



**HAL**  
open science

# Rôles du système à deux composants, Zra, et du transporteur ABC, Yhd, dans la réponse au stress chez les entérobactéries

Céline Borde

► **To cite this version:**

Céline Borde. Rôles du système à deux composants, Zra, et du transporteur ABC, Yhd, dans la réponse au stress chez les entérobactéries. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1191 . tel-04224308

**HAL Id: tel-04224308**

**<https://theses.hal.science/tel-04224308>**

Submitted on 2 Oct 2023

**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.



N°d'ordre NNT :  
2021LYSE1191

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED341**  
**Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation**

**Spécialité de doctorat** : Microbiologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 07/10/2021, par :  
**Céline Borde**

---

**Rôles du système à deux composants,  
Zra, et du transporteur ABC, Yhd, dans  
la réponse au stress chez les  
entérobactéries**

---

Devant le jury composé de :

LEMAIRE, Marc  
BETTON, Jean-Michel  
DELEPELAIRE, Philippe  
LALOUX, Géraldine  
JOURLIN, Cécile  
RODRIGUE, Agnès

Professeur Université Lyon1  
Directeur de Recherche CNRS Paris  
Directeur de Recherche CNRS Paris  
Professeure Université catholique de Louvain  
Maitre de Conférences Aix-Marseille université  
Maitre de Conférences INSA de lyon

Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Rapporteuse  
Examinatrice  
Maitre de thèse



# **Université Claude Bernard – LYON 1**

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

## **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI





## Remerciements

Ce manuscrit concrétise un travail de recherche de quatre années au sein du laboratoire Microbiologie, Adaptation et Pathogénie. Il a été accompagné par la contribution d'un certain nombre de personnes que je souhaite remercier.

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, Cécile JOURLIN, Jean-Michel BETTON, Philippe DELEPELAIRE, Marc LEMAIRE et Géraldine LALOUX ainsi que ma directrice de thèse Agnès RODRIGUE. Je tiens également à remercier les membres de mon comité de pilotage, Christian LESTERLIN, Ludovic VIAL, Eve DE ROSNY et Alexandre SOULARD. Vos conseils toujours bienveillants m'ont été précieux et m'ont aidé à diriger cette thèse.

Je suis particulièrement reconnaissante envers ma directrice de thèse, Agnès RODRIGUE, qui m'a accompagnée dans la réalisation de mes stages de master et de ma thèse. Elle a su allier ses obligations de maître de conférences avec ma thèse pour me consacrer le temps dont j'avais besoin. Je la remercie pour sa bienveillance, son soutien, son écoute, ses conseils ainsi que la confiance qu'elle m'a accordée.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude aux membres de mon équipe de recherche « Trafic et signalisation membranaires » : Michel DROUX, Géraldine EFFANTIN, Erwan GUEGUEN, Typhaine BRUAL, Agnès RODRIGUE, Kevin ROYET, Véronique UTZINGER, Julie BALTENNECK, Melvin RENAULT, Xavier NICOLAI, Bastien LE DEROUT, Vladimir SCHEVCHIK, Guy CONDEMIN, Nicole COTTE-PATTAT et Yvan RHABE.

En particulier, je remercie Michel DROUX de m'avoir transmis ses connaissances en biochimie et notamment sur l'HPLC. Je suis très reconnaissante pour son soutien, son sens de l'humour inébranlable et ses conseils avisés. Je remercie également Géraldine EFFANTIN pour son soutien technique lors des expériences, notamment en fin de thèse. Je remercie Erwan GUEGUEN de ses conseils en biologie moléculaire et de tout ce qu'il m'a appris. Pour leur assistance technique, je remercie Véronique UTZINGER et Marie-André LAVITAL. Enfin, un grand merci à Kevin ROME qui m'a transmis ce sujet et son expérience de thésard. J'ai, moi-même, eu la chance d'encadrer Maxence RAMBAUD, Katell BELEVAIRE et Corentin BONNET et je les remercie pour leur bonne humeur et leur implication.

L'avancement de ce travail a été rendu possible grâce à la collaboration avec des personnes dont l'expertise scientifique a été cruciale pour la qualité de cette étude. Pour leur accueil et leur support à l'animalerie, Je tiens à remercier Caroline ROMESTAING, Julie ULMANN, Angeline CLAIR et Laetitia AVERTY avec qui j'ai pu travailler dans la bonne humeur. Je tiens à remercier également Séverine BALMAND au sein du BF2i qui m'a transmis ses connaissances et son expertise pour préparer des échantillons jusqu'à les visualiser au microscope. Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Thierry MARCHAL ainsi que les membres de son équipe. Cette collaboration m'a permis d'avoir un avis d'un œil d'expert sur le traitement des lames d'histopathologie. Pour leur expertise en microscopie, je remercie Julie CAYRON et Christian LESTERLIN avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Au sein de la plateforme Protein Science Facility à l'IBCP, je remercie Virginie GUEGUEN-CHAIGNON avec qui j'ai eu de plaisir de travailler et de réaliser les expériences de FTSA.

La thèse n'est pas seulement une aventure professionnelle mais c'est également de belles rencontres. J'ai eu le plaisir de côtoyer et d'avoir le soutien au quotidien de nombreuses personnes que je ne vais malheureusement pas pouvoir toutes citer. Je vais tout d'abord remercier les membres de l'équipe « Signalisation et Mécanismes Adaptatifs chez les Levures » notamment Jade RAVENT, Alexandre SOULARD et Marc LEMAIRE pour leur convivialité, leurs conseils et nos discussions lors des repas. Je salue également Charlotte ORIOL avec qui j'ai partagé des très bons moments au laboratoire, que j'ai plaisir de revoir et avec qui j'espère repartir à l'aventure. Je salue mes compagnons de bureau passé, Petit Kevin, Grand Kevin et Jadou avec qui nous avons partagé de super moments qui resteront gravés dans ma mémoire. En effet, je n'oublierai pas de garder une hygiène de vie irréprochable, de manger des carottes et de faire de la via-ferrata. Je salue également mes compagnons de bureau présents Gégé, Julie, Amandine, Flo et Véro avec qui nous avons toujours des discussions intéressantes surtout quand il s'agit de chats. Je remercie Melvin RENAULT pour sa bonne humeur et ses blagues au quotidien ainsi que Typhaine BRUAL pour sa bonne humeur et les moments de détente du vendredi soir.

Enfin, les derniers mais pas les moindres, je souhaite remercier mes amis et ma famille en particulier mes parents qui m'ont toujours encouragés. Je remercie également mon copain de m'avoir soutenu et encouragé au cours de ces quatre années de thèse. À tous, je vous dis merci de votre soutien au quotidien !

## Résumé

Les entérobactéries peuvent être retrouvées dans différentes niches trophiques comme le sol ou le tube digestif d'un mammifère. Le passage d'un environnement à un autre peut aboutir à des conditions physico-chimiques défavorables ou une exposition à des antimicrobiens. Cela peut générer une altération de la membrane qui est directement en contact avec l'environnement. Afin de détecter les stress membranaires et y répondre, les bactéries possèdent des systèmes appelés ESR (Envelope Stress Response).

Dans ce travail de thèse, la résistance intrinsèque aux antimicrobiens a été étudiée notamment *via* l'étude un nouvel ESR, le système Zra. Ce système est composé d'un senseur, ZraS, d'un régulateur transcriptionnel, ZraR, et d'une protéine périplasmique, ZraP. Tous les éléments de ce système sont conservés chez certaines membres des familles des *Enterobacteriaceae*, des *Yersiniaceae* et des *Budviciaceae*. Chez *Escherichia coli* et *Citrobacter rodentium*, Zra est activé en présence du zinc mais il n'est pas impliqué dans l'homéostasie métallique. En revanche, Zra est impliqué dans la résistance intrinsèque aux antimicrobiens. Afin de comprendre le lien entre le système Zra et la résistance intrinsèque aux antimicrobiens, les gènes cible du régulateur ZraR ont été identifiés par CHIP-seq et leur expression confirmée par qRT-PCR. Suite à ces analyses, certains gènes ont été sélectionnés pour une étude approfondie de leur fonction. Un opéron, codant un transporteur ABC (ATP Binding Cassette), a été particulièrement étudié. Ce transporteur est conservé chez la majorité des membres de l'ordre des *Enterobacteriales*. Chez *E.coli*, il est impliqué dans la résistance à certains antibiotiques. Par ailleurs, il est important dans la pathogénie de *C. rodentium*.

Nos travaux ont permis d'identifier de nouveaux acteurs de la résistance intrinsèque aux antibiotiques et pourraient permettre de développer de molécules les ciblant afin de potentialiser l'effet des antibiotiques connus.

MOTS-CLÉS : ESR ; Antibiotimicrobien ; Réponse au stress ; Transporteur ABC ; Pathogénie ; *Escherichia coli* ; *Citrobacter rodentium*



## Summary

Enterobacteriaceae can be found in several trophic niches such as the soil or the mammalian digestive tract. The passage from one environment to another may result to disadvantaged physico-chemical conditions or to antimicrobial exposure. Directly in contact with the environment, the membrane can be damaged. In order to detect and respond to membrane stress, bacteria use systems called ESR (Envelope Stress Response).

In this PhD work, the intrinsic resistance to antimicrobials was studied in particular the role of a new ESR, the Zra system. This system is composed of a sensor, ZraS, a transcriptional regulator, ZraR, and a periplasmic protein, ZraP. All the elements of this system are conserved in some members of the *Enterobacteriaceae*, *Yersiniaceae* and *Budviciaceae* families. In *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium*, *zra* is activated in the presence of zinc but is not involved in metal homeostasis. In contrast, Zra is involved in intrinsic antimicrobial resistance. To understand the link between the Zra system and intrinsic antimicrobial resistance, ZraR target-genes were identified by ChIP-seq and their expression was confirmed by qRT-PCR. Following these analyses, some genes were selected for an in-depth study of their function. One transcriptional unit coding an ABC transporter (ATP Binding Cassette) has been specifically investigated. This transporter is conserved in most members of the order Enterobacteriales. In *E.coli*, Yhd was shown to be involved in the resistance to some antibiotics. In contrast, this system seems to have a completely different function in *C.rodentium* and was shown to be important for its pathogenicity.

Our research has identified new actors of intrinsic resistance to antibiotics and could allow the development of molecules targeting them in order to potentiate the effect of known antibiotics.

KEYWORDS : ESR ; antimicrobial ; Stress response ; ABC transposter ; Pathogenicity ; *Escherichia coli* ; *Citrobacter rodentium*



## Table des matières

<b>Première partie :</b> .....	<b>12</b>
<b>Introduction bibliographique</b> .....	<b>12</b>
<b>Chapitre I – Les entérobactéries : évolution de leur taxonomie, différents milieux de vie et les stress environnementaux</b> .....	<b>14</b>
1 – La taxonomie des entérobactéries .....	14
2 -Les différents habitats des entérobactéries.....	15
2.1 – Variétés de milieux de vie environnementaux .....	15
2.2 – Interaction avec un hôte .....	15
2.2.1 Relation commensale et de symbiose .....	15
2.2.2 Relation de parasitisme.....	16
2.2.2.1 Chez les plantes .....	16
2.2.2.2 Chez les humains et les animaux.....	18
3 - Stress rencontrés par les entérobactéries et les mécanismes qui leur permettent d’y faire face .....	19
3.1 - Définition du stress .....	19
3.2 - Les différents types de stress .....	20
3.2.1 – Exemples de variations de paramètres environnementaux .....	20
3.2.1.1 - Le stress thermique .....	20
3.2.1.2 – Le stress pH.....	20
3.1.1.3 - Le stress osmolaire .....	21
3.1.1.4 – Le stress lié à la disponibilité de nutriments .....	21
3.2.2 – Exemples de stress générés par des composés toxiques .....	21
3.2.2.1 – Le stress métallique .....	21
3.2.2.2 – Les stress antimicrobiens.....	22
4 – Les différents systèmes de réponse au stress .....	23
4.1 - Les facteurs sigma.....	23
4.2 - Les systèmes à deux composants .....	24
<b>Chapitre II – Les systèmes de réponse au stress de l’enveloppe chez les pathogènes.....</b>	<b>26</b>
1 – L’enveloppe, une cible de stress.....	26
1.1 – La structure de l’enveloppe chez les entérobactéries .....	26
1.2 – Les stress rencontrés par les pathogènes entériques et leur impact sur l’enveloppe .....	28
2 - Les systèmes de réponse au stress de l’enveloppe.....	31



2.1 – Le facteur sigmaE percevant le stress extracellulaire .....	31
2.1.1 – Le fonctionnement du système sigmaE .....	31
2.1.2 - Le régulon de sigmaE .....	32
2.2 - Le système Rcs .....	34
2.2.1 – Le fonctionnement du système Rcs .....	34
2.2.2 - Le régulon de Rcs .....	35
2.3 – Le système Cpx.....	37
2.3.1 – Le fonctionnement du système Cpx.....	37
2.3.2 - Le régulon de Cpx.....	38
2.4 – Le système Bae.....	40
2.5 – Le système Psp .....	40
2.6 – Cinq ESRs avec des régulons distincts et des fonctions complémentaires.....	42
3 – Rôle crucial des ESRs chez les pathogènes entériques.....	43
3.1.1 - <i>Escherichia coli</i> pathogènes.....	43
3.1.1.1 - Le système Rcs.....	43
3.1.1.2 – Le système SigmaE.....	44
3.1.1.3 – Le système Cpx .....	44
3.1.2 – <i>Citrobacter rodentium</i> .....	48
3.1.3 - <i>Proteus mirabilis</i> .....	49
3.1.3.1 - Le système SigmaE .....	49
3.1.3.2 - Le système Rcs .....	49
3.1.3.3 - Le système Cpx.....	49
3.1.4 – Autres Enterobacterales .....	51
<b>Chapitre III – Les transporteurs ABC : leurs structures et leurs fonctionnements .....</b>	<b>52</b>
1 – Topologie générale des transporteurs ABC.....	52
1.1 - Les trois classes de transporteurs ABC .....	54
1.2 – Les domaines de fixation de l'ATP (NBDs) .....	56
1.3 – Les domaines transmembranaires (TMDs) .....	58
1.4 – Les protéines de fixation du substrat (SBPs).....	60
2 – Les transporteurs ABC de <i>E.coli</i> .....	61
2.1 – Fonctionnement du transporteur MalFGK <sub>2</sub> -E.....	61
2.1 – Les différents transporteurs ABC de <i>E. coli</i> .....	61
<b>Objectifs de thèse .....</b>	<b>64</b>

1 – Le système à deux composants, ZraPSR .....	64
1.1 – Quelle est la fonction du système Zra chez <i>C. rodentium</i> ? ZraP est-elle impliquée dans la virulence ?.....	64
1.2 – Quels sont les gènes régulés par ZraR ?.....	65
2 – Quelle est la fonction du transporteur ABC, YhdWXYZ ? .....	66
<b>Deuxième Partie : .....</b>	<b>68</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>68</b>
<b>Chapitre IV - Matériels et méthodes.....</b>	<b>69</b>
1 - Méthodes microbiologiques.....	69
1.1 - Souches bactériennes et plasmides.....	69
1.2 - Composition des milieux de culture .....	69
1.2.1 - Milieu riche LB.....	69
1.2.2 - Milieu minimum M63.....	69
1.2.3 - Milieu MacConkey Sorbitol .....	69
1.3 - Préparation des milieux .....	69
1.4 - Conditions de culture et conservation des souches bactériennes .....	72
1.5 - Détermination de seuil de toxicité des métaux pour différentes souches bactériennes .....	72
1.6 - Dénombrement après stress biocide sur milieu solide .....	73
1.7 - Test de perméabilité de l'enveloppe LIVE/DEAD .....	73
1.6 - Test de mobilité .....	74
1.7 - Transduction généralisée avec le phage P1.....	74
1.8 - Test d'infection de souris par <i>C. rodentium</i> .....	75
1.8.1 - Préparation de l'inoculum bactérien .....	75
1.8.2 - Infection des souris par gavage oral .....	75
1.8.3 - Suivi quotidien du poids des souris et de la prolifération bactérienne .....	75
1.8.4 - Evaluation de l'état microscopique des colons.....	75
1.8.4.1 - Préparation et coloration des coupes .....	75
1.8.4.2 - Elaboration du score de pathogénie .....	76
1.9 – Test d'infection d'endives par <i>D. dadantii</i> .....	76
2 - Méthodes génétiques et de biologie moléculaire .....	77
2.1 - Extraction d'ADN génomique et plasmidique .....	77
2.2 - Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	77
2.3 - Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose .....	77

2.4 - Clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur par la technique de Sequence- and ligation-independent cloning (SLIC).....	78
2.4.1 - Digestion du vecteur par des endonucléases de restriction.....	78
2.4.2 - Purification de l'insert.....	78
2.4.3 - Clonage.....	78
2.5 - Transformation par de l'ADN plasmidique.....	78
2.5.1 - Transformation par la technique du TSS.....	78
2.5.2 - Transformation par électroporation.....	79
2.6 - Construction de souches mutantes.....	79
2.6.1 - Chez le modèle <i>E. coli</i> .....	79
2.6.2 - Chez le modèle <i>C. rodentium</i> .....	80
2.6.3 - Excision de la cassette de résistance à un antibiotique.....	80
2.6.4 - Chez le modèle <i>Dickeya</i> .....	80
2.7 - Mesure de l'activité d'un promoteur par la technique du gène rapporteur.....	81
2.8 - RT-qPCR.....	82
2.8.1 - Extraction d'ARNs totaux.....	82
2.8.2 - Rétrotranscription.....	83
2.8.3 - PCR quantitative en temps réel.....	83
2.9 – Evaluation du niveau d'enroulement de l'ADN par migration sur gel de chloroquine.....	84
3 - Méthodes biochimiques.....	84
3.1 - Purification de la protéine YhdW.....	84
3.1.1 - Surproduction.....	84
3.1.2 - Récupération de la fraction périplasmique.....	85
3.1.3 - Purification sur colonne d'affinité à Nickel.....	85
3.2 - Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	85
3.3 - Electrophorèse dénaturante des protéines sur gel SDS-PAGE.....	85
3.4 - Immunodétection.....	86
3.5 – Fluorescence-based Thermal Shift Assay.....	86
3.5.1 - Principe de la technique.....	86
3.5.2 - Méthode.....	87
3.6 - Dosage colorimétrique de l'indole.....	88
3.7 – Dosage de la loméfloxacin intracellulaire par HPLC.....	89
3.7.2.1 – Préparation des échantillons.....	89

3.7.2.2 – Fluorescence de la loméfloxacin	89
3.7.2.2 – Condition d'utilisation de l'HPLC	90
<b>Troisième Partie :</b>	<b>92</b>
<b>Résultats</b>	<b>92</b>
<b>Chapitre V – La conservation du système ZraPSR chez les entérobactéries et son fonctionnement chez <i>C. rodentium</i></b>	<b>93</b>
1 – Introduction	93
2 – Etude de la conservation du système au sein des entérobactéries	93
3 – Le système ZraPSR chez <i>E. coli</i> et <i>C. rodentium</i>	97
3.1 – Régulation du système ZraPSR	98
3.1.1 – Activité des promoteurs du système Zra chez <i>Citrobacter rodentium</i>	98
3.1.1 – Activité des promoteurs du système Zra de <i>E. coli</i> et <i>C. rodentium</i> chez <i>E. coli</i>	100
3.1.2 – Quantification de ZraR par western blot	102
3.2 – Analyses phénotypiques	103
3.2.1 – Le système ZraPSR n'est pas impliqué dans l'homéostasie métallique	103
3.2.2 – Le système ZraPSR est impliqué dans la survie en présence d'antibiotiques	103
3.2.3 – La protéine ZraP n'est pas impliquée dans la pathogénie/virulence de <i>C. rodentium</i>	104
4 - Conclusion	107
<b>Chapitre VI – Identification des cibles du régulateur ZraR et de nouveaux acteurs de la réponse au stress</b>	<b>108</b>
1 – Avant-propos	108
2 – Identification des cibles par CHIP-seq et validation par qRT-PCR	109
3 – Identification d'un problème chez la souche $\Delta zraR$	124
4. Erratum : Validation des cibles de ZraR	125
4.1 - Nouvelles analyses RT-qPCR	125
4.2 - Analyses phénotypiques	127
4.2.1 – Le système ZraR n'est pas impliqué dans la production d'indole	127
4.2.2 – Le système ZraR n'est pas impliqué dans la motilité de type swimming	128
4.2.3 – Le système ZraR régule des gènes impliqués dans l'export de la loméfloxacin	130
4.2.4 – Rôle de YrdD et YjjY dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques	131
4.2.4.1 - Implication de YrdD dans la réponse aux antibiotiques	131
4.2.4.2 - Etude préliminaire de la fonction de YrdD	132

4.2.4.3 - Etude de l'implication de YjjY dans la réponse aux antibiotiques .....	134
5 – Conclusion.....	136
<b>Chapitre VII – Etude du transporteur Yhd chez trois entérobactéries .....</b>	<b>137</b>
1 – Introduction .....	137
2 – Distribution de Yhd chez les entérobactéries.....	138
3 – Fonction du transporteur Yhd chez trois entérobactéries : <i>E. coli</i> W3110, <i>D. dadantii</i> 3937 et <i>C. rodentium</i> DSB100.....	140
3.1 – Quel est le rôle du transporteur Yhd chez un organisme non pathogène, <i>E. coli</i> K12 ? .....	142
3.1.1 - L'expression de l'opéron <i>yhd</i> est régulée par ZraR.....	142
3.1.2 – L'expression de l'opéron <i>yhd</i> est régulée par $\sigma^{54}$ .....	143
3.1.2 – YhdW est-elle produite ? Et sous quelle forme ?.....	143
3.1.3 - Le système Yhd est impliqué dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques .....	146
3.2 – Quel est le rôle du transporteur Yhd chez le pathogène murin, <i>Citrobacter rodentium</i> ?.....	148
3.2.1 – Quelle est la fonction du transporteur Yhd ?.....	148
3.2.1.1 – Quel est le ligand de la protéine YhdW ? .....	148
3.2.1.1.1 – Production et purification de YhdW couplée à un TAG histidine .....	148
3.2.1.1.2 – Identification du ligand à l'aide du Fluorescence Thermal Shift Assay .....	151
3.2.1.1.3 – Test de croissance avec de l'asparagine comme seule source de carbone .....	151
3.2.2 – Analyse de l'activité des promoteurs du système Yhd chez <i>C. rodentium</i> .....	154
3.2.2.1 – L'expression du système Yhd chez <i>C. rodentium</i> n'est pas régulée par ZraR .....	154
3.2.2.2 – L'expression du système Yhd chez <i>C. rodentium</i> est induite en milieu minimum, plus fortement en présence d'asparagine .....	155
3.2.2.3 – L'expression du système Yhd n'est pas induite en anaérobie .....	156
3.2.3 – Le système YhdWXYZ participe à la pathogénie de <i>C. rodentium</i> .....	158
3.3 – Le transporteur Yhd n'est pas impliqué dans la virulence du phytopathogène <i>D. dadantii</i> .....	163
4 – Conclusion.....	164
<b>Quatrième partie : .....</b>	<b>166</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>166</b>
<b>Chapitre VIII – Discussion et perspectives.....</b>	<b>167</b>

1 - Le système Zra, un système de réponse au stress .....	167
1.1 – Conservation du système Zra chez les entérobactéries pathogènes .....	167
1.2 – Quelle est la fonction du système Zra ?.....	168
1.2.1 – Le système Zra est activé par les métaux mais n'est pas impliqué dans l'homéostasie métallique .....	168
1.2.2 – Le système Zra est impliqué dans la résistance aux antimicrobiens .....	168
1.2.3 – Le système ZraSR est impliqué dans la pathogénie de <i>C. rodentium</i> mais pas ZraP .....	169
1.3 – Quels sont les gènes régulés par le système Zra ? .....	170
2 – Le transporteur Yhd, deux architectures pour deux fonctions .....	173
2.1 – Chez <i>E. coli</i> , Yhd est impliqué dans la résistance aux antimicrobiens .....	173
2.2 – Chez <i>C. rodentium</i> , Yhd transporte les acides aminés.....	173
2.3 – Yhd est impliqué dans la virulence de <i>Citrobacter rodentium</i> .....	174
<b>Bibliographie .....</b>	<b>177</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>201</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales entérobactéries associées à des maladies de plantes.....	17
Tableau 2 : Sept facteurs sigma chez <i>E.coli</i> .....	24
Tableau 3 : Exemples de stress de l'enveloppe et leur effet.....	30
Tableau 4 : Classification des SBPs.....	60
Tableau 5 : Souches bactériennes utilisées pour cette étude.....	70
Tableau 6 : Plasmides utilisés pour cette étude.....	71
Tableau 7 : Cycle d'amplification de qRT-PCR.....	84
Tableau 8 : Expression des unités transcriptionnelles entre la souche WT et <i>DzraR</i> déterminée par RT-qPCR.....	126

## Liste des figures

Figure 1 : Schématisation de la taxonomie des entérobactéries.....	13
Figure 2 : Exemples des infections majeures causées par les membres de l'ordre des Enterobacterales.....	19
Figure 3 : Régulation de l'initiation de la transcription en réponse à un stress via un facteur sigma ou un système à deux composants.....	25
Figure 4 : Représentation de la structure de l'enveloppe des entérobactéries.....	27
Figure 5 : Les stress des pathogènes gastriques lors de l'infection.....	30
Figure 6 : Représentation schématique du fonctionnement du système sigmaE.....	33
Figure 7 : Représentation schématique du fonctionnement du système Rcs.....	36
Figure 8 : Représentation schématique du fonctionnement du système Cpx.....	39
Figure 9 : Représentation schématique du fonctionnement des système Bae et Psp.....	41
Figure 10 : Diagramme de Venn des gènes effecteurs des cinq ESRs.....	42
Figure 11 : Schématisation des nouvelles connaissances concernant la régulation de la survie et la virulence par les SigmaE, Cpx et Rcs chez les <i>E. coli</i> pathogènes.....	47
Figure 12 : Schématisation des nouvelles connaissances concernant la régulation de la survie et la virulence par SigmaE, Cpx et Rcs chez <i>Proteus mirabilis</i> .....	50
Figure 13 : Topologie générale des transporteurs ABC exportateurs et importateurs.....	53
Figure 14 : Arbre phylogénétique simplifié des transporteurs ABC du vivant.....	55
Figure 15 : Représentation schématique des NBDs et des différents motifs conservés.....	57
Figure 16 : Classification des transporteurs ABC selon le repliement de leur TMD.....	59
Figure 17 : Fonctionnement de l'importation du maltose par le transporteur ABC, MalEFGK <sub>2</sub> .....	62
Figure 18 : Les transporteurs ABC chez <i>E. coli</i> K12.....	63
Figure 19 : Caractérisation du système Zra chez <i>E. coli</i> et <i>C. rodentium</i> .....	65
Figure 20 : Caractérisation du système Yhd chez <i>E. coli</i> , <i>C. rodentium</i> et <i>D. dadantii</i> .....	67
Figure 21 : Représentation schématique du principe de la coloration Live/dead (SYTO9®/Iodure de propidium).....	74
Figure 22 : Principe de l'opéron luxCDABE comme système rapporteur.....	81
Figure 23 : Principe du Fluorescence-based thermal shift assay.....	87

Figure 24 : Principe de la méthode de dosage colorimétrique de l'indole extracellulaire à l'aide du réactif de Kovacs .....	88
Figure 25 : Structure et caractéristiques de fluorescence de la loméfloxacin.....	89
Figure 26 : Chromatogramme pour la détection par fluorescence en HPLC de 5ng de loméfloxacin .....	91
Figure 27 : Courbe standard pour la loméfloxacin.....	91
Figure 28 : Présence des éléments du système Zra dans l'ordre des Enterobacteriales.....	95
Figure 29 : Présence des éléments du système Zra dans la famille des Enterobacteriaceae	96
Figure 30 : Comparaison du système ZraPSR chez E. coli et C. rodentium au niveau génétique et protéique.....	97
Figure 31 : Profil d'expression des promoteurs zraSR et zraP chez Citrobacter rodentium ...	99
Figure 32 : Profil d'induction des promoteurs de zraS et zraP de E.coli et C.rodentium chez E. coli W3110 WT, $\Delta$ zraR et $\Delta$ zraP.....	101
Figure 33 : Quantification relative de ZraR en condition LB supplémenté en zinc chez E. coli et C. rodentium par Western-Blot Anti-ZraR .....	102
Figure 34 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de zinc et de cuivre pour la bactérie Citrobacter rodentium en milieu riche .....	103
Figure 35 : Pourcentages de survie de C. rodentium WT, $\Delta$ zraR et $\Delta$ zraP en présence de différents antibiotiques.....	104
Figure 36 : Impact de la délétion de zraP sur la pathogénie de C. rodentium .....	106
Figure 37 : Alignement des séquençages du gène tnaB de WT W3110 et $\Delta$ zraR W3110 .....	125
Figure 38 : Effet de la mutation de zraR sur la production d'indole .....	128
Figure 39 : Etude de l'impact de la délétion de zraR sur la motilité et l'activité du promoteur du gène fliA.....	129
Figure 40 : Quantification de l'accumulation de la loméfloxacin à l'intérieur de la cellule.	130
Figure 41 : Impact de la délétion de yrdD sur la survie en présence d'antibiotiques .....	132
Figure 42 : Effet d'un stress oxydant sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d'E. coli W3110.....	133
Figure 43 : Effet de la mutation du gène yrdD sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidiques extrait de la souche sauvage et mutante $\Delta$ yrdD d'E. coli W3110.....	134
Figure 44 : Etude de l'impact de la délétion du gène yjyJ la survie en présence de loméfloxacin .....	135
Figure 45 : Schématisation de l'organisation de l'opéron yhd et du transporteur Yhd .....	138
Figure 46 : Arbre phylogénétique de l'ATPase, YhdZ, et présence des autres éléments du transporteur chez les entérobactéries.....	139
Figure 47 : Comparaison du transporteur Yhd entre E. coli, C. rodentium et D.dadantii au niveau génétique et protéique.....	140
Figure 48 : Prédiction de la topologie transmembranaires des domaines TMDs du transporteur Yhd avec le logiciel TMHMM 2.0.....	141
Figure 49 : Profil d'induction de la fusion yhdW ::lux et yhdX ::lux de E. coli.....	142
Figure 50 : Influence de la délétion de rpoN sur l'expression de yhdW et yhdX.....	143
Figure 51 : Test de surproduction de YhdW avec un TAG histidine.....	144
Figure 52 : Transcription et traduction du gène yhdW chez E. coli K12 W3110.....	145



Figure 53 : Pourcentages de survie de E.coli WT et $\Delta$ yhdWXYZ en présence de différents antibiotiques .....	146
Figure 54 : Quantification de la loméfloxacin à l'intérieur de la cellule .....	147
Figure 55 : Prédiction de la présence d'un peptide signal dans la protéine YhdW, avec SignalP-5.0.....	149
Figure 56 : Production et purification de YhdW avec le TAG histidine .....	150
Figure 57 : Etude de l'interaction de YhdW avec les acides aminés par fluorescent thermal shift assay .....	152
Figure 58 : Test de compétition entre la souche $\Delta$ yhdWXYZ et la souche sauvage .....	153
Figure 59 : Obtention d'un mutant auxotrophe et test de compétition .....	153
Figure 60 : Profil d'activité des promoteurs de yhdW et yhdX chez la souche sauvage de C. rodentium et le mutant $\Delta$ zraR .....	154
Figure 61 : Profil d'activité des promoteurs de yhdW et yhdX chez la souche sauvage .....	155
Figure 62 : Profil d'activité des promoteurs de yhdW et yhdX chez la souche sauvage en aérobiose et en anaérobiose.....	157
Figure 63 : Impact de la délétion de yhdW et yhdWXYZ sur la pathogénie de C. rodentium au jour 14 .....	159
Figure 64: Impact de la délétion de yhdW et yhdWXYZ sur la pathogénie de C. rodentium au Jour 7 et 11-14.....	161
Figure 65 : Photographies des coupes de colon de souris infectées ou non infectées .....	162
Figure 66 : Test d'infection d'endives par les souches D. dadantii WT et $\Delta$ yhdWXYZ.....	163
Figure 67 : Schématisation du fonctionnement du système ZraPSR .....	172
Figure 68 : Hypothèses du fonctionnement du transporteur Yhd chez E. coli et C. rodentium .....	176

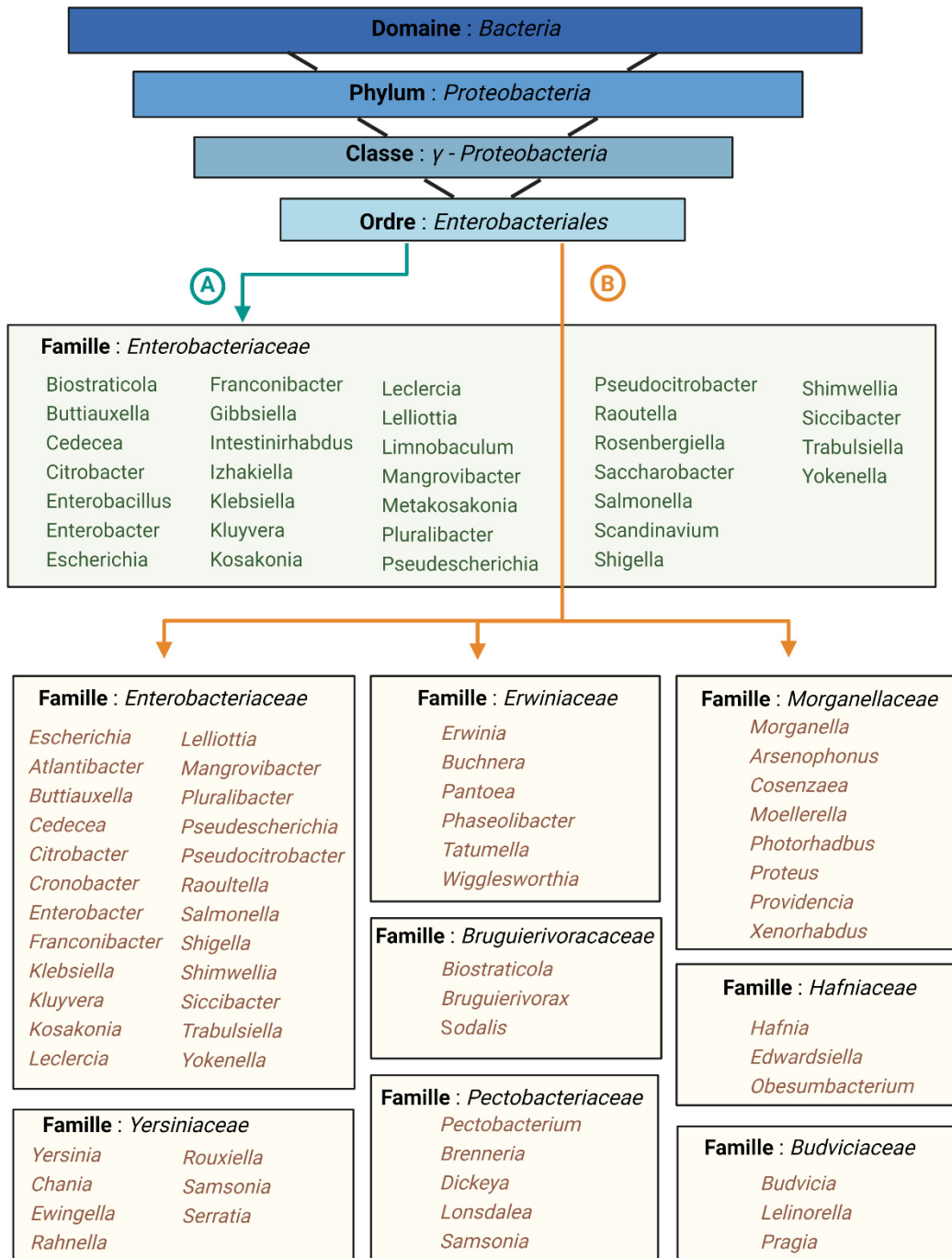
## Liste des symboles et des abréviations

ABC	ATP binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATC	Anhydrotétracycline
Asn	Asparagine
ChIP-seq	Chromatin immunoprecipitation sequencing
Cu	Cuivre
Cys	Cystéine
ESR	Envelope stress response
HK	Histidine Kinase
LPS	lipopolysaccharide
ME	Membrane externe
MI	Membrane interne
NBD	Nucleotide binding domain
OMP	Outer membran protein
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
SLIC	Sequence- and ligation-independent cloning
TCS	Two-component system
TMD	Transmembrane domain
TSA	Thermal shift assay
TSS	Transformation and storage solution
Zn	Zinc
Zra	Zinc resistance-associated

---

Première partie :  
Introduction bibliographique

---



**Figure 1** : Schématisation de la taxonomie des entérobactéries

Les entérobactéries font partie du domaine des bactéries, du phylum des protéobactéries, de la classe des gamma-protéobactéries et de l'ordre des Enterobacteriales. Jusqu'à récemment cet ordre était divisé en une seule famille, les Enterobacteriaceae (A). En 2016, une division de l'ordre des Enterobacteriales en 7 familles a été proposée par (Adeolu et al., s. d.) : Enterobacteriaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Budviciaceae, Morganellaceae, Hafniaceae et Erwiniaceae. Puis, en 2021, une huitième famille nommée Bruguierivoraceae a été proposée par (M. Li et al. 2021) (B). Cette figure a été adaptée à partir des publications de (J. Janda et Abbott 2021), (Adeolu et al., s. d.) et (Faner et al. 2017).

---

## Chapitre I – Les entérobactéries : évolution de leur taxonomie, différents milieux de vie et les stress environnementaux

---

### 1 – La taxonomie des entérobactéries

Au 18<sup>ième</sup> siècle, Carl von Linné posa les bases de la taxonomie (Linné 1788). À partir de cette période, la taxonomie n'a cessé d'évoluer et a permis d'identifier, nommer, inventorier et classer les organismes vivants. Ainsi un organisme vivant fait partie d'un domaine, d'un règne, d'un embranchement, d'une classe et d'une famille. Cette classification a tout d'abord été mise au point sur des critères physiques ou biochimiques de ressemblance entre certaines espèces. Mais elle a évolué au 20<sup>ième</sup> siècle grâce à la découverte de la structure de l'ADN et du développement du séquençage des acides nucléiques. L'analyse d'alignement et de comparaison de séquence a permis de construire des arbres phylogénétiques représentant l'histoire évolutive d'une espèce et ses relations de parenté.

À la fin du 17<sup>ième</sup> siècle, Antoine van Leeuwenhoek fut le premier à observer des micro-organismes dont des bactéries (Porter 1976). Les bactéries correspondent à un des 3 grands domaines du vivant en plus de ceux des eucaryotes et des archées. La taxonomie moderne des bactéries est née le 1<sup>er</sup> janvier 1980 avec la publication de la liste de noms bactériens approuvés (SKERMAN, McGOWAN, et SNEATH, s. d.). Elle implique l'identification, la nomenclature et la classification des bactéries. Parmi les différentes bactéries, nous allons nous intéresser aux entérobactéries. Ce sont des bactéries à Gram négatif qui correspondent à l'ordre des *Enterobacteriales*. Jusqu'à récemment, cet ordre comportait une seule famille, les *Enterobacteriaceae* (Octavia et Lan 2014). Bien que des groupements distincts de genres bactériens au sein de cette famille étaient déjà connus, ces groupements n'étaient jusqu'à récemment pas admis comme des groupes taxonomiques uniques (Octavia et Lan 2014; Young et Park 2007). Le faible pouvoir discriminatoire de la phylogénie basée sur le gène de l'ARN 16S ou sur un seul gène ne permettait pas de résoudre les interrelations des membres de l'ordre des *Enterobacteriales*.

Pour augmenter le pouvoir discriminatoire, l'analyse de séquences de plusieurs loci (MLSA, pour Multi-Locus Sequence Analysis) a été développée. Cette technique permet d'analyser simultanément le polymorphisme d'un grand nombre de gènes ou de protéines. Elles ont permis à Adeolu *et al*, en 2016, de proposer un nouveau cadre taxonomique. Ils ont réalisé des analyses phylogénétiques sur 179 membres de l'ordre des *enterobacteriales* basés sur 1548 protéines essentielles, sur 53 protéines ribosomales et sur 4 protéines spécialement adaptées à la MLSA. Ces trois arbres phylogénétiques ont permis de proposer une division de l'ordre des *Enterobacteriales* en 7 familles : *Enterobacteriaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Budviciaceae*, *Morganellaceae*, *Hafniaceae* et *Erwiniaceae* (Figure 1) (Adeolu *et al.*, s. d.). En 2021, Li *et al* propose une huitième famille portant le nom de *Bruguierivoraceae* incluant les genres *Bruguierivorax*, *Biostraticola* et *Sodalis* (M. Li *et al.* 2021).

## 2 -Les différents habitats des entérobactéries

Les membres de l'ordre des *Enterobacteriales* ont été détectés dans de nombreuses niches écologiques et de nombreux environnements. Les entérobactéries sont principalement retrouvées dans l'environnement ou hébergées par un hôte.

### 2.1 – Variétés de milieux de vie environnementaux

Au niveau de l'environnement, les entérobactéries sont retrouvées dans des habitats aquatiques tels que les eaux douces, les sources thermales et les sources marines ou salines (J. M. Janda et Abbott 2006; Farmer, Farmer, et Holmes 2010). Elles sont également présentes dans le sol.

Néanmoins, les différents habitats des entérobactéries ne sont pas compartimentés mais au contraire en interrelation entre eux. Par exemple, *Escherichia coli* O157:H7 peut être retrouvée dans une variété d'environnement comme l'eau, la nourriture, le sol, les bovins et les humains (Bach et al. 2011).

### 2.2 – Interaction avec un hôte

De nombreuses entérobactéries peuvent interagir avec différents types d'hôtes allant des plantes aux animaux en passant par les insectes. Ces relations peuvent être de différentes natures comme le commensalisme, la symbiose ou le parasitisme.

#### 2.2.1 Relation commensale et de symbiose

Le terme commensalisme est employé lorsque la relation est bénéfique pour la bactérie et neutre pour l'hôte alors que le terme symbiose est employé dans le cas où le bénéfique est réciproque pour les deux organismes.

Certaines entérobactéries sont retrouvées dans le tube digestif des animaux comme *Escherichia coli* ou de manière moins marquée *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Providencia* et *Enterobacter*. Bien qu'elle représente 0.1% du microbiote, *Escherichia coli* est la bactérie commensale la plus prédominante de la flore intestinale aérobie. Elle est retrouvée dans le système digestif de 60 à 80% des humains (Y.-D. Gao, Zhao, et Huang 2014). Son effet bénéfique pour l'hôte reste très nuancé. Certaines publications montrent qu'elle permettrait de prévenir la colonisation et l'attachement des pathogènes (Sassone-Corsi et Raffatellu 2015; Momose, Hirayama, et Itoh 2008) alors que d'autres études ont montré que la présence de protéobactéries était un signe de dysbiose (Litvak et al. 2017; Shin, Whon, et Bae 2015).

De nombreuses entérobactéries ont un rôle prépondérant dans le microbiote des insectes. Par exemple, *Burkholderia* sp est présente chez l'insecte *Riptortus clavatus* et lui permettrait de dégrader les toxines (Engel et Moran 2013). L'un des exemples le plus connu de symbiose entre une bactérie et un insecte est celui du genre *Buchnera* avec le puceron.

Cette symbiose est qualifiée d'obligatoire et les deux organismes ne peuvent pas vivre l'un sans l'autre. *Buchnera aphidicola* a un génome très réduit, mais les gènes permettant la coexistence avec son hôte ont été conservés comme ceux des voies métaboliques d'acides

aminés essentiels et de vitamines qui sont rares dans le régime de la sève du phloème (Poliakov et al. 2011).

### 2.2.2 Relation de parasitisme

Lorsqu'un organisme tire un bénéfice de l'interaction avec son hôte au détriment de celui-ci, le terme parasitisme est employé. Les membres de l'ordre *Enterobacteriales* peuvent avoir des interactions parasitaires avec différents hôtes allant de la plante aux mammifères.

#### 2.2.2.1 Chez les plantes

Parmi les *Enterobacteriales*, six genres possèdent un pouvoir pathogène sur végétaux. Il s'agit de *Brenneria*, *Dickeya*, *Erwinia*, *Lonsdalea*, *Pantoea* et *Pectobacterium* (Tableau 1). Leur pouvoir pathogènes touche différents produits de l'agriculture, les fleurs ornementales ou les arbres. Il existe 4 types de maladies ou infection : nécrose rapide (I), macération progressive des tissus (aussi appelé la pourriture molle) (II), occlusion des vaisseaux vasculaires (III) et hypertrophie conduisant à la formation d'une galle, d'une tumeur ou d'un chancre (IV).

Une maladie végétale qui a reçu une attention particulière est la pourriture molle. Cette maladie affecte les champs ou les stockages de légumes et de plantes ornementales. Ces infections sont principalement associées aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya*. Ces deux genres produisent de nombreuses enzymes extracellulaires, comme les pectinases, qui dégradent notamment la pectine contenue dans la paroi cellulaire des plantes, ce qui conduit à la pourriture humide des organes de stockage tels que les tubercules et les bulbes. Les données du début des années 1980 indiquent qu'à cette époque, les pertes économiques dues à la pourriture molle se situaient entre 50 et 100 millions de dollars par an (Motyka et al. 2017).

La pourriture molle peut également se traduire par la maladie de la jambe noire chez la pomme de terre. Dans sa forme la plus grave, les tiges deviennent foncées et se décomposent. Une étude suggère que *Dickeya* seul peut être responsable d'une réduction de 20 à 25 % du rendement des pommes de terre (Motyka et al. 2017).

D'autre part, le feu bactérien est une maladie nécrogène dévastatrice des arbres fruitiers à pépins, en particulier les poires et les pommes. L'agent étiologique est *Erwinia amylovora*.

Les arbres peuvent être sévèrement affectés par les genres *Brenneria*, et *Gibsiella*. Les arbres sévèrement affectés peuvent mourir en 4 à 5 ans. *Pantoea agglomerans* et *Pantoea ananatis* provoquent une variété de maladies dans les fruits, les légumes et les céréales.

Tableau 1 : Les principales entérobactéries associées à des maladies de plantes

Famille	Genre	Espèce	Hôtes	Type d'infection <sup>a</sup>
<i>Pectobacteriaceae</i>	<i>Brenneria</i>	<i>alni, nigrifluens, populi, roseae, rubrifasciens, salicis</i>	Aulne ( <i>Alnus spp.</i> ), chêne ( <i>Quercus robur, Quercus petraea</i> ), noyer ( <i>Juglans regia</i> ), peuplier ( <i>Populus euramericana</i> ), saule ( <i>Salix spp.</i> )	1, 3
	<i>Dickeya</i>	<i>chrysanthemi, dadantii, dianthicola, paradisiaca, solani, zea</i>	Banane ( <i>Musa spp.</i> ), chrysanthème ( <i>Chrysanthemum spp.</i> ), maïs ( <i>Zea mays</i> ), orchidée ( <i>Vanda spp.</i> ), pomme de terre ( <i>Solanum tuberosum</i> ), riz ( <i>Oryza sativa</i> ), violette africaine ( <i>Saintpaulia ionantha</i> ),	1, 2, 3
	<i>Lonsdalea</i>	<i>quercina</i>	Chêne cotier ( <i>Quercus agrifolia</i> )	2
	<i>Pectobacterium</i>	<i>atrosepticum, carotovorum</i>	Violette africaine ( <i>Saintpaulia ionantha</i> ), concombre ( <i>cucumis sativus</i> ), laitue ( <i>lactuca sativa</i> ), okra ( <i>Abelmoschus esculentus</i> ), pomme de terre ( <i>Solanum tuberosum</i> ), betterave sucrière ( <i>Beta vulgaris</i> ), pastèque ( <i>Citrellus lanatus</i> )	2
<i>Erwiniaceae</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>amylovora, mallotivora, tracheiphila</i>	Concombre ( <i>cucumis sativus</i> ), Papaye ( <i>Carica papaya</i> ), Pomme ( <i>Malus domestica</i> ), Pêche ( <i>Pyrus communis</i> ), autres fruits	1, 3
	<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans, ananatis, stewartii</i>	Cotton ( <i>Gossypium hirsutum</i> ), eucalyptus, Maïs ( <i>Zea mays</i> ), oignon ( <i>Allium cepa</i> ), Riz ( <i>Oryza sativa</i> )	1, 2, 3, 4

(A) Types d'infection : 1 : nécrose, 2 : macération, 3 : occlusion des vaisseaux vasculaires, 4 : formation de galle ou tumeur

Ce tableau a été adapté de celui de (J. Janda et Abbott 2021).



### 2.2.2.2 Chez les humains et les animaux

Parmi les entérobactéries pathogènes de l'Homme, deux types de bactéries se distinguent. Certaines entérobactéries sont toujours associées à des pathologies humaines (comme *Yersinia pestis*, *Salmonella serovar typhi*, *Yersini sp.*) alors que d'autres font partie de la flore commensale et peuvent causer des infections opportunistes (comme *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*).

Dès 1985, *Escherichia coli-Shigella*, *Salmonella*, et *Yersinia enterocolitica* étaient universellement reconnus comme des pathogènes gastro-intestinaux. Cependant, cette liste s'est étoffée et plus de 40 pathogènes différents ont été reconnus comme des agents étiologiques définitifs ou probables de troubles gastro-intestinaux (J. M. Janda et Abbott 2011). Parmi ces 40 agents pathogènes liés à des troubles digestifs, plus de 50 % sont dans l'ordre des *Enterobacteriales* (J. M. Janda et Abbott 2011). Les entérobactéries majoritairement responsables d'infections gastro-intestinales sont *Salmonella*, *Shigella* et *Escherichia coli*. Même si de nombreuses entérobactéries pathogènes sont responsables d'infection intestinale, leur pouvoir pathogène ne se limite pas au tractus digestif (Figure 2). En effet, au niveau du système sanguin, elles sont également responsables de 1/4 à 1/3 des bactériémies qui peuvent se compliquer en septicémie ou en méningite. De plus, les entérobactéries sont responsables de 70% des infections urinaires (Murray, Rosenthal, et Pfaller 2020) et elles ont également été identifiées dans des cas de calcul rénal ou d'infection de la prostate. Par ailleurs, au niveau du tractus respiratoire, les entérobactéries ont été mises en évidence dans des pneumonies, des bronchites ou des empyèmes (infection de la cavité pleurale). Enfin, certaines entérobactéries comme *E. coli* ont été identifiées comme responsables de péritonite (infection du péritoine).

Les entérobactéries sont impliquées dans de nombreux types d'infection. Mais certaines entérobactéries sont également responsables de maladies spécifiques comme la peste causée par *Yersinia pestis* ou la fièvre typhoïde causée par *Salmonella typhi*.

De la même façon, chez les animaux, les entérobactéries peuvent faire partie du microbiote mais également peuvent causer des maladies animales. En effet, de nombreux membres de l'ordre produisent des infections intestinales ou extra-intestinales sporadiques ou épisodiques chez de nombreux hôtes ((J. M. Janda et Abbott 2006; D. J. Brenner et Farmer 2015). De nouvelles associations agent-maladie sont régulièrement décrites, comme *Morganella morganii* qui provoque des infections mortelles chez les poulets (C. Zhao et al. 2012) et le *K. pneumoniae* hypermucoïde causant une septicémie et une méningite chez les petits d'otaries. Certains syndromes infectieux ont une gamme d'hôtes très spécifique comme *Citrobacter rodentium* qui est pathogène uniquement pour la souris. (Hyperplasie colique murine). Au contraire, d'autres syndromes infectieux peuvent être causés par une variété importante d'entérobactéries. Par exemple, la mammite bovine est causée par de nombreux pathogènes dont *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella spp.* et *Enterobacter aerogenes* (Olivares-Pérez et al. 2015).

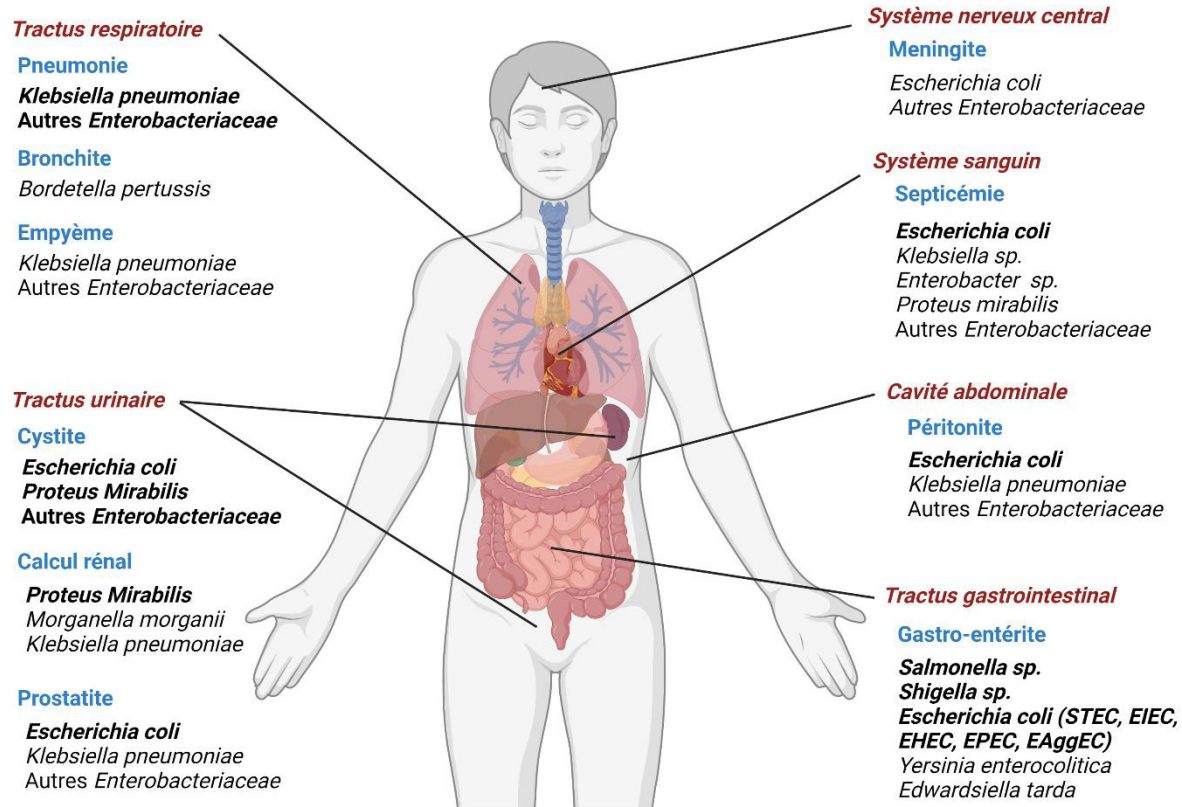


Figure 2 : Exemples des infections majeures causées par les membres de l'ordre des Enterobacteriales

Les différents compartiments anatomiques sont présentés en rouge et les infections correspondantes en bleu. Les bactéries responsables de ces infections sont notées ci-dessus. Les bactéries les plus importantes dans ces infections sont écrites en gras. Cette illustration a été adaptée à partir du livre de Murray et al (Murray, Rosenthal, et Pfaller 2020).

### 3 - Stress rencontrés par les entérobactéries et les mécanismes qui leur permettent d'y faire face

#### 3.1 - Définition du stress

Les bactéries sont capables de s'adapter à une multitude d'environnements différents. Néanmoins dans ces environnements, elles peuvent être confrontées à des stress. Un stress peut être causé par un facteur externe physique, chimique ou biologique qui a un effet négatif sur le métabolisme bactérien (CARLIER 1997; M. A. S. McMahon et al. 2007). Il peut entraîner un retard de croissance ou, dans certains cas, l'inhibition ou la mort des bactéries.

La bactérie utilise des mécanismes de régulation permettant de stabiliser les conditions physico-chimiques du milieu intracellulaire en réponse aux fluctuations environnementales. Cette stabilisation sera qualifiée d'homéostasie.

## 3.2 - Les différents types de stress

Dans les différents environnements où les bactéries évoluent, de nombreuses conditions peuvent être une source de stress. Il est bien connu que chaque bactérie a des paramètres physico-chimiques de croissance qui lui sont propres. Dès lors que ceux-ci sont modifiés, cela génère un stress. De plus, un stress pourra être généré par des composés toxiques notamment produits par son hôte ou d'autres micro-organismes. Cette partie sera dédiée à la description non exhaustive des paramètres environnementaux générant un stress chez les entérobactéries.

### 3.2.1 – Exemples de variations de paramètres environnementaux

Les changements des paramètres physico-chimiques tels qu'un changement de température, de pH, de pression osmotique ou de disponibilité en nutriments pourront générer un stress pour la bactérie. Ces paramètres physico-chimiques ont été particulièrement étudiés dans le but d'identifier les meilleurs moyens de garantir la stérilisation des produits alimentaires telle que la congélation (Laroussi 2005; Bernhardt et al. 2015; Ohshima, Okuyama, et Sato 2002; Villeger, Ricard, et Sixou 2004). Ils ont également été étudiés dans le but de définir les conditions de culture optimales d'un micro-organisme.

#### 3.2.1.1 - Le stress thermique

Les entérobactéries sont des bactéries mésophiles, cela signifie que ces bactéries peuvent croître à des températures entre 15 et 45°C cependant leur optimum de croissance se situe entre 35 et 42°C (Russell 2003). Les variations de température ont un effet sur la membrane, le cytoplasme, le ribosome, l'ADN et les protéines. Une température largement supérieure à la température optimale peut induire le mauvais repliement et l'agrégation des protéines aboutissant à une diminution de l'activité enzymatique. De même une température très inférieure à la température optimale peut induire une baisse de l'activité enzymatique voire l'arrêt de celle-ci. Les bactéries agissent contre ces dérèglements en faisant appel à des réseaux de régulation complexes activant un certain nombre de protéines spécialisées dans la réponse au stress thermique (H. Li et Gänzle 2016) telles que les protéines de type HSP (pour Heat Shock Protein) ou CSP (pour Cold Shock Protein).

#### 3.2.1.2 – Le stress pH

De la même façon que pour la température, chaque bactérie a un pH optimal de croissance, par exemple, certaines bactéries sont acidophiles (pH acide), d'autres neutrophiles (pH neutre) et enfin certaines sont basophiles (pH basique). Les entérobactéries ont un optimum de croissance à pH neutre. Néanmoins, elles peuvent être confrontées à des variations de pH et notamment à un stress acide. Par exemple, les entérobactéries pathogènes sont confrontées à un pH aux alentours de 2 dans l'estomac (Beasley et al. 2015). Un pH inadapté peut entraîner un dérèglement de la force motrice, des dommages membranaires et un mauvais repliement des protéines. Les bactéries ont acquis des mécanismes pour pallier ces désagréments. Il existe plusieurs stratégies comme des pompes à protons, des régulations métaboliques visant à éliminer les ions H<sup>+</sup> ainsi que des systèmes de protection des macromolécules comme les protéines chaperonnes ou les mécanismes de réparation de l'ADN prévenant l'agrégation des protéines et les dommages à l'ADN (Guan et Liu 2020).

### 3.1.1.3 - Le stress osmolaire

La bactérie pourra également être soumise à des changements d'osmolarité de l'environnement. Comme la membrane est semi-perméable, elle permet un échange et une diffusion d'eau et de solutés entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. Une diminution de l'osmolarité du milieu extracellulaire aboutit à un afflux important d'eau dans le cytoplasme donc à une augmentation de la pression cellulaire et à une turgescence. A l'inverse, une augmentation de l'osmolarité du milieu extracellulaire aboutit à une diffusion rapide de l'eau à l'extérieur de la cellule et à une plasmolyse.

Face à ce stress, des mécanismes se mettent en place aboutissant à une osmo-tolérance. Par exemple, si les mécanismes osmo-senseurs détectent une augmentation de l'osmolarité et cela induit des transporteurs qui transfèrent des molécules osmoprotectantes telle que la proline ou la bétaine de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule afin de contrebalancer l'effet de l'augmentation de la pression osmotique (Haardt et al. 1995). De plus, les canaux ioniques sont induits et génèrent un efflux non spécifique de solutés cytoplasmique et une fuite concomitante d'eau (Kempf et Bremer 1998).

### 3.1.1.4 – Le stress lié à la disponibilité de nutriments

Pour croître, les bactéries ont besoin d'eau, d'une source de carbone, d'une source d'azote et de minéraux. Comme cela a été mentionné, les entérobactéries se développent dans différentes niches trophiques plus ou moins riches en nutriments.

Même dans un milieu riche, les bactéries peuvent être exposées à une compétition avec les autres-microorganismes pour les ressources nutritives et elles doivent mettre en place des stratégies efficaces de captation des denrées alimentaires. Les bactéries peuvent s'adapter grâce à un métabolisme alternatif pour utiliser d'autres sources de carbone. En plus des sources de carbone, la privation de métal inhibe fortement la croissance des micro-organismes. Le système immunitaire de l'hôte lutte par exemple contre les infections en limitant les métaux disponibles à la surface des muqueuses et des épithéliums. On parle alors de « l'immunité nutritionnelle » (Chandrangsu, Rensing, et Helmann 2017).

## 3.2.2 – Exemples de stress générés par des composés toxiques

Les différentes niches trophiques des entérobactéries peuvent contenir des composés toxiques tels que les métaux, les antibiotiques ou les toxines.

### 3.2.2.1 – Le stress métallique

Les métaux sont essentiels et peuvent notamment servir de cofacteur des protéines et des enzymes impliquées dans une variété de processus allant du métabolisme à la réplication de l'ADN (Waldron et Robinson 2009). Néanmoins à haute concentration, ces derniers peuvent être nocifs pour les bactéries. Par exemple, le système immunitaire inné de l'hôte utilise la toxicité des métaux de transition pour lutter contre les infections via les macrophages (H. Gao et al. 2018). La principale cause de toxicité des métaux est leur capacité à se substituer au métal natif (Stadtman 1993). Ces liaisons aspécifiques, notamment du cobalt sur des protéines peuvent empêcher la formation de pont-di-sulfure et gêner le repliement correct des protéines (Ranquet et al. 2007). D'autre part, les métaux peuvent générer un stress

oxydant. La présence de fer et de cuivre entraîne la formation de radical hydroxyle (OH•). Ces radicaux hydroxyles initient la peroxydation des lipides qui engendrent une diminution de la fluidité membranaire (Cabiscol et al. 2000). Ils peuvent également engendrer des cassures simples ou doubles brins de l'ADN (Valko, Morris, et Cronin 2005).

Pour répondre au stress métallique, les bactéries peuvent diminuer la perméabilité de leur membrane, séquestrer les métaux à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Elles peuvent également transporter les métaux en dehors de la cellule via des pompes à efflux, détoxifier les métaux en des formes moins toxiques ou agir directement sur les cibles cellulaires sensibles aux métaux pour les réparer (Lemire, Harrison, et Turner 2013).

### 3.2.2.2 – Les stress antimicrobiens

D'autre part les entérobactéries peuvent être confrontées à la présence d'antimicrobiens générés par d'autres micro-organismes ou générés par l'hôte.

Au sein du sol ou du tube digestif, des phénomènes de compétition entre les bactéries ont lieu. En effet, les bactéries utilisent des composés antimicrobiens sécrétés pour tuer ou altérer les cellules cibles voisines. L'habitat et le mode de vie d'un producteur d'antibiotiques peuvent influencer le spectre des antibiotiques produits. Par exemple, un genre généraliste comme *Streptomyces* occupant un large éventail d'environnements produit de multiples molécules antimicrobiennes à large spectre qui permettront de toucher différents compétiteurs potentiels (Challis et Hopwood 2003). A l'extrême opposé, certains organismes hautement spécialisés dans un habitat donné peuvent produire des antimicrobiens à spectre plus étroit, ciblant des concurrents spécifiques. Par exemple, *Agrobacterium radiobacter* K84 produit l'antibiotique agrocine 84 qui est hautement spécifique d'un sous-ensemble d'*Agrobacterium tumefaciens* phytopathogènes (J.-G. Kim et al. 2006).

Le système immunitaire de l'hôte produit une variété importante de peptides antimicrobiens. Ces peptides antimicrobiens peuvent impacter la synthèse de la paroi cellulaire et/ou la membrane et/ou pénétrer à l'intérieur de la cellule et cibler des composants intracellulaires (G. Wang 2014). Par exemple, le peptide antimicrobien LL-37, généré par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires, reconnaît les membranes bactériennes anioniques puis se lie à la membrane externe et la traverse. Le peptide se lie à la membrane interne et il peut former des pores (C.-C. Lee et al. 2011). A l'intérieur du cytoplasme, LL-37 est capable de se lier à l'ADN et entraîner l'arrêt de la machinerie cellulaire (G. Wang et al. 2014).

De manière générale, la réponse cellulaire face à des composés antimicrobiens peut être l'export de l'antimicrobien, la diminution de la perméabilité membranaire, la modification de la cible, la dégradation ou la modification de l'antimicrobien.

## 4 – Les différents systèmes de réponse au stress

En réponse aux fluctuations de l'environnement, les bactéries possèdent des mécanismes de régulation capables de moduler l'expression basale de certains gènes. Ces mécanismes sont très diversifiés, cette partie traitera uniquement de deux mécanismes : les facteurs sigma et les systèmes à deux composants.

### 4.1 - Les facteurs sigma

L'initiation de la transcription et la reconnaissance du promoteur nécessitent la présence du facteur sigma ( $\sigma$ ). En effet, le facteur  $\sigma$  est capable de reconnaître une région promotrice et de se lier aux autres sous-unités de l'ARN polymérase afin de stabiliser l'holoenzyme. Le nombre de facteur sigma est très variable d'une bactérie à une autre. Par exemple, la bactérie symbiotique, *Buchnera aphidicola*, ne possède que 2 facteurs sigma alors que *E. coli* possède 7 facteurs sigma (Tableau 2). Au sein des 7 facteurs sigma de *E. coli*, on distingue deux familles différentes : la famille sigma 70 (6 membres) et la famille sigma 54 (1 membre). Dans le cas du facteur  $\sigma^{54}$ , la liaison avec l'ADN nécessite des protéines accessoires et l'hydrolyse de l'ATP. La famille sigma 70 est composée de 4 groupes polyphylétiques. Le premier groupe est constitué du facteur sigma primaire,  $\sigma^{70}$ , alors que les trois autres sont composés de facteurs sigma alternatifs ( $\sigma^{38}$ ,  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{24}$ ,  $\sigma^{28}$  et  $\sigma^{19}$ ). Une propriété importante des facteurs sigma est la nature des promoteurs reconnus par l'holoenzyme qu'ils peuvent former. La structure consensus des promoteurs reconnus par l'holoenzyme E-  $\sigma^{70}$  est composée des domaines de reconnaissance -10 et -35. Mis à part le site de fixation de  $\sigma^{38}$  qui est proche de celui de  $\sigma^{70}$ , chacun de ces facteurs sigma est capable de reconnaître une région promotrice différente (Tableau 2).

Le facteur  $\sigma^{70}$  est impliqué dans l'expression des gènes de ménage qui codent des fonctions indispensables à la survie de la cellule. Au contraire, les autres facteurs sigma participent notamment à l'activation de gènes à la suite d'un stimulus tel qu'une carence en fer ( $\sigma^{19}$ ), en carbone ( $\sigma^{38}$ ) ou un stress thermique ( $\sigma^{32}$  et  $\sigma^{24}$ ). Le facteur  $\sigma^{28}$  quant à lui est capable de réguler l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du flagelle (Fitzgerald, Bonocora, et Wade 2014). L'activité des facteurs sigma alternatifs est finement régulée. En condition de non-induction, le facteur sigma n'est pas disponible dans le cytoplasme, ce qui empêche la formation de l'holoenzyme correspondante. En condition inductrice, le facteur sigma est produit et/ou accumulé et/ou rendu disponible. Il peut alors former l'holoenzyme et permettre la transcription de différents gènes. Dans le cas de sigma 38, il est peu produit et dégradé en phase exponentielle de croissance. Mais il a été montré que la protéine Crl se fixerait au facteur sigma 38 pour le stabiliser et favoriser son interaction avec l'ARN polymérase, donc son activité (Cavaliere et Norel 2016) (Figure 3A, voie 1). D'autre part, certaines protéines agissent comme des facteurs anti-sigma capables de séquestrer le facteur sigma en condition non inductrice. Le stimulus peut directement modifier la conformation du facteur sigma (Figure 3A, voie 2), modifier la conformation d'une autre protéine qui séquestre alors le facteur anti-sigma (Figure 3A, voie 3) ou induit une dégradation enzymatique du facteur anti-sigma (Figure 3A, voie 4) (Paget 2015). Ces mécanismes permettent de rendre disponible le facteur sigma afin qu'il joue son rôle dans la réponse au stimulus.



*Tableau 2 : Sept facteurs sigma chez E.coli*

Facteur	Gene	Taille (kDa)	Site de fixation	Gènes régulés
<b>Famille <math>\sigma^{70}</math></b>				
$\sigma^{70}$ ( $\sigma^D$ )	<i>rpoD</i>	70	TTGACA-N <sub>12</sub> -TATAAT	Gènes de ménage et métabolisme général
$\sigma^{38}$ ( $\sigma^S$ )	<i>rpoS</i>	38	TTGACA-N <sub>12</sub> -TGTGCTATACT	Phase stationnaire
$\sigma^{32}$ ( $\sigma^H$ )	<i>rpoH</i>	32	CTTGAA-N <sub>14</sub> -CCCCATNT	Choc thermique
$\sigma^{24}$ ( $\sigma^E$ )	<i>rpoE</i>	24	GAACCTT-N <sub>16</sub> -TCTGA	Stress extracellulaire
$\sigma^{28}$ ( $\sigma^F$ )	<i>fliA</i>	28	TAAA-N <sub>15</sub> -GCCGATAA	Flagelle et chimiotactisme
$\sigma^{19}$ ( $\sigma^{fecl}$ )	<i>fecl</i>	19	GCAAAT-N <sub>17</sub> -TC	Import du citrate de fer
<b>Famille <math>\sigma^{54}</math></b>				
$\sigma^{54}$ ( $\sigma^N$ )	<i>rpoN</i>	54	CTGGCAC-N <sub>5</sub> -TTGCA	Métabolisme de l'azote

*Nx indique le nombre X de nucléotides*

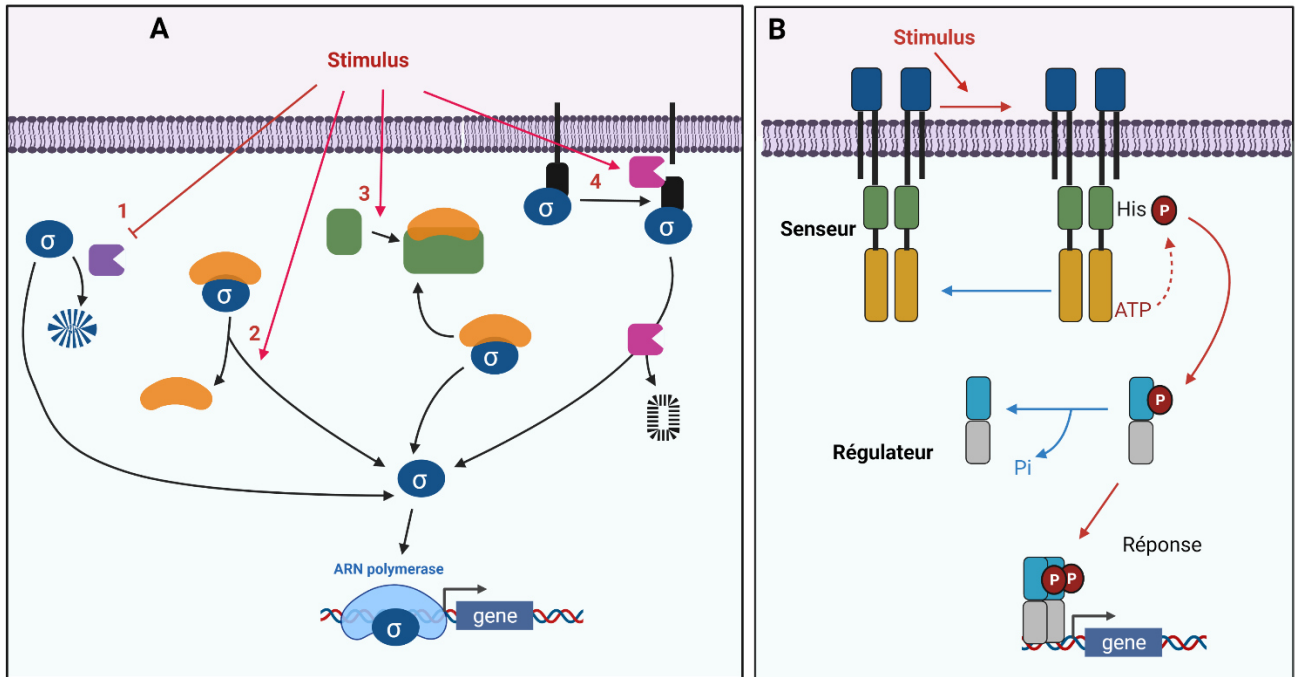
*Tableau adapté à partir de (Burgess 2001).*

#### 4.2 - Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants (TCS, pour Two Component System) constituent un des principaux mécanismes de détection et de réponse aux stimuli environnementaux (Bourret et al., 1989 ; Stock et al., 1989, 2000). Ces systèmes sont relativement abondants chez les procaryotes mais le nombre est variable d'une espèce à une autre. *E. coli* possède 28 systèmes à deux composants. Ces systèmes sont composés d'au moins 2 composants : un senseur, le plus souvent membranaire, qui possède une fonction histidine kinase (HK) et un régulateur de réponse (RR) cytoplasmique. Les senseurs fonctionnent généralement comme des récepteurs membranaires dimériques et se composent d'un domaine de détection du ou des stimuli, d'un domaine kinase et d'un domaine catalytique qui lie et hydrolyse l'ATP. Le régulateur transcriptionnel est composé de deux domaines : un domaine receveur de phosphate et un domaine de liaison à l'ADN.

Lors de l'interception du signal, l'histidine kinase subit un changement de conformation au niveau des segments transmembranaires qui aboutit à l'hydrolyse de l'ATP. Le phosphate libéré se fixe sur une histidine conservée (Figure 3B). L'auto-phosphorylation de l'histidine kinase stimule le transfert du groupe phosphoryle vers un résidu aspartate conservé sur le régulateur de réponse correspondant (Figure 3B). La phosphorylation entraîne un changement de conformation qui lui permet d'acquies sa fonction. Le régulateur peut alors se lier aux promoteurs d'un ensemble de gènes (Figure 3B).

De nombreuses histidine kinases sont bi-fonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles ont également la capacité d'agir comme des phosphatases ou des phosphotransférases inverses, déphosphorylant le régulateur de réponse. La dé-phosphorylation du régulateur de la réponse par son histidine kinase correspondante réinitialise la cascade de signalisation, permettant à la bactérie de répondre à nouveau au même stimulus lors d'une nouvelle exposition.



*Figure 3 : Régulation de l'initiation de la transcription en réponse à un stress via un facteur sigma ou un système à deux composants*

*(A) Régulation de l'activité des facteurs sigma alternatifs*

*En conditions non inductrices, les facteurs sigma alternatifs ne sont pas disponibles pour se lier à l'ARN polymérase. (1) Le facteur sigma est peu produit et il est dégradé. Dans une condition inductrice, sa dégradation est levée. (2) Le facteur sigma est lié à un facteur anti-sigma. Le stimulus induit le changement conformationnel du facteur anti-sigma, ce qui permet de libérer le facteur sigma qui peut aller se lier à l'ARN polymérase. (3) Le facteur sigma est lié au facteur anti-sigma. Le stimulus induit un changement de conformation d'une protéine qui aura plus d'affinité pour le facteur anti-sigma. Ainsi le facteur sigma pourra jouer son rôle. (4) Le facteur sigma peut être séquestré au niveau de la membrane. Le stimulus induit l'activation d'une cascade d'enzymes aboutissant à la libération du facteur sigma.*

*(B) Fonctionnement d'un système à deux composants*

*Dans la plupart des cas, l'histidine kinase est intégrée à la membrane. Le senseur détecte les signaux ou les stimuli et subit une autophosphorylation au niveau d'un résidu histidine conservé. Le groupe phosphate est ensuite transféré au régulateur de réponse cytoplasmique correspondant au niveau d'un résidu aspartate conservé. Les régulateurs de réponse phosphorylés forment un dimère actif qui peut alors réguler la transcription des gènes. Après la réponse cellulaire appropriée, le capteur présente une activité de phosphatase ou de phosphotransférase inverse, retirant le groupe phosphorylé du régulateur de réponse pour "réinitialiser" le système. Bien que la plupart des kinases se trouvent sous forme de dimère dans la membrane, des interactions dynamiques entre l'état mono- et di-mérique peuvent se produire.*



---

## Chapitre II – Les systèmes de réponse au stress de l’enveloppe chez les pathogènes

---

### 1 – L’enveloppe, une cible de stress

#### 1.1 – La structure de l’enveloppe chez les entérobactéries

L’interface de la bactérie avec son environnement est une structure multi-stratifiée, l’enveloppe. En 1884, Hans Christian Gram a développé une coloration permettant de catégoriser les bactéries en deux groupes : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Les entérobactéries sont des bactéries à Gram négatif c’est-à-dire que leur enveloppe est didermique. Elle est composée de plusieurs strates qui sont, de l’extérieur vers l’intérieur, la membrane externe (ME), une paroi de peptidoglycane (PG) et une membrane interne (MI) qui entoure le cytoplasme. L’espace se situant entre les deux membranes est appelé le périplasme (Figure 4). Chacune de ces trois structures définit un compartiment cellulaire particulier, avec une composition qui lui est propre.

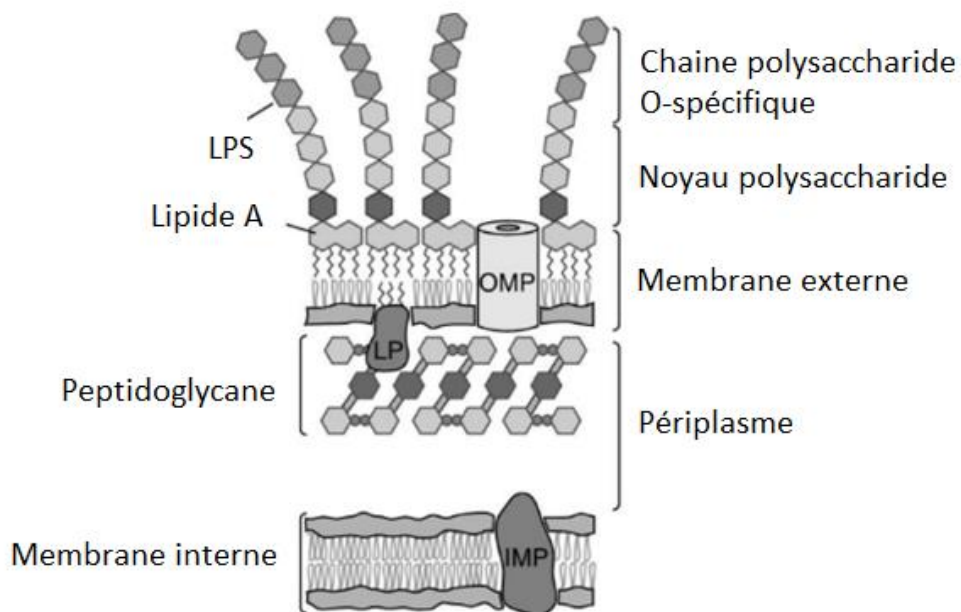
La membrane externe est asymétrique. Elle est composée d’un feuillet interne contenant des phospholipides et d’un feuillet externe contenant des lipopolysaccharides (LPS). Par son organisation, elle limite drastiquement la perméabilité de l’enveloppe aux grosses molécules hydrophiles et aux molécules hydrophobes. Il a également été montré que le LPS joue un rôle essentiel dans la perméabilité sélective de la ME (Khadka, Aryal, et Pan 2018). Elle contient peu de protéines exceptées des protéines de la membrane externe, appelées OMP (Outer Membrane Proteins) et les lipoprotéines (LP). Les OMPs, comme les porines, sont spécialisées dans l’import de petites molécules hydrophiles comme les nutriments. Les molécules de tailles plus importantes doivent passer par des transporteurs spécifiques. La membrane externe est fixée au peptidoglycane par une lipoprotéine, appelée Lpp, ou lipoprotéine de Braun.

Le peptidoglycane est composé d’unités répétées de disaccharide composé de N-acétyl glucosamine lié à l’acide N-acétyl muramique. Il est qualifié d’exosquelette bactérien et joue un rôle essentiel de maintien de la forme de la cellule. De plus, la membrane externe et les peptidoglycane sont des structures stabilisantes qui protègent la cellule des stress mécaniques et osmotiques (Silhavy, Kahne, et Walker 2010).

Le périplasme représente 20 à 40% du volume cellulaire chez *E. coli* (Stock, Rauch, et Roseman 1977). Le périplasme est plus visqueux que le cytoplasme et contient de nombreuses protéines solubles ayant des rôles variés. De manière non exhaustive, le périplasme contient par exemple : (i) des protéines de liaison, qui aident à l’absorption des acides aminés, des vitamines et des sucres à partir du milieu extérieur ; (ii) des enzymes de détoxification, qui inactivent certains antibiotiques ; (iii) des protéines impliquées dans la biogenèse du peptidoglycane et (iv) des protéines impliquées dans la réponse au stress comme des protéines chaperonnes. De plus, le périplasme permet également de séquestrer les enzymes potentiellement nocives comme la phosphatase alcaline. Toutes les protéines périplasmiques sont synthétisées dans le cytoplasme puis transportées au travers de la MI dans le périplasme.

Enfin la membrane interne sert de barrière finale entre l'environnement et le cytoplasme. Elle est composée d'une double couche de phospholipides qui engendre une perméabilité de la membrane interne plus contraignante que celle de la membrane externe. La MI laisse seulement passer les petites molécules non ou faiblement chargées comme l'eau, les gaz, l'urée ou l'ammoniaque mais elle est imperméable aux ions ou autres molécules. Elle contient de nombreuses protéines, appelées IMP (Inner Membrane Proteins), dont la moitié est impliquée dans le transport et le métabolisme (Papanastasiou et al. 2013; Sueki et al. 2020).

L'enveloppe est la barrière qui sépare le compartiment cellulaire bactérien de l'environnement. Elle peut être en contact avec de nombreux stress. Le maintien de son intégrité est primordial à la survie cellulaire.



*Figure 4 : Représentation de la structure de l'enveloppe des entérobactéries*

*La signification des abréviations utilisées est : IMP, protéine de membrane interne ; LP, lipoprotéine ; LPS, lipopolysaccharide et OMP, protéine de membrane externe.*

*Cette figure a été adaptée à partir de celle de (Silhavy, Kahne, et Walker 2010).*

## 1.2 – Les stress rencontrés par les pathogènes entériques et leur impact sur l’enveloppe

Les pathogènes entériques doivent s’adapter à de nombreuses conditions environnementales différentes au cours de l’infection comme des changements de température, de pH, d’osmolarité, de conditions d’oxydo-réduction, de disponibilité en nutriments ainsi que la présence de composés antimicrobiens. Ces variations génèrent un stress pour les bactéries qui peut également impacter l’enveloppe bactérienne.

La contamination à l’Homme par des pathogènes entériques peut se faire *via* de la nourriture infectée. Dans les aliments, les entérobactéries sont soumises à de nombreux stress thermiques qu’ils soient dûs au chauffage ou au refroidissement de l’aliment. Lorsque la bactérie entre en contact avec l’hôte, elle doit de nouveau s’acclimater à une variation de température, d’une température ambiante à celle du corps humain (Figure 5). Les changements de température ont un impact sur l’enveloppe bactérienne. Un passage à une température plus basse ralentira la biosynthèse des composants de l’enveloppe (K. J. Pogliano et Beckwith 1993), le repliement des protéines (Wang 2004), et rendra les membranes de la cellule moins fluides (Sinensky 1974). Au contraire, un passage à une température élevée peut provoquer le mauvais repliement des protéines, augmenter les taux de biosynthèse et ainsi surcharger les machines d’assemblage et augmenter la fluidité des membranes (Sinensky 1974) (Tableau 3).

À la suite de leur ingestion, les agents pathogènes doivent survivre à des variations de pH. Lors de leur arrivée dans l’estomac, ils sont exposés à un pH très acide aux alentours de 2 (Beasley et al. 2015) (Figure 5). Les altérations du pH entraînent un mauvais repliement des protéines ainsi qu’une perturbation des réactions enzymatiques (Tableau 3 et partie 3.2.1.2) (Tableau 3). D’autre part, les bactéries sont confrontées à une hyperosmolarité au cours de l’infection lors de leur passage dans la lumière du colon (Grauso et al. 2019) (Figure 5). Une modification de l’osmolarité entraîne de fortes pressions et tensions physiques sur les membranes cellulaires et la paroi cellulaire (Partie 3.2.1.3) (Tableau 3).

Les bactéries peuvent également être exposés aux espèces réactives de l’oxygène et de l’azote (RONS pour Reactive Oxygen and Nitrogen Species) (Figure 5). En effet, la plupart des types de cellules sont capables de générer des ROS dans certaines conditions. Cependant, les principales sources de ces molécules réactives sont les cellules phagocytaires et divers types de cellules épithéliales comme les entérocytes (Fink 2002). Les phagocytes sont capables de convertir l’oxygène en radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  à l’aide de l’oxydase NADPH dépendante. Le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) peut subir une dismutation spontanée ou enzymatique en peroxyde d’hydrogène ( $H_2O_2$ ). Les bactéries peuvent également être exposées à du monoxyde d’azote ( $NO$ ) qui peut être produit par tous les types cellulaires. La réaction de  $O_2^{\bullet-}$  et de  $NO$  peut générer l’anion cytotoxique peroxyde d’azote ( $OONO$ ). Les RONS sont déjà des molécules toxiques mais, en interagissant les uns avec les autres, ils peuvent donner des formes encore plus toxiques qui sont défavorables pour les bactéries. Des conditions d’oxydoréduction défavorables entraînent des dommages oxydatifs aux protéines et aux membranes, altérant considérablement leurs fonctions (Arts, Gennaris, et Collet 2015) (Tableau 3). En outre, de nombreuses protéines de l’enveloppe cellulaire, y compris des protéines essentielles,

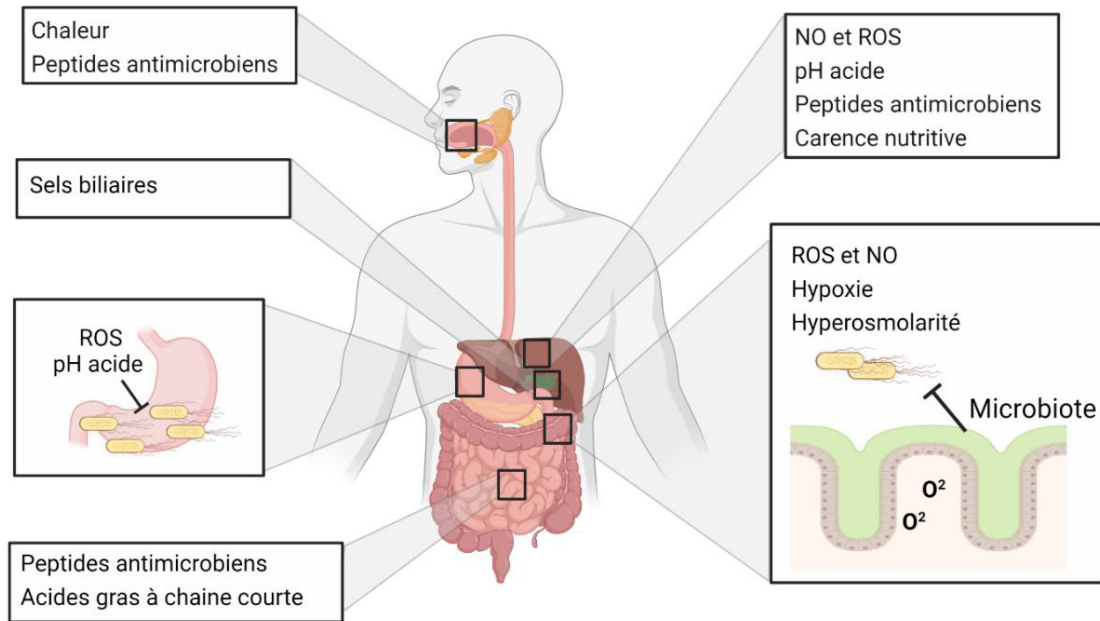
dépendent des liaisons disulfures pour maintenir leur structure et l'altération de ces liaisons due au stress oxydatif peut fortement altérer la fonction de ces protéines (Arts, Gennaris, et Collet 2015).

Dans certaines régions du tube digestif, les bactéries peuvent être confrontées à des carences nutritionnelles. Par exemple, les bactéries auxotrophes peuvent être incapables de synthétiser avec succès des parties de leur enveloppe en l'absence de nutriments clés. En outre, les micronutriments sont essentiels à la synthèse de certains composants de l'enveloppe. Les grands complexes protéiques de la chaîne de transport d'électrons nécessitent de nombreux centres fer-soufre et de groupes hémiques (C. E. Price et Driessen 2010). Par conséquent, un manque de fer environnemental peut entraîner un mauvais repliement de ces protéines et une perturbation de la membrane interne (C. E. Price et Driessen 2010).

Enfin, dans la lumière intestinale, les agents pathogènes entériques rencontrent des peptides antimicrobiens actifs sur la membrane, des sels biliaires et des acides gras libres (Figure 5). Les sels biliaires et les peptides antimicrobiens (Partie 3.2.2.2) constituent un élément important des défenses innées de l'intestin et offrent une protection contre les entéropathogènes.

Après les sels biliaires, le deuxième type métabolique le plus présent dans le colon sont les acides gras à chaîne courte (SCFA pour Short Chain Fatty Acids). Ce sont des acides gras volatils produits par le microbiote intestinal, notamment *Bacteroides sp.*, dans le gros intestin en tant que produits de fermentation de composants alimentaires qui ne sont pas digérés dans l'intestin grêle. Ils se caractérisent par le fait qu'ils contiennent moins de six atomes de carbone et qu'ils existent sous forme de chaînes droites ou ramifiées. L'acide acétique (C2), l'acide propionique (C3) et l'acide butyrique (C4) sont les plus abondants, représentant 90 à 95 % des SCFA présents dans le côlon (Ríos-Covián et al. 2016). À des concentrations adéquates, les SCFA ont également une activité antimicrobienne directe contre les bactéries pathogènes. Les SCFA peuvent réduire la croissance microbienne en modifiant le pH intracellulaire et le métabolisme. À un pH plus faible, les SCFA sont généralement présents sous des formes non ionisées qui peuvent traverser la membrane bactérienne et diffuser dans le cytoplasme bactérien. Une fois dans le cytoplasme, les SCFA se dissocient, augmentant les concentrations d'anions et de protons et abaissant le pH intracellulaire (Jacobson et al. 2018).

Les pathogènes entériques rencontrent une multitude de stress au contact de l'hôte et certains de ces stress impactent l'enveloppe. Or l'enveloppe est une structure essentielle à la survie de la bactérie. C'est pourquoi, il existe des systèmes qui sont spécialement dédiés à la réponse au stress membranaire.



*Figure 5 : Les stress des pathogènes gastriques lors de l'infection*

Après l'ingestion, un agent pathogène entérique rencontre des conditions de stress distinctes dans la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon de l'hôte. Cette figure a été adaptée à partir de celle de (Fang et al. 2016)

*Tableau 3 : Exemples de stress de l'enveloppe et leur effet*

Type de stress	Stress	de	la	Effet sur l'enveloppe
<b>Stress environnementaux</b>	Diminution de température			↓ taux de biosynthèse ↓ taux de repliements des protéines ↓ fluidité membranaire
	Augmentation de température			Mauvais repliement des protéines Stress sur les voies de biosynthèse ↑ fluidité membranaire
	Changement de pH			Mauvais repliement des protéines Perturbations des réactions
	Diminution de l'osmolarité			Import d'eau ↓ Concentration des solutés ↑ Tension membranaire
	Stress redox			Dommages oxydatifs des protéines et de la membrane Mauvais repliement des protéines
	Carence nutritive			Limite la biosynthèse
<b>Composés toxiques/antibiotiques</b>	Métaux			Dommages oxydatifs Déplacement des métaux natifs
	Peptides antimicrobiens			Perturbations membranaires
	Sels biliaires			Perturbations membranaires

Ce tableau est tiré de la publication de Mitchell et Silhavy, 2019 (Mitchell et Silhavy 2019).

## 2 - Les systèmes de réponse au stress de l'enveloppe

En raison de l'importance de l'intégrité membranaire dans l'homéostasie cellulaire, il existe des mécanismes spécialement dédiés à la détection des stress membranaires qui sont capables d'y répondre rapidement en activant une cascade de signalisation. Ces systèmes sont appelés des systèmes de réponse au stress de l'enveloppe (ESR pour Enveloppe Stress Response). Cinq systèmes ont été majoritairement décrits, il s'agit des systèmes SigmaE, Rcs, Cpx, Bae et Psp. Néanmoins, la découverte et la caractérisation de nouveaux ESR n'est pas à exclure. Le fonctionnement et le régulon de ces systèmes seront décrits dans la suite de cette partie.

### 2.1 – Le facteur sigmaE percevant le stress extracellulaire

Initialement, le facteur  $\sigma E$  (RpoE, pour RNA polymerase extracytoplasmic E) a été purifié avec l'ARN polymérase (Partie 4.1) et il a été montré qu'il activait la transcription des gènes inductibles à la chaleur comme *rpoH* (Erickson et Gross 1989).

De plus, il a été montré que, dans les souches de *E. coli* de laboratoire et de *Yersinia enterocolitica*, *rpoE* est un gène essentiel (De Las Peñas, Connolly, et Gross 1997; Heusipp, Schmidt, et Miller 2003) même si certaines mutations suppressives permettent aux mutants *rpoE* d'être viables (De Las Peñas, Connolly, et Gross 1997). En revanche, de nombreuses études ont montré que *rpoE* n'est pas essentiel chez d'autres bactéries, y compris *Salmonella* (Humphreys et al. 1999; Skovierova et al. 2006), bien qu'il apporte une contribution majeure à leur virulence. De manière intéressante, il a récemment été rapporté que la perte de l'antigène O du LPS rendait une délétion *rpoE* létale chez *Salmonella* (Amar et al. 2018). Les auteurs proposent que l'antigène O du LPS fournisse une protection de la ME de *Salmonella* permettant de tolérer une délétion de *rpoE*.

La délétion de *rpoE* altère de manière significative les propriétés de l'enveloppe, ce qui rend les bactéries plus sensibles aux stress. La compréhension de l'essentialité de ce système passe par la compréhension de son fonctionnement et l'identification des gènes qu'il régule.

#### 2.1.1 – Le fonctionnement du système sigmaE

Dans des conditions physiologiques normales, le facteur  $\sigma E$  est inactif et séquestré à la membrane interne par le facteur anti-sigma RseA. Cette interaction est renforcée par l'action de la protéine RseB qui augmente l'affinité du complexe entre RseA et  $\sigma E$ , ce qui entraîne l'inhibition de la voie (Collinet et al. 2000; Chaba et al. 2011) (Figure 6).

Le système est activé en présence d'un stress oxydatif, d'un choc thermique, de la privation de carbone, de la formation de biofilms (Rowley et al. 2006), de stress acide (Muller et al. 2009), du rayonnement ultraviolet A (UVA), du phage P22 et d'un choc hypo-osmotique (Amar et al. 2018). L'activation de la voie  $\sigma E$  implique une série d'événements de clivage protéolytique (Figure 6). Lors d'un stress membranaire, cet ESR détecte les OMPs ou le LPS mal repliés et/ou transférés au sein de la membrane externe et de l'espace périplasmique (Rowley et al. 2006). L'interaction entre l'extrémité C-terminale des OMPs mal repliés (uOMPs, pour unfolded Outer Membrane Protein) et le domaine PDZ (domaine d'interaction

protéine-protéine) de la protéase DegS, induit un changement conformationnel de DegS. Ce changement de conformation expose la région protéase de DegS qui réalise le clivage périplasmique de RseA (Walsh et al. 2003; Sohn, Grant, et Sauer 2009). Après le clivage par DegS, la protéase RseP (YaeL) est recrutée et la partie cytoplasmique de RseA, liée à  $\sigma E$ , est libérée dans le cytoplasme (Alba et al. 2002) (Figure 6). Après la libération de  $\sigma E$  lié à RseA, l'adaptateur SspB se lie au complexe et recrute la protéase ClpXP dépendante de l'ATP (Figure 6) (Baker et Sauer 2012). Ce complexe protéique est composé de ClpX qui est une ATPase AAA+ et ClpP qui est une peptidase. Dans l'étape finale de la cascade de  $\sigma E$ , le complexe protéique libère  $\sigma E$  de RseA (Baker et Sauer 2012). Une fois libérée de RseA,  $\sigma E$  est libre de se lier à l'ARN polymérase comme cofacteur, induisant ensuite l'expression du régulon  $\sigma E$  (Figure 6).

### 2.1.2 - Le régulon de sigmaE

Les gènes du régulon de  $\sigma E$  codent de nombreuses fonctions comme la réparation de l'ADN, le métabolisme, la biogénèse de la ME et des protéines chaperonnes ainsi que des protéases (Dartigalongue, Missiakas, et Raina 2001; Rhodius et al. 2006; Skovierova et al. 2006). Parmi eux, les principales chaperonnes régulées par  $\sigma E$  sont Skp, SurA et DegP (HtrA). Les protéines chaperonnes jouent un rôle majeur pour empêcher l'agrégation des uOMPs. En effet, il a été démontré que SurA et une autre chaperon Skp jouent un rôle dans le repliement des uOMPs en coopération avec le complexe BAM (Sklar et al. 2007). Enfin, à basse température, DegP joue un rôle de protéine chaperonne transportant les OMPs mal repliés et dépliés. Alors qu'à des températures plus élevées, DegP possède une fonction protéase dégradant les protéines qui ne peuvent plus être réparées (Spiess, Beil, et Ehrmann 1999). Donc les protéines chaperonnes et les protéases régulées par  $\sigma E$  sont importantes pour la biogénèse de la ME et la tolérance au stress extracytoplasmique.

En plus des chaperons et des protéases, un certain nombre de petits ARN interférants (ARNsi) ayant des fonctions régulatrices sont codés dans le régulon *rpoE*. Les ARNsi se lient à des cibles d'ARNm spécifiques et permettent ou non la traduction de l'ARNm en affectant sa stabilité ou en empêchant sa traduction (Holmqvist et Wagner, 2017). Les petits ARNs MicA (SraD) et RybB sont régulés par  $\sigma E$ . (Figure 6). Leurs fonctions se chevauchent et ils régulent à la baisse l'expression des porines de la membrane externe d'une manière dépendante de la protéine Hfq. MicA est responsable de la diminution de l'ARNm d'OmpA, particulièrement pendant la phase stationnaire lorsque  $\sigma E$  est très actif (Vogel et Papenfort 2006). Il a été démontré que RybB diminue spécifiquement les niveaux d'ARNm *ompC* et *ompW* via Hfq (Johansen et al. 2006) (Johansen et al., 2006). Par conséquent, ces ARNsi contribuent au maintien de l'homéostasie de l'enveloppe par la régulation négative de la production d'OMP réduisant le transport des uOMP dans le périplasme qui pourrait conduire à une activation continue de l'ESR.



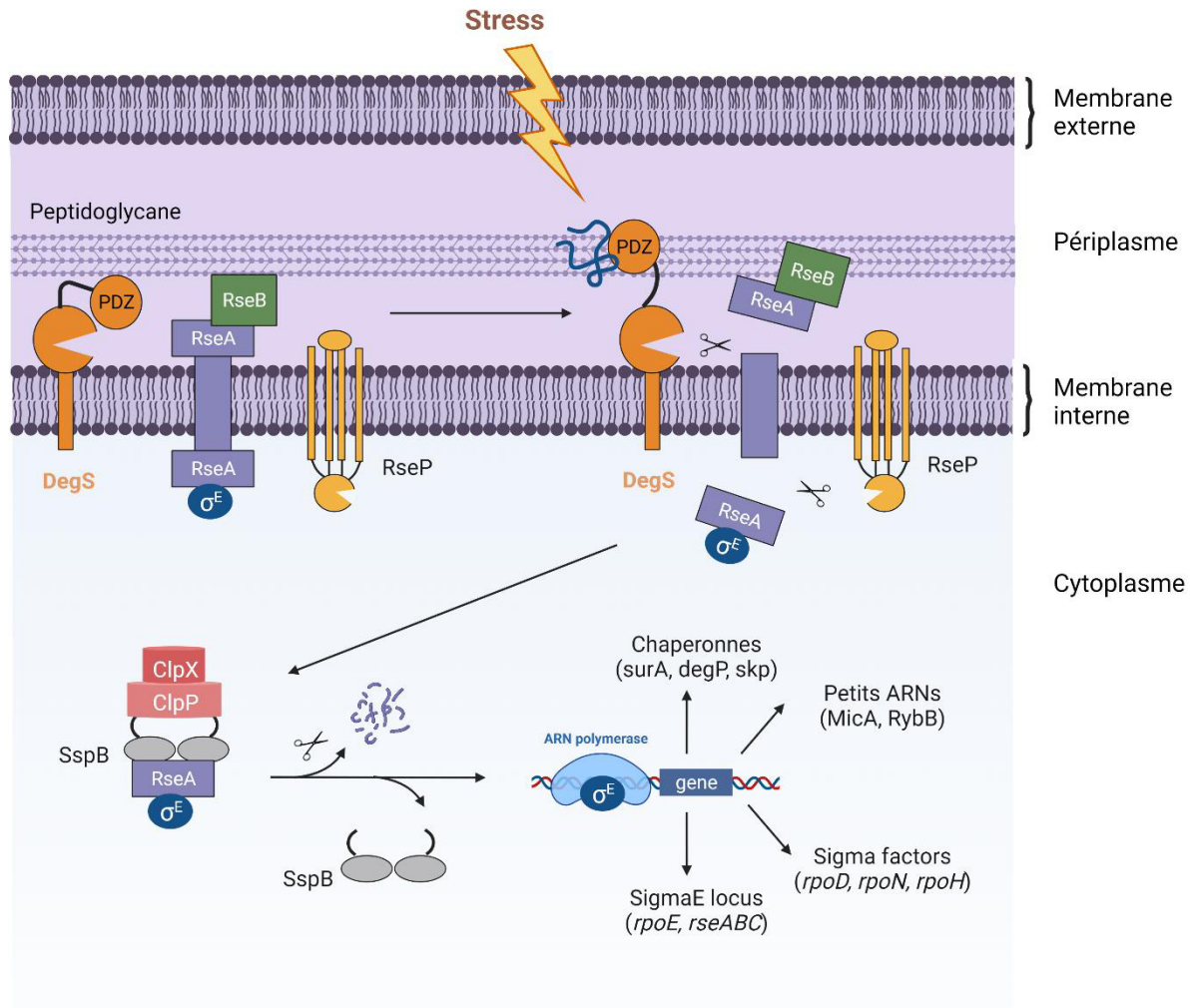


Figure 6 : Représentation schématique du fonctionnement du système  $\sigma^E$

En présence de protéines mal repliées, un changement de conformation se produit à la suite de la liaison des protéines mal repliées au domaine PDZ de DegS. Le domaine protéasique de DegS est alors exposé et clive le domaine périplasmique de RseA. RseP clive ensuite le domaine cytoplasmique de RseA, libérant une partie de RseA liée à  $\sigma^E$  dans le cytoplasme. La liaison de la protéine adaptatrice SspB au complexe RseA- $\sigma^E$  recrute la protéase ClpXP qui réalise la dégradation de RseA et la libération de  $\sigma^E$ .  $\sigma^E$  peut alors se lier à l'ARN polymérase et activer la transcription de son régulon. De manière non exhaustive, le régulon de  $\sigma^E$  est composé de son propre locus, de facteurs sigma, de petits ARNs et de protéines chaperonnes.

Cette figure a été adaptée de la publication de Hews et al. (Hews et al. 2019).



## 2.2 - Le système Rcs

Initialement, le système Rcs (Regulator of Capsule Synthesis) a été découvert lors de l'étude sur la régulation des gènes *cps* responsables de la formation de la capsule (Gottesman, Trisler, et Torres-Cabassa 1985). Le système Rcs est un système à deux composants (TCS) non conventionnel. Contrairement au TCS classique, il est constitué de trois protéines centrales, à savoir la kinase hybride transmembranaire RcsC, la protéine transmembranaire RcsD et le régulateur de réponse RcsB (Majdalani et Gottesman 2005).

Le système Rcs répond à de nombreux stress environnementaux tel que le stress acide, le stress métallique ainsi que les variations d'osmolarité mais il a également été montré que ce système détectait directement le stress de l'enveloppe. En effet, la délétion de gènes requis pour la synthèse de l'enveloppe entraînait une augmentation de l'expression du locus *rsc*. De plus, le système Rcs contribue à la résistance intrinsèque au défaut d'assemblage du peptidoglycane.

### 2.2.1 – Le fonctionnement du système Rcs

En l'absence de tout signal environnemental, d'une part, RcsC et RcsD agissent ensemble comme des phosphatases pour assurer une faible quantité de RcsB phosphorylé dans la cellule (Clarke 2010). D'autre part, l'activité du système Rcs est réprimée par IgaA, maintenant ainsi le signal par phosphorylation minimal en l'absence de stimuli environnementaux (Hussein et al. 2018; Wall, Majdalani, et Gottesman 2020).

L'activation du système Rcs est médiée par des dommages causés à la ME, les défauts de la synthèse du LPS, la perturbation du PG et la mauvaise localisation des lipoprotéines. Des études ont montré que la détection du signal pourrait impliquer les protéines RcsF, IgaA et RcsD. En revanche, le domaine périplasmique de RcsC ne participerait pas à ce phénomène (Wall, Majdalani, et Gottesman 2020). La lipoprotéine de la ME, RcsF, est nécessaire à la perception de plusieurs signaux de stress de l'enveloppe (Majdalani et Gottesman 2005; Castanié-Cornet, Cam, et Jacq 2006). La transduction du signal par RcsF ne serait pas directe mais ce serait son interaction avec IgaA qui neutraliserait l'effet inhibiteur de celle-ci sur le système (Wall, Majdalani, et Gottesman 2020; Hussein et al. 2018). Néanmoins, l'activation du système Rcs par la surproduction de la protéine DjIA n'est pas médiée par la protéine RcsF donc cela signifie qu'il existe plusieurs voies de signalisation (Majdalani et Gottesman 2005).

À la réception d'un stimulus médié par une voie de signalisation préalable, le senseur RcsC s'auto-phosphoryle sur l'histidine 479 puis le phosphate est ensuite transféré sur l'aspartate 875 de son domaine receveur. Le phosphate est ensuite transféré sur l'histidine 842 de RcsD, et finalement au résidu aspartate 56 du domaine receveur de RcsB (Majdalani et Gottesman 2005) (Figure 7A). RcsB une fois phosphorylé peut jouer son rôle de FT en homodimère ou en hétérodimère avec la protéine auxiliaire RcsA. Les sites de fixation à l'ADN seront différents si RcsB est lié ou non à RcsA (Pristovšek et al. 2003). Il a également été démontré que RcsB peut interagir avec de nombreuses protéines auxiliaires, telles que BglJ, MatA et GadE (Castanié-Cornet et al. 2010; Pannen et al. 2016; Venkatesh et al. 2010) (Figure 7B).

Enfin, en l'absence de stimuli externes ou en réponse à certains stress métaboliques, RcsB peut également être phosphorylée par des phosphodonneurs de faible poids moléculaire tels que le phosphate d'acétyle (AcP) (Hu et al. 2013).

### 2.2.2 - Le régulon de Rcs

RcsB peut former des homodimères ou des hétérodimères avec des protéines auxiliaires telles que RcsA, BglJ, MatA et GadE, puis se lier à un motif conservé dans les gènes régulés par Rcs pour activer ou réprimer la transcription. Par exemple, l'homodimère RcsB-RcsB régule positivement la transcription de *rprA* et négativement celle de *gadA* d'une manière dépendante de la phosphorylation de RcsB pour moduler la formation du biofilm et la synthèse de la glutamate décarboxylase, respectivement, chez *E. coli* (Castanié-Cornet et al. 2010). L'hétérodimère RcsB-RcsA active l'expression de l'opéron *csp* et réprime l'expression de l'opéron *flhDC* pour réguler la synthèse du polysaccharide capsulaire acide colanique et des flagelles, respectivement, d'une manière dépendante de la phosphorylation de RcsB dans *E. coli* (Francez-Charlot et al. 2003) (Figure 7A).

Il a été rapporté que la fonction de RcsA dépend de la phosphorylation de RcsB, tandis que les effets d'autres régulateurs auxiliaires, tels que BglJ, MatA et GadE, fonctionnent indépendamment de la phosphorylation de RcsB (Figure 7B). Chez *E. coli*, l'hétérodimère BglJ-RcsB active le gène *bgl* impliqué dans la synthèse des D-glucosides (Venkatesh et al. 2010) ; l'hétérodimère MatA-RcsB active l'opéron *mat* impliqué dans la biosynthèse des *fimbriae* (Pannen et al. 2016) ; l'hétérodimère GadE-RcsB active les gènes *gad* liés à la résistance au stress acide (Castanié-Cornet et al. 2010) (Figure 7B). De manière générale, la participation de multiples protéines auxiliaires confère une flexibilité au système Rcs, permettant ainsi une adaptation fine à des environnements complexes.

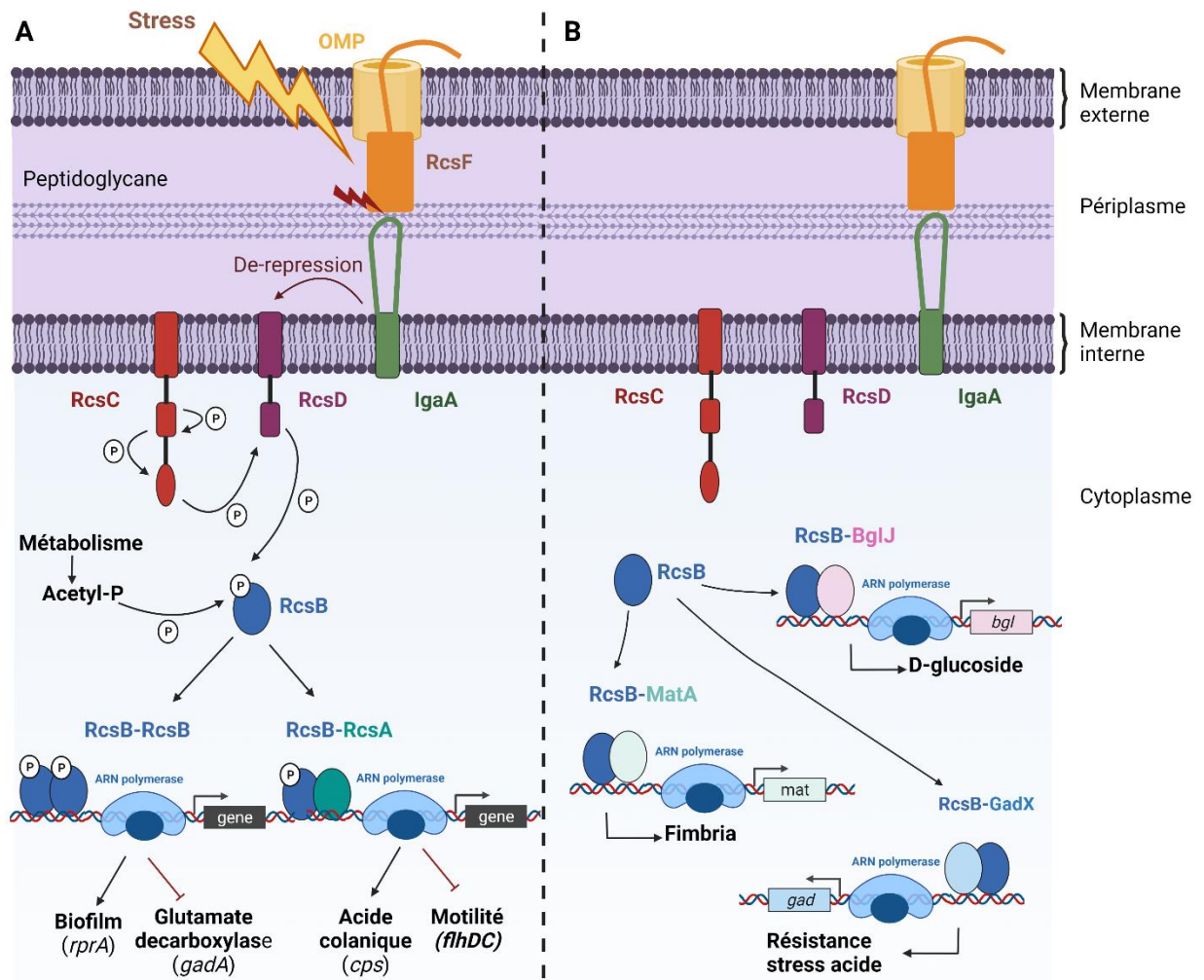


Figure 7 : Représentation schématique du fonctionnement du système Rcs

(A) RcsF, la lipoprotéine de la ME qui détecte les signaux provenant de la ME et du périplasma, se trouve dans une OMP au sein de la ME. Elle est représentée en interaction avec le domaine périplasmique d'IgaA. IgaA, une protéine de la MI qui est un régulateur négatif du relai de phosphate. Le modèle actuel suggère que lors de la signalisation du stress, RcsF augmente ou modifie les contacts avec IgaA, ce qui entraîne la dé-répression du phosphorelais. Ensuite, le RcsC s'autophosphoryle au niveau du domaine HK d'une manière ATP-dépendante. Le phosphate est ensuite transféré au domaine receveur de RcsC, au domaine phosphotransmetteur de RcsD, et enfin à RcsB de manière successive. En l'absence de stress, l'acétylphosphate peut agir comme un donneur de phosphate pour maintenir un faible niveau de RcsB phosphorylé. Une fois phosphorylé, RcsB peut former un homodimère RcsB-RcsB ou un hétérodimère RcsB-RcsA.

(B) De manière indépendante de la phosphorylation de RcsB, RcsB peut former des hétérodimères BglJ-RcsB, MatA-RcsB et GadE-RcsB qui interagissent ensuite avec un motif conservé pour moduler la transcription de gènes cibles, régulant ainsi les activités physiologiques des bactéries.

Cette figure a été adaptée de celle de Meng et al. (Meng, Young, et Chen 2021).

## 2.3 – Le système Cpx

Le système Cpx (Conjugative plasmid expression) a été découvert par McEwen et Silverman, la mutation des gènes *cpxA* et *cpxR* causait une altération de la composition de l'enveloppe (McEwen et Silverman 1982). Cet ESR est un système à deux composants constitué d'un senseur histidine kinase CpxA et un régulateur de réponse CpxR permettant une réponse physiologique adaptée.

### 2.3.1 – Le fonctionnement du système Cpx

En absence de stress, la protéine périplasmique CpxP interagit avec la boucle périplasmique de CpxA et inhibe le système Cpx. De plus, l'activité phosphatase de CpxA maintient CpxR dans un état non phosphorylé (T. L. Raivio et Silhavy 1997).

Une variété de signaux inducteurs activent la réponse Cpx, dont la plupart sont supposés affecter l'intégrité de l'enveloppe et/ou le repliement des protéines en dehors du cytoplasme. Il s'agit notamment du pH alcalin (Danese et Silhavy 1998), de l'expression aberrante du pilus (C. H. Jones et al. 1997), de l'adhésion à des surfaces hydrophobes (Otto et Silhavy 2002), des peptides antimicrobiens (Audrain et al. 2013) et du cuivre (Yamamoto et Ishihama 2006).

En réponse à ces stimuli, CpxA s'autophosphoryle puis transfère son groupement phosphate au régulateur de réponse CpxR (Figure 8). CpxR joue alors son rôle de FT des gènes codant principalement pour la synthèse de protéines chaperonnes, des enzymes de dégradation, des protéines de l'enveloppe et des protéines du complexe respiratoire.

En plus de la détection directe des signaux par CpxA, la transduction du signal est également impactée par la lipoprotéine NlpE et la protéine CpxP. En effet, la surexpression de NlpE a été démontrée comme une condition inductrice de la réponse Cpx chez *E. coli* (Danese et Silhavy 1998) même si elle ne s'avère pas essentielle dans la signalisation de la plupart des signaux induisant la réponse Cpx, comme la surexpression de PapG (DiGiuseppe et Silhavy 2003). Mais il a été proposé que NlpE pourrait permettre au système Cpx de détecter le stress lié au trafic des lipoprotéines et à l'état redox périplasmique (Delhaye, Laloux, et Collet 2019) (Figure 8). Quant à elle, la protéine CpxP est produite lors de l'activation du système Cpx alors que celle-ci inhibe l'activation de CpxA, probablement via son interaction avec la boucle cytoplasmique de CpxA (Tracy L. Raivio, Leblanc, et Price 2013; DiGiuseppe et Silhavy 2003; Tschauner et al. 2014). Cela peut paraître contre intuitif mais il a été montré qu'en présence de protéines de l'enveloppe mal repliées, CpxP jouerait un rôle de protéine chaperonne (Kwon et al. 2010) et serait donc spatialement éloignée de CpxA, et ensuite dégradée par DegP/HtrA (Buelow et Raivio 2005; Isaac et al. 2005; Tschauner et al. 2014). Cela signifie que CpxP inhiberait seulement le système en absence de stress ou lorsque la situation est revenue à la normale et permettrait ainsi de contrôler l'activation du système.

Même si le rôle de CpxP et de NlpE n'est pas essentiel dans la signalisation de Cpx pour la plupart des signaux inducteurs étudiés (DiGiuseppe et Silhavy 2003), ils permettraient une régulation plus fine de la réponse, à la fois en modulant l'activation du système *via* CpxP ou en facilitant la détection d'autres signaux *via* NlpE.

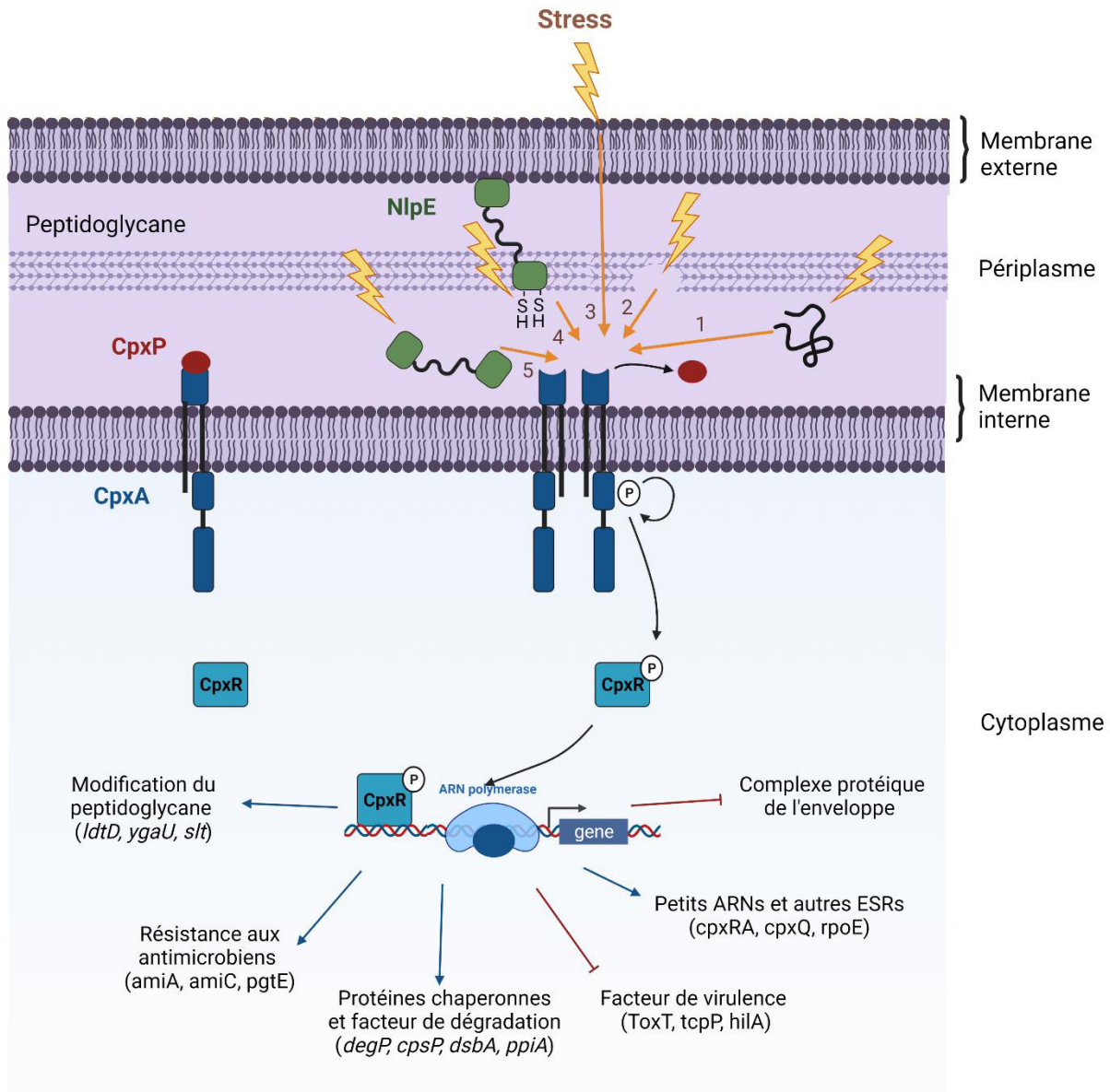
### 2.3.2 - Le régulon de Cpx

Certains des membres les mieux caractérisés du régulon Cpx sont des gènes qui sont impliqués dans le repliement et la dégradation des protéines de l'enveloppe, ce qui suggère un rôle de la réponse Cpx dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe en surveillant et en répondant au stress dû aux protéines de l'enveloppe mal repliées.

Ces gènes régulés par les Cpx comprennent ceux qui codent pour les chaperons périplasmiques CpxP et Spy (Danese et Silhavy 1998), la chaperonne/protéase DegP/HtrA (Danese et al., 1995), l'oxydoréductase formant des liaisons disulfure DsbA (J. Pogliano et al. 1997), la peptidyl-prolyl isomérase PpiA (J. Pogliano et al. 1997), la protéase de la MI HtpX et YccA, un facteur qui module l'activité protéolytique (Tracy L. Raivio, Leblanc, et Price 2013; Yamamoto et Ishihama 2006). La réponse Cpx semble également réguler d'autres ESR, comme l'opéron codant les composants régulateurs de la réponse  $\sigma E$  (*rpoE-rseABC*), qui est régulé négativement (N. L. Price et Raivio 2009). La raison pour laquelle la réponse  $\sigma E$  est régulée négativement par la réponse Cpx n'est pas claire, étant donné que les réponses Cpx et  $\sigma E$  répondent toutes deux au stress lié au mauvais repliement des protéines dans l'enveloppe.

Comme Cpx est un système de réponse au stress qui répond au stress de la MI, un résultat fonctionnel de l'activation de la voie Cpx est la répression transcriptionnelle directe ou indirecte des gènes codant pour les protéines formant des complexes protéiques membranaires non essentiels (Tracy L. Raivio 2014). Les complexes régulés incluent les complexes de la chaîne de transport des électrons (*nuo*, *cyo*) et la délétion de ces opérons pendant le stress membranaire dans un mutant  $\Delta cpxR$  peut restaurer l'homéostasie de l'enveloppe (Guest et al. 2017). Il est probable que la régulation de ces complexes facilite l'assemblage des complexes protéiques essentiels, en particulier compte tenu de l'augmentation de l'expression des chaperons et des protéases causées par l'activation de la réponse Cpx (Tracy L. Raivio 2014). La réponse Cpx augmente également l'expression des protéines modificatrices de PG, des gènes liés à l'efflux, et des gènes liés à l'homéostasie des métaux et des oxydoréductions (López, Checa, et Soncini 2018). Ces modifications transcriptionnelles contribuent à restaurer l'homéostasie du PG.





**Figure 8 :** Représentation schématique du fonctionnement du système Cpx

La réponse Cpx détecte et répond à une variété de stress d'enveloppe. Les flèches orange et chiffres correspondants indiquent les signaux inducteurs proposés pour la réponse Cpx : (1) les stress qui conduisent à un mauvais repliement des protéines ; (2) les dommages au peptidoglycane ; (3) les signaux de surface ; (4) la surveillance des états redox périplasmiques ; (5) les défauts de trafic des lipoprotéines de la ME. En l'absence d'induction, l'activité phosphatase de CpxA maintient CpxR non phosphorylé. Lors de l'induction, le phosphotransfert de CpxA phosphorylée vers CpxR conduit à la modulation par CpxR phosphorylé de la transcription de gènes impliqués dans plusieurs processus. Les gènes présentés sont représentatifs, mais non exhaustifs, du régulon Cpx.

Cette figure a été adaptée de la publication de Hews et al. (Hews et al. 2019).

## 2.4 – Le système Bae

Un quatrième ESR, le système Bae (Bacterial adaptative response) a été découvert en étudiant les régulateurs du gène *spy* codant pour une protéine chaperonne, déjà connue comme étant régulée par le système Cpx (Raffa et Raivio 2002).

Le système Bae est un TCS composé du senseur BaeS et du régulateur de réponse BaeR. La protéine BaeS détecte notamment les flavonoïdes (Leblanc, Oates, et Raivio 2011), les métaux (Leblanc, Oates, et Raivio 2011; Da Wang et Fierke 2013; Zhou et al. 2003), l'indole (Raffa et Raivio 2002) et l'éthanol (Bury-Moné et al. 2009), cela induit son autophosphorylation. Une fois phosphorylé, elle peut transférer son groupement phosphate sur le régulateur de réponse BaeR. BaeR joue son rôle de facteur de transcription des gènes codant des fonctions inconnues, des pompes à efflux et une protéine chaperonne (Spy) (Figure 9A). Ces effets rendraient Bae bien adaptée pour répondre à l'exposition à des molécules toxiques dont la cellule peut être protégée par l'efflux. En effet, la surexpression de BaeR entraîne une résistance à la novobiocine et aux sels biliaires (Nagakubo et al. 2002).

## 2.5 – Le système Psp

La réponse au stress Psp (Phage shock protein), nommée d'après la protéine de choc phagique (Brissette et al. 1990), tend à être activée par des perturbations importantes de la MI qui entraînent une perte de la force proton motrice (PMF, pour Proton Motive Force) (van der Laan et al. 2003; Maxson et Darwin 2004; Becker et al. 2005). Le système Psp est activé par de graves perturbations de la MI. Il peut s'agir d'une infection par un phage filamenteux, d'un choc thermique extrême, d'un choc osmotique, d'une exposition à l'éthanol (Brissette et al. 1990), d'une exposition à un solvant organique (H. Kobayashi, Yamamoto, et Aono 1998), de perturbations de la sécrétion de protéines (S. E. Jones et al. 2003) et de la localisation des OMP au niveau de l'IM (Carlson et Silhavy 1993). Bien que l'on ait pensé que la Psp était induite directement par des changements dans la PMF, le signal inducteur semble être plus compliqué.

L'activateur transcriptionnel, PspF, est empêché d'agir dans des conditions non inductrices par une interaction physique avec PspA (Figure 9B). La détection du signal reste méconnue bien qu'au moins certains signaux semblent être directement détectés par PspA 108,113,114. Lorsqu'ils sont activés, PspB et PspC se lient à PspA qui libère PspF (Yamaguchi et al. 2013). PspF est un activateur transcriptionnel qui interagit avec l'ARN polymérase contenant  $\sigma^{54}$  (le facteur sigma de réponse à la carence en azote) pour augmenter la transcription de *pspA*, *pspB*, *pspC*, *pspD*, *pspE* et *pspG* (S. E. Jones et al. 2003; G. Jovanovic, Weiner, et Model 1996). En plus de séquestrer PspF, PspA agit comme un effecteur dans la réponse Psp en se liant au feuillet interne de l'IM et en empêchant la fuite des protons à travers la membrane (Kleerebezem, Crielaard, et Tommassen 1996; R. Kobayashi, Suzuki, et Yoshida 2007) (Figure 9B). En outre, il a été signalé que PspB et PspC ont un rôle direct dans la prévention de la toxicité de la sécrétine (Elderkin et al. 2005). PspD et PspG sont également considérées comme des effecteurs (Goran Jovanovic et al. 2006; Lloyd et al. 2004), bien que leurs fonctions n'aient pas été entièrement caractérisées.

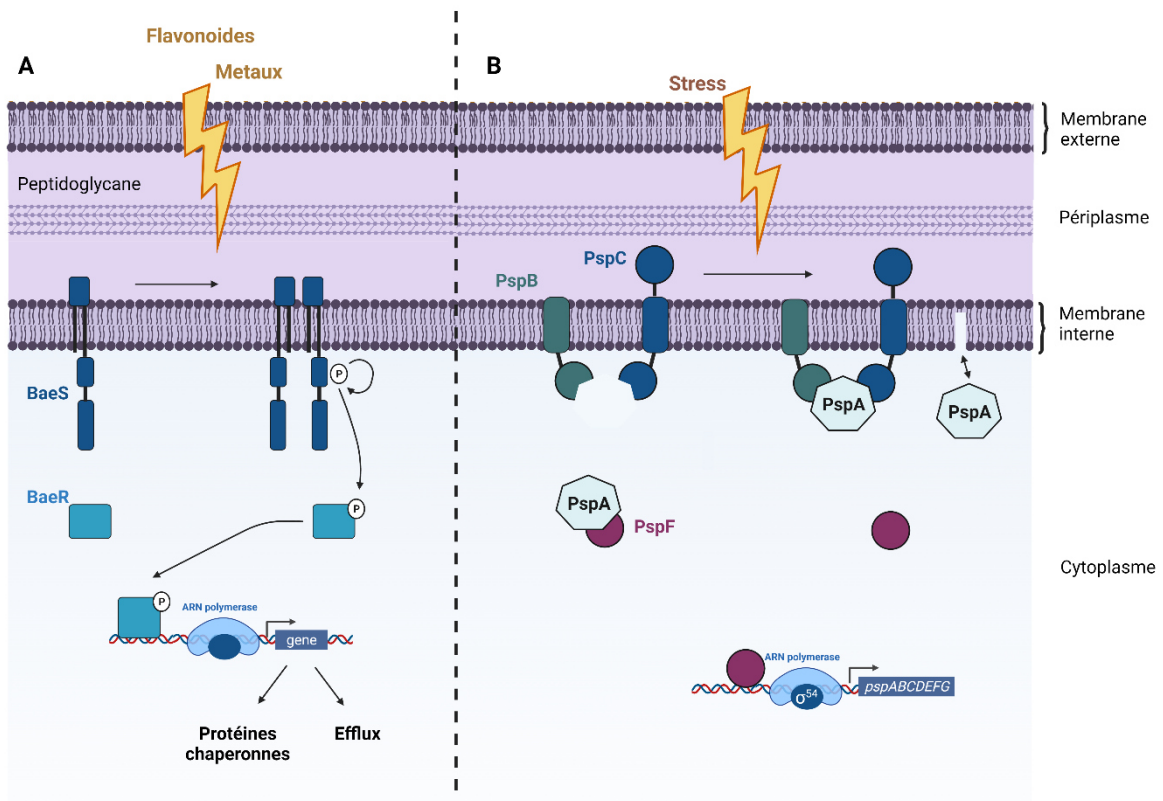


Figure 9 : Représentation schématique du fonctionnement des système Bae et Psp

(A) Le système Bae est activé par l'exposition à des molécules toxiques induisant l'autophosphorylation de l'histidine kinase capteur BaeS. BaeS transfère la phosphorylation au régulateur de réponse BaeR pour l'activer. Une fois phosphorylé, BaeR va jouer son rôle de facteur de transcription et activer l'expression de gènes codants des fonctions inconnues, des protéines chaperonnes et des mécanismes d'efflux.

(B) Le système Psp répond à un dommage grave de la MI. Cela entraîne l'interaction de PspBC avec PspA, permettant à PspF d'interagir avec l'ARN polymérase contenant la  $\sigma^{54}$  pour la régulation transcriptionnelle. PspA agit également comme effecteur en stabilisant directement l'IM.

Cette figure a été adaptée à partir de celle de Mitchell et Silhavy (Mitchell et Silhavy 2019).



## 2.6 – Cinq ESRs avec des régulons distincts et des fonctions complémentaires

Les ESR peuvent être induits par des signaux de stress membranaires communs (antimicrobiens, protéines mal-repliées, indole, métaux, choc thermique ou choc osmotique). Une étude et une comparaison des transcriptomes lors de la surexpression de RpoE, CpxR, PspF, BaeR et RcsB a été réalisée par Bury-Moné *et al.* (Bury-Moné *et al.* 2009). Sur la base des connaissances antérieures et des données actuelles, ils ont pu conclure que chaque voie individuelle contrôle un ensemble de gènes impliqués dans la réponse cellulaire, et montrent peu de chevauchement avec les autres voies (Figure 10). Les ESRs sont donc des mécanismes complémentaires qui aboutissent à une réponse adaptative complète.

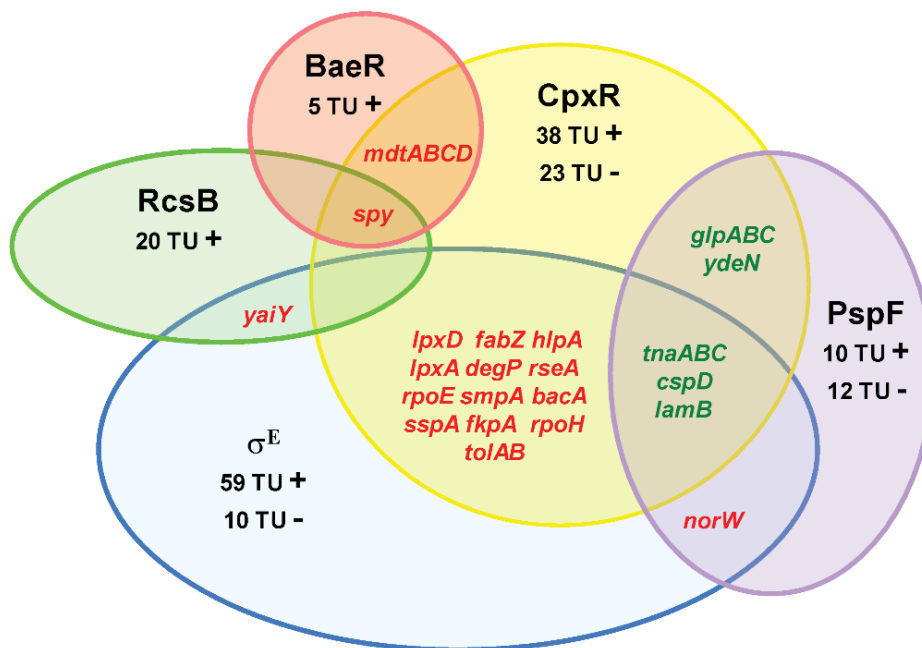


Figure 10 : Diagramme de Venn des gènes effecteurs des cinq ESRs

Une étude comparative des transcriptomes des principaux ESRs ( $\sigma^E$ , Cpx, Psp ; Bae et Rcs) a été réalisée. Le nombre total d'unités transcriptionnelles (TU pour transcriptionnal unit) affectées par la surexpression de chaque régulateur est indiqué dans les aires respectives. Pour chaque régulateur, la régulation est indiquée par un + pour une régulation positive et un - pour une régulation négative. Le régulon Cpx comprend les gènes affectés par la surproduction ou la délétion de CpxR (les gènes réprimés ou induits par l'absence de cpxR sont comptés + et -, respectivement). Seuls les gènes communs à au moins deux régulons et confirmés par qRT-PCR et/ou la littérature sont listés (rouge : induit, vert : réprimé). Les gènes décrits dans la littérature comme dépendant de CpxR et  $\sigma^E$  ou BaeR sont également inclus.

Cette figure est issue de la publication de Bury-Moné *et al.* (Bury-Moné *et al.* 2009).

### 3 – Rôle crucial des ESRs chez les pathogènes entériques

L'implication des ESRs SigmaE, Cpx et Rcs dans la pathogénie de *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium*, *Salmonella* et *Proteus mirabilis* sera décrite dans la suite de cette partie.

#### 3.1.1 - *Escherichia coli* pathogènes

##### 3.1.1.1 - Le système Rcs

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) sont responsables d'infections digestives. Ces deux bactéries adhèrent aux cellules intestinales à l'aide de lésions d'attachement et d'effacement dont les effecteurs sont codés par le locus d'effacement des entérocytes (LEE). Chez les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) O157 : H7, le système Rcs à l'état inactif régule négativement l'expression des gènes de l'îlot de pathogénicité du LEE en inhibant le gène régulateur *pch*, tandis que le système Rcs à l'état actif régule positivement l'expression des gènes de l'îlot de pathogénicité du LEE en induisant l'expression du gène *grvA*, ce qui conduit à une expression accrue des protéines effectrices du système de sécrétion de type III (T3SS) (Toru Tobe et al. 2005). L'augmentation de ces facteurs de virulence conduit à l'amélioration de l'adhésion et de l'invasion des bactéries aux cellules hôtes, et favorise finalement sa capacité d'infection (Toru Tobe et al. 2005) (Figure11).

Comme son nom l'indique, le système Rcs est nécessaire à la synthèse des capsules d'acide colanique chez *E. coli* K12 (Gottesman, Trisler, et Torres-Cabassa 1985). L'acide colanique a été identifié comme étant impliqué dans certains aspects de la virulence chez *E. coli*. Par exemple, la mutation de la production d'acide colanique atténue la virulence de *E. coli* APEC chez les poulets (G. Li et al. 2005). D'autre part, un mutant d'*E. coli* O157:H7 déficient en acide colanique est moins tolérant à la chaleur et à l'acide (Mao, Doyle, et Chen 2001), ce qui suggère que cet exopolysaccharide confère un effet protecteur contre les stress environnementaux de l'hôte, tels que la température corporelle et l'environnement acide. Au contraire, Han et al. ont constaté que la surproduction d'acide colanique par *E. coli* altère sa pathogénie et augmente la durée de vie de *C. elegans* et de *Drosophila melanogaster* lors d'une infection (Han et al. 2017).

L'effet le plus étudié du système Rcs est sa capacité à inhiber la motilité bactérienne et l'expression de l'opéron *flhDC*, qui code le maître régulateur de la production des flagelles (Francez-Charlot et al. 2003). Or les flagelles sont considérés comme un organelle de surface jouant un rôle important dans le développement des biofilms d'*E. coli* (Van Houdt et Michiels 2005) et la motilité flagellaire responsable de la viabilité, de la compétitivité et de la pathogénicité dans le stade précoce de l'infection par *E. coli* (Josenhans et Suerbaum 2002).

Des études ont montré que le petit ARN RprA dans *E. coli* est régulé positivement par le système Rcs, et il peut s'apparier à l'extrémité 5' de l'ARNm *rpoS* (codant pour le facteur sélectif  $\sigma$ ,  $\sigma_s$ ), augmentant ainsi le niveau de traduction de l'ARNm *rpoS* (Majdalani, Hernandez, et Gottesman 2002). L'activation du système Rcs peut conduire à une augmentation de l'expression de RprA dans *E. coli*, régulant ainsi négativement la formation du biofilm (Majdalani, Hernandez, et Gottesman 2002). Il a été signalé que le défaut de formation de biofilms chez *E. coli* associé à la mutation de *rscC* ou *rscD* est causé par

l'augmentation du niveau d'expression de  $\sigma$  dans les cellules, et ce défaut peut être restauré en mutant *rcsB* ou *rprA* (Ferrières, Thompson, et Clarke, s. d.) (Figure 11).

### [3.1.1.2 – Le système SigmaE](#)

Les souches d'*E. coli* extra-intestinales sont capables de coloniser et de provoquer une infection en dehors de leur niche intestinale habituelle. Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) en sont un exemple et constituent une cause majeure d'infections des voies urinaires. Il a été décrit que les gènes codant les protéines chaperonnes régulés par RpoE *degP* et *skp* sont importants pour la colonisation des voies urinaires par *E. coli* (Redford et Welch 2006). *E. coli* entéropathogène (EPEC) est une cause majeure de diarrhée infantile et sa capacité à adhérer aux entérocytes intestinaux est centrale dans sa pathogénèse. L'adhésine intimine est nécessaire pour l'attachement aux cellules épithéliales et il a été montré que les protéines chaperonnes régulés par *rpoE* SurA, DegP et Skp sont nécessaires pour l'insertion de l'intimine dans la ME (Bodelón, Marín, et Fernández 2009) (Figure 11).

Un autre pathovar d'*E. coli*, *Escherichia coli* adhérent-invasif (AIEC), est capable d'envahir les cellules épithéliales intestinales. RpoE est nécessaire pour la formation de biofilms d'AIEC associés à la maladie de Crohn ; l'inhibition de RpoE par la surexpression de RseAB a entraîné une réduction significative de la formation de biofilms d'AIEC (Chassaing et Darfeuille-Michaud 2013). De plus, RpoE est importante pour l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales par les AIEC (Rolhion, Carvalho, et Darfeuille-Michaud 2007; Chassaing et Darfeuille-Michaud 2013). Les études démontrent que l'inhibition de RpoE conduit à une réduction de l'adhésion et de l'invasion et que cela est en partie dû à une expression réduite des flagelles et des pili de type 1. Cependant, les mécanismes exacts à l'origine des phénotypes observés ne sont pas encore totalement élucidés (Chassaing et Darfeuille-Michaud 2013) (Figure11).

### [3.1.1.3 – Le système Cpx](#)

La pertinence de la réponse Cpx pour la physiologie et la pathogénicité de diverses souches d'*Escherichia coli* est bien documentée (Figure 11). Des études sur MP1, une souche commensale d'*E. coli* isolée chez la souris, ont montré que la délétion de *cpxR* provoquait un grave défaut de colonisation chez la souris (Lasaro et al. 2014). De plus, les souches d'UPEC délétées de *cpxRA* ont une colonisation et une virulence atténuées dans les modèles de souris et de poisson zèbre (Debnath et al. 2013).

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) sont responsables d'infections digestives. Ces deux bactéries adhèrent aux cellules intestinales à l'aide de lésions d'attachement et d'effacement dont les effecteurs sont codés par le locus LEE. L'activation de la réponse Cpx réprime le LEE T3SS dans les EPEC (MacRitchie et al. 2008). Cette régulation se fait par la répression de la transcription de plusieurs opérons LEE et de manière post-transcriptionnelle par l'action de la chaperonne périplasmique et de la protéase DegP/HtrA (MacRitchie et al. 2008; MacRitchie, Acosta, et Raivio 2012). La régulation du T3SS de LEE présente des points communs entre EPEC et EHEC, à savoir le régulateur transcriptionnel Ler (Abe et al. 2008; Mellies et al. 1999).

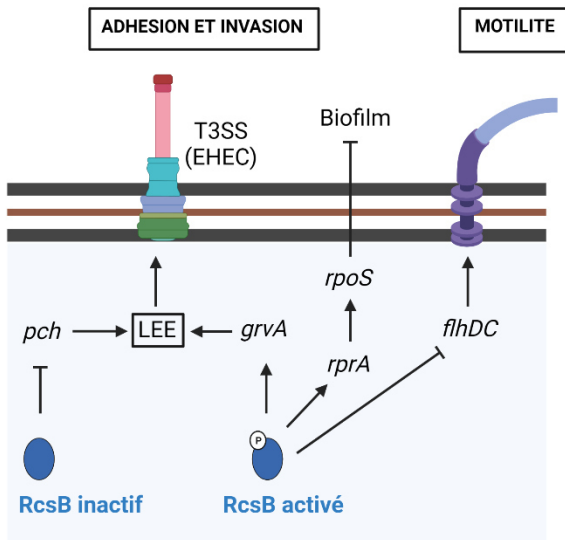
Chez les EHEC, deux études ont montré l'influence du système Cpx sur la régulation de la transcription du locus LEE mais leurs conclusions sont très différentes (De la Cruz et al. 2016; Shimizu, Ichimura, et Noda 2015). Une première étude a montré que l'activité du rapporteur *espA-luxE* était activée en réponse à l'adhésion à des billes de verre hydrophobes et à des cellules Caco-2 indifférenciées, d'une manière qui dépend de NlpE et de CpxA. Dans les cellules adhérentes, NlpE a activé la transcription de *espA* (Shimizu, Ichimura, et Noda 2015). Cela a conduit à la suggestion que l'activation de la réponse Cpx, après la détection de la surface par NlpE, conduit à une régulation positive des gènes LEE, notamment du T3SS, spécifiquement par la régulation CpxR du régulateur positif LhrA (Shimizu, Ichimura, et Noda 2015). Mais une seconde étude a montré que l'augmentation des niveaux de CpxR phosphorylé en l'absence de CpxA réprime les niveaux des protéines translocatrices EspABD codées par LEE5 ainsi que la transcription de *ler*, d'une manière dépendante de la protéase Lon. La surexpression de NlpE a conduit à une réduction de la transcription de *espA*, quantifiée par qPCR (De la Cruz et al. 2016). Néanmoins, la délétion du système Cpx atténuait la virulence des EHECs chez l'insecte *Galleria mellonella*, ce qui suggère que le système Cpx participerait à la virulence des EHECs indépendamment du T3SS (De la Cruz et al. 2016).

La discordance entre ces deux études (Figure 11) pourrait provenir des approches expérimentales utilisées. En effet, des cellules EHEC collées en surface ont été utilisées dans l'étude de Shimizu et ses collègues, alors que l'étude de De la Cruz et al. a été menée principalement sur des cellules cultivées en milieu liquide. D'autres travaux devraient être menés pour élucider l'impact de la détection de la surface sur la modulation de la signalisation Cpx, car il semble que l'adhésion modifie de manière significative la régulation de la virulence par Cpx dans les EHEC.

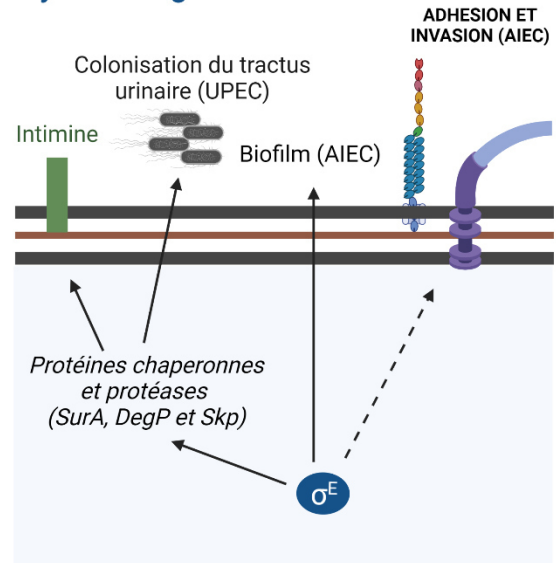
Au niveau moléculaire, de nombreuses études se sont concentrées sur les machineries protéiques localisées dans l'enveloppe, telles que le pilus P des *E. coli* UPEC et le pilus de type 4 (BFP, pour Bundle-Forming Pilus) des *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), qui sont assemblées dans l'enveloppe et jouent des rôles clés dans l'adhésion aux cellules hôtes (Wullt et al. 2000; T. Tobe et Sasakawa 2001). La surexpression des sous-unités PapE et PapG du pilus P active la réponse Cpx. Cette activation de la réponse Cpx n'est pas due à un stress causé par un mauvais repliement des protéines mais à la présence d'une extension N-terminale spécifique sur PapE impliquée dans la polymérisation des sous-unités du pilus. Cela suggère que la réponse Cpx contrôle spécifiquement l'assemblage du pilus (S. E. Jones et al. 2003; Y. M. Lee et al. 2004). Pour corroborer cette hypothèse, la délétion de *cpxR* induit la production de pili P plus courts chez *E. coli* K12 (Hung et al. 2001). La réponse CpxR est aussi capable de réprimer directement l'expression des gènes *pap* (Hernday et al. 2004). Des rôles similaires pour la réponse Cpx dans l'assemblage efficace et l'inhibition de l'élaboration des pili ont été démontrés en relation avec le BFP des EPEC, malgré leur assemblage et leur composition structurelle différents par rapport aux pili P (Vogt et al. 2010; Humphries et al. 2010). En particulier, l'expression efficace de la BFP dépendait des facteurs de repliement des protéines périplasmiques régulés par CpxR, CpxP, DsbA et DegP/HtrA (Vogt et al. 2010). La régulation des complexes multiprotéiques de l'enveloppe par la réponse Cpx n'est pas limitée aux pili, car les flagelles de plusieurs souches d'*E. coli* sont régulées négativement (Shimizu, Ichimura, et Noda 2015).

Il a récemment été montré que la délétion de *cpxR* augmentait la sensibilité au  $\beta$ -lactame mécillinam, mais que l'activation constitutive conduisait à des défauts de forme, de croissance et de division cellulaire (Delhaye, Collet, et Laloux 2016). De plus, ces défauts étaient dépendants de l'expression de *LdtD* (Delhaye, Collet, et Laloux 2016). Ces résultats indiquent un rôle de la réponse Cpx dans le suivi non seulement du contrôle de la qualité des protéines dans l'enveloppe, mais aussi comme facteur régulateur clé pour une bonne intégrité de la paroi cellulaire. La paroi cellulaire est essentielle pour maintenir la forme de la cellule et prévenir la lyse lors de conditions osmotiques changeantes et constitue une cible importante pour de nombreux antibiotiques et stratégies immunitaires innées. La régulation à la hausse des enzymes modificatrices de PG peut servir à renforcer l'enveloppe pendant le stress dans d'autres compartiments de l'enveloppe afin d'augmenter sa stabilité globale. Il est possible que la régulation par Cpx des gènes *ldtD* et *ygaU* codant des enzymes de modification de la paroi soit une stratégie pour faire face au stress de l'enveloppe (Bernal-Cabas, Ayala, et Raivio 2015) découlant de l'immunité innée de l'hôte. Bien qu'il reste des choses à découvrir, ces études indiquent que la réponse Cpx est un régulateur de réglage fin de la structure du PG qui sert à atténuer les stress potentiels de la paroi cellulaire, à la fois dans et hors des hôtes.

### Système Rcs



### Système SigmaE



### Système Cpx

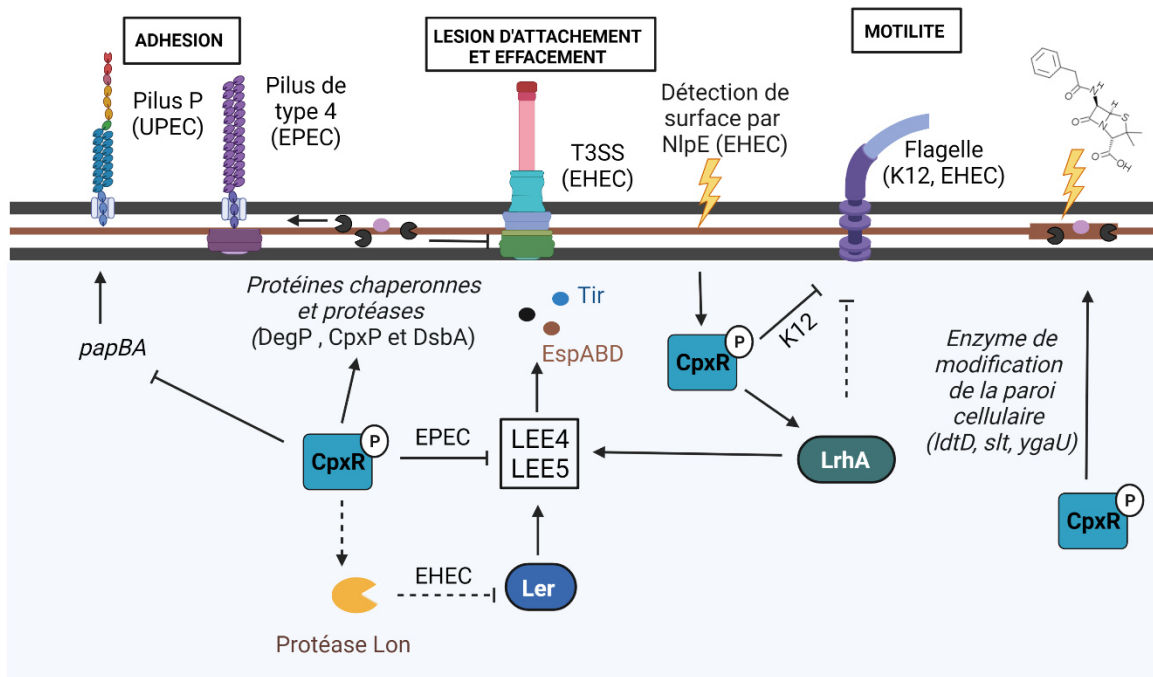


Figure 11 : Schématisation des nouvelles connaissances concernant la régulation de la survie et la virulence par les SigmaE, Cpx et Rcs chez les *E. coli* pathogènes

Les ESR SigmaE, Cpx et Rcs régulent de nombreux facteurs de virulence et des structures de surface, telles que le pilus, le flagelle, l'intimine ou les systèmes de sécrétion chez *E. coli*. En outre, un certain nombre de facteurs spécifiques aux bactéries sont régulés par cet ESR. Il s'agit notamment du locus d'effacement des entérocytes (LEE). Les flèches → représentent une régulation positive et les flèches -| une régulation négative. Les lignes pointillées indiquent les cas où la régulation est indirecte et/ou où les facteurs intermédiaires sont inconnus.

### 3.1.2 – *Citrobacter rodentium*

Le pathogène *Citrobacter rodentium* partage des mécanismes communs avec les EPEC et EHEC, en particulier le LEE, et il a été montré que ce pathogène est un bon modèle pour étudier les infections EPEC et EHEC *in vivo* (Collins et al. 2014).

Des travaux menés par Thomassin *et al.* ont permis de découvrir plusieurs TCS impliqués dans la régulation des propriétés de virulence de *C. rodentium*. Plus précisément, l'inactivation des TCS RstAB, UhpAB, ZraRS, RcsBC et ArcAB entraîne une mortalité retardée chez les souris C3H/HeJ sensibles (Thomassin et al. 2017). Les deux ESRs, Cpx et Rcs, seraient donc impliqués dans la virulence de *C. rodentium*. Seul le rôle du système Cpx a été particulièrement approfondi dans des études récentes.

La délétion de *cpxRA* atténue la capacité de *C. rodentium* à coloniser et dans certains cas à causer la mort des souris (Thomassin et al. 2017; Vogt et al. 2019; Thomassin et al. 2015). L'expression du locus *cpx* est induite pendant l'infection, ce qui suggère que la réponse est activée pendant la colonisation de l'hôte (Thomassin et al. 2017; 2015). La suppression de *cpxP* ou *nlpE* n'a pas eu d'impact significatif sur la colonisation, la virulence ou la capacité à se lier aux cellules HeLa contrairement au mutant  $\Delta cpxRA$  qui a été atténué dans tous ces aspects (Giannakopoulou et al. 2018). L'atténuation de la virulence s'est avérée indépendante de la sécrétion de type III et du taux de croissance, car les profils de sécrétion et les taux de croissance restent relativement les mêmes par rapport au type sauvage chez les mutants  $\Delta cpxRA$  (Thomassin et al. 2015; Vogt et al. 2019).

De manière intéressante, il a récemment été signalé que la délétion des gènes régulés par Cpx *degP/htrA* et *dsbA* entraînait une réduction des niveaux de protéines sécrétées de la protéine translocatrice du système de sécrétion de type III, EspB, chez *C. rodentium* (Vogt et al. 2019). De plus, la délétion de *degP* ou de *dsbA* a rendu *C. rodentium* complètement avirulent, contrairement à la délétion de *cpxRA* qui, dans cette étude, a entraîné une moindre atténuation de la virulence par rapport aux études précédentes (Thomassin et al. 2017; Vogt et al. 2019; Thomassin et al. 2015). La raison de la différence entre ces études est actuellement inconnue. Cependant, la mutation du promoteur de *degP* et *dsbA* de sorte qu'ils ne soient plus sous le contrôle de CpxR n'atténue pas la virulence, ce qui suggère que la régulation Cpx de *degP* ou *dsbA* n'est pas la raison entière pour laquelle ces mutants sont avirulents (Vogt et al. 2019). Dans l'ensemble, ces études indiquent un rôle clé pour la réponse Cpx dans la virulence *in vivo*, mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour caractériser le mécanisme et afin de comprendre la façon dont cela se produit.

### 3.1.3 - *Proteus mirabilis*

#### 3.1.3.1 - Le système SigmaE

*Proteus mirabilis* est une bactérie pathogène humaine causant des infections urinaires importantes et récurrentes (Figure 12). Il a été montré que RpoE avait une action globale dans la pathogénie de *P. mirabilis*. RpoE augmente la survie, l'invasion et la colonisation bactérienne chez la souris notamment en diminuant la mobilité et en augmentant la synthèse des *fimbriae*. De plus, RpoE affecte, l'expression des interleukines 8 (IL-8) par les cellules urothéliales (cellules de la vessie) (Liu et al. 2015).

IL-8 est sécrété par les cellules urothéliales lors de la reconnaissance d'un pathogène afin de recruter les cellules immunitaires. Lorsqu'un mutant  $\Delta rpoE$  est mis en contact avec des cellules urothéliales, la synthèse de l'ARNm IL-8 est augmentée. Le mécanisme proposé est que RpoE est impliqué dans la modification de la composition de l'enveloppe bactérienne ce qui conduit à l'échappement de la reconnaissance antigénique de l'hôte. Ces résultats montrent que l'action de l'ESR RpoE ne se limiterait pas à la régulation de la pathogénie mais pourrait également influencer la réponse immunitaire et augmenter le fitness des bactéries possédant ce système.

Chez *E. coli*, la transcription de *rpoE* est contrôlée par les facteurs sigma RpoD, RpoN et RpoS. RpoD est régulée positivement par le système Rcs lors d'une altération de l'homéostasie membranaire (Klein et al. 2016). Il serait intéressant de vérifier la régulation du système RpoE par Rcs chez *P. mirabilis*. Cela pourrait expliquer la similarité de réponse des deux systèmes dans la mobilité et la formation des *fimbriae* qui sont importants pour l'adhérence aux cellules urothéliales (Figure 12).

#### 3.1.3.2 - Le système Rcs

Comme RpoE, chez *P. mirabilis*, le système Rcs a été montré comme un activateur de la différenciation et la formation de *fimbriae*. Néanmoins, il inhiberait la virulence notamment par la répression de l'expression du gène *zapA* qui code une protéase sécrétée s'attaquant aux Immunoglobulines et des gènes *hpm* qui codent une hémolysine sécrétée s'attaquant aux globules rouges (Howery, Clemmer, et Rather 2016).

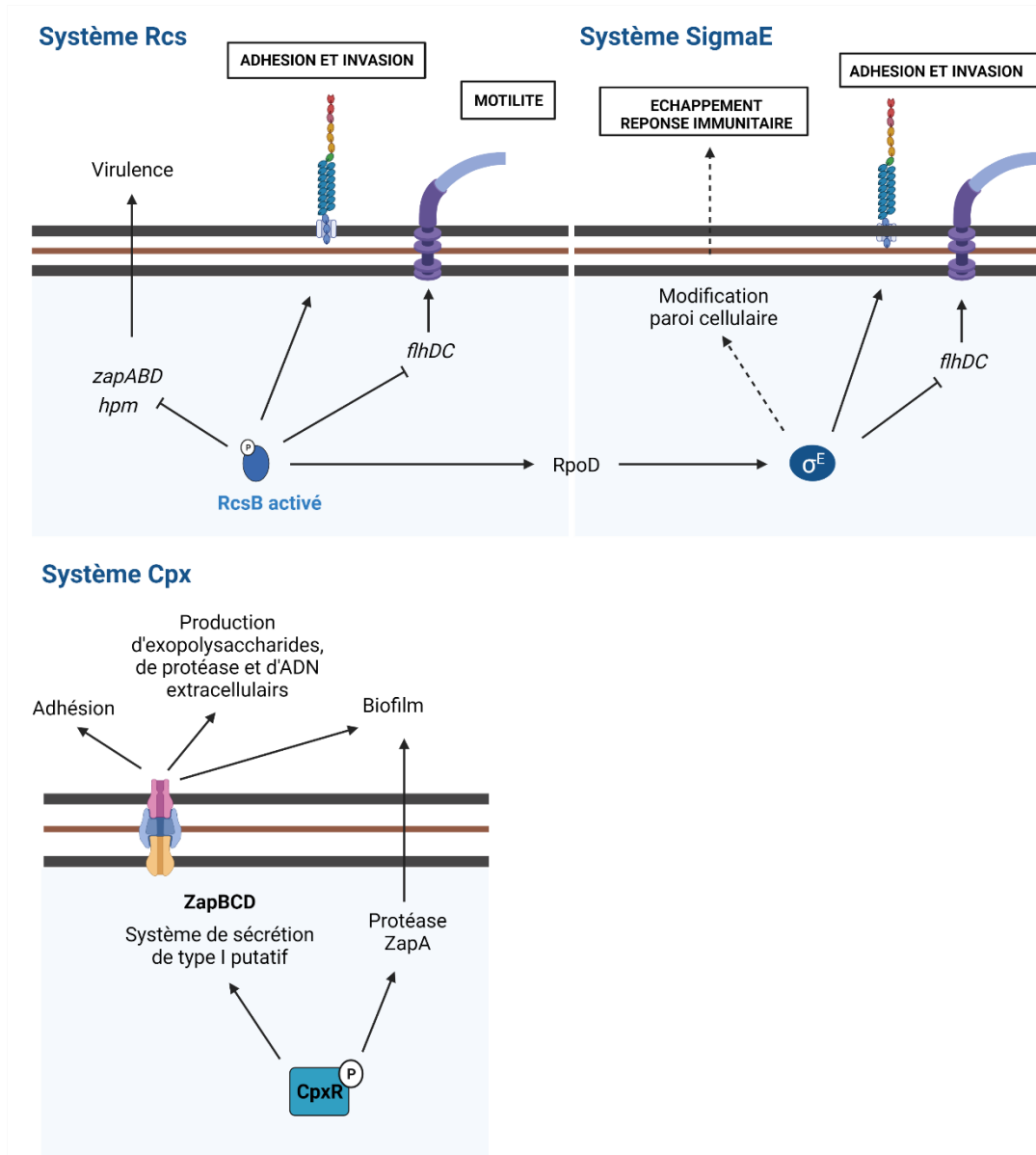
Outre *E. coli*, des études transcriptomiques sur des bactéries telles que *S. enterica*, *Erwinia amylovora* et *Proteus mirabilis* ont également déterminé l'effet régulateur négatif du système Rcs sur la motilité et l'expression du *flhDC* (Howery, Clemmer, et Rather 2016; Mariscotti et García-del Portillo 2009). Semblable au système chez *E. coli*, le système Rcs de ces bactéries peut affecter la motilité cellulaire, la colonisation bactérienne, la formation de biofilms et même la capacité à infecter l'hôte en régulant la biosynthèse des flagelles.

#### 3.1.3.3 - Le système Cpx

Chez *Proteus mirabilis*, le système Cpx régule directement l'opéron *zapABCD* notamment en présence de cuivre. Cet opéron contient *zapA* codant une protéase et *zapBCD* codant pour un système de sécrétion putatif de type 1 (Chen et al. 2020). Les souches mutantes  $\Delta cpxR$ ,  $\Delta zapA$  et  $\Delta zapD$  présentaient également un défaut de formation de biofilms. L'expression de *zapBCD* à partir d'un plasmide a également rétabli la capacité de formation de biofilms du mutant  $\Delta cpxR$ . De plus, les mutants  $\Delta zapD$  et  $\Delta cpxR$  avaient une activité



protéasique, une capacité d'adhésion et d'auto-agrégation et une production d'exopolysaccharides et d'ADN extracellulaire significativement plus faibles que celles du type sauvage (Chen et al. 2020).



*Figure 12 : Schématisation des nouvelles connaissances concernant la régulation de la survie et la virulence par SigmaE, Cpx et Rcs chez Proteus mirabilis*

Les ESR SigmaE, Cpx et Rcs régulent de nombreux facteurs de virulence et des structures de surface, telles que le pilus, le flagelle, l'intimine ou les systèmes de sécrétion chez *E. coli*. En outre, un certain nombre de facteurs spécifiques aux bactéries sont régulés par cet ESR. Il s'agit notamment du flagelle, du fimbriae ou de système de sécrétion. Les flèches  $\rightarrow$  représentent une régulation positive et les flèches  $-|$  une régulation négative. Les lignes pointillées indiquent les cas où la régulation est indirecte et/ou où les facteurs intermédiaires sont inconnus.

### 3.1.4 – Autres Enterobacterales

Le rôle des ESRs dans la pathogénie des entérobactéries décrit ci-dessus n'est pas exhaustif. En plus de ce qui a été décrit précédemment, les ESRs ont un rôle dans la virulence d'autres pathogènes humains. Par exemple, le rôle des ESRs Cpx et SigmaE dans la virulence de *Salmonella* a été très étudié. Mais encore, le système Rcs a été mis en évidence dans l'inflammation et la prolifération bactérienne de *Serratia marcescens* (Castelli et Vescovi 2011; K. J. McMahon et al. 2012; Romanowski et al., s. d.). Enfin le système Psp a également montré une importance dans la virulence de *Salmonella typhimurium* et de *Yersinia enterocolitica* (Karlinsky et al. 2010; A. J. Darwin et Miller 2001; Andrew J. Darwin 2013). De façon générale, le rôle des ESRs dans la pathogénie fait appel à des mécanismes de régulation complexes mais les ESRs semblent jouer un rôle crucial dans la virulence des entérobactéries.

Certains ESRs ont également un rôle dans la virulence de phytopathogènes. En effet, le système Rcs joue un rôle important dans la virulence de *Erwinia amylovora* (Dongping Wang, Korban, et Zhao 2009; Dongping Wang et al. 2012; J. H. Lee, Ancona, et Zhao 2018). Il a également été montré que le système Cpx est essentiel pour la virulence de *Dickeya dadantii* (Bontemps-Gallo, Madec, et Lacroix 2015). Néanmoins le rôle des ESRs chez les phytopathogènes reste méconnu mais ces systèmes pourraient également jouer un rôle crucial dans la réponse au stress et la virulence chez ces organismes.

---

## Chapitre III – Les transporteurs ABC : leurs structures et leurs fonctionnements

---

Comme cela a été décrit précédemment, l'enveloppe assure une perméabilité sélective qui permet de maintenir les conditions physico-chimiques constantes dans le cytoplasme malgré les changements environnementaux. Les protéines membranaires déterminent la perméabilité sélective de la membrane. La plupart de ces transporteurs sont des canaux ioniques ou des transporteurs de la famille des MFS (Major Facilitator Superfamily) qui permettent le mouvement passif de solutés à l'intérieur du cytoplasme. Néanmoins, l'accumulation d'un soluté contre le gradient de concentration nécessite un transport actif.

Parmi ces transporteurs actifs, les transporteurs de type ABC (pour ATP Binding Cassette) sont une des familles de protéines les plus abondantes. Ils sont retrouvés dans tous les organismes, du microbe aux humains. Les protéines ABC jouent de nombreux rôles cellulaires allant du transport de molécules à la réplication/réparation de l'ADN. Malgré ces diverses fonctions, cette famille possède comme caractéristique commune la présence d'un domaine cytoplasmique ABC extrêmement bien conservé, permettant la liaison et l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à la fonction de la protéine.

Les transporteurs ABC permettent d'exporter ou d'importer, de manière unidirectionnelle, une grande variété de composés en utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP. Les molécules transportées peuvent être des petites molécules, des grosses molécules, des molécules chargées positivement ou négativement, des ions inorganiques, des sucres, des protéines, des acides aminés ou des complexes polysaccharides. Les ABC transporteurs peuvent être des transporteurs très spécifiques mais certains peuvent être également multi spécifiques.

### 1 – Topologie générale des transporteurs ABC

Malgré des fonctions cellulaires très diverses, cette large famille possède une topologie extrêmement bien conservée chez les importateurs comme les exportateurs (Figure 13). Les transporteurs ABC sont composés de 4 ou 5 domaines :

- ❖ Deux domaines transmembranaires (TMD, pour TransMembrane Domain)

Les TMDs constituent le canal dans la membrane qui est alternativement accessible du côté intracellulaire ou extracellulaire pour permettre le transport de molécules. Ces domaines sont peu conservés parmi les espèces, ce qui est en accord avec la grande variété des composés transportés au sein de la famille des ABC. Les TMDs sont composés de plusieurs domaines transmembranaires, de protubérance cytoplasmiques et périplasmiques. Entre deux protubérances cytoplasmiques, des hélices dites « de couplage » sont retrouvées et elles interagissent avec le NBD (Nucleotide Binding Domain) (Hollenstein, Dawson, et Locher 2007).

❖ Deux domaines de fixation de l'ATP (NBD, pour Nucleotide Binding Domain)

Les domaines NBDs sont les domaines les mieux conservés parmi la superfamille des protéines ABC puisqu'ils comportent de nombreux motifs conservés qui sont essentiels à l'hydrolyse de l'ATP. Ces domaines sont hydrophiles et interagissent avec les boucles cytoplasmiques des TMDs. Comme leurs noms l'indiquent, ils sont responsables de l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au fonctionnement du transporteur. La liaison de l'ATP induit des changements de conformation dans les NBD, les forçant à se rapprocher et à former un dimère sous forme de sandwich.

❖ Une protéine fixatrice du substrat (SBP, pour Substrate Binding Protein).

Dans certains cas, il peut y avoir un cinquième composant. Il s'agit d'une protéine qui est utilisée pour lier les ligands avec une haute affinité et les délivrer aux composants membranaires responsables de la translocation dans le cytoplasme. Il existe une forte corrélation concernant sa présence ou son absence avec la direction du transport. La présence de la SBP est fortement corrélée avec un transporteur de type importateur. A l'inverse, son absence est fortement corrélée avec un transporteur de type exportateur.

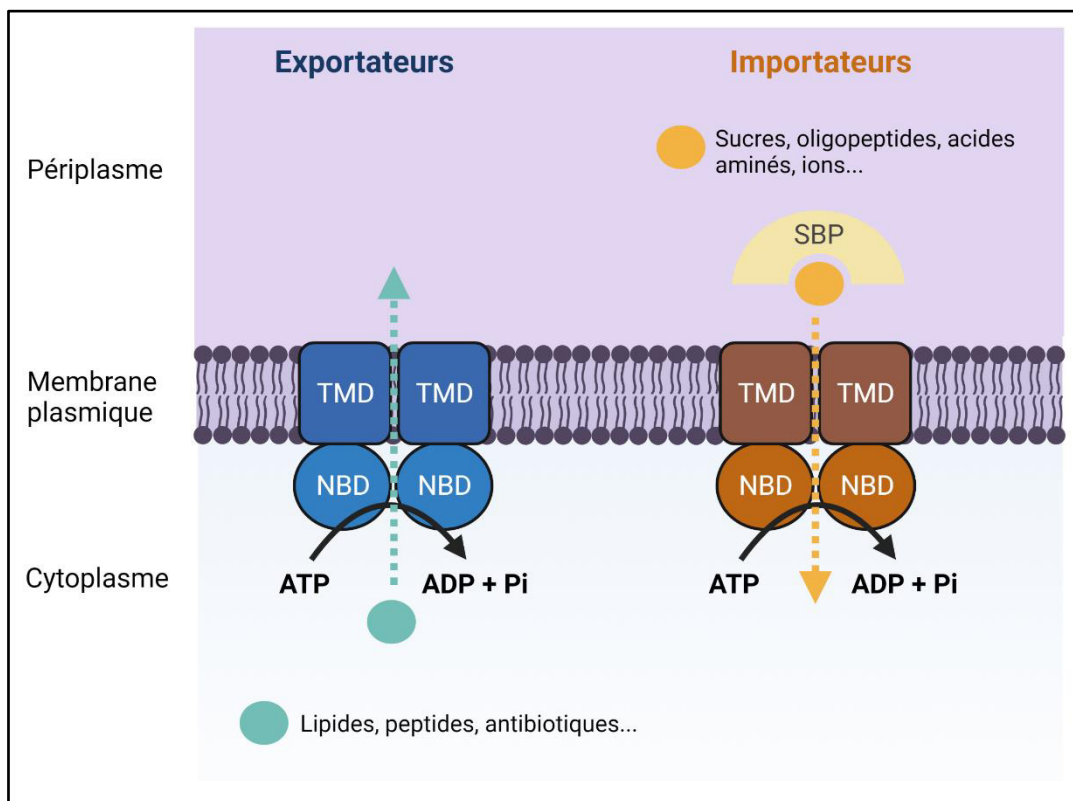


Figure 13 : Topologie générale des transporteurs ABC exportateurs et importateurs

Les transporteurs ABC possèdent 4 domaines : 2 domaines transmembranaires (TMD pour TransMembran Domain) et 2 domaines de fixation de l'ATP (NBD pour Nucleotide Binding Domain). Les transporteurs ABC importateurs possèdent généralement un cinquième composant qui est une protéine périplasmique fixatrice du substrat (SBP pour Substrate Binding Protein). Les composés pris en charge par les transporteurs ABC sont très divers, de l'ion aux antibiotiques.

## 1.1 - Les trois classes de transporteurs ABC

En 2001, Dassa *et al.* élaborent un arbre phylogénétique en se basant sur plus de 600 protéines NBDs (Dassa et Bouige 2001). L'arbre phylogénétique simplifié est présenté dans la figure 14. Cette étude permet de regrouper les protéines homologues des bactéries, des archées et des eucaryotes. Cela permet de distinguer 3 classes de transporteurs ABC ainsi que 29 familles (Figure 14). Les trois classes, déterminées par cette étude, correspondent assez bien aux trois divisions fonctionnelles des systèmes ABC, c'est-à-dire les importateurs, les exportateurs et les autres.

### ❖ La classe 1 des transporteurs ABC

Cette classe est composée de transporteurs ABC avec des domaines NBDs et TMDs fusionnés. Elle contient en majorité des systèmes d'exportation. Les fusions peuvent être soit du type ABC-IM, soit du type IM-ABC. Le qualificatif IM-ABC signifie que le domaine TMD (aussi appelé IM) est en N-terminal et que le domaine NBD (aussi appelé domaine ABC) est en C-terminal alors que les fusions de type ABC-IM signifie que le domaine NBD est en N-terminal et le domaine TMD en C-terminal. Seules les familles CCM et MCM ne suivent pas cette organisation structurale et ressemblent à celles des protéines de classe 2 et 3 respectivement (Dassa et Bouige 2001).

### ❖ La classe 2 des transporteurs ABC

Cette classe comprend des protéines avec deux domaines NBDs répétés en tandem et ne comprend pas de domaine TMD. Ils ne fonctionnent probablement pas comme transporteurs (Dassa et Bouige 2001).

### ❖ La classe 3 des transporteurs ABC

Cette classe contient des systèmes avec des domaines TMDs et NBDs portés par des chaînes polypeptidiques indépendantes. La plupart des transporteurs ABC de cette classe correspondent à des importateurs (Dassa et Bouige 2001). Les importateurs dépendent généralement de la présence d'une protéine fixatrice du substrat (SBP) extracellulaire distincte qui reconnaît les substrats avec une grande affinité. Cependant, la classe 3 contient plusieurs transporteurs qui ne possèdent pas de SBP et qui ne peuvent pas être liés de manière concluante à l'importation. Il a été proposé que ces systèmes, impliqués dans la résistance aux médicaments et aux antibiotiques ou dans la biogénèse des polysaccharides extracellulaires, participent à l'exportation de ces molécules (Davidson *et al.* 2008).

La suite de cette partie traitera des domaines structuraux des NBDs, des TMDs et des SBPs.

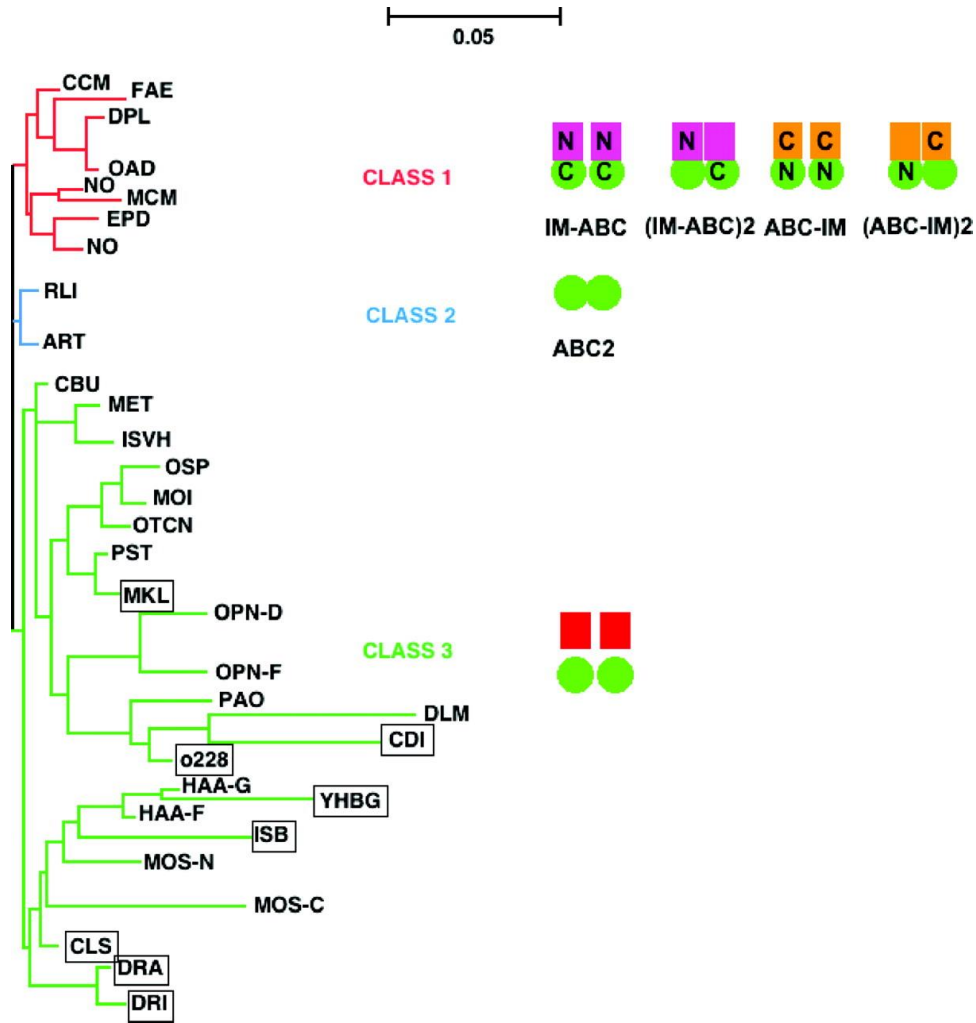


Figure 14 : Arbre phylogénétique simplifié des transporteurs ABC du vivant

Sur la partie gauche, l'arbre phylogénétique est présenté ainsi que les principales subdivisions de l'arbre correspondant aux trois classes de transporteur ABC. Sur la partie droite, les topologies des transporteurs ABC sont représentées de manière schématique. Les domaines NBDs sont représentés par un cercle vert et les domaines TMDs sont représentés par un rectangle de couleur. La branche rouge correspond aux transporteurs ABC de la classe 1. Ces systèmes ont des domaines NBDs et TMDs fusionnés. Ils correspondent principalement aux exportateurs. Les transporteurs ABC symbolisés avec un rectangle violet correspondent à ceux avec des TMDs à l'extrémité N-terminal alors que ceux symbolisés par un rectangle orange correspondent à ceux avec des TMDs à l'extrémité C-terminal. Les domaines N- et C-terminaux sont symbolisés respectivement par un N et un C. La branche bleue correspond aux transporteurs ABC de classe 2. Ces systèmes ont des domaines NBDs en tandem et aucun domaine TMD connu. La branche verte correspond aux transporteurs ABC de classe 3. Ces systèmes ont des domaines TMDs et NBDs portés par des chaînes polypeptidiques indépendantes. Ils correspondent principalement à des importateurs. Les noms des familles encadrés sont des systèmes qui pourraient être des exportateurs.

Cette figure provient de la publication de Davidson et al. (Davidson et al. 2008).

## 1.2 – Les domaines de fixation de l'ATP (NBDs)

Tous les transporteurs ABC contiennent deux NBD, également appelés ATPases ou domaines ABC, qui lient et hydrolysent l'ATP. Les NBD des transporteurs ABC constituent un sous-groupe de la superfamille diverse des NTPases à boucle P (Vetter et Wittinghofer 1999) et dépendent des ions magnésium pour la catalyse. Chaque NBD se compose de deux sous-domaines : le domaine de type RecA, que l'on trouve également dans d'autres ATPases à boucle P, et le domaine  $\alpha$ -hélicoïdal qui est unique aux transporteurs ABC (Figure 15B). Les NBDs sont constitués par un ensemble spécifique de huit motifs hautement conservés : la boucle (A-loop), la boucle P ou motif de Walker A, le motif de Walker B, la boucle D (D-loop), la boucle H (H-loop), la boucle Q (Q-loop) et le motif signature des ABC (ABC motif) (Figure 15C).

La boucle Q est située à l'interface entre les deux sous domaines des NBDs, le sous-domaine de type RecA et le sous-domaine  $\alpha$ -hélicoïdal. La boucle Q est également un site majeur d'interaction avec les TMDs (Figure 15A). Le motif de signature ABC se trouve dans le sous-domaine  $\alpha$ -hélicoïdal et c'est un motif caractéristique de la superfamille ABC. Il a été établi que chez certains transporteurs ABC, il participerait à la dimérisation des deux NBDs (Ramaen et al. 2005).

Les différents motifs participent notamment à la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Par exemple, l'interaction du motif signature des ABC avec l'ATP a été mise en évidence dans certains transporteurs (Smith et al. 2002). De son côté, la boucle A aide le positionnement de l'ATP et le motif de Walker A (GXXGXGK(S/T)) interagit avec le phosphate  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP. La boucle H contient un résidu histidine très conservé qui, en interagissant avec l'aspartate conservé de la boucle D, contribue aux positionnements de la molécule d'eau, de l'adénine et du magnésium. Le motif de Walker B contribue à coordonner l'ion magnésium via le résidu aspartate conservé. Adjacent à ce motif, un résidu glutamate conservé agit comme le résidu catalytique de l'hydrolyse de l'ATP (Orelle et al. 2003). Les changements de conformation de la boucle D affectent la géométrie du site catalytique et contribuent à la formation du site d'hydrolyse de l'ATP.

Les deux NBD des transporteurs ABC peuvent adopter différentes orientations l'un par rapport à l'autre : ils peuvent se serrer l'un contre l'autre (conformation fermée) ou se dissocier partiellement (conformation ouverte) (Figure 15A). Il existe deux sites de liaison à l'ATP à l'interface entre les deux monomères, qui sont reliés par une (pseudo)symétrie double. La liaison à l'ATP favorise la formation de la conformation fermée car chaque molécule d'ATP interagit avec des motifs des deux NBD (Figure 15A). C'est uniquement lorsque les monomères sont serrés les uns contre les autres que l'hydrolyse de l'ATP peut avoir lieu. La libération du phosphate et de l'ADP après l'hydrolyse de l'ATP déstabilise le dimère et permet aux NBDs de s'écarter. De plus, au cours de ce cycle catalytique, le sous-domaine de type RecA et le sous-domaine  $\alpha$ -hélicoïdal au sein de chaque NBD tournent l'un vers l'autre lorsque l'ATP est lié et s'éloignent l'un de l'autre après l'hydrolyse et la libération de l'ADP et du phosphate. De cette façon, l'énergie chimique de l'hydrolyse de l'ATP est transformée en énergie conformationnelle qui peut être transmise aux TMD pour favoriser l'accès alterné de la voie de translocation du substrat aux deux côtés de la membrane.



Bien que les dimères possèdent deux sites d'hydrolyse de l'ATP, cela ne signifie pas forcément que les transporteurs ABC utilisent deux molécules d'ATP. En effet, certains transporteurs ABC contiennent un seul site ATPase complet car le second site est dégénéré (Procko et al. 2009; P. M. Jones et George 2013). Cependant, ce n'est pas une propriété universelle, par exemple, dans le transporteur de maltose MalEFGK2, deux sites ATPase fonctionnels sont requis (Fetsch et Davidson 2002).

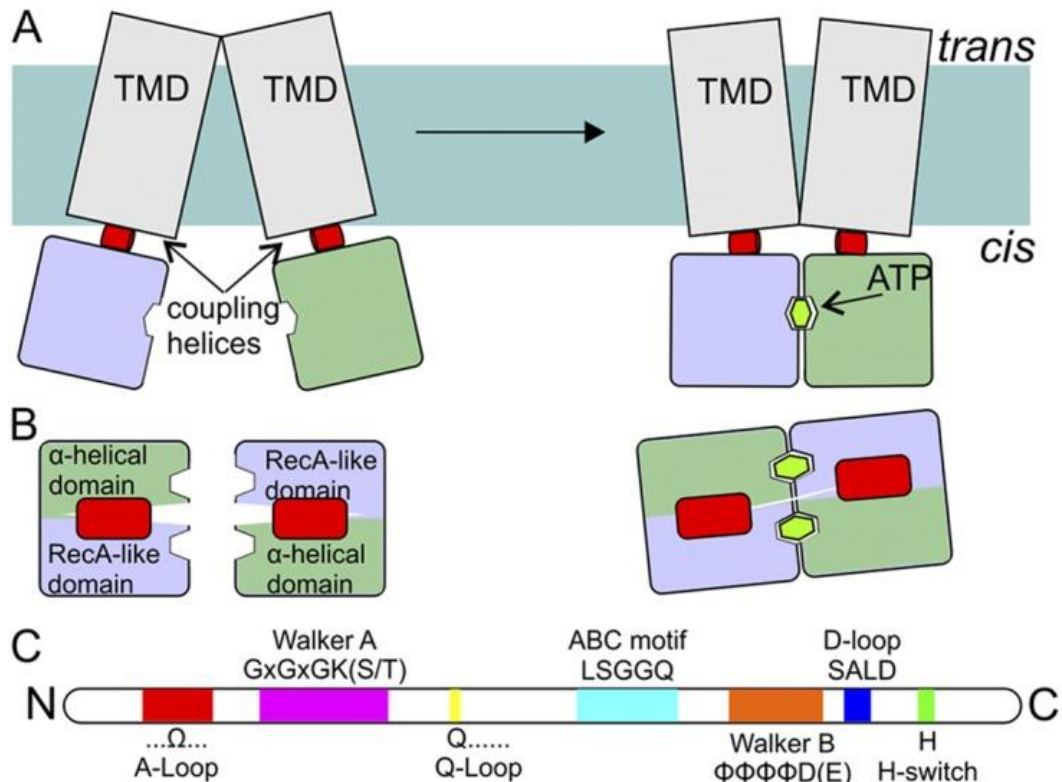


Figure 15 : Représentation schématique des NBDs et des différents motifs conservés

(A) Au niveau de la membrane, les NBDs sont attachés aux TMDs (en gris) via des hélices de couplage (en rouge) présentes dans les boucles des TMDs. La liaison et l'hydrolyse de l'ATP provoquent des réarrangements dans les NBDs, qui sont propagés aux TMDs via les hélices de couplage. (B) Les hélices de couplage des TMDs et des NBDs ainsi que les NBDs sont présentés vue de dessus. Les NBDs sont composés du domaine  $\alpha$ -hélicoïdal en vert et domaine de type RecA en violet. (C) Les positions relatives des motifs de séquence dans les NBDs sont représentées : boucle A en rouge; Walker A en magenta; Walker B en orange; boucle D en bleu; boucle H en vert; motif ABC en bleu cyan et boucle Q en jaune.

Cette figure provient de la publication de Beek et al. (ter Beek, Guskov, et Slotboom 2014)



### 1.3 – Les domaines transmembranaires (TMDs)

Au contraire des NBDs, les TMDs présentent des repliements et des topologies distincts. La variété de structuration des TMDs en lien avec la variété de molécules transportées pourrait amener à bouleverser la classification préalablement établie par Dassa et Bouige (Dassa et Bouige 2001). En effet, en 2001, Dassa et Bouige avaient élaboré un arbre phylogénétique qui avait permis de réaliser la première classification des transporteurs ABC (Chapitre III, partie 1.1 ; (Dassa et Bouige 2001)). Mais en 2020, en se basant sur les nouvelles connaissances structurales des TMDs, une classification revisitée a été proposée par Thomas et al. (Thomas et al. 2020) (Figure 16).

La proposition d'une nomenclature révisée provient de la richesse récente des structures des transporteurs ABC déterminées par cristallographie aux rayons X et par microscopie cryo-électronique à une seule particule, qui a dévoilé une diversité remarquable de repliements des TMDs. L'abondance d'informations structurales fournit l'occasion d'introduire une nomenclature universelle qui combine les analyses phylogénétiques précédentes avec les nouvelles découvertes provenant des structures à haute résolution. La nomenclature regroupe les transporteurs ABC en types distincts, I à VII, sur la base du repliement de leur TMD (Thomas et al. 2020) (Figure 16).

Les types I à III correspondent à des importateurs qui possèdent soit des protéines fixatrices du substrats (SBP) ou un composant transmembranaire de liaison au substrat. Le nombre d'hélices transmembranaires de ces TMDs varient de 5 à 10 (Thomas et al. 2020). Ils sont impliqués dans l'import de molécules essentielles. Par exemple, le transporteur MalFGK<sub>2</sub>-E de type I transporte le maltose (Bao et Duong 2014), le transporteur BtuCD-F de type II prend en charge la vitamine B12 (Borths et al. 2005) et le transporteur LbECF-FoIT de type III prend en charge le folate (Vitamine B9) (Q. Zhao et al. 2015). Ces trois types de transporteurs ABC sont retrouvés seulement chez les procaryotes.

Les types IV et V, mais particulièrement les membres du type IV, ont des fonctions très variées. Les membres du types IV peuvent être des importateurs, des exportateurs, des floppase lipidique, des canaux ioniques et des régulateurs transcriptionnels (Thomas et al. 2020). Le nombre d'hélices transmembranaires de ces TMDs est au nombre de 6. Ces deux types de transporteurs sont présents à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes.

Enfin les types VI et VII correspondent à des transporteurs de type exportateurs. Le transporteur Lpt de type VI est connu pour participer au transport du LPS vers la membrane externe (Sperandeo et al. 2007). Le système MacB de type VII est impliqué dans la résistance aux antibiotiques (Greene et al. 2018). De nombreux transporteurs ABC de type MacB interviennent dans divers processus cellulaires, notamment la détection des antibiotiques, la division cellulaire et le trafic des lipoprotéines comme les systèmes FtsEX et LolCDE (Pichoff, Du, et Lutkenhaus 2019; Nickerson et al. 2018). Le nombre d'hélices transmembranaires de ces TMDs est au nombre de 6 pour le type VI et de 4 pour le type VII.

La classification évoluera très certainement avec des nouvelles découvertes de structures des transporteurs ABC.

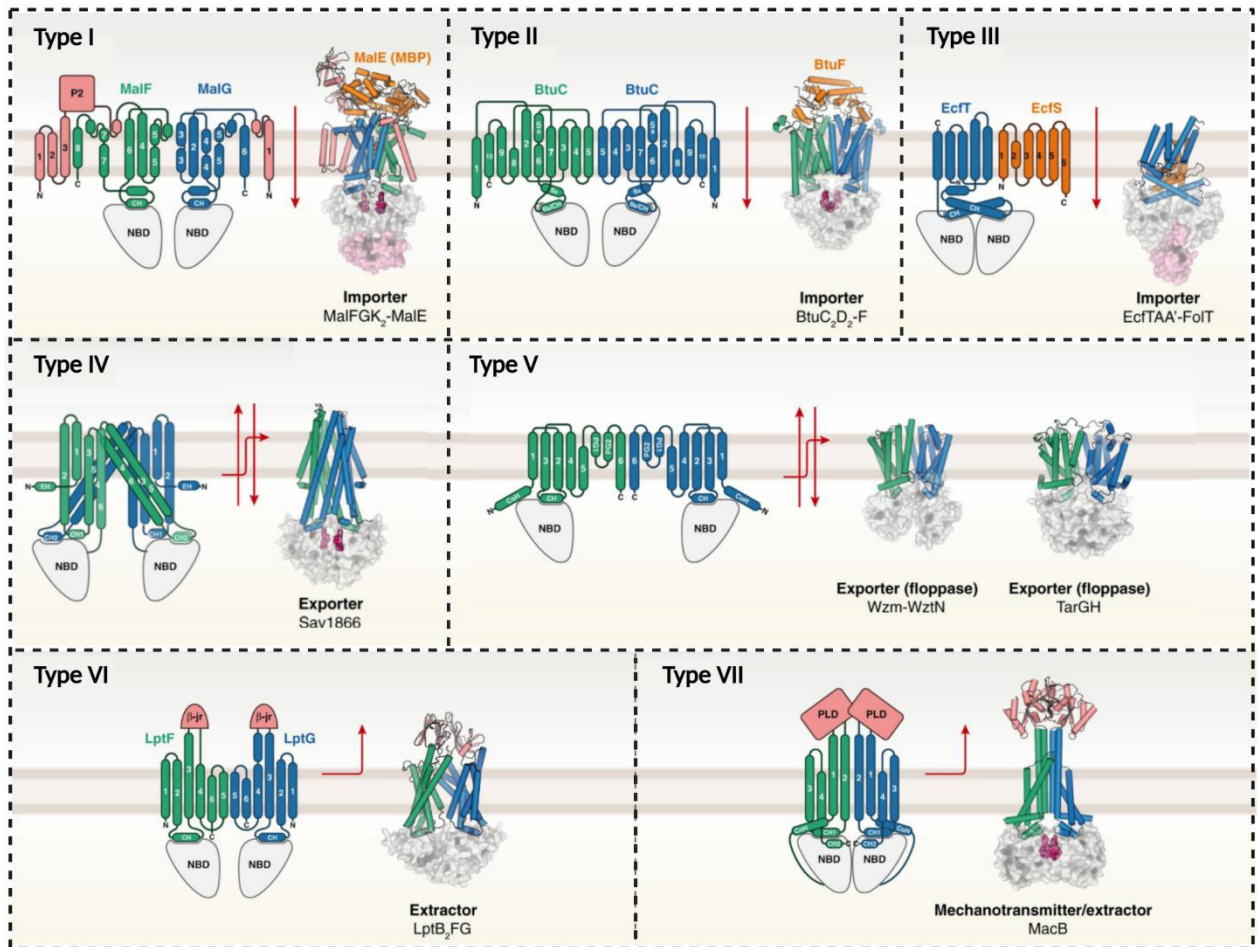


Figure 16 : Classification des transporteurs ABC selon le repliement de leur TMD

Les membres de la superfamille des transporteurs ABC peuvent être regroupés en types distincts en fonction du repliement de leurs domaines TMDs. Seuls les exemples les plus représentatifs sont présentés pour chaque type. Ils ne reflètent pas nécessairement l'abondance ou l'importance du type respectif, mais soulignent la structure commune et la diversité fonctionnelle des transporteurs.

Les deux TMDs de chaque transporteur sont représentés en vert et en bleu, respectivement, sauf dans les cas où les TMD font partie de la même chaîne polypeptidique (couleur bleue uniforme) L'extrémité C-terminal est symbolisée par un C et l'extrémité N-terminale est symbolisée par un N. Les composants de liaison au substrat des transporteurs de type I à III sont illustrés en orange. Les domaines auxiliaires et les hélices supplémentaires (TM) sont représentés en saumon. Dans le type I, le composant de couleur saumon noté P2 est une boucle extra-cytoplasmique. Dans le type II, le composant de couleur saumon noté  $\beta$ -jr correspond à un domaine «  $\beta$ -jellyroll-like ». Dans le type VII, les deux composants de couleur saumon notés PLD correspondent à des domaines périplasmiques. Les directions du transport des substrats sont indiquées par des flèches rouges.

Cette figure a été adaptée à partir de celle de Thomas et al. (Thomas et al. 2020).

## 1.4 – Les protéines de fixation du substrat (SBPs)

La SBP est un constituant soluble des transporteurs ABC qui est situé sur le côté trans de la membrane. Les SBP pour différents substrats présentent des affinités de liaison très variables (Berntsson et al. 2010). Les constantes de dissociation sont souvent de l'ordre de 0,01 à 1  $\mu$ M (Davidson et al. 2008) mais sont parfois beaucoup plus faibles ou plus élevées. Par exemple, MolA de *Haemophilus influenzae* a une affinité d'environ 100  $\mu$ M pour le molybdate et le tungstate (Tirado-Lee et al. 2011) et TbpA de *E. coli* a une affinité de 2,3 nM pour la thiamine (Soriano et al. 2008). Les SBPs sont soit liées par un polypeptide au TMD du transporteur, soit connectées à la membrane par une ancre lipidique ou une hélice transmembranaire séparée, soit diffusent librement dans le périplasma.

Bien que les SBPs puissent varier considérablement en termes de séquence et de taille, et qu'elles aient des spécificités de substrat très différentes, elles partagent une architecture générale hautement conservée avec deux domaines ou lobes qui sont reliés par une région charnière. Sur la base de leur structure et d'une étude phylogénétique, les SBP peuvent être classées en six groupes/clusters différents (tableau 4) (Berntsson et al. 2010). Chaque groupe de SBP reconnaît des types de substrat différents allant des ions (Delepelaire 2019) aux oligopeptides (Slamti et Lereclus 2019) en passant par les sucres et les acides aminés.

*Tableau 4 : Classification des SBPs*

Cluster	Sous-cluster	Type de substrats	Principales caractéristiques
A	I	Métaux, ions	Une seule hélice $\alpha$ rigide relie les deux domaines.
	II	Sidérophores	
B		Glucides, Leu, Ile, Val, autoinducteur-2	Trois segments d'interconnexion entre les deux domaines
C		Di- et oligopeptides, Arg, cellobiose, nickel	Un domaine supplémentaire. Ces SBP sont nettement plus grandes.
D	I	Glucides	Deux charnières relativement courtes entre les deux domaines
	II	Putrescine, thiamine	
	III	Oxyanions tétraédriques	
E		Acide sialique, acides 2-céto, ectoine, acide pyroglutamique	Grande hélice flexible entre les deux domaines. Uniquement associé aux transporteurs TRAP.
F	I	Anions planaires trigones, ligands inconnus	Deux charnières entre les deux domaines comme dans le cluster D, mais ces charnières sont presque deux fois plus longues, ce qui donne plus de flexibilité au SBP
	II	Méthionine	
	III	Solutés compatibles	
	IV	Acides aminés	

*Ce tableau a été adapté à partir des publications (ter Beek, Guskov, et Slotboom 2014; Berntsson et al. 2010).*

## 2 – Les transporteurs ABC de *E.coli*

### 2.1 – Fonctionnement du transporteur MalFGK<sub>2</sub>-E

Les ABC transporteurs ont été découverts chez les bactéries vers 1980. Les deux premiers transporteurs ABC caractérisés sont l'importateur de l'histidine, HisJMQP, chez *Salmonella typhimurium* et l'importateur du maltose, MalFGK<sub>2</sub>-E, chez *E. coli* (Gilson et al. 1982).

Le transporteur MalFGK<sub>2</sub>-E est un des importateurs dont le mécanisme a été le mieux étudié (Figure 17). Ce transporteur est composé de MalF et MalG qui sont les TMDs, d'un homodimère de la NBD, MalK<sub>2</sub> et enfin de la SBP, MalE (Figure 17). Des analyses biochimiques, structurales et biophysiques ont décrypté le mécanisme d'action de ce transporteur ABC. Le maltose et les maltodextrines peuvent traverser la membrane externe via des protéines de la membrane externe (Szmelcman et Hofnung 1975). Une fois dans la périplasme, MalE fixe le maltose ou les différentes maltodextrines avec une forte affinité (Quioco, Spurlino, et Rodseth 1997). MalE fixée au sucre va venir s'amarrer au niveau des TMDs et déclenche un changement conformationnel de MalK<sub>2</sub> qui rend le site de liaison du substrat dans MalF accessible. Le maltose se fixe sur MalF. À la suite de l'hydrolyse de l'ATP, le transporteur reprend son état de repos et le maltose entre l'intérieur de la cellule (Mächtel et al. 2019) (Figure 17). L'étude approfondie du mécanisme de ce transporteur permet de décrypter de manière générale le fonctionnement des importateurs ABC et il pourra être inféré à d'autres transporteurs similaires.

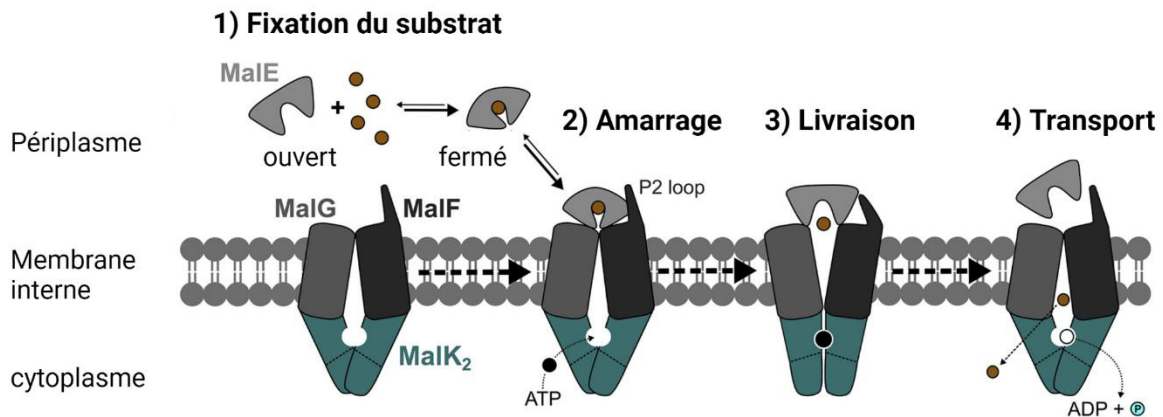
### 2.1 – Les différents transporteurs ABC de *E. coli*

Chez les bactéries, le nombre de transporteurs ABC est relativement variable. Par exemple, *Agrobacterium tumefaciens*, qui est une bactérie retrouvée dans le sol, possède plus de 200 transporteurs ABC alors que certaines bactéries avec un spectre d'hôte restreint en possède très peu (Davidson et al. 2008). *E. coli* K12, quant à elle, possède plus de 70 transporteurs ABC donc 52 fonctionnels (Figure 18). Les transporteurs ABC représentent environ 5% du génome de *E. coli*.

La majorité des transporteurs ABC de *E. coli* sont des importateurs d'une large variété de composés essentiels pour la cellule (45 sur 52, figure 18). En effet, ils importent des minéraux, des ions organiques, des phosphates, des acides aminés, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polyols, des lipides, des peptides et des métaux. On peut supposer que leur fonctionnement est similaire à celui de l'importateur MalFGK<sub>2</sub>-E, précédemment décrit.

*E. coli* possède un transporteur ABC qui n'est pas lié au transport. Il s'agit du transporteur FtsEX, qui est impliqué dans la division cellulaire (Pichoff, Du, et Lutkenhaus 2019).

Enfin elle possède six transporteurs ABC qui sont proches des transporteurs de type eucaryotes et qui jouent ou pourraient jouer un rôle dans l'export. Parmi eux, le transporteur MacB a été décrit comme un transporteur des antibiotiques de type macrolides. (Greene et al. 2018).



*Figure 17 : Fonctionnement de l'importation du maltose par le transporteur ABC, MalEFGK<sub>2</sub>*

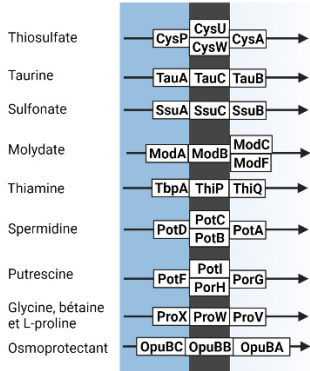
Le transporteur est composé d'une SBP, MalE, de deux TMDs, MalG et MalF ainsi que d'une ATPase en dimère, MalK<sub>2</sub>. L'import du maltose est réalisé en 4 étapes. À la suite de la fixation du maltose, MalE adopte une forme fermée et va aller s'amarrer aux TMDs, cela induit un changement conformationnel des NBDs qui se ferment pour pouvoir hydrolyser l'ATP. À la suite du changement de conformation, le site de liaison de MalF est alors accessible pour accueillir le maltose. Enfin après l'hydrolyse de l'ATP, le transporteur retourne à l'état de repos et le maltose termine sa translocation vers le cytoplasme.

Cette figure a été adaptée à partir de celle de la publication de Mätchell et al. (Mächtel et al. 2019).

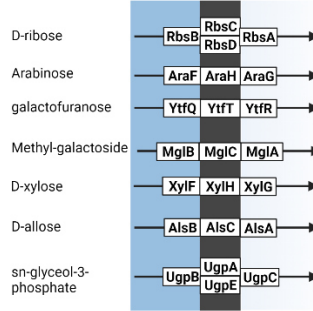
**Transporteurs ABC**

**Transporteurs ABC de type importateur**

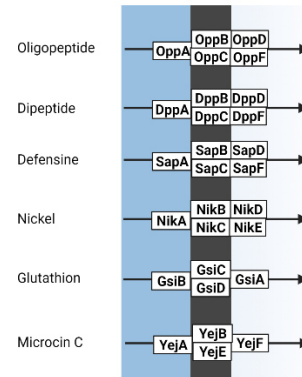
Transporteurs de minéraux et d'ions organiques



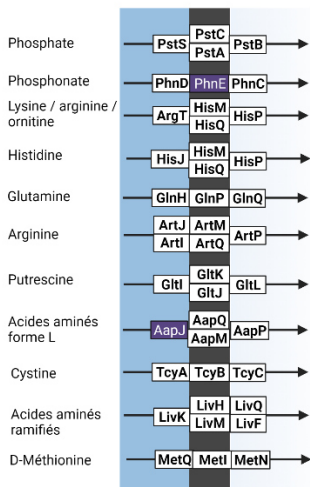
Transporteurs de monosaccharides,



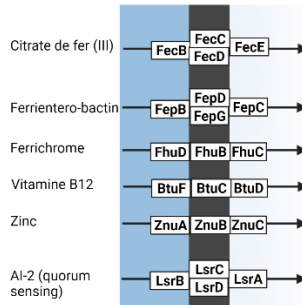
Transporteurs de peptides et de nickel



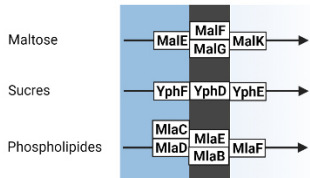
Transporteurs de phosphate et d'acides aminés



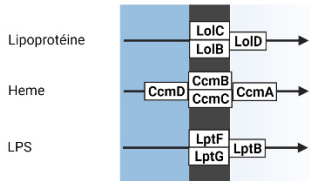
Transporteurs d'ions métalliques, de sidérophores ou de vitamines B12



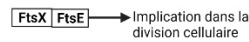
Transporteurs d'oligosaccharides, polyols et lipides



Autres transporteurs



Transporteurs ABC sans fonction dans le transport



Transporteurs ABC de type exportateur

- Sous famille ABCB [MsbA] [MdiA/B]
- Sous famille ABCC [CydC/D]
- Exportateur de macrolide [MacB]
- Autres transporteurs ABC putatifs [YojI] [YddA]

Figure 18 : Les transporteurs ABC chez E. coli K12

Les composants des transporteurs ABC de E. coli K12 ainsi que leurs rôles sont présentés ci-dessus. Le périplasma, la membrane interne et le cytoplasme sont symbolisés respectivement en bleu, noir et bleu clair. Lorsque le composant est dans le cadre violet, cela signifie qu'il est non fonctionnel (AapJ/YhdW et PhnE). Les transporteurs sont divisés en trois types : importateurs, exportateurs et sans fonction dans le transport. Les données ont été collectées à partir de la base de données KEGG ([https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?eco02010](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?eco02010)).



---

## Objectifs de thèse

---

### 1 – Le système à deux composants, ZraPSR

Comme il a été évoqué dans le début de l'introduction, les bactéries sont soumises à des environnements très changeants voire hostiles. L'intégration des signaux de stress environnementaux dans les réseaux de régulation transcriptionnelle est fondamentale dans l'adaptation des bactéries. Certains environnements perturbent l'enveloppe et génèrent des stress membranaires et activent la réponse au stress de l'enveloppe. Dans la littérature, 5 ESRs principales ont été décrits chez *E. coli* : RpoE, Cpx, Rcs, Bae et Psp. Néanmoins, la découverte de nouveaux ESR n'est pas à exclure. Récemment, le système ZraPSR a été proposé comme un nouvel ESR (Rome et al. 2018).

Le système ZraPSR est un système de fonctionnement similaire à CpxPAR. Il est composé d'un senseur, ZraS, d'un régulateur transcriptionnel, ZraR, et d'une protéine périplasmique, ZraP. Chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*, le système Zra est fortement induit par le zinc (Appia-Ayme et al. 2011; Petit-Härtlein et al. 2015; Leonhartsberger et al. 2001). De par cette forte induction, il a premièrement été proposé comme un système impliqué dans l'homéostasie du zinc (Leonhartsberger et al. 2001). Néanmoins, il s'est avéré que ce système n'est pas impliqué dans ce phénomène (Petit-Härtlein et al. 2015) mais dans la résistance aux antimicrobiens (Appia-Ayme et al. 2011; Rome et al. 2018). Enfin, les travaux antérieurs au laboratoire ont montré que la délétion du système Zra induisait une sensibilité accrue aux antimicrobiens mais également un défaut de perméabilité membranaire en présence de ces derniers (Rome et al. 2018). Cela pourrait être lié avec un rôle du système ZraPSR dans la réponse au stress de l'enveloppe.

Dans un premier temps, nous avons évalué la conservation du système Zra chez les entérobactéries. Ce système est très conservé en particulier chez les entérobactéries pathogènes. Dans le but de mieux comprendre sa fonction, nous avons choisi d'étudier le système Zra chez *Citrobacter rodentium*, un pathogène murin qui est un modèle robuste et simple à mettre en œuvre. Dans un second temps, nous avons complété son étude chez *E. coli* afin de comprendre le mécanisme d'action moléculaire de ce système. Pour cela nous avons décrypté la fonction de gènes appartenant au régulon ZraR (Figure 19).

#### 1.1 – Quelle est la fonction du système Zra chez *C. rodentium* ? ZraP est-elle impliquée dans la virulence ?

La conservation du système ZraPSR au sein des entérobactéries a été analysée. Il s'avère que le système ZraPSR, lorsqu'il est présent, est conservé dans son intégralité. Le système est conservé chez certains membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, des *Yersiniaceae* et des *Budviciaceae*. Etant donné que le système ZraSR a été mis en avant par Thomassin *et al.* dans le pouvoir pathogène de *C. rodentium* (Thomassin et al. 2017), Le système ZraPSR a été caractérisé chez cette bactérie, selon trois axes : étude de sa régulation transcriptionnelle, analyse de son implication dans la résistance aux antibiotiques ainsi que dans la virulence de la bactérie.

## 1.2 – Quels sont les gènes régulés par ZraR ?

Afin de mieux appréhender le fonctionnement du système ZraPSR, les gènes modulés par ZraR ont été identifiés. Pour cela, une approche d'immunoprécipitation de la chromatine associée à ZraR (ChIP, Chromatin ImmunoPrecipitation) a été mise en œuvre antérieurement au laboratoire. Cette approche a permis d'identifier une quarantaine de sites de fixation de ZraR. J'ai ensuite étudié l'expression des cibles par qRT-PCR entre la souche sauvage et la souche mutante  $\Delta zraR$ . Cette étude a permis d'aboutir à une publication (Rome et al. 2018). Néanmoins, un problème au niveau de la souche mutante  $\Delta zraR$  a été identifié et les analyses ont été refaites. Cela a permis de montrer que le régulateur régule négativement cinq cibles. Parmi ces cibles, les gènes *yrdD* et *yjjY* ont été étudiés en se focalisant sur leur implication dans la résistance aux antimicrobiens.

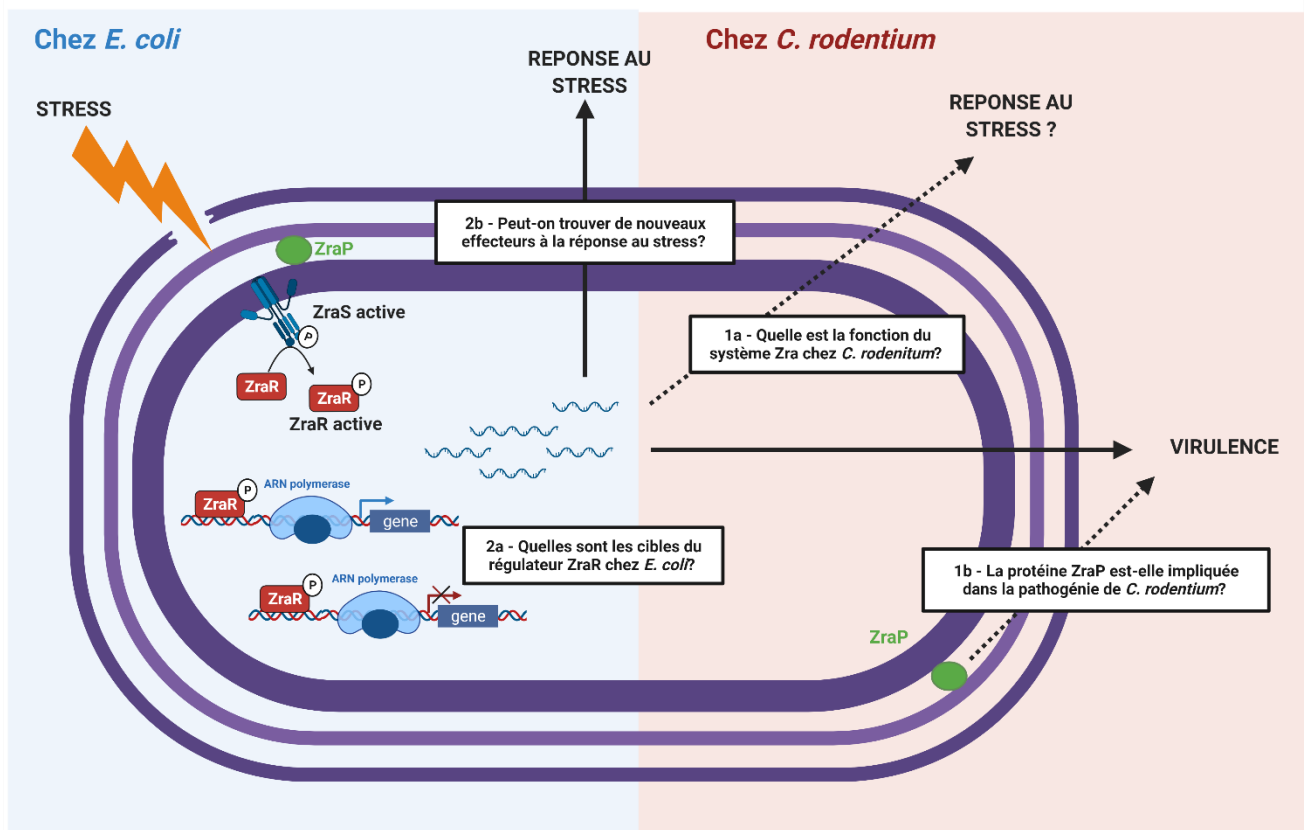


Figure 19 : Caractérisation du système Zra chez *E. coli* et *C. rodentium*



## 2 – Quelle est la fonction du transporteur ABC, YhdWXYZ ?

L'enveloppe des bactéries est une structure qui limite drastiquement la perméabilité. Les échanges avec le milieu sont régulés par des transporteurs. Parmi ces transporteurs, les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) sont impliqués dans le transport d'une large variété de substrats. L'identification des sites de liaison du régulateur ZraR avec l'ADN par CHIP-seq a fait ressortir le transporteur ABC, YhdWXYZ (aussi appelé AapJQMP). Ce transporteur est conservé chez de nombreuses entérobactéries notamment dans la famille des *Enterobacteriaceae*, *Pectobacteriaceae* et *Yersiniaceae*. Le transporteur Yhd a été identifié *in silico* comme un importateur d'acides aminés et expérimentalement chez *Rhizobium leguminosarum* (Linton et Higgins 1998; Walshaw et Poole 1996). Il est composé d'une protéine fixatrice du substrat (SBP), YhdW, de deux domaines transmembranaires (TMD), YhdX et YhdY, ainsi que d'un ATPase (NBD), YhdZ.

L'objectif de ce travail a été de mieux comprendre la fonction de ce transporteur. Nos analyses de séquences montrent que chez certaines bactéries la délétion d'une base a provoqué un décalage de cadre de lecture aboutissant à un codon STOP anticipé et donc à une protéine YhdW tronquée. Aussi, nous avons choisi d'étudier ce transporteur chez une bactérie qui possède la version tronquée de YhdW, *E. coli*, et une bactérie où YhdW est présente dans son intégralité, *C. rodentium* (Figure 20).

Chez *E. coli* K12, nous avons ainsi étudié le phénotype de souches mutantes de ce transporteur ainsi que sa régulation transcriptionnelle et mis en évidence un rôle dans le transport d'antibiotique.

Chez le pathogène murin *C. rodentium* et chez le phytopathogène *Dickeya dadantii*, le système Yhd est présent dans son intégralité. Le système a été particulièrement étudié chez *C. rodentium*. Des analyses biochimiques et génétiques ont été menées et montré un rôle de ce transporteur dans le transport des acides aminés. De plus, l'implication de ce transporteur dans la pathogénie de *C. rodentium* et *D. dadantii* a été évaluée.

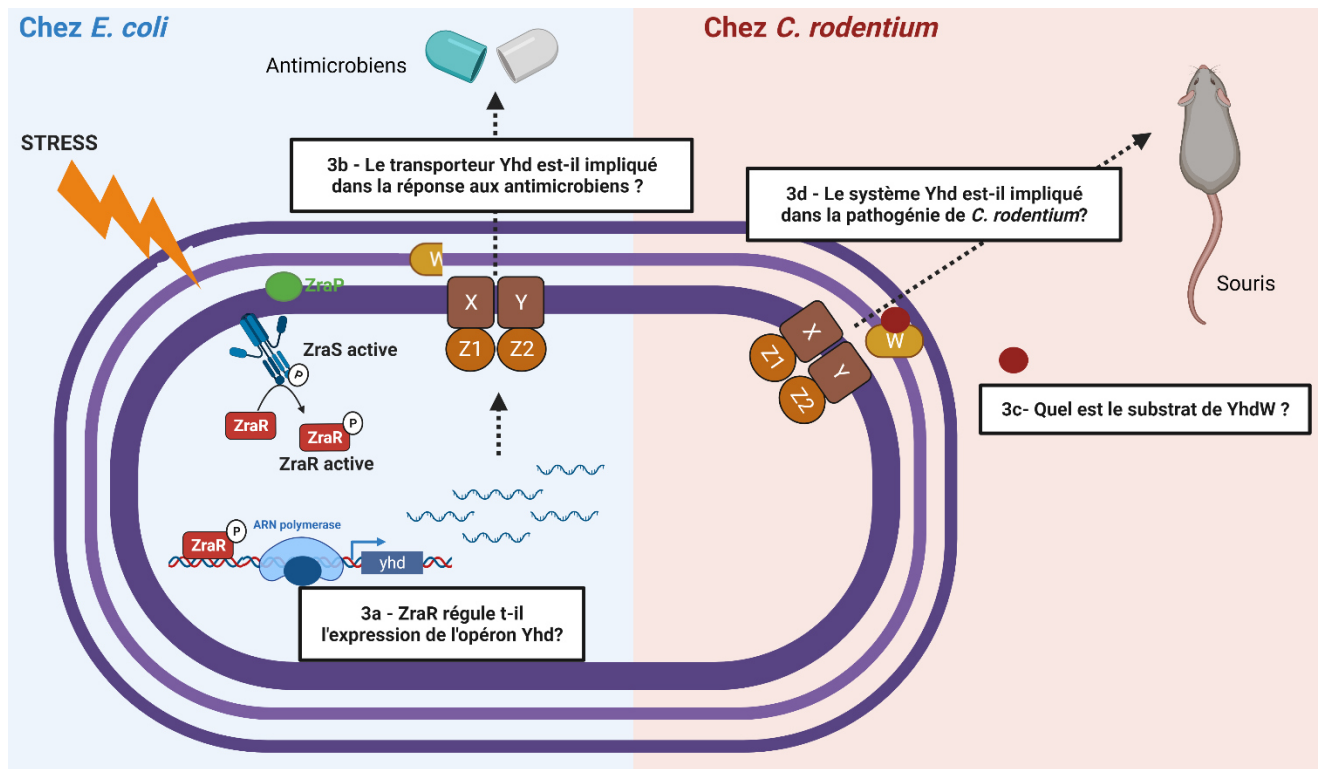


Figure 20 : Caractérisation du système Yhd chez *E. coli*, *C. rodentium* et *D. dadantii*

---

Deuxième Partie :  
Matériel et Méthodes

---

---

## Chapitre IV - Matériels et méthodes

---

### 1 - Méthodes microbiologiques

#### 1.1 - Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et plasmides utilisés sont décrits dans les tableaux 5 et 6. Les souches dérivent de *Escherichia coli* K12 et de *Citrobacter rodentium* DBS100 (ATCC 51459).

#### 1.2 - Composition des milieux de culture

##### 1.2.1 - Milieu riche LB

La composition de ce milieu est la suivante : NaCl 10 g.L<sup>-1</sup> ; bactotryptone 10 g.L<sup>-1</sup> ; extrait de levure 5 g.L<sup>-1</sup> ; pH 7. Ce milieu constitue un milieu nutritif complet utilisé habituellement pour la croissance des bactéries. Il peut également être sous forme solide (GL).

##### 1.2.2 - Milieu minimum M63

La composition de ce milieu est la suivante : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,6 g.L<sup>-1</sup> ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup> ; MgSO<sub>4</sub> 0,2 g.L<sup>-1</sup> ; FeSO<sub>4</sub> 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ; pH 7,2. Ce milieu sert de base minimale et doit être complété par une source de carbone comme du glucose 0,2%, du glycérol 0,2% ou du citrate 0,2%. Il peut être utilisé sous forme solide (G).

##### 1.2.3 - Milieu MacConkey Sorbitol

La composition de ce milieu est la suivante : tryptone (17 g.L<sup>-1</sup>) ; peptone de viande (3 g.L<sup>-1</sup>) ; sels biliaires (1,5 g.L<sup>-1</sup>) ; Sorbitol (10g.L<sup>-1</sup>) ; cristal violet (0,001 g.L<sup>-1</sup>) ; Rouge neutre (0,03 g.L<sup>-1</sup>) ; NaCl (5g.L<sup>-1</sup>), Agar (13,5 g.L<sup>-1</sup>) ; pH 7,1. La gélose Mac Conkey est un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries. En effet, le cristal violet et les sels biliaires, qu'elle contient, sont des agents sélectifs qui freinent le développement des bactéries à Gram positif. L'orientation de l'identification est basée sur l'utilisation du sorbitol, repérable grâce à un indicateur de pH (rouge neutre).

#### 1.3 - Préparation des milieux

Les milieux complets (LB) et minimums (M63) employés sont préparés selon Miller (Miller 1972) sous forme liquide ou solide après addition de 12 g.L<sup>-1</sup> d'agar. Les antibiotiques sont ajoutés s'il y a lieu aux concentrations finales : ampicilline (100 µg.mL<sup>-1</sup>), kanamycine (50µg.mL<sup>-1</sup>) ou de chloramphénicol (20µg.mL<sup>-1</sup>).

Tableau 5 : Souches bactériennes utilisées pour cette étude

Souches	Caractéristiques	Sources
W3110	Souche dérivée de <i>Escherichia coli</i> K12 F- <i>mcrAmcrB</i> IN (rrnD-rrnE)1 $\lambda$	Collection du laboratoire
W3110 $\Delta zraR$	W3110, $\Delta zraR$	(Petit-Härtlein et al. 2015)
W3110 $\Delta zraP$	W3110, $\Delta zraP$	(Petit-Härtlein et al. 2015)
W3110 $\Delta yhdW$	W3110, $\Delta yhdW$	Ce travail
W3110 $\Delta yhdXY$	W3110, $\Delta yhdXY$	Ce travail
W3110 $\Delta yhdWXYZ$	W3110, $\Delta yhdWXYZ$	Ce travail
W3110 $\Delta yrdD$	W3110, $\Delta yrdD$	Ce travail
W3110 $\Delta yjjY$	W3110, $\Delta yjjY$	Ce travail
W3110 $\Delta zraRmdtL$	W3110, $\Delta zraRmdtL$	Ce travail
W3110 $\Delta fliA$	W3110, $\Delta fliA$	Ce travail
BW25113	Souche dérivée de <i>Escherichia coli</i> K12 F- DE( <i>araD-araB</i> )567 <i>lacZ</i> 4787(del)::rrnB-3 LAM- rph-1 DE( <i>rhaD-rhaB</i> )568 <i>hsdR</i> 514	Collection du laboratoire
BW25113 $\Delta zraR$	BW25113, $\Delta zraR$	Ce travail
RCL2	Souche Nal <sup>R</sup> dérivée de <i>Citrobacter rodentium</i> DBS100 (ATCC 51459)	(Gueguen et Cascales 2013)
RCL2 $\Delta zraR$	RCL2, $\Delta zraR$	Ce travail
RCL2 $\Delta zraP$	RCL2, $\Delta zraP$	Ce travail
RCL2 $\Delta yhdW$	RCL2, $\Delta yhdW$	Ce travail
RCL2 $\Delta yhdWXYZ$	RCL2, $\Delta yhdWXYZ$	Ce travail
RCL2 $\Delta asnA$	RCL2, $\Delta asnA$	Ce travail
RCL2 $\Delta asnB$	RCL2, $\Delta asnB$	Ce travail
RCL2 $\Delta asnAasnB$	RCL2, $\Delta asnAasnB$	Ce travail
RCL2 $\Delta asnAasnB yhdWXYZ$	RCL2, $\Delta asnAasnB yhdWXYZ$	Ce travail
3937	Souche dérivée de <i>Dickeya dadantii</i> 3937	Collection du laboratoire
3937 $\Delta yhdWXYZ$	3937, $\Delta yhdWXYZ$	Ce travail
DH5 $\alpha$	Souche dérivée de <i>Escherichia coli</i> K12 F- <i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> - m <sub>K</sub> +) <i>recA1 relA1 supE44 thi-1</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argFV169</i> ), $\Phi$ 80 <i>lacZDM15</i>	(Woodcock et al. 1989)
BL21	Souche dérivée de <i>Escherichia coli</i> B F- <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) (DE3)	(Studier et Moffatt 1986)

Tableau 6 : Plasmides utilisés pour cette étude

Nb : Les clonages sont réalisés à partir de gènes ou d'opéron provenant de *E. coli* sauf mention d'un autre organisme.

Plasmides	Caractéristiques	Source	Rôle
pKD13	Amp <sup>R</sup> , gène de Kan <sup>R</sup> entouré de sites FRT, oriRyR6k	(Datsenko et Wanner 2000a)	Création de mutants
pKD3	Amp <sup>R</sup> , gène de Cm <sup>R</sup> entouré de sites FRT, oriRyR6k	(Datsenko et Wanner 2000a)	
pKD46	Amp <sup>R</sup> , opéron <i>λred γβα</i> inductible par l'arabinose, oriR101, repA101-ts	(Datsenko et Wanner 2000a)	
pKOBEG	Cm <sup>R</sup> , opéron <i>λred γβα</i> inductible par l'arabinose, oriR101, repA101-ts	(Chaveroche, Ghigo, et d'Enfert 2000)	
pRE112	Cm <sup>R</sup> , gène <i>sacB</i>	Collection du laboratoire	
pRE112-YhdXZ	Cm <sup>R</sup> , gène <i>sacB</i> , 500pb amont et aval de l'opéron <i>yhdWXYZ</i>	Ce travail	
pCP20	Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , FLP <sup>+</sup> , oriR101, repA101-ts	(Datsenko et Wanner 2000a)	
pLux	Kan <sup>R</sup> , luxCDABE, Ori p15A	Collection du laboratoire	Fusions transcriptionnelles
<i>PfliA</i> ::lux	Fusion de promoteur <i>fliA</i> de <i>E. coli</i> avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux	Ce travail	
<i>PyhdW</i> ::lux	Fusion du promoteur de <i>yhdW</i> de <i>E. coli</i> avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux	Ce travail	
<i>PyhdW</i> ::lux (RCI2)	Fusion du promoteur de <i>yhdW</i> de <i>C. rodentium</i> RCL2 avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux	Ce travail	
<i>PyhdX</i> ::lux	Fusion du promoteur de <i>yhdX</i> de <i>E. coli</i> avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux	Ce travail	
<i>PyhdX</i> ::lux (RCI2)	Fusion du promoteur de <i>yhdX</i> de <i>C. rodentium</i> avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux	Ce travail	
<i>PzraP</i> ::lux (W3110)	Fusion du promoteur de <i>zraP</i> de <i>E. coli</i> W3110 avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux	(Petit-Härtlein et al. 2015)	
<i>PzraP</i> ::lux (RCI2)	Fusion du promoteur de <i>zraP</i> de <i>C. rodentium</i> RCL2 avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux		
<i>PzraS</i> ::lux	Fusion du promoteur de <i>zraS</i> de <i>E. coli</i> avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux	(Petit-Härtlein et al. 2015)	
<i>PzraS</i> ::lux (RCI2)	Fusion du promoteur de <i>zraS</i> de <i>C. rodentium</i> RCI2 avec les gènes <i>luxCDABE</i> dans pLux	Ce travail	

Tableau 6 : Plasmides utilisés dans cette étude (suite)

Plasmides	Caractéristiques	Source	Rôle
pUC18	Amp <sup>R</sup> , vecteur de clonage	(Yanisch-Perron, Vieira, et Messing 1985)	Complémentation de mutation
pUC18- <i>yrdD</i>	Gène <i>yrdD</i> et son promoteur clonés dans pUC18	Ce travail	
pET30	Kan <sup>R</sup> , promoteur T7, vecteur de surexpression	Novagen	Surproduction de protéine
pET30-YhdW (RCL2)	ORF <i>yhdW</i> (RCL2) clonée dans pET30	Ce travail	

#### 1.4 - Conditions de culture et conservation des souches bactériennes

Les cultures sont généralement effectuées à 37°C en milieu LB. Pour assurer une croissance et une bonne aération, la culture est réalisée en milieu liquide sous agitation (130rpm) en erlenmeyer ou tube rempli au 1/5<sup>ième</sup>. L'ensemencement s'effectue à partir d'un centième d'une préculture en phase stationnaire de croissance cultivée dans la même condition que la culture finale. Pour les croissances en milieu solide, les boîtes sont généralement incubées à 37°C en aérobiose. Le nombre de bactéries est estimé par mesure de la turbidité, exprimée en unités de densité optique à 600nm (D.O. <sub>600nm</sub>). Une unité de D.O. <sub>600nm</sub> correspond à environ 4,5.10<sup>8</sup> bactéries par mL. Les souches sont conservées à 4°C sur boîtes de pétri ou à -80°C dans leur milieu de culture additionné de glycérol 15%.

#### 1.5 - Détermination de seuil de toxicité des métaux pour différentes souches bactériennes

Des précultures liquides sont effectuées comme précédemment décrits en absence de métaux jusqu'à l'obtention d'une D.O. <sub>600nm</sub> de 0,6. Ces cultures sont utilisées à D.O. <sub>600nm</sub> finale de 0,006 pour inoculer 200µL de milieu LB supplémenté ou non avec des concentrations croissantes en métaux dans une microplaque de 96 puits. La plaque est placée à 37°C sous agitation (280rpm) dans l'incubateur du lecteur de microplaque Infinite® 200 Pro (Tecan). Au bout de 10h de culture, la D.O. <sub>600nm</sub> est mesurée et utilisée pour estimer la croissance des différentes souches. Le pourcentage de survie en présence des différentes concentrations de métaux est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ survie} = \frac{\text{Croissance bactérie avec métal (D. O. 600nm)}}{\text{Croissance bactérie sans métal (D. O. 600nm)}} \times 100$$

### 1.6 - Dénombrement après stress biocide sur milieu solide

Les bactéries sont mises en culture dans du LB à 37°C sous agitation jusqu'à D.O.  $_{600\text{nm}}$  de 0,1. Ces cultures sont réparties dans des microtubes dans lesquels un antibiotique ou de l'eau stérile est ajouté. Les bactéries sont ensuite incubées 1h sous agitation à 37°C. Ensuite, les cultures sont diluées en cascade d'un facteur 10 à 10000 dans du LB. Puis 50 $\mu\text{L}$  de la dilution  $10^{-4}$  est déposé en mode exponentiel sur boîte de LB agar à l'aide du spiraleur. Le mode de dépôt exponentiel du spiraleur est un ensemencement avec une concentration logarithmique décroissante. C'est-à-dire que la dilution  $10^{-4}$  est étalé au centre puis ensuite elle est diluée jusqu'à  $10^{-7}$  à la périphérie de la boîte. Après 24h d'incubation à 37°C en aérobiose, un dénombrement est réalisé à l'aide du scanner pour estimer la survie bactérienne. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie selon la formule suivante :

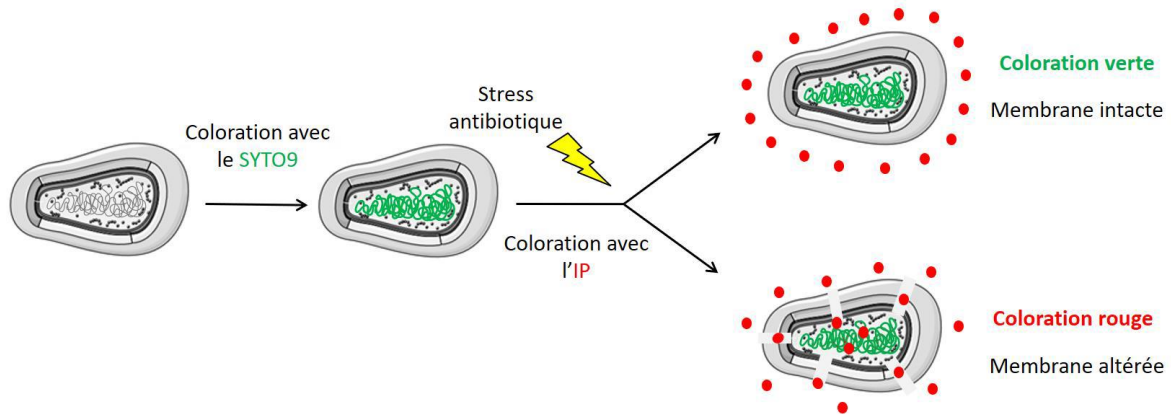
$$\% \text{ survie} = \frac{\text{nb bactérie avec antibiotique (CFU/mL)}}{\text{nb bactéries sans antibiotique (CFU/mL)}} \times 100$$

### 1.7 - Test de perméabilité de l'enveloppe LIVE/DEAD

Une culture bactérienne est réalisée en milieu riche à 37°C sous agitation jusqu'à D.O.  $_{600\text{nm}}$  de 0,1. Cette culture est répartie dans des microtubes avec un antibiotique ou de l'eau stérile. Le dénombrement des cellules présentant un défaut d'intégrité membranaire après traitement a été estimé en utilisant le kit LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>TM</sup> Bacterial Viability (ThermoFisher Scientific). Après 45 min d'incubation à 37°C, en suivant les instructions du kit, 1 $\mu\text{L}$  de SYTO9<sup>®</sup> ainsi que 1 $\mu\text{L}$  d'Iodure de Propidium (IP) sont rajoutés et les cellules sont de nouveau incubées sous agitation à 37°C durant 15min. Chaque culture a été déposée sur une lame de milieu LB 1% agarose selon la méthode décrite par Lesterlin et Dubarry (Lesterlin et Dubarry 2016). L'observation des bactéries est réalisée avec un microscope à fluorescence Eclipse Ti-E microscope (Nikon). L'acquisition des images a été réalisée pendant 10 ms pour le SYTO9<sup>®</sup> et l'IP en les excitant à 488 nm et 560 nm respectivement. Toutes les cellules sont marquées en vert par le SYTO9<sup>®</sup>. En revanche, les cellules dont l'intégrité membranaire est endommagée, sont colorées en rouge par l'iodure de propidium (Stocks 2004) (Figure 21). À la suite de l'acquisition des clichés, le dénombrement des cellules rouges et vertes a été effectué à l'aide du logiciel Fiji sur un total d'environ 700 cellules en triplicat, cela a permis de calculer le pourcentage de cellules dont l'intégrité membranaire est altérée grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ défaut d'intégrité membranaire} = \frac{\text{nb bactérie rouges}}{\text{nb bactéries totales}} \times 100$$





*Figure 21 : Représentation schématique du principe de la coloration Live/dead (SYTO9®/Iodure de propidium)*

La membrane bactérienne est perméable au colorant SYTO9® qui marque en vert les acides nucléiques de l'ensemble des cellules de l'échantillon, tandis que l'iodure de propidium (IP) est un intercalant de l'ADN qui contrairement au SYTO9® ne peut pas diffuser à travers la barrière membranaire. Cette méthode permet de différencier les cellules dont la membrane est intacte (colorées en vert) des cellules dont la membrane est endommagée (colorées en rouge).

### 1.6 - Test de mobilité

A partir d'une boîte de pétri de la souche cible striée la veille, une colonie est récupérée avec une oese puis celle-ci est piquée au milieu d'une boîte GL 0,3% supplémenté ou non avec une concentration subinhibitrice de zinc (500µM). La boîte est incubée à 37°C environ 24h au bout desquelles le diamètre de mobilité est mesuré.

### 1.7 - Transduction généralisée avec le phage P1

Le protocole a été notamment adapté de la publication de Thomason et al. (Thomason, Costantino, et Court 2007). Le stock de phage P1vir est réalisé en milieu liquide par infection de 5mL de souche donneuse cultivée à D.O.  $_{600nm}$  environ 0,2 en LB supplémenté en MgSO<sub>4</sub> 8mM et CaCl<sub>2</sub> 4mM avec 0,5mL d'un stock précédent. Le mélange est ensuite placé à 37°C avec agitation (230rpm) jusqu'à lyse complète des bactéries (3 à 4h). Le lysat, récupéré par centrifugation, est stérilisé par 0,2mL de chloroforme et stocké à 4°C. La transduction est effectuée pendant 30 min à 37°C par mise en contact de la souche receveuse cultivée en phase exponentielle de croissance en LB MgSO<sub>4</sub> 8mM et CaCl<sub>2</sub> 4mM avec le stock de phage, à une multiplicité d'infection de 1 phage pour 10 bactéries. Cette étape permet à un fragment chromosomique de la souche donneuse encapsidé dans une particule phagique de pénétrer dans la cellule receveuse et de recombiner. Après trois lavages en LB additionné avec du citrate 0,1% pour éliminer le phage non adsorbé, une culture d'expression est effectuée durant 1h en milieu LB additionné avec du citrate 0,1%. Les bactéries sont ensuite étalées sur le milieu sélectif approprié 24h à 37°C.

## 1.8 - Test d'infection de souris par *C. rodentium*

L'ensemble des protocoles utilisés ont été adaptés de la publication de Crépin *et al.* (Crépin *et al.* 2016). Ces expériences d'infection sont réalisées en collaboration avec l'animalerie Dubois. L'analyse des lames de microscopie et l'élaboration du score de pathogénie ont été réalisées en collaboration avec le vétérinaire Thierry Marchal.

### 1.8.1 - Préparation de l'inoculum bactérien

Les cultures des différentes souches bactériennes de *C. rodentium* RCL2 sont inoculées sur la nuit à 37°C sous agitation (150rpm). Le lendemain matin, les cultures sont centrifugées à 3000rpm pendant 10min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est repris dans 1/10<sup>ème</sup> de volume de PBS.

### 1.8.2 - Infection des souris par gavage oral

Les souris utilisées au cours de l'étude sont des souris femelles C56/BL7 âgées de 6 semaines. Les souris ont une semaine d'acclimatation à l'animalerie avant le début de l'expérience. Préalablement, les souris sont pesées et identifiées par un marquage. Les souris sont inoculées oralement par 200µL de solution bactérienne, préparée ci-dessus, ou de PBS stérile pour le groupe témoin non-infecté. Après la procédure, les souris sont placées par groupe dans une cage et leur rétablissement est surveillé. Puis l'excédent des différents inoculums bactériens est dilué et étalé sur boîte GL et MacConkey Sorbitol afin d'évaluer le nombre de bactéries vivantes dans l'inoculum, environ 10<sup>9</sup> CFU.

### 1.8.3 - Suivi quotidien du poids des souris et de la prolifération bactérienne

Chaque jour après l'infection, les souris sont pesées et leurs fèces sont récupérées. Les échantillons de fèces sont pesés et resuspendus à raison de 0,1 g de fèces pour 1 ml de PBS. Les fèces sont laissées ramollir pendant 20min dans le PBS puis ils sont dispersés par agitation mécanique et par vortex. Le mélange est centrifugé 3s à 2 500g et des dilutions en série sont réalisées puis étalées sur MacConkey Sorbitol. Le nombre de bactéries vivantes par gramme de fèces est ensuite déterminé.

### 1.8.4 - Evaluation de l'état microscopique des colons

#### 1.8.4.1 - Préparation et coloration des coupes

Aux moments critiques, jour 7 et 14 post-infection, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale conformément aux procédures scientifiques pour les animaux (loi de 1986) et les règles d'éthique locales. Une portion de 0,5 centimètre du côlon terminal a été prélevée en gardant le tube du côlon intact. Les fèces ont délicatement été poussées hors du côlon et le tissu a été lavé avec du PBS. Les tissus ont ensuite été fixés dans du paraformaldéhyde 4%. Les échantillons sont déshydratés et inclus dans de la paraffine. Puis deux coupes par échantillon sont réalisées à l'aide d'un microtome et déposées sur des lames. Les coupes sont ensuite déparaffinées, réhydratées puis colorées.

Les deux coupes subissent deux colorations différentes :

❖ La coloration HE (hématoxyline et éosine)

L'hématoxyline est un colorant qui a une affinité pour les molécules chargées négativement. Il colore notamment en bleu le noyau par le biais de sa fixation aux acides nucléiques. L'éosine est un colorant qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement.

Il colore notamment en rose le cytoplasme et les autres éléments cellulaires. Cette coloration permet de visualiser les différentes couches de l'épithélium intestinal.

❖ La coloration PAS (Periodic Acid Schiff)

C'est une coloration spécifique composée d'acide périodique et de réactif Schiff. Elle permet de mettre en évidence les mucopolysaccharides présents dans certains tissus conjonctifs et dans le mucus. L'acide périodique réalise l'oxydation d'un glucopyranose libérant des fonctions aldéhydes qui vont réduire le réactif de Schiff qui révèle alors une coloration rouge. Cette coloration permet de visualiser les cellules caliciformes présentes dans la sous muqueuse.

#### 1.8.4.2 - Elaboration du score de pathogénie

L'analyse des coupes colorées au HE a permis d'évaluer notamment la longueur des cryptes intestinales. Pour cela, pour chaque coupe, dix cryptes intestinales correctement orientées sont mesurées à l'aide du logiciel ImageJ. L'analyse des coupes colorées au PAS a permis de visualiser l'impact sur les cellules caliciformes présentes dans la sous muqueuse.

#### 1.9 – Test d'infection d'endives par *D. dadantii*

Les différentes souches bactériennes ont été cultivées une nuit en milieu LB. Les bactéries ont ensuite été lavées en milieu M63 et la D.O.<sub>600nm</sub> a été ajustée à 1. Les bactéries ont été diluées 10 fois et 10 $\mu$ l ont été inoculés dans des feuilles d'endives blessées. Les feuilles ont été incubées à 30°C à une humidité élevée. Après 24h, les aire d'infection ont été mesurées.

## 2 - Méthodes génétiques et de biologie moléculaire

### 2.1 - Extraction d'ADN génomique et plasmidique

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée avec le kit DNA Purification System (Promega). Les extractions des plasmides de petite et grande quantité, a été réalisées avec le kit Nucleospin Plamid (Macherey-nagel) en suivant les indications du fournisseur.

### 2.2 - Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaine (PCR)

La technique de PCR permet d'amplifier un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques. Elle repose sur la synthèse enzymatique d'ADN par une ADN polymérase thermostable à partir de deux amorces de polarité opposée complémentaires des extrémités de chacun des brins à amplifier. Un cycle de synthèse est constitué de trois étapes :

- 1- La dénaturation de la matrice ADN par chauffage à 95°C
- 2- L'hybridation des amorces réalisée à une température dépendante de la composition en base et de la longueur des oligonucléotides
- 3- L'élongation de l'ADN à partir des amorces par l'ADN polymérase est réalisée à 72°C en présence des dNTP

Une amplification classique comporte 30 cycles, précédés d'une étape de dénaturation initiale de 5 min à 95°C et s'achevant par une étape d'élongation finale de 5min à 72°C. La durée d'élongation doit être adaptée en fonction de la taille du fragment à amplifier. Les cycles de chauffage successifs sont assurés par le thermocycleur. Il est recommandé de choisir des amorces de 20 nucléotides minimums avec un pourcentage G+C de 50 à 60% et se terminant en 3' par G ou C.

### 2.3 - Séparation par électrophorèse sur gel d'agarose

Les différents fragments d'ADN, mélangés à une solution de charge (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25%, EDTA 25mM, glycérol 50%), sont séparés en fonction de leur masse moléculaire et leur degré d'enroulement dans le gel d'agarose à un certain pourcentage préparé en tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA). Un marqueur de taille (2-Log DNA Ladder) est déposé et migre en même temps que les échantillons. La séparation s'effectue en tampon TAE sous l'influence d'un champ électrique. Puis le gel est immergé pendant une dizaine de minutes dans un bain contenant du bromure d'éthidium (BET) intercalé dans les molécules d'ADN. Le rinçage du gel se fait dans de l'eau et la visualisation à l'aide d'un transilluminateur U.V. Enfin la photographie du gel est prise.

## 2.4 - Clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur par la technique de Sequence-and ligation-independent cloning (SLIC)

Le clonage consiste à insérer un fragment d'ADN (insert) dans un vecteur plasmidique. Traditionnellement celui-ci se fait par digestion et ligature. Or désormais sur ce principe de base, de nouvelles méthodes ont vu le jour.

### 2.4.1 - Digestion du vecteur par des endonucléases de restriction

Le vecteur, préalablement choisi pour ses caractéristiques, est linéarisé par des endonucléases de restriction. Les enzymes de restriction reconnaissent et clivent des séquences palindromiques particulières d'ADN bicaténaire. Le clivage peut donner des bords francs ou des extrémités cohésives. Les enzymes sont utilisés à raison de 1 à 5 unités (U) par échantillon (500ng d'ADN) dans les tampons recommandés par le fournisseur. Les coupures sont réalisées pendant 1 à 2h à la température recommandée.

### 2.4.2 - Purification de l'insert

Le gène à cloner est amplifié par PCR borné par 20 paires de bases complémentaires aux extrémités 5' et 3' du plasmide linéarisé. Le fragment d'intérêt est séparé par électrophorèse sur gel d'électrophorèse. Puis il est excisé sur le gel puis purifié par le kit Nuclospin Extract II (Macherey-Nagel). La purification est basée sur l'absorption différentielle de l'ADN sur colonne de résine anionique qui retient l'ADN et permet d'éliminer l'agarose, les sels et les impuretés (Vogelstein et Gillespie 1979). Le fragment est élué par deux éluions de 30µL de Tris HCL 10mM pH 8,5.

### 2.4.3 - Clonage

L'insert et l'ADN plasmidique, préalablement linéarisé, sont placés avec un ratio molaire 4:1 dans un mix réactionnel avec 2,25 unités de T4 DNA polymérase (BIOLABS) dans un volume final de 20µL. Un témoin est réalisé avec de l'eau à la place de l'insert.

Le mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30s puis placé 5min à 4°C. Durant la première étape, la T4 DNA polymérase, sans ajout de nucléotide, revêt son activité de T4 exonucléase 3' à 5' ce qui permet la formation d'extrémités cohésives. Ces séquences complémentaires permettent l'hybridation entre l'insert et le plasmide, donc de créer un plasmide contenant la séquence d'intérêt. Le mélange est ensuite transformé dans les cellules DH5α préalablement rendues compétentes par un traitement chimique avec le tampon TSS (pour Transformation and Storage Solution).

## 2.5 - Transformation par de l'ADN plasmidique

### 2.5.1 - Transformation par la technique du TSS

Les plasmides sont introduits par choc thermique au cours de la transformation dans les cellules hôtes bactériennes, rendues compétentes par un traitement au tampon de transformation TSS (Chung, Niemela, et Miller 1989).

Un volume de 5mL de milieu LB estensemencé avec 50µL d'une préculture de la nuit de la souche bactérienne à transformer. Les cellules sont récoltées par centrifugation à une D.O.<sub>600nm</sub> d'environ 0,3 correspondant à  $1,5 \cdot 10^8$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Le culot est repris délicatement dans 0,1mL d'une solution de TSS froide (PEG 3350 10%, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, DMSO 5%

dans du LB) conservée à 4°C. Les cellules peuvent être utilisées après maintien 30min au moins dans la glace. Pour la transformation, 0,1 à 1µg de plasmide sont ajoutés aux cellules compétentes. Le mélange est laissé 30min dans la glace, placé 45s à 42°C puis placé dans la glace 5min. 900µL de LB sont ajoutés et la culture est incubée à 37°C pendant 1h minimum pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide. Les cellules sont ensuite étalées sur le milieu sélectif approprié et incubées à 37°C pendant 24h.

### 2.5.2 - Transformation par électroporation

La transformation par électroporation permet de faire pénétrer de l'ADN dans une cellule hôte bactérienne par un choc électrique. Pour 50mL de culture initiale, le culot cellulaire a été lavé avec 25mL, 10mL, 5mL et 500µL de glycérol 10% afin d'éliminer les sels. 50µL de cellules electrocompétentes sont placés dans une cuve d'électroporation stérile, refroidie dans la glace puis environ 1ng d'ADN plasmidique est ajoutée dans la cuve. L'échantillon d'ADN en contact avec les cellules est soumis à un choc électrique très bref de l'ordre de la milliseconde mais de très forte intensité. Après l'impulsion électrique, les cellules sont reprises dans 1mL de milieu LB et incubées 1h à 37°C. A la suite de cette culture d'expression, les cellules sont centrifugées et le culot étalé sur le milieu sélectif puis incubé à 37°C pendant 24h.

## 2.6- Construction de souches mutantes

### 2.6.1 - Chez le modèle *E. coli*

L'inactivation d'un gène est effectué au laboratoire selon la méthode de mutagenèse en une étape de Datsenko and Wanner (Datsenko et Wanner 2000a) dans la souche W3110.

La cassette de délétion a été amplifiée à l'aide d'amorces qui sont complémentaires aux régions amont et aval du gène de résistance au chloramphénicol (CmR) ou gène de résistance à la kanamycine (KanR) ainsi qu'aux séquences « Flippase Recognition Target » (FRT) du plasmide pKD3 ou pKD13 (Datsenko et Wanner 2000a). En plus de ces régions complémentaires au pKD3 ou au pKD13, ces amorces possèdent des extrémités nucléotidiques flanquantes, complémentaires des 50 paires de bases amont et aval du gène cible à remplacer. Une migration électrophorétique du produit PCR a été réalisée sur un gel d'agarose 1% pour vérifier la PCR. La cassette a été purifiée à l'aide du kit PCR clean-up de Macherey-Nagel.

Les cellules d'*E. coli* W3110 portant le plasmide pKD46 (Datsenko et Wanner 2000a) ont été mises en culture dans un milieu LB supplémenté en ampicilline, à 30°C sous agitation. Lorsque celles-ci ont atteint une D.O.<sub>600nm</sub> égale à 0,2, la synthèse de la λ red recombinase a été induite par l'ajout de 0,2% d'arabinose. La croissance de ces cellules a été poursuivie jusqu'à une de 0,6. Les bactéries ont ensuite été rendues compétentes par lavages successifs dans de l'eau supplémentée en glycérol. Puis la cassette a été mise en contact avec les cellules électrocompétentes et une transformation par électroporation. Grâce à la complémentarité de leurs séquences, les cassettes ont pu être intégrées dans le génome par recombinaison homologue. L'insertion a été vérifié par PCR. Chaque délétion a ensuite été transduite avec le phage P1 afin de s'assurer que la cassette s'insère une seule fois dans le génome. Enfin la cassette est excisée du génome.

### 2.6.2 - Chez le modèle *C. rodentium*

L'inactivation d'un gène est effectuée au laboratoire selon la méthode de mutagenèse en une étape de Datsenko and Wanner (Datsenko et Wanner 2000a) adaptée par Crepin et al (Crepin et al. 2016) dans le modèle *C. rodentium*.

Trois-cents paires de bases amont et aval du ou des gènes à déléter sont amplifiées par PCR. Le gène de résistance à la kanamycine ou au chloramphénicol a été amplifié à l'aide d'amorces qui sont complémentaires aux régions amont et aval du gène de résistance ainsi qu'aux séquences « Flippase Recognition Target » (FRT) du plasmide pKD3 ou pKD13 (Datsenko et Wanner 2000a). En plus de ces régions complémentaires au pKD3 ou au pKD13, ces amorces possèdent des extrémités nucléotidiques flanquantes de 20 paires de bases complémentaires aux régions amont et aval du gène cible à remplacer. Une PCR avec les trois fragments (les 300pb de amont, le gène de résistance et les 300pb de aval) permet d'obtenir la cassette de délétion. Une migration électrophorétique du produit PCR a été réalisée sur un gel d'agarose 1% pour vérifier la PCR. La cassette a été purifiée à l'aide du kit PCR clean-up de Macherey-Nagel.

Les cellules d'*C. rodentium* RCL2 portant le plasmide pKOBEG ont été mises en culture dans un milieu LB supplémenté en chloramphénicol, à 30°C sous agitation. Lorsque celles-ci ont atteint une D.O.<sub>600nm</sub> égale à 0,2, la synthèse de la  $\lambda$  red recombinaise a été induite par l'ajout de 0,2% d'arabinose. La croissance de ces cellules a été poursuivie jusqu'à une D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6. Les bactéries ont ensuite été rendues compétentes par lavages successifs dans de l'eau supplémentée en glycérol. Puis la cassette a été mise en contact avec les cellules électro-compétentes et une transformation par électroporation a été réalisée. Grâce à la complémentarité de leurs séquences, les cassettes ont pu être intégrées dans le génome par recombinaison homologue. L'insertion a été vérifiée par PCR. Enfin la cassette est excisée du génome.

### 2.6.3 - Excision de la cassette de résistance à un antibiotique

Afin d'exciser la cassette contenant le gène de résistance à l'antibiotique et insérée à la place du gène à déléter, le plasmide pCP20 a été utilisé (Tableau 6). Ce plasmide présente une réplication sensible à la température et une induction thermique de la synthèse de la recombinaise FLP. Cette enzyme est capable d'agir sur les sites répétés FRT flanqués de chaque côté du gène de résistance afin d'exciser la cassette de résistance. Les mutants Cm<sup>R</sup> et Km<sup>R</sup> ont été transformés avec le plasmide pCP20, et des transformants résistants à l'ampicilline ont été sélectionnés à 30°C. Ensuite ils ont été striés à 42°C puis testés pour la perte de toutes les résistances aux antibiotiques. La majorité a perdu simultanément le gène de résistance et le plasmide. La perte de la cassette de résistance à un antibiotique a été vérifiée par une PCR.

### 2.6.4 - Chez le modèle *Dickeya*

L'inactivation d'un gène est effectuée en utilisant la méthode de contre-sélection à l'aide du gène *sacB* (Link, Phillips, et Church 1997). Cette méthode a été adaptée chez *Dickeya dadantii* par Royet et al. (Royet et al. 2018). A l'intérieur du plasmide pRE112, 500pb de bases amont et aval du ou des gènes à déléter ont été clonés. Le plasmide a ensuite été transféré de MFDpir à *Dickeya dadantii* par conjugaison. *Dickeya dadantii* est incapable de répliquer le plasmide pRE112. Le premier événement de recombinaison a été sélectionné sur GL additionné en



kanamycine. Le deuxième évènement de recombinaison a ensuite été sélectionné sur GL -NaCl avec un supplément de saccharose 5%. La délétion a été vérifié par PCR.

## 2.7 - Mesure de l'activité d'un promoteur par la technique du gène rapporteur

### 1.1.1. Principe et gène rapporteur utilisé

L'étude de promoteur d'intérêt est réalisée grâce à une fusion transcriptionnelle. Cette approche consiste à fusionner le promoteur de gènes d'intérêt en amont du gène rapporteur. Le gène rapporteur, dépourvu de promoteur, se trouve alors sous le contrôle du promoteur du gène d'intérêt. L'activité du promoteur est ainsi mesurée. Dans le cadre de ces travaux, l'opéron *luxCDABE* de *Photorhabdus luminescens* a été utilisé comme système rapporteur.

Les gènes *luxAB* codent les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la luciférase dont le substrat est la flavine mononucléotide sous forme réduite (FMNH<sub>2</sub>), aussi appelé luciférine bactérienne. Tandis que Les gènes *luxCD* et *luxE* codent quant à eux un complexe d'acide gras réductase nécessaire à la régénération de l'aldéhyde gras. En présence du dioxygène, la luciférase oxyde la luciférine (FMNH<sub>2</sub>) et un aldéhyde gras en réciproquement une flavine mononucléotide sous forme oxydée (FMN) et un acide gras. Lors de l'oxydation du FMNH<sub>2</sub>, il y a une émission d'un photon (Figure 22).

Le promoteur d'intérêt est placé en amont de l'opéron *lux* sur le vecteur pLux, ce qui permet de mesurer l'activité du promoteur en mesurant le nombre de photons émis par la luciférine, grâce à un luminomètre.

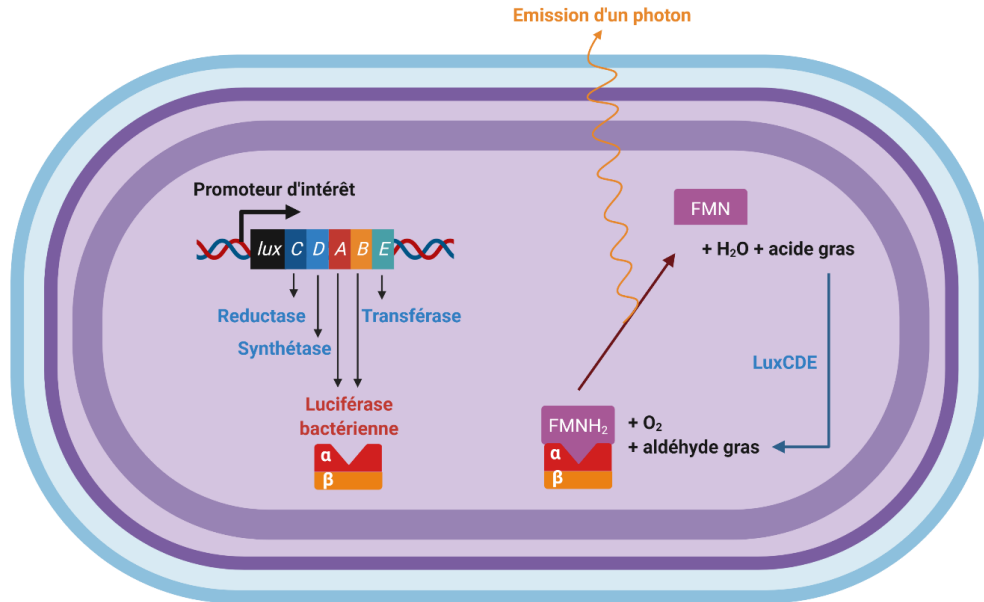


Figure 22 : Principe de l'opéron *luxCDABE* comme système rapporteur

L'expression de l'opéron *luxCDABE* est placée sous le contrôle d'un promoteur d'intérêt. Les gènes *luxAB* codent les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la luciférase bactérienne. En présence du dioxygène, la luciférase réalise l'oxydation de la flavine mononucléotide sous forme réduite (FMNH<sub>2</sub>) et de l'aldéhyde gras en flavine mononucléotide sous forme oxydée (FMN) et en acide gras. Cette réaction s'accompagne de l'émission d'un photon. D'autre part, les gènes *luxCD* et *luxE* qui codent une réductase, une synthétase et une transférase.



*Ces enzymes sont nécessaires à la réduction de l'acide gras afin de régénérer un aldéhyde gras. Grâce à ce système rapporteur, la luminescence témoigne de l'activité du promoteur.*

### 1.1.2. Mesures de la luminescence en plaque 96 puits

Les bactéries transformées par le plasmide contenant le système rapporteur sont mises en culture à 37°C sous agitation jusqu'à D.O. <sub>600nm</sub> de 0,6. Cette culture est utilisée pour inoculer aux 1/100<sup>èmes</sup> 200µL de différents milieux additionnés ou non de biocide (métaux, antibiotiques...) dans une microplaque de 96 puits. La plaque est placée à 37°C sous agitation (280rpm) durant 24 à 48h dans l'incubateur du lecteur de plaque Infinite® 200 PRO (Tecan). La croissance bactérienne est mesurée toutes les 20 minutes par mesure de la D.O. <sub>600nm</sub>. En parallèle, la totalité des photons émis lors de la réaction de bioluminescence sont mesurés. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de luminescence normalisée par la D.O. <sub>600nm</sub>.

### 1.1.3. Mesures de la luminescence sur boîtes

Pour évaluer l'activité du promoteur directement sur boîte de pétri, les différentes cultures sur boîte sont placées dans l'appareil. Une image en lumière visible est réalisée puis dans l'obscurité, l'acquisition d'une image correspondant aux photons émis pendant 2 min est réalisée. Les images obtenues révèlent les différents niveaux de luminescence correspondant à l'activité du promoteur au niveau de bactéries sur boîte. Les images sont ensuite traitées avec le logiciel ImageJ. Pour évaluer le niveau de luminescence, la valeur « intden », correspondant au produit de l'aire et de la valeur moyenne de gris, est prise en compte.

## 2.8 - RT-qPCR

### 2.8.1 - Extraction d'ARNs totaux

Les ARNs totaux issus de 10mL de cultures à D.O. <sub>600nm</sub> égale à 1 de la souche sauvage d'*E. coli*, W3110, et du mutant  $\Delta zraR$  en milieu LB supplémenté avec 500µM de zinc ont été extraits par la méthode au phénol froid en milieu acide (Maes et Messens 1992). Dans ces conditions, contrairement à l'ADN et aux protéines, les ARNs en présence de phénol (pH 4,3) restent solubles dans la phase aqueuse. Les culots cellulaires sont resuspendus dans 500µL d'une solution composée de Tris 25mM pH 7,6, EDTA 10mM, glucose 20%. Puis les cellules sont cassées mécaniquement dans des tubes remplis avec des billes (de 150 - 212µm de diamètre) et 500µL de phénol froid. Les tubes sont ensuite centrifugés et les surnageants sont récupérés et soumis à deux traitements avec 1 volume de phénolchloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1) ajoutés à un volume équivalent de celui du surnageant. Puis un dernier traitement avec un mélange d'un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24 :1) permet d'éliminer les traces de phénol. La précipitation des acides ribonucléiques est réalisée avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol 100%. Après 30min à -20°C, la préparation d'ARNs est centrifugée et le culot obtenu est à nouveau resuspendu dans 1mL d'éthanol à 75%. Les culots d'ARNs totaux sont ensuite séchés à 42°C afin d'éliminer les traces d'éthanol. Puis les culots sont solubilisés avec 65µL d'eau traitée au DEPC (DiEthylPyroCarbonate) qui inhibe les RNAase. Les restes d'ADNs sont éliminés par deux traitements à la DNase avec le kit DNA-

freeTM Ambion. Les quantités des ARNs extraits sont dosées au nanodrop par la mesure de la D.O. 260nm. La qualité de la préparation est vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose 1% et l'absence de contamination par de l'ADN est vérifiée par PCR. Les ARNs sont alors conservés à -80°C.

### 2.8.2 - Rétrotranscription

Les ARNs (1 µg) ont été rétrotranscrits (RT) en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide du kit Invitrogen SuperScript II Reverse Transcriptase en suivant les instructions du fournisseur ThermoFisher Scientific. Ce kit est composé d'une transcriptase reverse et d'amorces se fixant aléatoirement sur les matrices ARNs. A la fin de la RT, les échantillons ont été incubés à 70°C pendant 15min pour dégrader les ARNs engagés dans des complexes ARN-ADNc. Les ADNc néo synthétisés ont été conservés à -20°C.

### 2.8.3 - PCR quantitative en temps réel

La technique de PCR permet d'amplifier un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques. Basé sur ces mêmes principes, la qPCR permet de quantifier précisément l'ADNc, ce qui permet d'estimer la quantité d'ARN messagers initiale, donc au final l'expression des gènes dans l'échantillon testé. Cette quantification est basée sur la mesure, à chaque cycle, de la fluorescence émise par le SYBR Green lorsque celui-ci s'est intercalé dans la double hélice d'ADN synthétisé. Le kit LightCycler® 480 SYBR Green Master (Roche Applied Science) a été utilisé. Pour chaque gène étudié par qPCR, les amorces, présentées dans le tableau 7, ont été conçues selon la méthode de *Thornton et al.* (Thornton et Basu 2011). Une gamme étalon a été établie à partir de différentes dilutions d'ADN génomique de la souche W3110 *E. coli*. Elle permet d'évaluer l'efficacité de l'amplification mais aussi de quantifier les transcrits du gène d'intérêt présents dans les différents échantillons. Les milieux réactionnels ont été préparés selon les instructions du fournisseur. Chaque réaction est effectuée sur 1µl d'échantillon (gamme étalon et ADNc ~ 50ng/µL) dans un volume réactionnel final de 10µl. Le cycle de synthèse est détaillé dans le tableau 7. Les cycles des chauffages successifs sont assurés par l'appareil LightCycler.

Le logiciel LightCycler® 480 Software calcule ensuite, pour chaque échantillon, le nombre de cycles nécessaire à la détection de la fluorescence (début de la phase linéaire d'émission de la fluorescence). Ce nombre correspond au « Crossing Point » (CP), cela permet de comparer les seuils de détection des ADNc entre la souche sauvage WT et la souche mutante  $\Delta zraR$ .

Ces expressions ont ensuite été normalisées en se référant à l'expression du gène de référence *fabZ*, codant la  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP déshydrogénase, dont l'expression est stable dans les conditions de l'étude, selon le calcul,  $\Delta Cp \text{ échantillon} = Cp \text{ gène} - Cp \text{ fabZ}$ . Puis le ratio d'expression (différence d'expression ou Fold change, FC) est calculé selon la formule suivante :  $FC = 2^{-(\Delta Cp \text{ échantillon } \Delta zraR - \Delta Cp \text{ échantillon WT})}$  (Winer et al. 1999). Pour chaque gène, la différence a été évaluée entre au moins trois échantillons WT et  $\Delta zraR$  provenant de cultures biologiquement indépendantes.

Tableau 7 : Cycle d'amplification de qRT-PCR

Etape	Temps	Température	Cycles
Dénaturation initiale	10min	95°C	1
Dénaturation	15s	95°C	45
Hybridation	15s	62-67°C	
Elongation	20s	72°C	
Dénaturation	1s	95°C	1
Elongation	1min	65°C	1
Refroidissement	30s	40°C	1

### 2.9 – Evaluation du niveau d'enroulement de l'ADN par migration sur gel de chloroquine

L'analyse du niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique a été réalisée sur un gel d'agarose 0.8% contenant de la chloroquine à 2.5µg/mL. La chloroquine est un agent intercalant qui se fixe préférentiellement sur l'ADN relâché et provoque son étirement. Cet étirement de la molécule d'ADN va ralentir sa vitesse de migration. La migration électrophorétique a été effectuée dans une cuve de 20 cm de long contenant du tampon Tris-Borate EDTA (TBE) 1X pH 8.3 et également de la chloroquine 2.5µg/mL pendant 16h à voltage constant (2.5V/cm).

Dans ces conditions, l'ADN super enroulé migre plus vite que l'ADN relâché. Après la migration électrophorétique, la chloroquine a été éliminée du gel d'agarose par des lavages successifs à l'eau distillée pendant 2h toutes les 30min puis pendant 3h toutes les heures. Le gel d'agarose a été coloré pendant 30 min dans une solution de bromure d'éthidium (BET) puis décoloré pendant 15min dans l'eau distillée et finalement révélé sous la lumière UV. La répartition des topoisomères du plasmide permet d'estimer le niveau d'enroulement global de l'ADN.

## 3 - Méthodes biochimiques

### 3.1 - Purification de la protéine YhdW

#### 3.1.1 - Surproduction

Le gène *yhdW* de *C. rodentium* cloné dans le vecteur de surexpression pET30 est placé sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7. La production de cette enzyme est elle-même placée sous le contrôle de l'opérateur *lac* inductible par l'IPTG. Une culture de 100mL de LB de la souche BL21 possédant le vecteur pET30-YhdW-8histidines est menée sous agitation à 30°C jusqu'à D.O. <sub>600nm</sub> de 0,3 puis elle est induite par addition d'IPTG 0,1mM final. Après 5h d'induction, les cellules sont centrifugées.

### 3.1.2 - Récupération de la fraction périplasmique

Après centrifugation à 4°C, les cellules sont resuspendues dans 3 mL de TE (Tris HCl 50mM Ph 8, EDTA 1 mM) sur la glace puis 3,5 mL de sucrose 40% sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 10 min sur la glace et il est mélangé par inversion douce. Les cellules sont centrifugées 7000g pendant 8 min à 4°C. Le surnageant est prélevé et conservé à -20°C. Le culot est repris dans 4mL d'eau et MgSO<sub>4</sub> 0,1M (ou MgCl<sub>2</sub> 0,1M). Le mélange est incubé 4 min sur la glace. Les cellules sont centrifugées 7000g pendant 8 min à 4°C. Le surnageant, correspondant à la fraction périplasmique, est prélevé et conservé à -20°C. Les culots sont ensuite resuspendus dans 4 mL d'eau et conservé à -20°C. Par la suite les différentes fractions sont déposées sur gel de polyacrylamide.

### 3.1.3 - Purification sur colonne d'affinité à Nickel

En raison de la possible présence d'EDTA, les fractions périplasmiques ont été dialysées dans du tampon A (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 100mM, Glycérol 5% et  $\beta$ -mercaptoéthanol 2mM). La fraction périplasmique de 8mL est incubée pendant 1h à 4°C sous agitation avec 2 mL de résine Ni-NTA et de l'imidazole à une concentration finale de 10mM. Le mélange est ensuite chargé dans une colonne. Puis un lavage avec 20 mL de tampon A additionné avec 10 mM d'imidazole est effectué. L'élution est réalisée avec 8 mL de tampon A additionné avec 250 mM d'imidazole. Les différentes fractions ont été récupérées, conservées à -20°C et déposées sur gel de polyacrylamide afin de vérifier que l'élution a bien fonctionné. Afin d'éliminer l'imidazole, le tampon des échantillons a été remplacé par du tampon A à l'aide des colonnes PD-10 desalting columns (Cytiva) en suivant les instructions du fournisseur.

### 3.2 - Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode est fondée sur le décalage de la longueur d'onde d'absorbance maximale de 465 à 595nm d'une solution acide de bleu brillant de Coomassie G-250 suite à la fixation de protéines. Le réactif colorant concentré 5 fois est en solution dans l'acide phosphorique et du méthanol. La procédure suivie est la microméthode, le volume réactionnel final de 1 mL, permet de doser de 1 à 20 $\mu$ g de protéine par essai. En parallèle, une gamme de concentration de BSA est toujours réalisée pour l'étalonnage. L'échantillon protéique à doser est ajouté dans le tampon pour un volume final de 800 $\mu$ L auxquels sont ajoutés 200 $\mu$ L de réactif coloré concentré. L'incubation est menée à température ambiante durant 20 min à l'obscurité. Le coefficient directeur de la droite d'étalonnage permet de calculer les concentrations protéiques des échantillons.

### 3.3 - Electrophorèse dénaturante des protéines sur gel SDS-PAGE

Cette méthode permet une séparation des protéines sur gel de polyacrylamide, essentiellement en fonction de leur taille. Avant le dépôt les échantillons protéiques sont chauffés 5 min à 95°C, en présence de SDS 1,6% et de  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,715M. Les gels à 12 ou 15% d'acrylamide utilisés sont coulés en deux temps : gel de séparation puis gel de concentration dans lequel le peigne est inséré. La polymérisation débute par l'addition de persulfate d'ammonium et de TEMED. La migration s'effectue dans du tampon SDS-PAGE (Tris base 25mM, glycine 186 mM, SDS 0,1%, pH 8,5) à environ 80 V pendant 1 à 2h. Le gel est ensuite plongé dans une solution de coloration (Bleu de Coomassie 0,25%, éthanol 40%, acide

acétique 10%). Le bleu de Coomassie fixé de manière aspécifique est éliminé par plusieurs bains dans une solution de décoloration (éthanol 40% et acide acétique 10%).

### 3.4 - Immunodétection

Après séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon-Blot™ PVDF (BioRad) par électrotransfert humide dans le Trans-Blot (BioRad). Le transfert est effectué en tampon glycine (glycine 39mM, Tris 48mM, SDS 0,0375%, éthanol 20%) à un ampérage constant. La membrane est ensuite saturée dans du TBS (Tris-HCL 50mM, pH 7,5, NaCl 150mM) contenant 5% de lait, pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4° afin de saturer les sites de liaison aspécifiques. La membrane est ensuite incubée 1h avec en présence d'anticorps primaires dirigés contre la protéine après dilution (1/1000<sup>ème</sup> au 1/10000<sup>ème</sup> selon la protéine) dans du TBS-T (tween 20 0.1%). L'excès d'anticorps primaires est éliminé par 3 lavages en TBS-T et les anticorps secondaires, anti-IgG de lapin, marqués à la peroxydase et dilué au 1/10000<sup>ème</sup> en TBS-T sont ensuite ajoutés. Après incubation d'1h à température ambiante, la membrane est rincée dans du TBS-T puis séchée. Après rinçage, une immunorévélation par détection de l'activité peroxydase est effectuée à l'aide du kit. La peroxydase va catalyser l'oxydation du luminol présent dans les réactifs du kit, réaction qui va s'accompagner d'une émission de lumière détectable par une exposition sur un film autoradiographique.

## 3.5 – Fluorescence-based Thermal Shift Assay

### 3.5.1 - Principe de la technique

La technique de fluorescence-based thermal Shift Assay (FTSA) permet de contrôler le changement de la température de dénaturation d'une protéine soumise à différentes conditions à l'aide d'un colorant fluorescent (SYPRO orange®). Le colorant est initialement dans un environnement aqueux avec la protéine repliée. Lorsque la température augmente, la protéine se déplie et ses régions hydrophobes sont exposées, le colorant n'est alors plus dans un milieu aqueux, ce qui résulte en une augmentation de la fluorescence. Néanmoins, il a été montré que la liaison de la protéine avec un ligand de faible poids moléculaire peut augmenter la stabilité thermique de la protéine. Une différence importante de la température de dénaturation peut donner des indications sur les ligands de la protéine (Figure 23). Cette méthode a été adaptée par Giuliani *et al.* (Giuliani, Frank, et Collart 2008a) afin d'identifier quels acides aminés se lient aux protéines de liaison aux solutés dans la famille des ABC transporteurs bactériens. Pour valider leur technique, les interactions de six protéines dont le ligand est connu ont été testées et la technique a permis de retrouver les ligands de l'ensemble des six protéines testées.

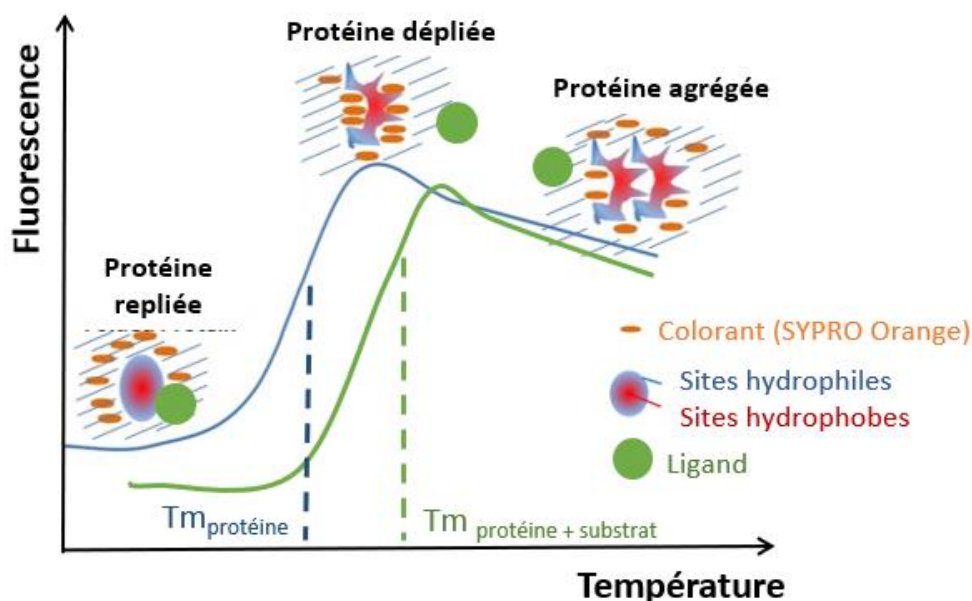


Figure 23 : Principe du Fluorescence-based thermal shift assay

Lorsque la température augmente, la protéine se délie et ses régions hydrophobes sont exposées, le colorant peut s'y fixer, ce qui entraîne une augmentation de fluorescence (courbe bleue). Si la protéine est en présence de son ligand dans le mélange (courbe verte), elle possède une meilleure stabilité thermique. Donc l'observation d'une différence significative de la température de fusion ( $T_m$ ) entre la protéine seule et la protéine avec un ligand indique une augmentation de la stabilité thermique de la protéine et une liaison au ligand.

### 3.5.2 - Méthode

La technique de FTSA a été réalisée essentiellement comme décrit par Giuliani *et al.* (Giuliani, Frank, et Collart 2008a). Les acides aminés ont été achetés auprès de Sigma. Les essais ont été réalisés avec un appareil LightCycler 480 (excitation à 498 nm, émission à 610 nm). Chaque réaction contenait une certaine concentration de la protéine YhdW, le colorant SYPRO Orange (Invitrogen) avec ou sans acide aminé dissous dans un volume final de 25  $\mu$ L de tampon A (Tris HCl 10mM pH 8, NaCl 100mM, glycérol 5%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2mM). Un premier criblage a été réalisé avec 1,5  $\mu$ M de protéine avec ou sans un panel de 21 acides aminés à 0,2mM ou 1mM. Le second criblage a été réalisé avec 2,5  $\mu$ M de protéine YhdW en présence ou non de 0,25mM; 0,5mM; 0,75mM ou 1mM d'acide aminé.

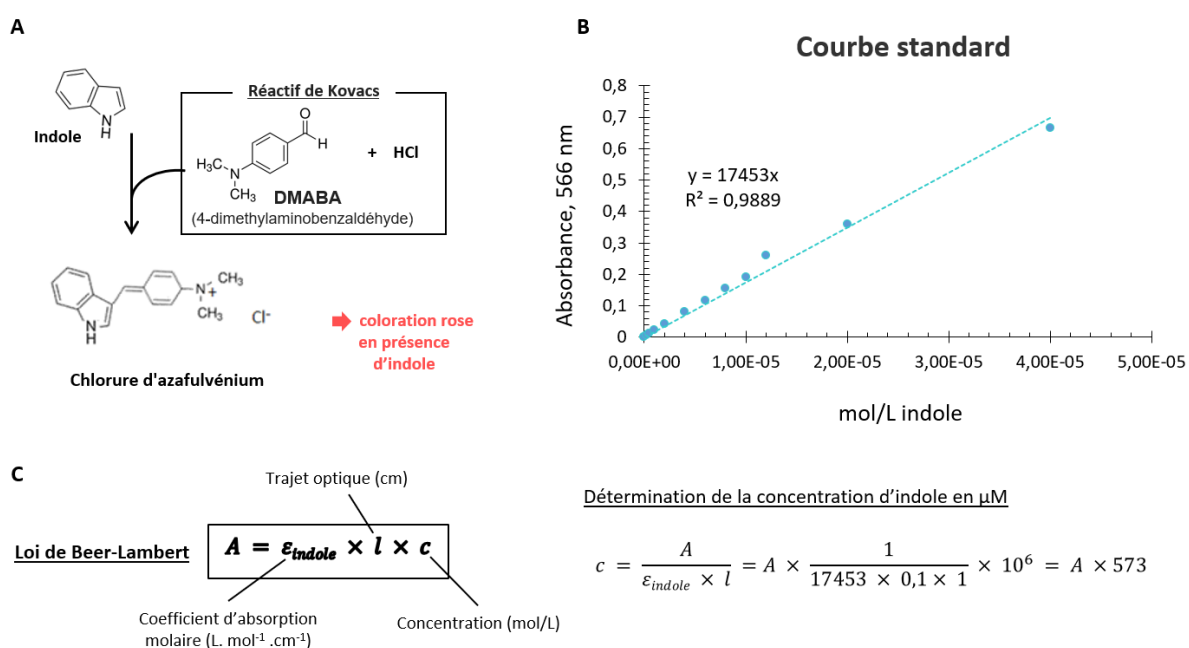
Les différents mix réactionnels sont placés dans une plaque de 96 puits (Roche). Les échantillons ont été initialement équilibrés à 25 °C pendant 10 min et un programme de courbe de fusion a été exécuté avec une augmentation de la température de 1 °C toutes les 30 s jusqu'à 99 °C.

Le logiciel a calculé les valeurs de la dérivée première ( $-d/dt$ ) à partir des données brutes de fluorescence pour déterminer le  $T_m$ . La température de fusion ( $t_m$ ) a été déterminée à la fois pour la protéine seule et la protéine avec les différents ligands. La différence de  $t_m$  ( $\Delta T_m$ )

entre la protéine seule et la protéine avec un ligand a été calculé. Un  $\Delta T_m$  supérieur à  $2^\circ\text{C}$  a été considéré comme indiquant une liaison positive.

### 3.6 - Dosage colorimétrique de l'indole

Le réactif de Kovacs est utilisé depuis très longtemps pour déterminer si une bactérie produit de l'indole. Ce réactif (Kovacs's reagent for indoles, Sigma-Aldrich) est composé de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (DMABA) et d'acide chlorhydrique dans du butanol. En présence d'indole, le DMABA forme du chlorure d'azafulvénium qui est un composé coloré rose (Figure 24A). Les bactéries ont été cultivées dans différentes conditions jusqu'à une D.O. 600nm de 1. Les cultures sont centrifugées. Un volume de  $100\ \mu\text{L}$  de surnageant est ensuite incubé avec  $600\ \mu\text{L}$  d'éthanol absolu et  $300\ \mu\text{L}$  de réactif de Kovacs à  $40^\circ\text{C}$  pendant 1h sous agitation à 450rpm. Par la suite, l'absorbance (D.O.) a été lue à 566nm, ce qui correspond à l'absorbance maximum du dérivé par le réactif de Kovacs en présence d'indole. La concentration d'indole a été déterminée grâce à la courbe étalon et la loi de Beer-Lambert à partir de l'absorbance des échantillons lue à une D.O. de 566nm (Figure 24B et 24C).



**Figure 24 :** Principe de la méthode de dosage colorimétrique de l'indole extracellulaire à l'aide du réactif de Kovacs

**A-** Le réactif de Kovacs contient de l'HCl et du 4-diméthylaminobenzaldéhyde (DMABA) qui en présence d'indole forme un composé coloré rose, le chlorure d'azafulvénium. **B-** Une courbe standard a été réalisée avec une gamme de  $0,2$  ;  $0,5$  ;  $1$  ;  $2$  ;  $4$  ;  $6$  ;  $8$  ;  $10$  ;  $12$  ;  $20$  et  $40 \times 10^{-6}$  mol/L d'indole, ce qui a permis de déterminer le coefficient d'absorption moléculaire de l'indole noté  $\epsilon_{\text{indole}}$ . **C-** A partir de la courbe étalon, la relation entre l'absorbance et la concentration en mM a été établie à l'aide de la loi de Beer-Lambert et en tenant en compte du facteur de dilution (1/10).



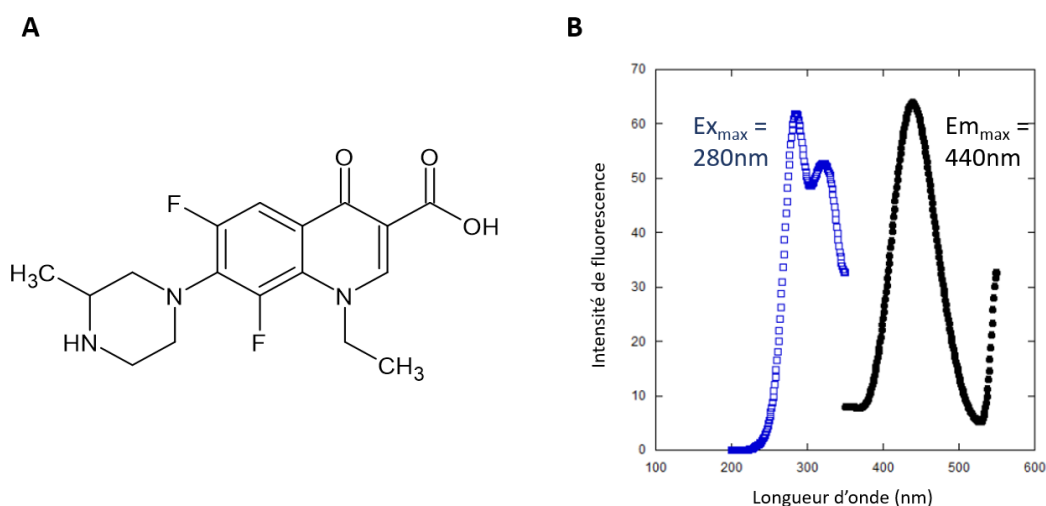
### 3.7 – Dosage de la loméfloxacin intracellulaire par HPLC

#### 3.7.2.1 – Préparation des échantillons

Le protocole de préparation des cellules a été adaptée à partir de la publication de Vergalli et al. (Vergalli et al. 2018). Les cultures ont étéensemencées au 100<sup>ième</sup> dans du LB à partir de précultures. Les bactéries ont été cultivées en milieu riche, LB, jusqu'à une D.O. 600nm de 0.6. Les cellules ont été collectées par centrifugation. Elles ont été resuspendues dans du tampon NaPi-Mg (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 44.2%, 55.8 NaHPO<sub>4</sub> et MgCl<sub>2</sub> 0.25%) de sorte à être à une D.O. 600nm finale de 6. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C en présence ou non de 1µg/mL de loméfloxacin. Un aliquot a ensuite été prélevé pour chaque condition au bout de 30, 45 60, 90 et 120 minutes. Le nombre de cellules a été dénombré par dilution et étalement et les cellules ont été centrifugées sur un coussin de sucrose (1M). Le surnageant a été retiré et les cellules ont été lysées dans un volume de 200µL de tampon de lyse (acétonitrile 50% et acide trifluoroacétique 2,5%). Les débris cellulaires ont été séparés de la solution à l'aide d'une centrifugation et les surnageants ont été analysés.

#### 3.7.2.2 – Fluorescence de la loméfloxacin

La loméfloxacin est un composé de la famille des quinolones. Elle est naturellement fluorescente. Afin de déterminer son maximum d'excitation et d'émission, un spectre de fluorescence a été réalisé (Figure 25). La loméfloxacin a une excitation maximale à 280 nm et une émission maximale à 440 nm. Ces longueurs d'ondes seront utilisées pour la détection par fluorescence de la molécule.



*Figure 25 : Structure et caractéristiques de fluorescence de la loméfloxacin*

*La loméfloxacin est un antibiotique de la famille des quinolones et sa structure est présentée ci-dessus (A). Cette molécule est naturellement fluorescente avec une excitation maximale à 280nm et une émission maximale à 440nm (B).*



### 3.7.2.2 – Condition d'utilisation de l'HPLC

Le système HPLC se composait d'un module de séparation Alliance HT Waters 2795 et la détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur à matrice de photodiodes Waters 2996 interconnecté avec un fluorimètre SFM25 (Kontron). Les différentes solutions ont été passées à travers une colonne Gemini 5 micron C18 (250 X 4,6 mm, Phenomenex) à 40°C et à un débit de 1mL/min. Le protocole d'élution a utilisé le gradient linéaire suivant : 0 à 5 min, 100% de A ; 5 à 15 min, 55% de A, 45% de D ; 15 à 25 min, 0% de A, 100% de D ; 25 min à 30 min 100% de A, 0% de D et rééquilibré pendant 5 min dans 100 % de A avant un nouveau cycle (Figure 26). Le solvant A était composé de 0,005 % d'acide trifluoroacétique (TFA) et le solvant D contenait 100% de méthanol (Figure 26).

La loméfloxacinine a été détectée avec un fluorimètre SFM25 (Kontron) équipé d'une cellule à écoulement de 8 µL. La fluorescence émise a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation de 280 nm et une longueur d'onde d'émission de 440 nm (tailles de fente, 15 et 10 nm respectivement, et puissance de lampe de 400 W). La quantification de la loméfloxacinine a été effectuée en mesurant les surfaces des pics à l'aide du logiciel de traitement de données chromatographiques (Mass lynx, Waters).

A l'aide de la courbe standard (Figure 27), une relation a pu être établie entre la quantité de loméfloxacinine et l'intensité de l'aire du pic de fluorescence. Afin de déterminer la quantité de loméfloxacinine à l'intérieur d'une cellule, la quantité de loméfloxacinine a été divisé par le nombre de cellules. La formule ci-dessous a été utilisée pour calculer la quantité de loméfloxacinine par cellule.

$$\text{Quantité de loméfloxacinine par cellule} \left( \frac{\text{ng}}{\text{cellule}} \right) = \frac{\frac{\text{aire du pic}}{a} \times \text{facteur de dilution}}{\text{nombre de cellule}}$$

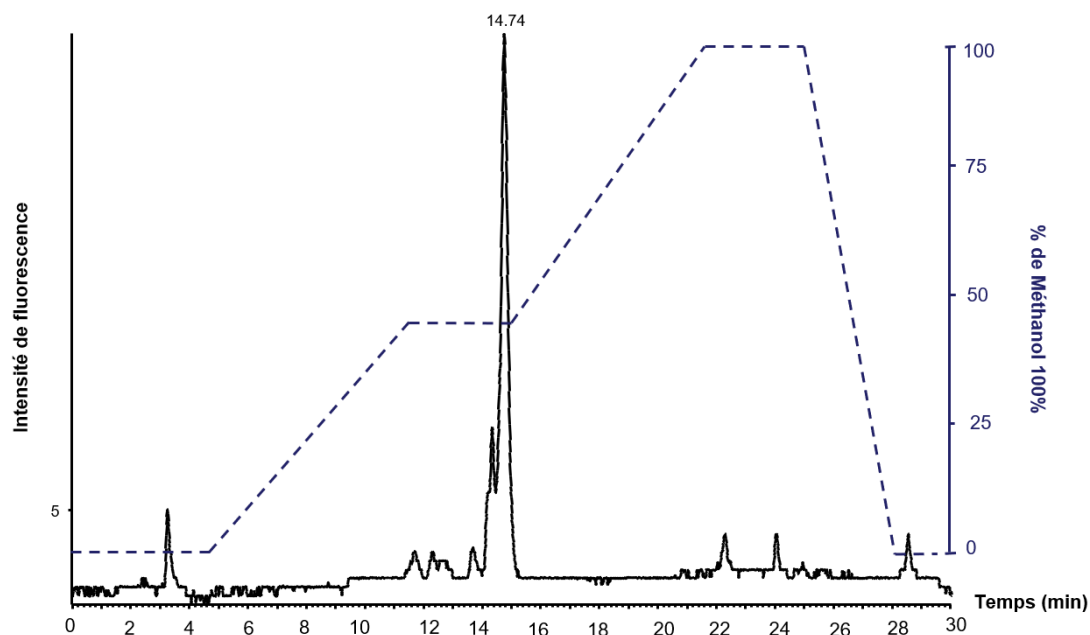


Figure 26 : Chromatogramme pour la détection par fluorescence en HPLC de 5ng de loméfloxacin

Le chromatogramme présenté correspond à un échantillon contenant 5ng de loméfloxacin. Le pic à 14,74 min correspond à la molécule de loméfloxacin. Le gradient utilisé est représenté par la courbe bleue et en pointillée correspondant au pourcentage du solvant D, Méthanol 100%.

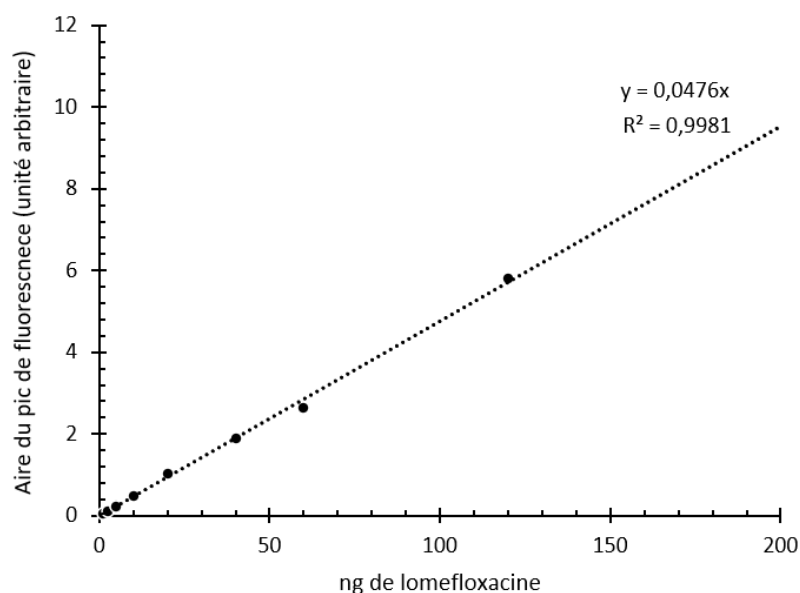


Figure 27 : Courbe standard pour la loméfloxacin

Une courbe standard a été réalisée avec une gamme de 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 60 et 120 ng de loméfloxacin. L'intensité de fluorescence a été mesurée à 440 nm après excitation à 280 nm. L'aire du pic de fluorescence est proportionnelle à la quantité de loméfloxacin. Les valeurs sur le graphique correspondent à la valeur de la pente linéaire ( $a = 0.0476$ ) et le coefficient de régression ( $R^2 = 0.9981$ ).

---

Troisième Partie :  
Résultats

---

---

## Chapitre V – La conservation du système ZraPSR chez les entérobactéries et son fonctionnement chez *C. rodentium*

---

### 1 – Introduction

Le système ZraPSR est composé de trois protéines : le senseur ZraS, le régulateur transcriptionnel ZraR et la protéine périplasmique ZraP. Ce système a tout d'abord été caractérisé par sa forte induction en présence de zinc (Leonhartsberger et al. 2001). Néanmoins, il a rapidement été montré qu'il n'était pas impliqué dans l'homéostasie métallique (Petit-Härtlein et al. 2015). Des études ont montré que ce système serait impliqué dans la réponse au stress antimicrobien chez *Escherichia coli* (Rome et al. 2018) et *Salmonella typhimurium* (Appia-Ayme et al. 2011). Etant donné que ce système est impliqué dans la résistance aux antimicrobiens, sa conservation ainsi que son impact dans la pathogénie ont été étudiés dans ce travail.

Ainsi le premier axe vise à évaluer la conservation de ce système au sein des entérobactéries et en étudier le fonctionnement chez le pathogène *Citrobacter rodentium*. *C. rodentium* est un modèle bactérien très intéressant puisqu'il est exclusivement pathogène pour la souris et qu'il possède un mécanisme de virulence par attachement et d'effacement commun avec les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et les *E. coli* entéropathogéniques (EPEC) (Crepin et al. 2016). Dans un premier temps, le système Zra a été étudié chez *C. rodentium* afin d'évaluer si sa régulation et sa fonction sont les mêmes que chez *E. coli*. Dans un second temps, l'impact du système sur son pouvoir pathogène a été évalué. Une étude menée en 2017 avait montré que la délétion des gènes *zraS* et *zraR* aurait un impact sur la virulence de ce pathogène (Thomassin et al. 2017). Néanmoins, ce système n'est pas seulement composé du senseur ZraS et du régulateur ZraR. Il possède également une protéine périplasmique ZraP qui lie du zinc et possède un rôle de protéine chaperonne (Petit-Härtlein et al. 2015). Son implication dans le phénomène de résistance aux antimicrobiens a également été mis en évidence (Rome et al. 2018). Afin d'évaluer l'implication de ZraP dans la pathogénie de *C. rodentium*, la délétion du gène *zraP* sera évaluée sur la virulence du pathogène.

### 2 – Etude de la conservation du système au sein des entérobactéries

Dans un premier temps, la conservation des éléments du système ZraPSR au sein de l'ordre des *Entérobacterales* a été évaluée. L'arbre phylogénétique des *Enterobacterales*, réalisé par Adeolu et al. en 2016 (Adeolu et al., s. d.), a servi de support pour associer la présence des éléments du système et leur environnement génétique, avec la classification des espèces. Ainsi, sur cet arbre, les analyses de synténie réalisées grâce au logiciel SynTax (Oberto 2013) ont été reportées (Figure 28). L'ordre des *Enterobacterales* est composé des familles suivantes : *Enterobacteriaceae*, *pectobacteriaceae*, *yersiniaceae*, *budviciaceae*, *morganellaceae*, *hafniaceae* et *erwiniaceae*. Les gènes *zraPSR* sont retrouvés dans les familles des *Enterobacteriaceae*, des *yersiniaceae* et des *budviciaceae* (Figure 28). Les gènes *zraPSR* sont toujours retrouvés selon le même ordre c'est-à-dire le gène *zraP* positionné de manière

divergente par rapport aux gènes *zraSR*. Ces gènes présentent une cooccurrence qui est sûrement liée à leurs interactions fonctionnelles et physiques. Dans ce cas, la coévolution est qualifiée de coévolution de type présence/absence c'est-à-dire que ces gènes sont présents ensemble ou absents. L'absence et la présence du locus *zra* peut s'expliquer aussi bien par des délétions du locus que des transferts.

De la même façon, la conservation du système chez les *Enterobacteriaceae*, a été évaluée à l'aide des analyses réalisées avec Syntax et de l'arbre réalisé par Alnajar *et al.* en 2017 (Alnajar et Gupta 2017). Selon cette publication, la famille des *Enterobacteriaceae* est subdivisée en six clades : celui de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Cronobacter* et *Cedecea* (Figure 29). Les gènes *zraPSR* sont présents dans deux clades : celui d'*Escherichia* et de *Klebsiella* (Figure 29). Ces gènes sont entourés des gènes *purD-purH* et *yjaH-hupA-yjaG-nfi*. Dans le genre *Escherichia*, toutes les espèces possèdent les gènes *zraPSR*, en revanche, dans d'autres genres, la présence de *zraPSR* est variable selon les espèces. Par exemple, dans le genre *Citrobacter*, *C. rodentium* et *C. youngae* possèdent *zraPSR* alors que *C. koseri* ne l'a pas. De la même manière, dans une même espèce, la présence de *zra* dans les souches peut être variable. Dans une même espèce, par exemple chez *Klebsiella michigansis*, le système Zra est présent chez la majorité des souches (11 sur 13 souches analysées) comme la souche E718 mais celui-ci n'est pas présent dans deux souches, FDDARGOS 647 et BD177.

Dans la famille des *yersiniaceae*, le système Zra est présent chez le genre *Yersinia* et l'espèce *Serratia fonticola* mais cette fois-ci pas au niveau de la région *purD-purH-yjaH-hupA-yjaG-nfi* (Figure 28). Chez *Yersinia pseudotuberculosis* MD67, les gènes sont localisés au niveau de la région *xapA-xapB-BZ21\_470-BZ21\_469* alors que chez *Serratia liquefaciens*, ils le sont au niveau d'une région totalement différente. De la même façon, le système Zra est présent chez les *budviciaceae* mais son environnement génétique n'est pas conservé. Les génomes bactériens subissent énormément de recombinaisons et de mutations. Il n'est donc pas surprenant que la synténie soit conservée uniquement entre les espèces les plus proches (Tamames 2001). Cela signifie qu'il n'y a pas de contrainte imposant l'entourage génétique de *zraPSR*.

La plupart des espèces chez qui le système Zra est conservé sont des pathogènes entériques ou des bactéries commensales des mammifères. En effet, par exemple, le système n'est pas présent chez les genres phytopathogènes *Dickeya* ou *Pectobacterium*. A titre d'exemple, ce système sera étudié chez le pathogène murin, *C. rodentium*.

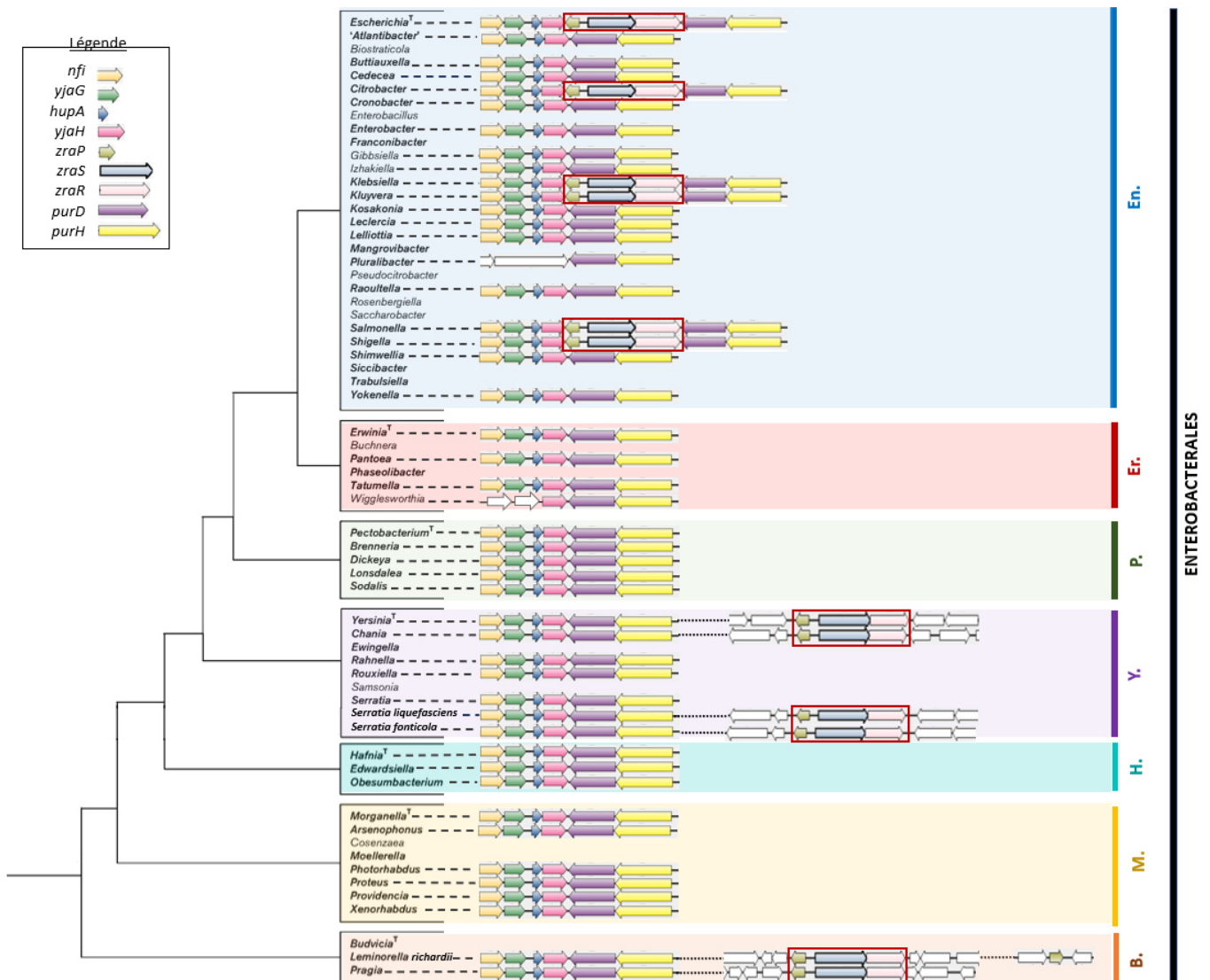


Figure 28 : Présence des éléments du système Zra dans l'ordre des Enterobacterales

L'arbre phylogénétique utilisé est tiré de la publication de Adeolu et al. 2016. En face de chaque genre ou espèce bactérienne, la présence des gènes du système Zra est mentionnée et les gènes sont encadrés en rouge. Les gènes bordants ou non les gènes zraPSR sont indiqués en couleur lorsqu'ils sont identiques entre les différentes bactéries. L'analyse de synténie a été réalisée à l'aide du logiciel SyntTax (Oberto 2013). L'ordre et la famille des bactéries sont indiqués sur la gauche de la figure. Les abréviations En., Er., P., Y., H., M. et B. correspondent respectivement aux familles suivantes Enterobacteriaceae, erwiniaceae, pectobacteriaceae, yersiniaceae, hafniaceae, morganellaceae et budviciaceae.

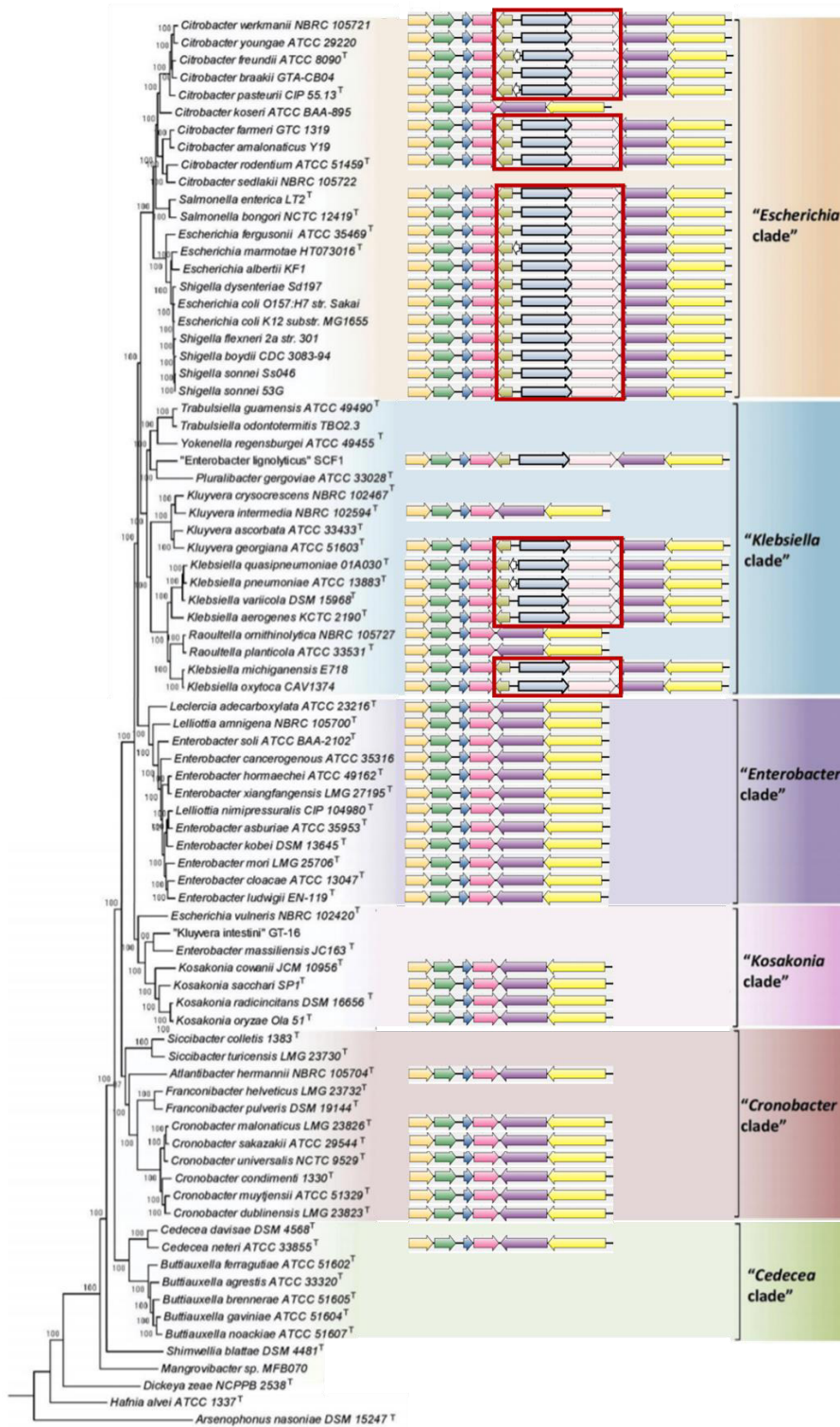


Figure 29 : Présence des éléments du système Zra dans la famille des Enterobacteriaceae

L'arbre phylogénétique utilisé est tiré de la publication de Alnajjar et al. 2017 (Alnajjar et Gupta 2017).. Il a été construit à partir de 2487 protéines essentielles grâce à la méthode du maximum de vraisemblance pour 78 espèces de la famille des Enterobacteriaceae. En face de chaque espèce bactérienne, la présence des gènes du système Zra est mentionnée et les gènes zra sont encadrés en rouge. Les gènes bordants ou non les gènes zraPSR sont indiqués en couleur lorsqu'ils sont identiques entre les différentes espèces bactériennes. L'analyse de synténie a été réalisée à l'aide du logiciel SyntTax (Oberto 2013). Les six principaux clades de la famille sont identifiés.



### 3 – Le système ZraPSR chez *E. coli* et *C. rodentium*

Afin d'étudier l'implication de ce système dans l'interaction et l'adaptation de la bactérie avec son hôte, le pathogène murin *C. rodentium* a été choisi comme second modèle d'étude. Ce dernier est un pathogène qui a évolué récemment et dont le génome a subi de nombreux événements de recombinaison et de transposition (Petty et al. 2011). Malgré ces nombreux réarrangements génomiques, la conservation du système *zraPSR* laisse supposer qu'il pourrait conférer un avantage sélectif à ce pathogène (Jordan et al. 2002).

De la même façon que chez *E. coli*, le système Zra est composé des trois gènes *zraS*, *zraR* et *zraP* dont l'ordre est identique. Les pourcentages d'identité génétique et protéique des composants du système entre les deux modèles sont élevés (Figure 30). Les régions promotrices de *zraPSR* de *E. coli* et *C. rodentium* ont été alignées. Les sites de fixation de ZraR qui avaient été déterminés à l'aide de la technique d'empreinte à la DNase par Leonhartsberger *et al* (Leonhartsberger et al. 2001) ont été reportés sur l'alignement. De même, à l'aide de données *in silico* et de la littérature, les motifs de fixation de  $\sigma 54$  (-12 et -24) et de  $\sigma 70$  (-10 et -35) ont été identifiés sur l'alignement. Comme pour *E. coli*, le gène *zraP* est transcrit de façon divergente par rapport à *zraSR* (Figure 30). La région promotrice possède un fort pourcentage d'identité. Les motifs de fixation de ZraR et de  $\sigma 54$  semblent particulièrement similaires.

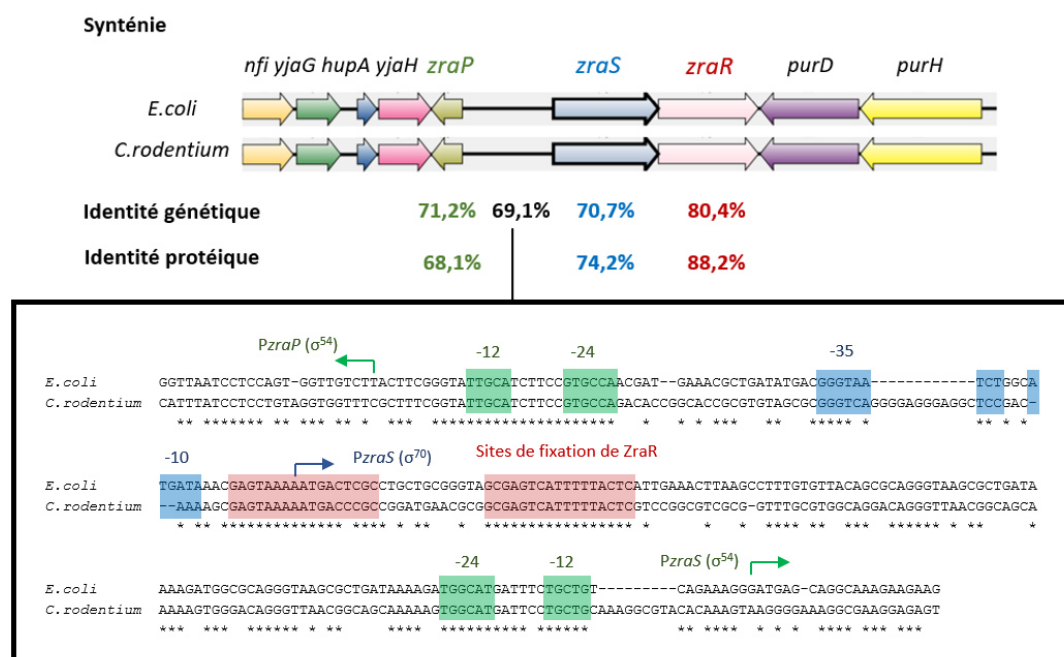


Figure 30 : Comparaison du système ZraPSR chez *E. coli* et *C. rodentium* au niveau génétique et protéique

La synténie (l'ordre des gènes) est schématisée pour *E. coli* et *C. rodentium*. En dessous de chacun des gènes *zra*, les identités génétique (calculée avec MUSCLE) et protéique (calculée avec clustal Omega) sont indiquées. La représentation de l'alignement de la région intergénique des deux bactéries a été réalisée avec le logiciel MUSCLE. Une étoile (\*) est placée sous les nucléotides identiques entre les deux séquences. Les nucléotides en rouge correspondent aux deux sites de fixation de ZraR chez *E. coli*, en vert à la région -12 et -24 du promoteur  $\sigma 54$ , enfin en bleu à la région -10 et -35 du promoteur  $\sigma 70$ .



### 3.1 – Régulation du système ZraPSR

#### 3.1.1 – Activité des promoteurs du système Zra chez *Citrobacter rodentium*

Les conditions d'expression du système *zraPSR* sont connues dans *E. coli*. L'expression est induite par le zinc, le plomb et certains antibiotiques tels que la polymyxine B et la loméfloxacin (Petit-Härtlein et al. 2015)(Rome et al. 2018). En revanche chez *C. rodentium*, les conditions d'expression de ce système ne sont pas connues. Pour les déterminer, une approche de fusion transcriptionnelle a été utilisée. Le principe est de fusionner le promoteur de l'opéron *zraSR* ou celui de *zraP* en amont des gènes de l'opéron *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens*. L'activation du promoteur conduit à la transcription et la production des protéines Lux. Les photons générés par l'oxydation du substrat de la luciférase permettent d'évaluer l'activité du promoteur. Préalablement, l'émission de luminescence par les bactéries seules ou les bactéries contenant le vecteur vide pLux a été évaluée. Celle-ci est négligeable et ne nécessite pas d'être retranchée aux luminescences mesurées.

Les valeurs maximales de luminescence de la fusion P*zraSR*::lux et de la fusion P*zraP*::lux avec ou sans métal sont indiquées dans la figure 31. En condition LB, chez la souche sauvage, la luminescence de la fusion P*zraSR*::lux a une valeur basale d'environ 3000 U.A./D.O. et la fusion P*zraP*::lux a une valeur basale d'environ 8000 U.A./D.O.. La luminescence des deux fusions est réprimée en milieu LB additionné de glucose 0.4% par rapport au milieu LB. Lorsque les bactéries sauvages sont exposées à des concentrations subinhibitrices de métal, il y a une augmentation de la luminescence. La réponse de la fusion est fortement induite par le cuivre et le zinc, avec une augmentation de la luminescence d'un facteur 2,3 et 1,8 pour P*zraSR*::lux, et 5 et 7 pour P*zraP*::lux par rapport à la luminescence mesurée sans métal. Contrairement au zinc et au cuivre, le plomb n'induit pas de différence d'activité des fusions transcriptionnelles.

Dans le contexte de la délétion de *zraR*, d'une part, l'activité de la fusion P*zraS*::lux est similaire à celle de la souche sauvage en milieu LB, LB additionné de glucose et LB additionné de plomb. En revanche, l'activité de la fusion chez le mutant  $\Delta zraR$  est inférieure à celle de la souche sauvage en milieu LB contenant du cuivre et du zinc. D'autre part, l'activité de la fusion P*zraP*::lux est nulle dans la souche  $\Delta zraR$  pour toutes les conditions.

Dans le contexte génétique du mutant  $\Delta zraP$ , l'activité de la fusion P*zraSR*::lux est similaire à celle de la souche sauvage en condition LB et LB additionné avec du glucose 0.4%. En revanche, l'activité de la fusion P*zraP*::lux est 3 fois plus forte chez le mutant  $\Delta zraP$  que dans la souche sauvage en condition LB. En présence de zinc ou de cuivre, l'activité de la fusion P*zraSR*::lux est 5 et 4 fois et l'activité de la fusion P*zraP*::lux est 2 et 3 fois plus importante que celles de la souche sauvage.

Ces résultats montrent que chez *C. rodentium* :

- ❖ En condition LB, le niveau d'expression basale de *zraP* est 2,6 fois supérieur à celui de *zraS*, ce qui suggère que le promoteur de *zraP* est plus fort que le promoteur de *zraS*.

- ❖ Le locus *zraPSR* est régulé négativement en présence de fortes concentrations en glucose. Cette répression n'est pas liée à la présence ou l'absence de ZraR.
- ❖ Le zinc et le cuivre sont les meilleurs inducteurs de la fusion *PzraP::lux* et *PzraS::lux* avec un profil d'expression très similaire de ces deux fusions. L'induction du système rapporteur en présence de zinc et de cuivre est directement liée à la présence du régulateur ZraR.
- ❖ ZraP réprime l'opéron *zraPSR* notamment en présence de métal.

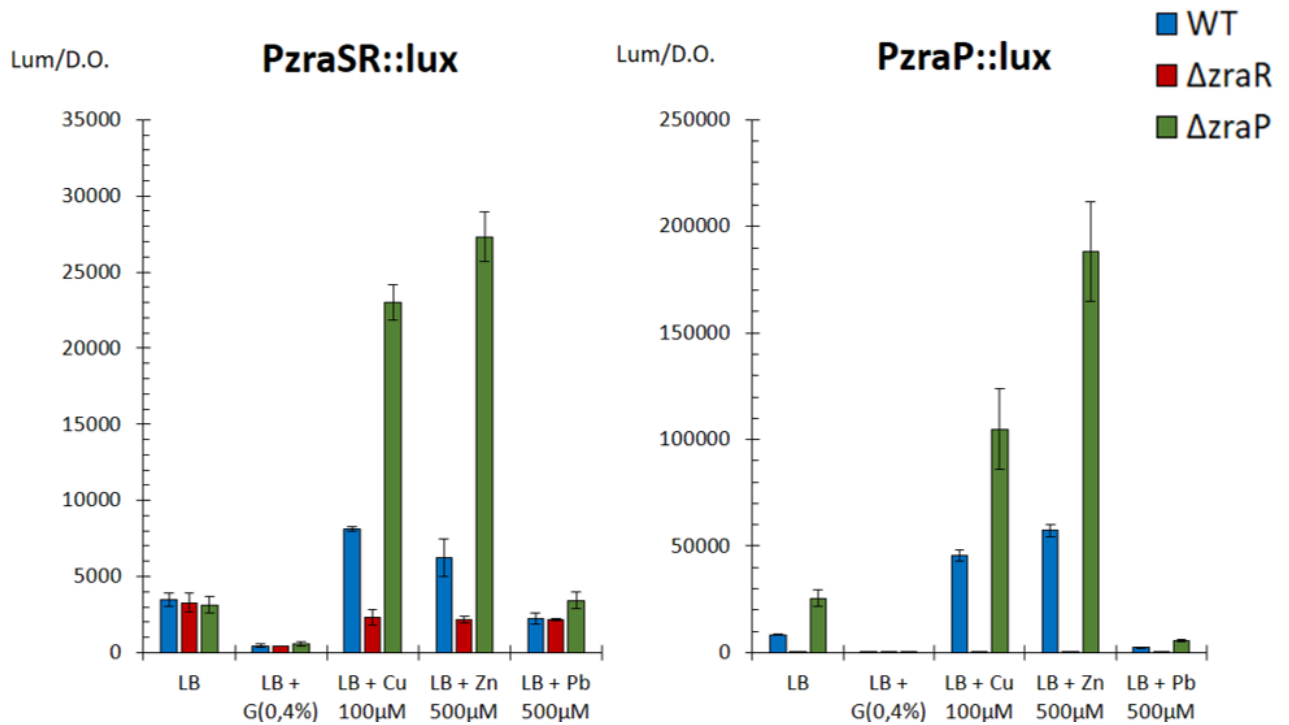


Figure 31 : Profil d'expression des promoteurs *zraSR* et *zraP* chez *Citrobacter rodentium*

Les gènes de l'opéron *lux* sont sous le contrôle des promoteurs *zraSR* et *zraP*. L'activité du promoteur est étudiée dans le contexte génétique de la souche sauvage (WT, en bleu) et des mutants  $\Delta zraR$  (en rouge) et  $\Delta zraP$  (en vert). La luminescence est mesurée toutes les 20 minutes pendant 24h à 37°C, en présence de concentrations subinhibitrices de cuivre (Cu), zinc (Zn), plomb (Pb) et cadmium (Cd) en microplaques de 96 puits. Cette figure représente la luminescence maximale exprimée en unité arbitraire (U.A.) normalisée par la D.O. 600nm correspondante pour chacune des conditions de culture.

### 3.1.1 – Activité des promoteurs du système Zra de *E. coli* et *C. rodentium* chez *E. coli*

La région intergénique du locus *zra* présente une identité génomique très importante (69.10%) entre *E. coli* et *C. rodentium* (Figure 30). De plus, les zones de fixation de ZraR sont très similaires entre les deux bactéries. Cela laisse supposer que le régulateur ZraR de *E. coli* pourrait reconnaître et se fixer sur la région promotrice des gènes *zra* de *C. rodentium*. Afin de répondre à cette question, l'activité des fusions entre le promoteur de *zraS* ou de *zraP* de *C. rodentium* et les gènes rapporteurs *lux* a été étudiée chez *E. coli* (Figure 32 C et D). A titre de comparaison, les fusions *PzraS::lux* et *PzraP::lux* de *E. coli* ont également été étudiées dans les mêmes conditions chez *E. coli* (Figure 32 A et B).

Les valeurs de luminescence maximale des différentes fusions en présence ou non de métal sont représentées dans la figure 32. Chez la souche sauvage de *E. coli*, l'activité des fusions *PzraSR::lux* et *PzraP::lux* de *E. coli* est environ 100 fois supérieure en présence de zinc ainsi que 4 et 2 fois inférieure en présence de forte concentration en glucose (Figure 32 A et B).

Chez la souche  $\Delta zraR$ , l'activité de la fusion *PzraSR::lux* est inférieure à celle de la souche sauvage en LB additionné en glucose, en LB additionné en cuivre et en LB additionné en zinc. L'activité de la fusion *PzraP::lux* est nulle lorsque le gène *zraR* est muté.

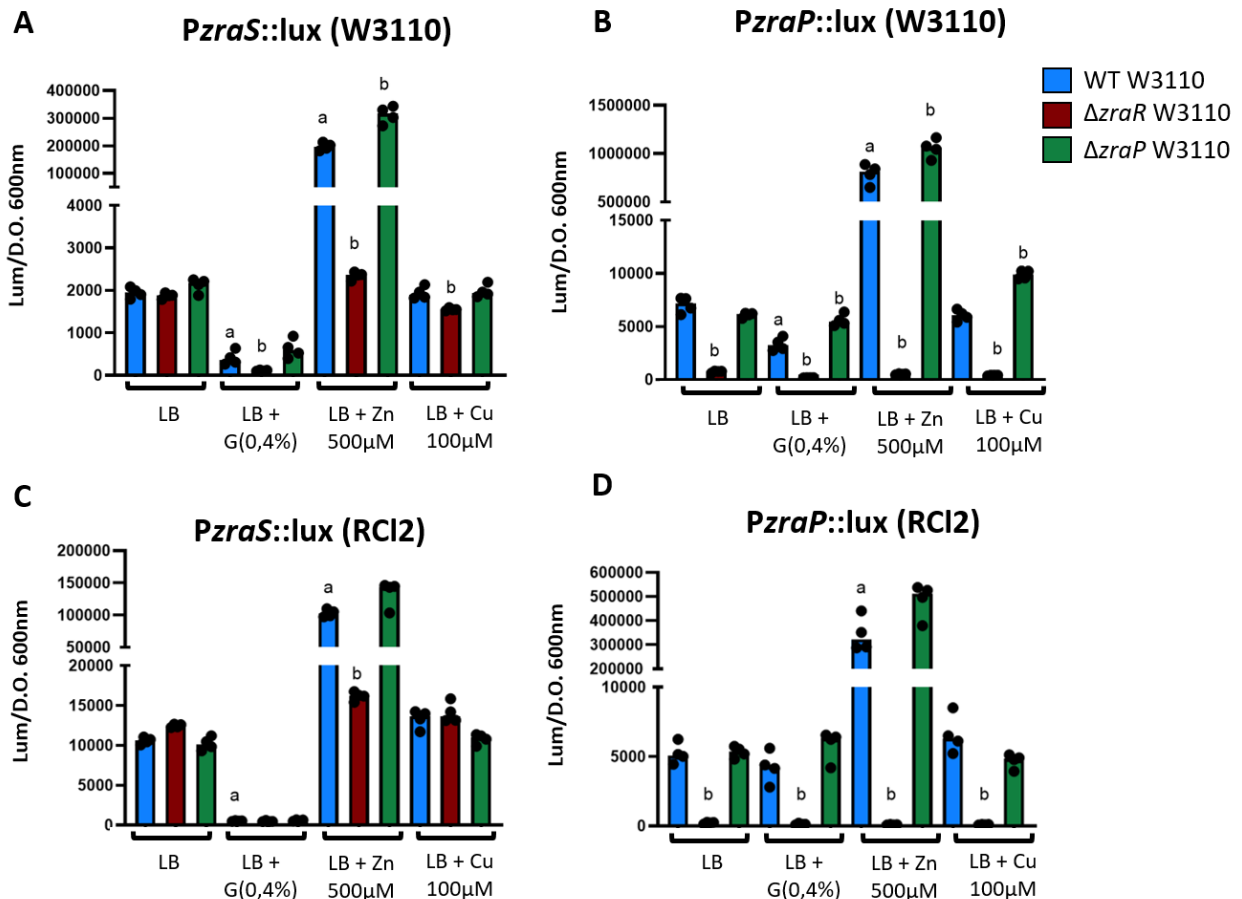
Chez la souche  $\Delta zraP$ , les fusions *PzraSR::lux* et *PzraP::lux* de *E. coli* ont une activité supérieure à celle de la souche sauvage notamment en LB additionné en zinc (Figure 32 A et B). Contrairement à chez *C. rodentium*, le cuivre n'a pas d'action sur l'activité des promoteurs de *zra* chez *E. coli* et le zinc a un effet inducteur beaucoup plus fort (100 fois).

Les fusions *PzraSR::lux* et *PzraP::lux* de *Citrobacter rodentium* RCI2 ont été placées chez les souches WT,  $\Delta zraR$  et  $\Delta zraP$  de *E. coli* W3110 (Figure 32 C et D). Chez la souche sauvage, les fusions transcriptionnelles sont actives et l'activité des fusions est diminuée lorsque le gène *zraR* est muté. Cela signifie que le régulateur ZraR de *E. coli* peut reconnaître et jouer son rôle de facteur de transcription au niveau de la région promotrice de *zraSR* et *zraP* de *C. rodentium*. Chez *E. coli*, l'activité des fusions transcriptionnelles de *C. rodentium* est très proche de celle des fusions de *E. coli*. Chez la souche sauvage, la fusion *PzraSR::lux* est réprimée en présence de forte quantité de glucose et activée en présence de zinc (10 fois) par rapport à la condition LB (Figure 32 C). Concernant la fusion *PzraP::lux* chez la souche sauvage, la fusion ne présente pas d'activité différentielle entre la condition LB et LB additionné en glucose. De plus, l'activité de la fusion est 100 fois supérieure en présence de zinc par rapport à la condition sans métal (Figure 32 D).

Chez le mutant  $\Delta zraR$ , la fusion *PzraSR::lux* n'est plus activée en présence de zinc en comparaison avec la souche sauvage et l'activité de la fusion *PzraP::lux* est nulle.

En revanche, chez le mutant  $\Delta zraP$ , l'activité des fusions ne diffère pas avec celle chez la souche sauvage.

L'identité génétique entre les deux souches est suffisante pour que ZraR de *E. coli* puisse reconnaître le locus *zra* de *C. rodentium*. Mais la régulation du locus *zra* de *C. rodentium* chez *E. coli* est différente de celle chez *C. rodentium*. En effet, l'activité des promoteurs n'est plus induite en présence de cuivre et l'induction de l'activité notamment de *PzraP::lux* en présence de zinc est supérieure chez *E. coli* par rapport à celle chez *C. rodentium* (100 fois contre 5 fois).

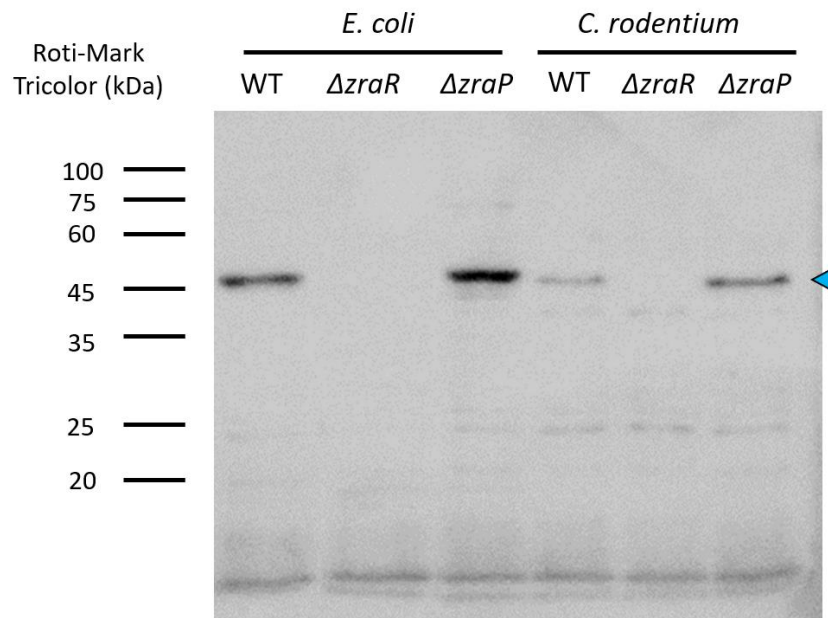


**Figure 32 :** Profil d'induction des promoteurs de *zraS* et *zraP* de *E.coli* et *C.rodentium* chez *E. coli* W3110 WT,  $\Delta zraR$  et  $\Delta zraP$

Les gènes de l'opéron *lux* sont sous le contrôle du promoteur *zraSR* et *zraP* de *E.coli* W3110 et de *C. rodentium* RC12. L'activité du promoteur est étudiée chez *E. coli* W3110 dans le contexte génétique de la souche sauvage (WT) et du mutant  $\Delta zraR$ . Le profil de l'induction du promoteur est analysé en mesurant la luminescence émise toutes les 20 minutes pendant 24h à 37°C, en présence de glucose ainsi qu'en présence de concentrations subinhibitrices de zinc (Zn) et de cuivre (Cu) en microplaques de 96 puits. Cette figure représente la luminescence maximale normalisée par la D.O. 600nm correspondante pour chacune des conditions de milieu. Le test de Mann-Whitney a été réalisé et une différence ( $p < 0,05$ ) entre deux conditions est indiqué par a ou b. Une différence entre la souche sauvage en condition LB + G (0,4%), LB + Zn 500µm ou LB + Cu 100µM par rapport à la souche sauvage en condition LB est indiquée par un « a ». Une différence entre la souche sauvage par rapport aux souches mutées dans une même condition est indiquée par un « b ».

### 3.1.2 – Quantification de ZraR par western blot

Dans la partie précédente, les analyses de l'activité du promoteur des gènes *zraSR* ont montré que chez *E. coli* et *C. rodentium*, la mutation du gène *zraP* entraînait une augmentation de l'activité du promoteur en condition LB supplémenté avec du zinc. Afin de vérifier si la délétion du gène *zraP* a un impact au niveau de la quantité de la protéine ZraR, les bactéries sauvage (WT) et mutées ( $\Delta zraR$  et  $\Delta zraP$ ) ont été cultivées en LB supplémenté avec 500 $\mu$ M de zinc jusqu'à une D.O. de 1. Les extraits ont ensuite été analysés par Western-Blot avec les anticorps anti-ZraR (figure 33). Comme attendu, La protéine ZraR n'est pas détectée chez les mutants  $\Delta zraR$ . Par ailleurs, Il semblerait qu'il y ait une quantité supérieure de protéine ZraR chez *E. coli* par rapport à *C. rodentium*. Néanmoins cela peut être dû à une détection plus faible de la protéine ZraR de *C.rodentium* puisque les anticorps sont spécifiques de la protéine ZraR de *E. coli*. Chez ces deux bactéries, la quantité de la protéine ZraR est supérieure dans le mutant  $\Delta zraP$  par rapport à la souche sauvage (WT). Cette observation est cohérente avec l'augmentation de l'activité du promoteur de *zraSR* chez  $\Delta zraP$  par rapport à la WT.



**Figure 33 :** Quantification relative de ZraR en condition LB supplémenté en zinc chez *E. coli* et *C. rodentium* par Western-Blot Anti-ZraR

Les bactéries sauvages (WT) et mutées ( $\Delta zraR$  et  $\Delta zraP$ ) de *E. coli* et *C. rodentium* ont été cultivées en LB supplémenté avec 500 $\mu$ M de zinc jusqu'à une D.O. de 1. Les cellules ont été récupérées et lysées. Les extraits cellulaires ont été séparés sur gel SDS-PAGE (15% d'acrylamide) et transfert sur membrane PVDF. Ensuite la présence de ZraR a été vérifiée à l'aide d'anticorps anti-ZraR. La protéine ZraR a été détectée par chimioluminescence et sa position est indiquée par une flèche bleue. Les bandes du marqueur de taille ont été reportées à gauche de l'image.

### 3.2 – Analyses phénotypiques

#### 3.2.1 – Le système ZraPSR n'est pas impliqué dans l'homéostasie métallique

L'expression des gènes du système ZraPSR est fortement induite en présence de concentrations sub-inhibitrices de cuivre et de zinc (Figure 31). Le système pourrait permettre de détecter la présence de zinc ou de cuivre et d'y répondre en protégeant le cytoplasme de la surcharge en métaux. Chez *E. coli*, le système Zra a déjà été montré comme ne participant pas à la résistance en présence de zinc ni de cuivre (Petit-Härtlein et al. 2015). Afin d'évaluer si le système ZraPSR est impliqué dans l'homéostasie métallique chez *C. rodentium*, les CMI (concentrations minimales inhibitrices) de la souche sauvage (WT) et des mutants ( $\Delta zraR$  et  $\Delta zraP$ ) ont été déterminées pour le zinc et le cuivre.

Les CMI du zinc sont estimées entre 750 et 800  $\mu\text{M}$  en milieu riche et 2.75 et 3mM pour celles du cuivre. La figure 34 montre qu'aucun des gènes *zra* n'est impliqué dans la résistance au zinc ou au cuivre car les valeurs CMI sont identiques entre la souche sauvage et les mutants.

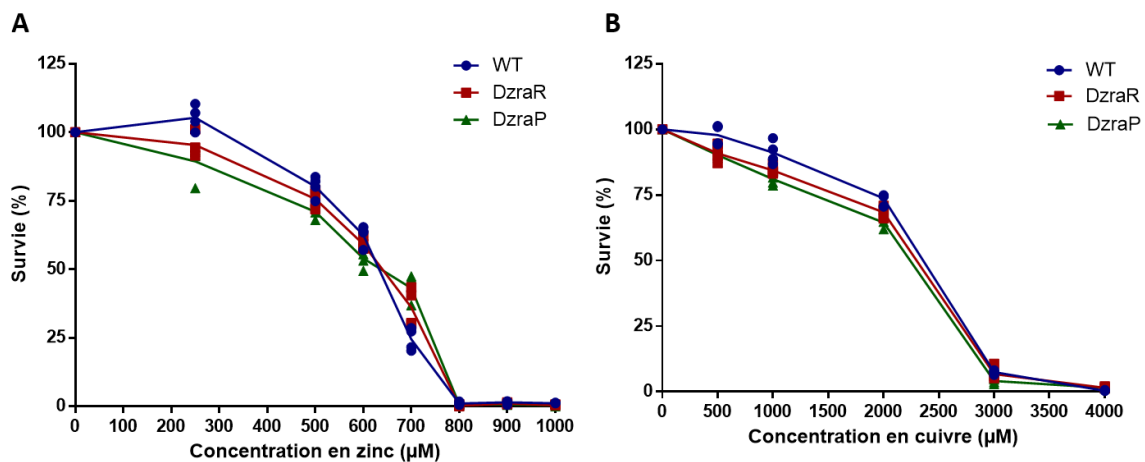


Figure 34 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de zinc et de cuivre pour la bactérie *Citrobacter rodentium* en milieu riche

Quatre précultures biologiquement indépendantes ont été réalisées pour chaque souche en absence de métaux en milieu riche liquide, LB, jusqu'à D.O de 0,6. Les bactéries ont ensuite été inoculées dans du milieu riche LB à D.O finale de 0,006 dans les puits d'une plaque de 96 puits contenant ou non des concentrations croissantes de zinc (A) ou de cuivre (B). La plaque a été incubée à 37°C pendant 24h avec agitation et mesure de la D.O toutes les 20 minutes. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition sans métal à 10h de culture.

#### 3.2.2 – Le système ZraPSR est impliqué dans la survie en présence d'antibiotiques

Le système ZraPSR chez *E. coli* est impliqué dans la réponse à différents stress notamment aux antibiotiques (Rome et al. 2018). En effet, il a été proposé que ce système soit un système de réponse au stress de l'enveloppe. C'est pourquoi nous nous sommes intéressées à l'impact de la délétion de *zraR* et *zraP* sur la sensibilité aux antibiotiques de *C. rodentium*. Afin de visualiser l'impact de la délétion de *zraR* et *zraP* sur la sensibilité aux antibiotiques, les pourcentages de survie ont été déterminés par rapport à la condition sans antibiotique (Figure 35). Chez *C. rodentium*, en présence de chlorure de benzéthonium (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) et de polymyxine B (0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), les souches  $\Delta zraR$  et  $\Delta zraP$  ont des pourcentages de survie 10 et 2 fois inférieurs

à celui de la souche sauvage (Figure 35). Le système Zra semble donc être également impliqué dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques chez *C. rodentium*.

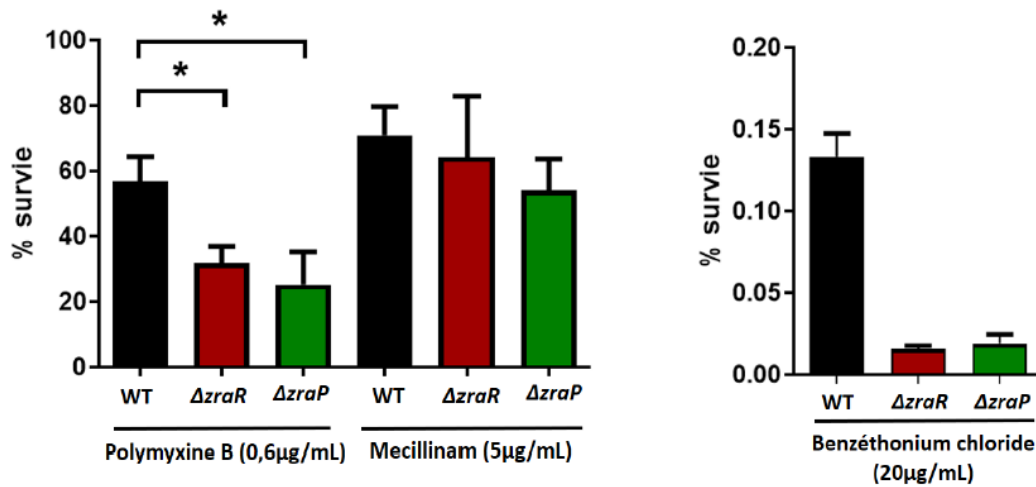


Figure 35 : Pourcentages de survie de *C. rodentium* WT,  $\Delta zraR$  et  $\Delta zraP$  en présence de différents antibiotiques

Les pourcentages de survie en présence de différents biocides sont présentés pour la souche sauvage WT et la souche mutante  $\Delta yhdWXYZ$ . Cette expérience a été réalisée en 4 réplicats pour les tests en présence de polymyxine B et de mécillinam et en 2 réplicats pour le test en présence de benzéthonium chlorure sur des cultures biologiquement indépendantes. Le test de Mann-Whitney a été réalisé et une différence ( $p < 0,05$ ) est indiqué par \*.

### 3.2.3 – La protéine ZraP n'est pas impliquée dans la pathogénie/virulence de *C. rodentium*

Dans le système Zra, la protéine ZraP joue à la fois un rôle de rétrocontrôle du système et elle est impliquée dans la résistance aux antimicrobiens notamment la polymyxine B et le chlorure de benzethonium chez *C. rodentium*. Ces mêmes effets avaient déjà été montrés dans des études antérieures chez *E. coli* (Rome et al. 2018). De plus, Thomassin et al ont montré que la délétion des gènes *zraS* et *zraR* a un effet sur la virulence de *C. rodentium* (Thomassin et al. 2017). Étant donné que ZraP est également impliqué dans les phénomènes de résistances aux antimicrobiens, son implication dans la pathogénie de *C. rodentium* a été investiguée.

*Citrobacter rodentium* est un agent infectieux responsable d'une perte de poids modeste et transitoire ainsi que de diarrhées chez la souris. Deux souches de souris sont principalement utilisées comme modèles : C57BL/6 et C3H/HeJ. Chez la souris C57BL/6, le pathogène est responsable d'une forme de maladie modérée alors que chez la souris C3H/HeJ, le pathogène est responsable d'une forme sévère de la maladie pouvant être fatale à cause de la déshydratation. Dans une démarche de bien-être animal, nous avons utilisé le modèle C57BL/6 dans cette étude.

Le protocole d'infection avec *Citrobacter rodentium* a été mis au point à l'aide de la publication de Crepin *et al.* (Crepin et al. 2016). Afin de diminuer les variations pouvant être liées au stress des animaux ou l'alimentation, les souris ont eu une semaine d'acclimatation à l'animalerie Dubois préalablement à l'expérience. Au jour 0, une solution de PBS ou une



solution de  $10^9$  CFU de bactéries WT ou  $\Delta zraP$  a été inoculée par gavage oral à 5 souris. Ensuite, le poids des souris a été suivi quotidiennement. Le pourcentage de poids par rapport au Jour 0 présente une variabilité élevée en fonction des individus. Néanmoins, les souris infectées semblent avoir une prise de poids moins importante que les souris non infectées (Figure 36A).

Les fèces ont également été collectés quotidiennement. Elles ont été pesées, broyées dans du PBS stérile puis étalées sur milieu MacConkey sorbitol. Ce milieu permet uniquement la croissance des entérobactéries. Étant donné qu'il y a très peu d'entérobactéries naturellement présentes dans le tube digestif, le dénombrement sur ce milieu permet d'évaluer le nombre de CFU de *C. rodentium* par gramme de fèces. La concentration chez les souris du groupe témoin reste faible ( $10^3$  CFU/g) et constante tout au long de l'expérience (Figure 36B). En revanche, comme attendu, la concentration chez le groupe infecté avec la bactérie WT augmente et atteint un plateau à partir du 6<sup>ième</sup> jour post-infection ( $4 \times 10^6$  CFU/g). A partir du 11<sup>ième</sup> jour, la concentration bactérienne commence à diminuer correspondant à la phase de clairance où l'hôte commence à éliminer l'infection (Figure 36B). Chez le groupe infecté avec la bactérie  $\Delta zraP$ , la concentration bactérienne évolue de la même façon que chez le groupe infecté par la bactérie WT excepté une clairance légèrement supérieure entre le 10<sup>ième</sup> et 14<sup>ième</sup> jour (Figure 36B).

Le 14<sup>ième</sup> jour post-infection, les souris ont été sacrifiées et leur colon a été prélevé. Dans un premier temps, leur colon a été pesé et sa longueur mesurée puis dans un second temps, 5mm ont été découpés et fixés afin d'être utilisés pour réaliser des analyses histologiques. *Citrobacter rodentium* est responsable de légère colite chez le modèle murin C57BL/6. Afin d'évaluer cet effet, le poids des colons a été rapporté à leur longueur. Ainsi, une augmentation significative est visible chez les souris infectées en comparaison du groupe de souris non infectées ( $p > 0.05$ ) (Figure 36C). En revanche aucune différence n'est visible entre les souris infectées par la bactérie WT et les souris infectées par la bactérie  $\Delta zraP$  (Figure 36C). Les colons ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) puis inclus dans un bloc de paraffine, coupés au microtome et colorés avec la coloration HE (Hématoxyline et éosine, figure 36E) et PAS (Periodic Acid Schiff, figure 36F). L'inclusion dans la paraffine et les coupes ont été réalisées par mes soins dans les locaux du laboratoire BF2i et les colorations par la plateforme d'histopathologie de VetAgroSup. L'infection par *Citrobacter rodentium* provoque une élongation des cryptes intestinales (CCH, colonic crypt hyperplasia) et une déplétion en cellules caliciformes. Le premier paramètre a été évalué en mesurant 10 cryptes correctement orientés chez chaque souris symbolisée par un trait noir dans la figure 36D. La taille des cryptes est significativement supérieure chez les souris infectées par rapport aux souris non infectées ( $p > 0.0001$ ). Aucune différence n'est observée entre les deux groupes de souris infectées (Figure 36D). La coloration au PAS permet d'identifier les cellules caliciformes car les polysaccharides présents dans le mucus sont oxydés par l'acide périodique. Dans la figure 36F, cette coloration permet de mettre en évidence que les souris infectées ont des cellules caliciformes plus petites et probablement moins de mucus que les souris non infectées. Ces analyses ne montrent pas d'effet de la délétion de *zraP* sur la virulence de *Citrobacter rodentium*.



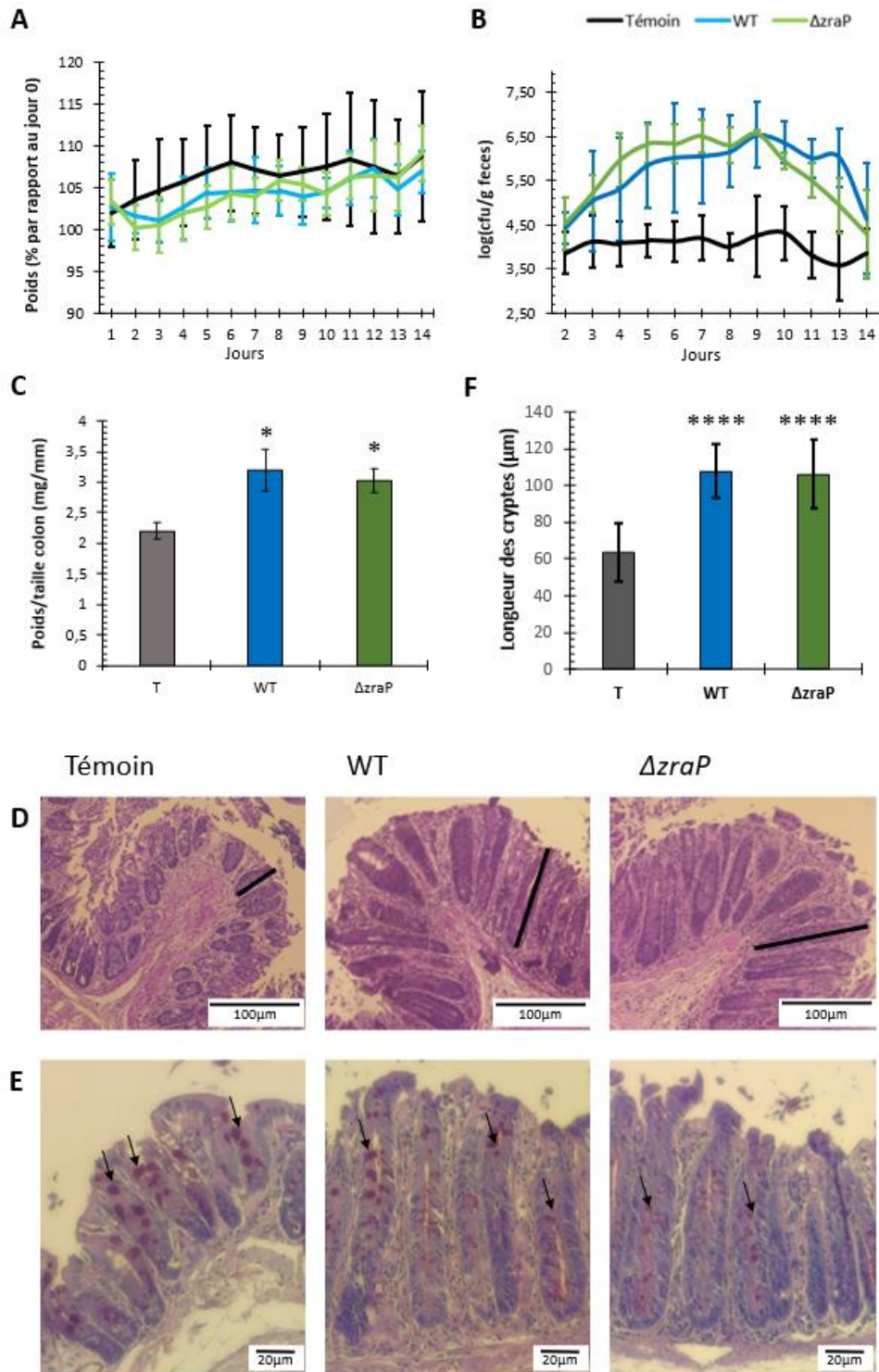


Figure 36 : Impact de la délétion de *zraP* sur la pathogénie de *C. rodentium*

Les souris C57BL/6 ont été infectées par gavage oral avec une solution de PBS, une solution bactérienne de WT RCI2 ou  $\Delta zraP$  RCI2 (n=5). (A) Le poids des souris a été suivi quotidiennement. Le pourcentage du poids des souris par rapport au jour de l'infection est présenté pour chaque jour post-infection. (B) Les fèces ont été collectées quotidiennement, pesées, broyées dans du PBS et étalées sur MacConkey Sorbitol. La concentration bactérienne a été déterminé en CFU/gramme de fèces. (C) Les souris ont été sacrifiées au 14<sup>ième</sup> jour et leur colon a été prélevé. Il a été pesé et mesuré, ce qui a permis de déterminer un ratio poids/longueur

du colon en mg/mm. Le test statistique de Mann-Whitney a été réalisé et une différence  $p < 0.05$  entre les conditions d'infection et la condition contrôle est indiquée par \*. (D et F) Les colons ont été fixés, inclus dans de la paraffine et coupés en fine lamelle au microtome puis colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine (D) ou du PAS (E). (F) Dix cryptes intestinales correctement orientées ont été mesurées par souris. Le test statistique de Mann-Whitney a été réalisé et une différence  $p < 0.0001$  entre les conditions d'infection et la condition contrôle est indiquée par \*\*\*\*.

#### 4 - Conclusion

Dans ce chapitre, l'étude de la conservation du système ZraPSR a montré qu'il était présent chez des *Enterobacteriaceae*, des *Yersiniaceae* et des *Budviciaceae*. Chez les *Enterobacteriaceae*, ce système est conservé seulement chez le clade d'*Escherichia* et celui de *Klebsiella*. Les trois éléments du système ZraPSR ont co-évolué et sont retrouvés ensemble chez toutes les entérobactéries où le système est présent. Le système ZraPSR semble plus conservé chez une majorité d'entérobactéries pathogènes ou commensales des mammifères.

Le système ZraPSR a ensuite été étudié chez un pathogène murin, *Citrobacter rodentium*. Chez cet organisme, ce système est activé en présence de zinc mais également de cuivre. Néanmoins le système n'est pas impliqué dans l'homéostasie métallique comme cela avait déjà été observé chez *E. coli*. Nous avons aussi montré que la délétion de *zraR* ou *zraP* augmentait la sensibilité à la polymyxine B et au chlorure de benzethonium. Une étude a déjà mise en évidence l'impact de la délétion de *zraR* sur la virulence de *Citrobacter rodentium*. Afin de déterminer si ZraP jouait également un rôle dans la pathogénie, des tests d'infections ont été réalisés. Il semble que ZraP ne soit pas impliqué dans la virulence.

---

## Chapitre VI – Identification des cibles du régulateur ZraR et de nouveaux acteurs de la réponse au stress

---

### 1 – Avant-propos

Dans le chapitre précédent, le rôle de ZraPSR a été mis en évidence dans la résistance à la polymyxine B et au chlorure de benzéthonium chez *C. rodentium*. Des études précédentes avaient montré que le système Zra était impliqué dans la résistance à la polymyxine B chez *E. coli* (Appia-Ayme et al. 2011). Les travaux de la thèse de Kevin Rome ont montré que la délétion de *zraS* ou *zraP* conférait une sensibilité accrue à de nombreux antibiotiques et des stress environnementaux. Une approche de microscopie a également montré que les mutants de ce système présentaient un défaut d'intégrité membranaire en présence de biocides (Rome et al. 2018). Le système ZraPSR a donc été proposé comme un système de réponse au stress de l'enveloppe (ESR).

Néanmoins les mécanismes moléculaires sous-jacents du fonctionnement de ce système restent à élucider. Dans la littérature, les ESR ont un rôle prépondérant dans la réponse au stress via le contrôle coordonné de l'expression d'un certain nombre de gènes. Jusqu'à présent le régulateur ZraR était seulement connu comme régulant le locus *zra*. Or, on peut supposer que ce régulateur pourrait jouer un rôle de facteur de transcription au niveau d'autres *loci*. Pour répondre à cette question, lors de la thèse de Kevin Rome, les cibles potentielles de ZraR ont été identifiées par une approche de ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing). Cette approche a permis d'identifier les zones de fixation du régulateur ZraR avec l'ADN et d'identifier les gènes potentiels directement régulés par le régulateur. Durant mon master et le début de ma thèse, j'ai étudié la régulation de l'expression de certaines de ces cibles par qRT-PCR afin de valider ou infirmer leur régulation par ZraR. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication présentée ci-dessous. Par la suite, certaines cibles ont été plus particulièrement étudiées pour comprendre leur rôle dans la réponse au stress.

## 2 – Identification des cibles par ChIP-seq et validation par qRT-PCR

Article



## The Two-Component System ZraPSR Is a Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*

Kévin Rome<sup>1</sup>, Céline Borde<sup>1</sup>, Raleb Taher<sup>2</sup>, Julien Cayron<sup>3</sup>, Christian Lesterlin<sup>3</sup>, Erwan Gueguen<sup>1</sup>, Eve De Rosny<sup>2</sup> and Agnès Rodrigue<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR5240, CNRS, INSA Lyon, Université Lyon 1, F-69621 Villeurbanne Cedex, France

<sup>2</sup> - Institut de Biologie Structurale, Campus EPN, CS, 10090, 71 Avenue des Martyrs, 38044 Grenoble cedex 9, France

<sup>3</sup> - Microbiologie Moléculaire et Biochimie Structurale (MMSB), Université Lyon 1, CNRS, INSERM, UMR5086, 69007 Lyon, France

Correspondence to Agnès Rodrigue: [agnes.rodrigue@insa-lyon.fr](mailto:agnes.rodrigue@insa-lyon.fr)

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021>

Edited by Jenal Urs

### Abstract

During their lifecycle, bacteria are exposed to continuous changes in their environment, some of which are stressful and can be harmful. The cell envelope is the first line of defense against a hostile environment, but it is also the first target for damage. To deal with this problem, bacteria have evolved systems collectively called "envelope stress response," or ESR, dedicated to the detection and repair of damaged components. Here we decided to investigate whether the atypical two-component system ZraP-SR is a novel ESR. Based on the screening of more than 240 drugs using the Biolog technology, we show that the deletion of *zraP* or *zraR* confers increased susceptibility to five classes of antibiotics and to some environmental stress targeting the envelope. Using a microscopy approach, we also establish that ZraP and ZraR are required to maintain envelope integrity. So far, the ZraR regulator was only known to activate the transcription of *zraP* and *zraSR*. Using chromatin immunoprecipitation followed by sequencing and RT-qPCR, we have now identified 25 additional genes regulated by ZraR, the majority of which are involved in the response against stress. Taken together, our results demonstrate that ZraP-SR is a novel ESR.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

A common feature of bacteria is that their envelope is in direct contact with their environment. The integrity of this structure is thus crucial to protect the cells against changing or stressful conditions. Detection of stress defects in the cell wall structure or assembly, and ability to repair and maintain the envelope structure are key functions allowing bacteria to evolve in unbalanced environments. In Gram-negative bacteria, several signal transduction pathways are dedicated to the detection of damage of the envelope and to a rapid response via transcriptional regulation of effector genes. These systems are grouped under the term envelope stress response (ESR). Each ESR detects a set of stimuli and controls the expression of genes involved in different cellular functions that concur to the repair or the homeostasis of the envelope. These stimuli range from physical (heat, surface adhesion), chemical (indole, antibiotics, metals) to biological stress

(misfolded or damaged proteins) [1]. In *Escherichia coli*, the main ESRs are the  $\sigma E$ , Psp, Cpx, Bae and Rcs pathways [2–5]. Most of these ESRs systems belong to the two-component systems family, like Rcs, Bae or Cpx [6]. A sensor composed of a histidine kinase located in the inner membrane autophosphorylates upon signal detection and subsequently phosphorylates a cognate cytoplasmic response regulator [7]. When activated, the regulator modulates the expression of the stress response.

One of the best-characterized ESRs is the Cpx system composed of the CpxA histidine kinase and the CpxR response regulator. Cpx is induced by a diversity of extracytoplasmic stimuli such as pH variations, hyperosmolarity, indole and metals [8]. It is also responsive to periplasmic protein misfolding, peptidoglycan alteration and fluctuations of the physical properties of the membranes [3]. Notably, Cpx responds to the fluctuation of the outer-membrane properties upon cell attachment to hydrophobic



surfaces, in an NlpE-dependent manner. Overexpression of this this outer-membrane lipoprotein leads to activation of CpxA [9]. It has been shown also that the Cpx system monitors the appropriate targeting of lipoproteins and contributes to the suppression of the toxic effect in case of mislocalization [10]. A transcriptomic study revealed that induction of Cpx by NlpE results in the deregulation of a hundred genes [11]. The signature of stress adaptation mediated by CpxAR is the down-regulation of several large and energy-consuming membrane complexes, and the up-regulation of proteases and chaperones [11]. The identification of CpxP as an accessory protein of the two-component CpxAR system raised the question of its role. CpxP does not seem to be involved in signal transfer between CpxA and CpxR. Instead, it modulates the autokinase activity of CpxA by interacting with its sensor domain. This interaction results in a negative feedback on the CpxAR signaling cascade [12]. The CpxA–CpxP interaction has been inferred from the structural study of CpxP. CpxP is an antiparallel dimer and has an  $\alpha$ -helix structure forming a cap shaped dimer. Interestingly, the concave surface has many positively charged residues, whereas the convex surface contains a hydrophobic patch. It has been suggested that the positively charged concave surface of the CpxP dimer interacts with negatively charged residues of the periplasmic domain of CpxA. When under stress, CpxP would be dissociated from CpxA by misfolded proteins, through their interaction with the hydrophobic patch in the convex region of the former [13,14]. Following its release, CpxP is proposed to contribute to prevent protein aggregation through its chaperone activity [13].

The CpxP structure has revealed a structural homology to periplasmic proteins that was not predictable from the amino acid sequence. These structural homologs were grouped under the name of "CpxP superfamily," consisting of the periplasmic proteins CpxP, Spy and ZraP [15]. The amino acid sequence identity between ZraP and Spy, ZraP and CpxP, Spy and CpxP is 13%, 12% and 29%, respectively. These proteins have the structural particularity of being organized in oligomers composed of dimers of intertwined  $\alpha$ -helices. In addition to this common tertiary structure, the analysis of CpxP, Spy and ZraP structures revealed the presence of an LTXXQ motif forming a "pinhead" at the end of a helix specific to this family. Although the chaperone function of Spy and CpxP in the stress response of the envelope has been known for a long time [16], this is not the case for ZraP for which a similar role has been inferred only from indirect observations [17].

The *zraP* gene is clustered and co-regulated with the two-component system *zraSR*. The expression of ZraP and ZraSR is induced by  $Zn^{2+}$  through the *zraSR* phosphorelay, although it is not involved in zinc resistance [18]. Interestingly, we previously

showed that ZraP displays chaperone properties and is a repressor of the expression of the ZraP-SR system [18]. Thus, both at the structural and functional levels, the Zra system share similarities with the Cpx signaling pathway.

The functional convergence between Spy and CpxP was suggested by the fact that the expression of *spy* and *cpxP* is induced in the presence of polymyxin B [19]. Polymyxin B is an antibiotic of the family of cationic peptides which binds to negatively charged lipopolysaccharides (LPS) leading to alteration of the outer membrane [20]. Appia *et al.* [17] investigated in *Salmonella enterica* the effect of polymyxin B on the third element of this structural family, ZraP. Ultimately, by phenotypic analysis of deletion mutants  $\Delta cpxP$ ,  $\Delta zraP$  and  $\Delta spy$  in the presence of polymyxin B, these authors showed that all the components of the "CpxP superfamily" are involved in the intrinsic resistance to this antibiotic. This result also suggested that ZraP is involved in envelope homeostasis.

Here, we have investigated the function of ZraP-SR in antibiotic resistance and characterized the regulon of ZraR. We show that ZraP and ZraSR are important to maintain membrane integrity in the presence of biocides targeting the envelope, suggesting that Zra is a novel ESR. We finally demonstrate, using chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-Seq), that ZraR controls a regulon of genes of diverse functions that may be critical to maintain envelope integrity and cell survival under stressful conditions.

## Results

### Zra confers intrinsic resistance to several drugs

The absence of ZraP confers sensitivity to the cationic polypeptide antibiotic polymyxin B in *S. enterica* [17], suggesting that it may be involved in biocide resistance mechanisms. To further its characterization and determine if ZraP is actually a key actor of cell survival under stressful conditions, we used the Biolog Phenotype Microarrays technology [21]. Thus, 240 chemicals were screened that belong to different chemical classes: detergent, uncoupling agents, metals, antibiotics and so on. *E. coli* lacking *zraP* developed sensitivity to seven drugs, five of which were antibiotics (Table 1).  $\Delta zraP$  mutant was more sensitive to the antibiotics lomefloxacin (fluoroquinolone), capreomycin (aminoglycoside), puromycin (aminonucleoside), tetracycline (cycline) and amoxicillin ( $\beta$ -lactam) than WT. The *zraP* deletion mutant was also more sensitive to the detergent domiphen bromide and to the electron acceptor methyl viologen. On the other hand, it was more resistant to the antibiotics cephalotin, and cefuroxime ( $\beta$ -lactams, cephalosporin), amikacine (aminoglycoside) and the oxidative-phosphorylation inhibitor CCCP (Table 1).



**Table 1.** High-throughput screening of the sensitivity of the *zraR* mutant to drugs

Drug	Family	Target	Δarea (Δ <i>zraP</i> -WT)	Phenotype Δ <i>zraP</i>	
Lomefloxacin	Fluoroquinolone	Replication	-5595	Sensitive	
Puromycin	Aminonucleoside	Protein synthesis	-4466		
Amoxicillin	β-lactam	Peptidoglycan	-3180		
Methyl viologen	Electron acceptor	Respiration	-2832		
Capreomycin	Aminoglycoside	Protein synthesis	-1421		
Domiphen bromide	Quaternary Ammonium	Membranes	-1290		
Tetracycline	Cycline	Protein synthesis	-338		
Cephalotin	β-lactam Cephalosporin	Peptidoglycan	6670		Resistant
Cefuroxime	β-lactam Cephalosporin	Peptidoglycan	6266		
Amikacine	Aminoglycoside	Protein synthesis	1364		
CCCP	Oxidative phosphorylation inhibitor	Respiration	1191		

Using the Biolog technology, the respiration of the bacteria was monitored for 24 h. Δarea: the area under the resulting curves were calculated, then the area of the curve obtained with the wild-type strain was subtracted from the area of the mutant strain.

Because the Biolog technology may be occasionally biased, these results were confirmed by *in vivo* survival tests using the same drugs or drugs of the same families. The assays were also extended to more drugs and to the Δ*zraR* mutant. For that purpose, the bacteria were first grown in liquid medium until OD<sub>600 nm</sub> = 0.1, then the drug was added at a sub-inhibitory concentration to avoid any secondary effects; after 1 h the bacteria were spread on agar rich medium plates. The survival bacterial rate corresponds to the ratio of living cells in the untreated and treated conditions. The impact of ZraP and ZraR on the cell survival is given by the ratio of the survival rates between WT and mutant. The Biolog results were confirmed for most of the tested chemicals. They were not confirmed for methyl viologen and CCCP for which opposite results were obtained (Fig. 1a). As these two compounds are electron uncouplers, they may interfere with the reduction of tetrazolium dye which monitors the respiration in the Biolog system. The Biolog results were also not confirmed for cephalotin as the observed effect was not statistically significant. Among the other chemical tested, the Δ*zraP* mutant was more sensitive to benzethonium chloride (quaternary ammonium, surfactant) and ampicillin (β-lactam) (Fig. 1a) and more resistant to gentamicin (aminoglycoside). We finally confirmed that *zraP* is more sensitive to polymyxin B. When tested, the Δ*zraR* mutant displayed phenotypes similar to that of the Δ*zraP* mutant, except that it was more sensitive to rifampicin (rifamycin) and to mecillinam (β-lactam) (Fig. 1a).

The role of ZraPSR in the intrinsic antibiotics resistance suggests that the expression of the *zra* genes is induced in their presence. To test this hypothesis, we have used transcriptional fusion between the promoters of *zraP* and *zraS* and the *luxCDABE* genes. The induction profile of P*zraP*::*lux* in response to antimicrobials at subinhibitory concentrations was analyzed. The expression of *zraP* is induced 2- to 3-fold in the presence of benzethonium chloride, mecillinam, polymyxin B, tetracycline and lomefloxacin compared to the control condition (Fig. 1b). The expression of *zraS* was induced by the same

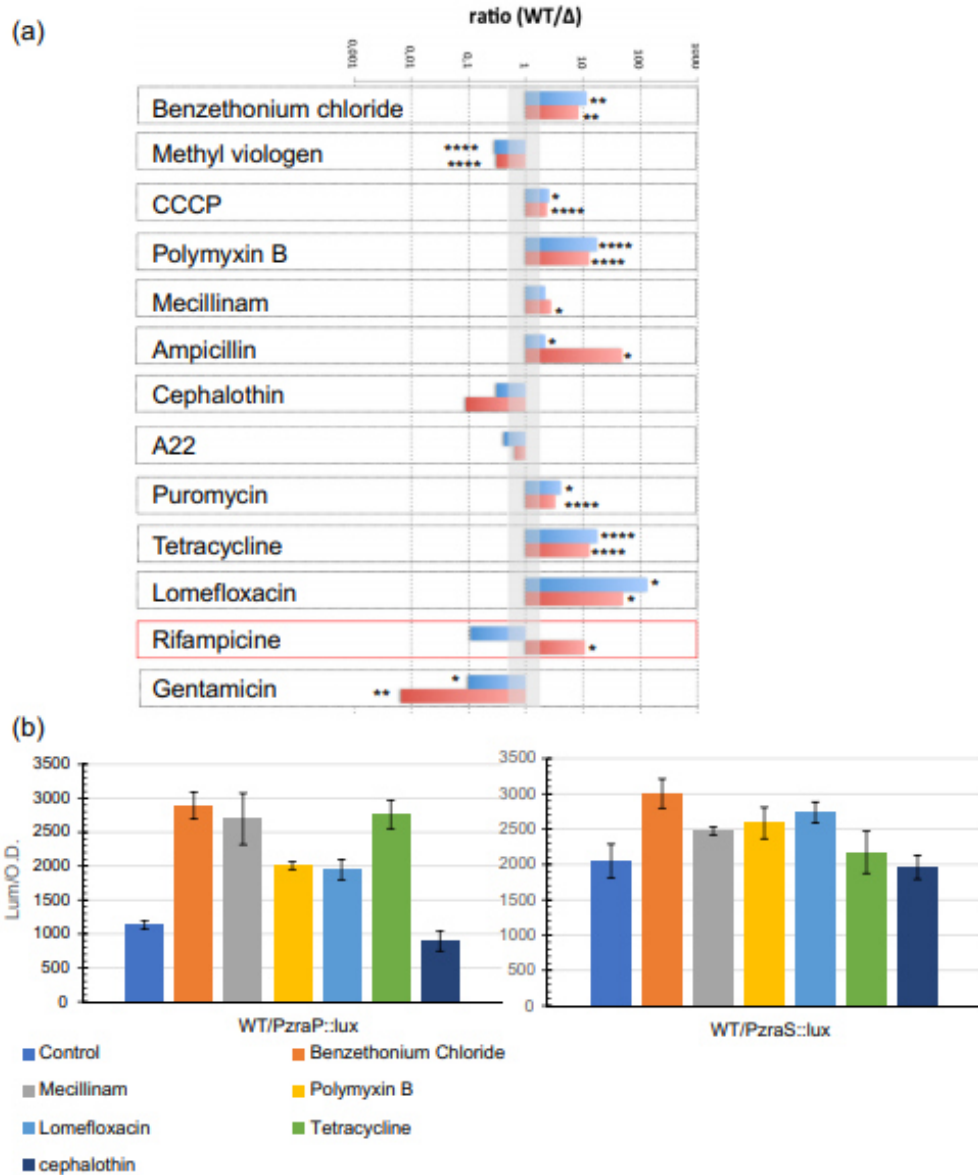
compounds as *zraP*. To note, the fold change of induction was less pronounced with *zraS* as previously observed using Zn as an inducer [18]. As a control, we used cephalothin; the *zra* mutants were not more sensitive to this compound. In this case, the expression of *zraP* or *zraS* was not induced and was similar to the control condition. These results demonstrate that the expression of the system is induced by antimicrobials to which the mutants are more sensitive, underlying the function of ZraPSR in response to these antimicrobials.

**Impact of the Zra mutations on environmental stress survival**

The Biolog chemical phenotyping, as well as the *in vivo* assays, highlighted the susceptibility of the *zra* mutants to several chemicals, mainly to those targeting the envelope. To investigate a more general function of the Zra system in stress survival, *zra* mutants were tested under environmental stresses that *E. coli* may encounter during its lifecycle and that affect the envelope. The conditions tested were acidic pH, bile salts, indole, oxidative stress and osmotic stress. The deletion of *zraP* significantly altered the survival of bacterial grown under acidic pH in the presence of bile salts or after an osmotic choc with NaCl (Table 2), while the deletion of *zraR* only conferred sensitivity to acidic pH and osmotic shock (Table 2).

**ZraP-SR are important for membrane integrity in the presence of membrane-targeting biocides**

Because of its similarity with CpxP-AR, ZraP-SR was predicted to be an ESR. To assess if the *zra* mutants show defects in membrane integrity, we used the Live/Dead assay. This kit utilizes a mixture of SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain and the red-fluorescent nucleic acid stain, propidium iodide (LIVE/DEAD™ BacLight™; Thermo Fisher Scientific). With SYTO 9, all bacteria display green fluorescence, whereas propidium iodide penetrates only bacteria with damaged membranes, which display red fluorescence. In the



**Fig. 1.** Impact of *zraP* or *zraR* deletion on resistance to several antibiotics. (a) Relative survival rate of the  $\Delta zraP$  (in blue) or  $\Delta zraR$  (in red) mutants, compared to the wild-type strain. \*Denotes significant difference; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ , Student's *t* test. (b) Expression of PzraP::lux (left) or PzraS::lux (right) gene fusions in the presence of different compounds. The values represent the maximum of fluorescence over OD 600 nm recorded in LB medium at 37 °C.



**Table 2.** Sensitivity of the *zraP* and *zraR* mutants to environmental stresses

Condition	Stress	Survival ratio (WT/ $\Delta$ <i>zraP</i> )	Survival ratio (WT/ $\Delta$ <i>zraR</i> )
Malic acid	pH	8.97****	8.20***
Bile salts	Membrane	2.42*	1.01
Indole	Membrane	1.44 ns	1.46
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidative	1.05 ns	1.21
NaCl	Osmotic	1.60*	1.78*

The following concentrations were used: 33 mM malic acid, 0.05% bile salts, 3 mM indole, 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 500 mM NaCl. Survival (%) = CFU (colony-forming units) of surviving cells/CFU of non-challenged cells. Survival ratio of the mutant ( $\Delta$ *zraP* or  $\Delta$ *zraR*) was calculated as the ratio of survival percentages (WT/mutant).

\*Denotes significant difference; \* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; (n.s.) = non significant ( $p > 0.05$ ), Student's t test.

absence of stress, the  $\Delta$ *zraP* or  $\Delta$ *zraR* cells showed no default in membrane integrity or in cell morphology as compared to the wild-type cells (Fig. 2A). Bacteria were incubated for 1 h with different drugs at sub-inhibitory concentrations. After treatment with the quaternary ammonium surfactant (cationic biocide) benzethonium chloride, the  $\Delta$ *zraP* and  $\Delta$ *zraR* mutants displayed significantly more red-labeled cells than wild type, showing that their membrane integrity was more affected (Fig. 2B). Upon exposure to polymyxin B, which disrupts the cell membranes, the  $\Delta$ *zraP* and  $\Delta$ *zraR* mutants also exhibited significantly more red-labeled cells (Fig. 2C). Next, we incubated the cells with mecillinam (adminocillin) a  $\beta$ -lactam antibiotic, an inhibitor of the peptidoglycan transpeptidase PBP2, which causes cell rounding. In this case, the bacteria (WT and mutants) were all stained green. As expected, all the cells were rounder than the untreated controls, but the mutant cells were even smaller and more spherical (see Fig. S4 for a magnification of the images). The average cell size (measured as the length between the two poles) in the control was 2.85  $\mu$ m ( $\pm 0.15$ ) (Fig. 2D) whereas in the presence of mecillinam, the average size of the WT cells was 2.56 ( $\pm 0.15$ )  $\mu$ m, that of the  $\Delta$ *zraR* mutant was 2.19 ( $\pm 0.09$ )  $\mu$ m and that of the  $\Delta$ *zraP* mutant, 2.12 ( $\pm 0.08$ )  $\mu$ m (Fig. 2D). For comparison, we used antibiotics that do not target the envelope but to which the  $\Delta$ *zra* mutants are more susceptible. Accordingly, in the presence of tetracycline, which targets translation, few bacteria were labeled red and no significant differences were obtained between the  $\Delta$ *zra* mutants and the wild-type strain. The results were similar to the control condition in the absence of an external drug (Fig. 2A–E).

As a conclusion, in the presence of drugs that target the envelope, the  $\Delta$ *zra* mutants show enhanced membrane disruption and abnormal cell shape. This highlights the importance of the Zra system for envelope maintenance.

### ZraP protects the cell from envelope stress via its inhibitory function of the system

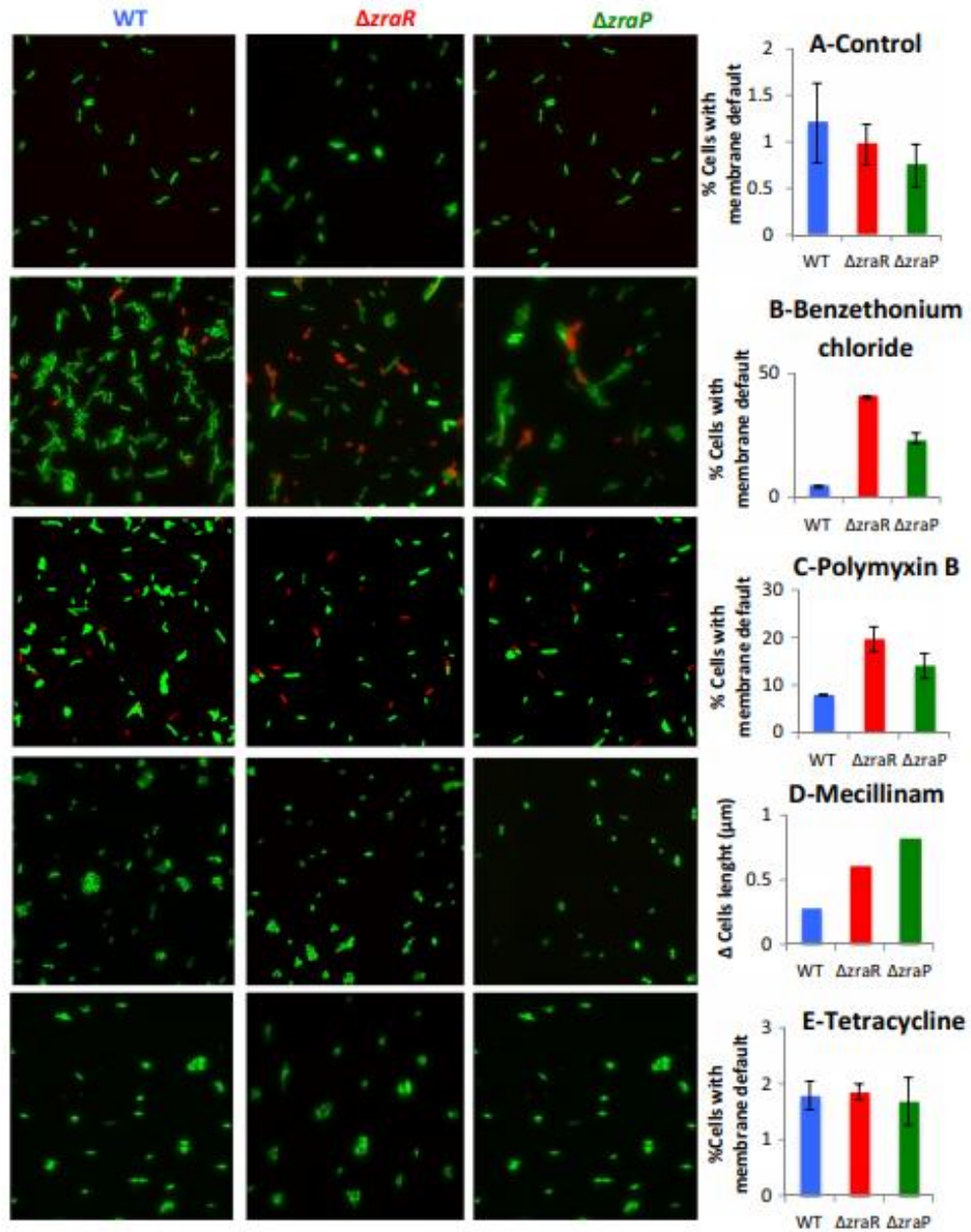
We previously showed, *in vitro*, that ZraP displays chaperone activity [18], indicating that the ability of Zra to provide envelope maintenance and/or repair could reside in that activity. To test that hypothesis, the ability of ZraP to confer enhanced resistance to polymyxin B, independently to the activation of the genes regulated by ZraR, was assessed. For that purpose, ZraP was cloned in a pBad18 plasmid and transformed into WT and  $\Delta$ *zraR* strains. Cells were grown in the presence of arabinose to the exponential phase to allow for ZraP expression before the addition of 2  $\mu$ g/mL of polymyxin B. Induction of ZraP expression was monitored by Western blot (Fig. 3a). One hour after treatment, no significant differences were observed in survival rates between the cells expressing ZraP and the control cultures that did not contain arabinose (Fig. 3b). Because, the chaperon activity of ZraP is enhanced in the presence of zinc ions, 500  $\mu$ M of Zn<sup>2+</sup>, corresponding to a sub-inhibitory concentration [18], was added at the same time as the antibiotic. However, even in these conditions, no protecting effect of ZraP on the polymyxin B treatment was observed (Fig. 3b).

Next, we tested a series of previously characterized *zraP* mutants, H1A,  $\Delta$ Nter and  $\Delta$ Cter, cloned in a pUC plasmid.  $\Delta$ Nter and  $\Delta$ Cter mutants lack the first four and the last seven amino acids of the mature protein, respectively. While the three mutants were shown to be exported to the periplasm, they were all impaired in their signaling function [18]. The H1A and  $\Delta$ Nter mutants are defective in Zn<sup>2+</sup> binding. The  $\Delta$ Cter mutant retains its ability to bind the metal ion and exhibits a chaperone activity comparable to that of the wild-type protein but is affected in its oligomerization state, the latter being responsible for the loss of its repressor activity. The mutated forms of ZraP were expressed in a  $\Delta$ *zraP* strain challenged with polymyxin B (Fig. 3c). None of the *zraP* mutants were able to complement the defective strain. These results suggest that ZraP alone is not able to restore the intrinsic resistance to the envelope-targeting antibiotic only via its chaperon activity, and therefore, its participation to the cell protection arises mainly from its repressor function of the Zra system.

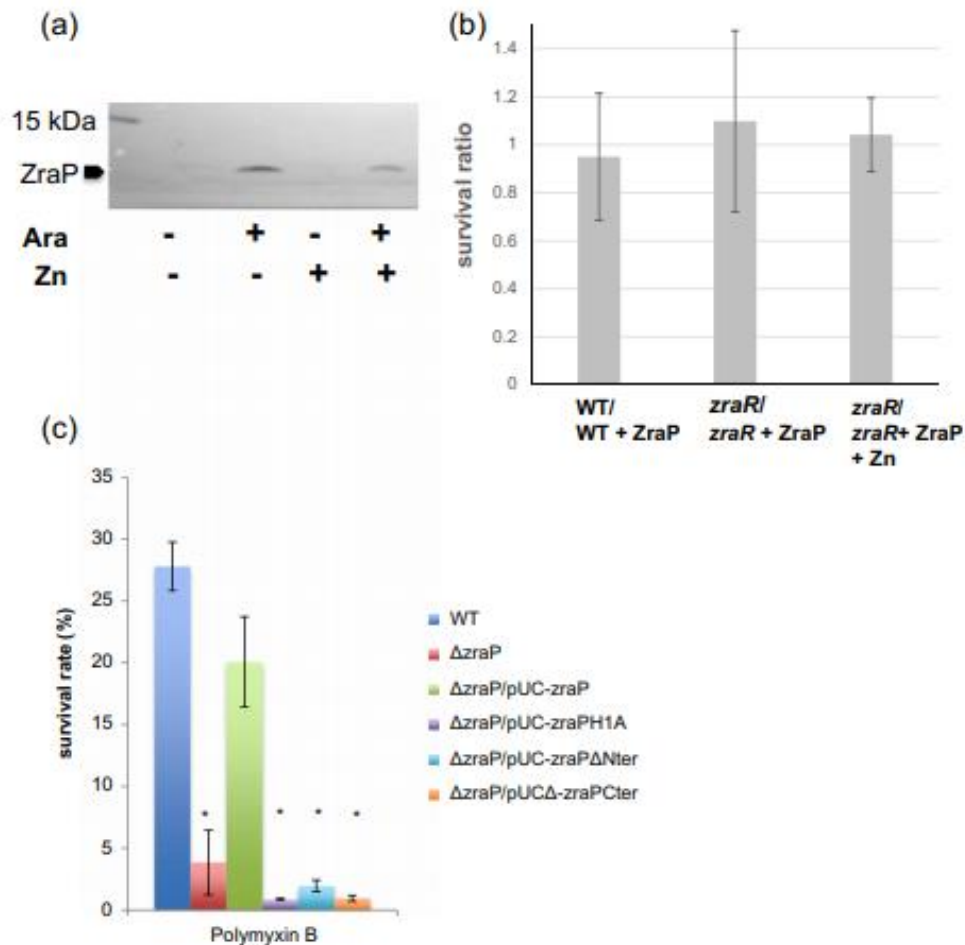
### ZraR orchestrates a complex cellular network

As proposed above, ZraP is mainly a signaling partner of the response to drug and environmental stresses. It also contributes to maintain membrane integrity. These functions suggest that, in addition to *zraSR* and *zraP*, ZraR regulates genes involved in the cellular defense against stresses. To examine the ZraR regulon, we used a ChIP-Seq approach. First, we raised polyclonal antibodies against ZraR that are highly specific as shown by Western blot (Fig. S1).





**Fig. 2.** The Zra system protects the cell envelope. Fluorescence microscopy of cells stained with Syto9 and propidium iodide after exposure to the mentioned drugs. The merged acquisition of both channels is displayed. More than 600 cells were counted. Representative fields are shown. Right panels (A-B-C-E): % = number of red cells/total number of cells. Right panel (D): the cell lengths were measured between the two poles, the difference with the control condition is shown.



**Fig. 3.** ZraP alone is unable to restore cell survival under polymyxin B challenge. (a) Overexpression of ZraP from the pBAD plasmid was monitored in the  $\Delta zraR$  strain by Western blot in the presence of Arabinose or Zn. (b) Survival ratio of the WT or the  $\Delta zraR$  strains compared with the same strains overproducing ZraP (+ZraP), challenged with polymyxin B. Zn was added where mentioned. (c) Percentage of survival after 1-h exposure to 1  $\mu$ g/ml polymyxin B. WT and mutant  $\Delta zraP$  complemented by *zraP* variants (WT,  $\Delta$ Nter, H1A,  $\Delta$ Cter). \*Denotes a significant difference compared to the wild-type strain ( $p < 0.05$ , Student's *t* test).

Next, we optimized the conditions of induction of the system by  $Zn^{2+}$ . For that purpose, we measured the activity of a transcriptional *zraP::lux* fusion and concluded that in LB medium the optimal induction was obtained with 500  $\mu$ M  $ZnSO_4$  (Fig. S1). Finally, the expression of ZraR was monitored during growth. ZraR was optimally expressed at  $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$  and was stably produced during both the exponential and stationary phase ( $OD = 1.5$ ) (Fig. S1). Using these conditions, we mapped ZraR binding locations in the presence of  $Zn^{2+}$  using ChIP-Seq. As expected, the number of reads was enriched in the *zraP-zraSR* intergenic region in both biological replicates, with enrichments of 2.24- and 1.64-fold, respectively (Fig. S2, Table 3). Although these enrichment ratios

are rather low for a region known to be regulated by ZraR, this threshold was applied to select genes potentially regulated by it. Second, only genes that have enrichment peaks located in their upstream region (Fig. S2) were considered as possibly regulated by ZraR. A total of 39 ZraR binding locations were identified using this approach (Table 3). The potential ZraR targets are involved in numerous cell functions: environmental stress response, metabolism, protein synthesis, motility and biofilm formation. ZraR is not only a response regulator of a two-component system but also a bEBP (bacterial enhancer binding protein) [22]. Because bEBPs are needed to activate sigma 54 factors, ZraR was predicted to activate the transcription of sigma 54-dependent genes [23]. However, the

**Table 3.** ChIP-Seq results

Gene	ChIP-Seq		Characteristics		
	Fold-change	-LOG10 (p-value)	Biological process	Product function	σ Factor <sup>a</sup>
<i>zraP</i>	2.24	586	Stress response	Chaperone and modulator of ZraSR	σ54
<i>raiA</i>	1.87	246		Ribosome stability	σ70
<i>ssrA</i>	2.16	444		Trans-translation	σ70
<i>prp</i>	1.92	118		mRNA degradation	σ70
<i>mdtL</i>	1.66	59		Transporter	Unknown
				Putative antibiotic resistance	
<i>cspA</i>	3.16	1293	Cellular cycle	Cold shock response	σ70
<i>cspB</i>	1.59	120		Cold shock response	σ54, σ70
<i>rpoH</i>	2.1	446		Sigma factor 32	σ70, σ54, σ24
<i>sspA</i>	1.95	117		Stringent starvation response	Unknown
<i>yhhY</i>	1.63	54		N-acetyltransferase	σ70
<i>ryhB</i>	1.62	72		Small regulatory RNA	σ70
<i>acrE</i>	1.58	49.47		Multidrug export protein	σ70
<i>cpxP</i>	1.66	131		Chaperone and modulator of CpxAR	
<i>hokA</i>	3.16	1293		Small toxic polypeptide	σ24
<i>fau</i>	2.71	950		5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	Unknown
<i>rfaD</i>	1.58	42		Membrane component	Heptose epimerase
<i>yhdW</i>	1.50	45	Putative amino acid ABC-transporter		σ54
<i>wecD</i>	1.56	44	Cellular cycle	Synthesis of LPS O-antigen	σ70
<i>metY</i>	2.79	928		tARN	σ70
<i>yrdD</i>	1.69	164		Putative topoisomerase	Unknown
<i>rsmG</i>	1.82	78		rARN methyl transferase	σ70
<i>rhO</i>	1.82	92		Transcription termination factor	Unknown
<i>rpsJ</i>	1.7	181		Ribosomal protein	σ70
<i>fliA</i>	2.71	161		Sigma factor 28	σ28, σ70
<i>crsB</i>	2.22	188		Biofilm formation	σ70
<i>gcvB</i>	1.92	118		Small regulatory RNA	σ70
<i>bsmA</i>	1.80	108		Biofilm peroxide resistance putative lipoprotein	σS
<i>glnA</i>	4.76	2926	Metabolism	Glutamine synthetase	σ54
<i>tnaAB</i>	1.59	123		Tryptophan transport and catabolism	σ70
<i>glnH</i>	1.71	86		glutamine transport	σ54
<i>argG</i>	2.79	928		Arginosuccinate synthetase	σ70
<i>mtiD</i>	1.55	46		Manitol dehydrogenase	σ70
<i>ntrB</i>	1.52	130		Sensory histidine kinase	σ54, σ70
				Nitrogen metabolism	
<i>exuR</i>	1.68	64		Hexuronate regulon transcriptional repressor	σ32, σ70
<i>gadW</i>	1.51	39.4	Acid stress	Unknown	
<i>dcuB</i>	1.73	72	Transcriptional activator	C4 dicarboxylate transporter	σ70
				anaerobic respiration	
<i>tktA</i>	1.64	36	Unknown	transketolase	Unknown
<i>yjy</i>	1.66	131		Putative protein	σ70
<i>bax</i>	1.77	80		Conserved protein	σ70
<i>yjeJ</i>	1.57	46		Putative protein	σ32, σ70
<i>txsA</i>	1.73	72		Suppressor of F exclusion of phage T7	σ32

<sup>a</sup> σ Factor: denotes the sigma factor known to control the gene, as deduced from literature and databases.

majority of the promoter regions of ZraR gene targets we screened are recognized by sigma 70 (Table 3). ZraR might thus not specifically control the expression of genes controlled by sigma 54.

Next, the level of expression of each target gene was analyzed. For that purpose, total RNAs were isolated from the wild-type and Δ*zraR* strains grown in the presence of Zn<sup>2+</sup>, and mRNAs levels were quantified using RT-qPCR. The differential expression of each gene was tested; values are reported in Table 4. A total of 22 genes or operons showed significantly different

expression between the two strains (Table 4). The expressions of *tnaA* and *tnaB*, coding for proteins that regulate the intracellular indole levels, were more expressed in the Δ*zraR* strains than in WT, indicating that ZraR down-regulates their expression. The same profile was found for *mdtL* that codes for an efflux pump. Conversely, the expression of other genes was reduced in the Δ*zraR* strain. The latter contribute among other functions to metabolism (*glnA*, *glnH*, *exuR*) or motility (*fliA*). Remarkably, the majority of the ZraR up-regulated genes code for effectors involved in



**Table 4.** Genes that are controlled by ZraR

Transcriptional unit	Product description/function	Fold-change	p-value
<i>acrE</i>	Multidrug export protein	2.55	0.0003
<i>cpxP</i>	Chaperone and modulator of CpxAR	2.62	0.0473
<i>cspB</i>	Cold shock protein	3.79	0.0447
<i>exuR</i>	Negative regulator of exu regulon	2.52	0.0079
<i>fliA</i>	Sigma factor 28	7.59	0.0001
<i>gadW</i>	Acid stress – transcriptional activator	2.58	0.0139
<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	3.27	0.0324
<i>glnH</i>	Glutamine transport	2.65	0.0042
<i>mdtE</i>	Multidrug export protein	7	0.0450
<i>mdtL</i>	Transporter-putative antibiotic resistance	-3.95	0.0066
<i>pnp</i>	RNA processing	2.88	0.0387
<i>raiA</i>	Ribosome stability	3.99	0.0446
<i>rfaD</i>	Heptose epimerase	2.13	0.0363
<i>rpoH</i>	Sigma factor 32	3.6	0.0023
<i>sspA</i>	Stringent starvation response	3.05	0.0237
<i>ssrA</i>	Trans-translation	2.25	0.0229
<i>tnaA ; tnaB</i>	Tryptophan transport and indole production	-19.53; -49.87	0.0012 ; 0.0260
<i>yhdW</i>	Putative amino acid ABC transporter	10.45	0.0025
<i>yhhY</i>	N-acetyltransferase	2.11	0.0317
<i>Yjly</i>	Putative protein	3.24	0.0423
<i>yrdD</i>	Putative topoisomerase	2.44	0.0307
<i>zraP</i>	Chaperone and modulator of ZraSR	35.67	0.0043

qRT-PCR results of the genes that are differentially expressed among those identified by ChIP-Seq. The fold change indicates the ratio of gene expression of strain WT to strain  $\Delta zraR$ .

the response to physico-chemical stresses such as uv stress (*pnp*), thermal stress (*rpoH*, *cspB*), nutritive deficiency (*sspA*) and detoxification (*yhhY*). Some other genes can only be indirectly connected to the stress response because they are involved in essential cell functions. These are genes coding for chaperones (*cpxP*, *zraP*), a putative ABC transporter (*yhdW*), enzymes catalysing LPS synthesis (*rfaD*), a protein involved in maintaining ribosome stability in stationary phase (*raiA*), a protein involved in trans-translation (*ssrA*), and a putative topoisomerase (*yrdD*). ZraR also controls regulatory proteins such as ExuR (catabolism of hexuronate), NtrB (nitrogen metabolism), FliA (sigma factor 28), RpoH (sigma factor 32), as well as small regulatory RNAs (*ryhB*, *crsB*, *gcvB*). Finally, genes of unknown function were also detected (*yjly*, *yjeJ*, *fxsA*). We then tried to identify a consensus binding site in the promoter region of regulated genes. No sequence motif could be obtained with automated tools (e.g., MAST, GLAM), indicating that the ZraR regulator exhibits little sequence specificity. However, specific bioinformatic analysis of the validated regulatory regions (see Materials and Methods) provided a weak motif that appears with strong accuracy in a subset of regulated genes (Fig. S5). This low sequence specificity may be related to the observation that ZraR activates the transcription of both sigma 54 and sigma 70 promoters: this dual role involves different binding mechanisms, usual sequence motifs may be poorly suited to describe such versatility. Another possible explanation is that, like many dimeric transcription factors, ZraR recog-

nizes and binds DNA regions with specific structural and mechanical properties, which are also poorly described by usual sequence motifs [24]. Even if the structure of the DNA–protein complex is not available, the central A/T tract is characteristic of flexible regions that could be bent by the protein. In addition, ZraR preferentially binds regions located between divergently oriented transcription units, which are known to accumulate negative supercoiling [25,26] and exhibit unusual DNA conformations. The mechanisms behind ZraR binding selectivity may thus involve DNA dynamical features rather than, or in addition to, the static genomic sequence.

To sum up, the global picture of the ZraR regulon (Fig. 4) highlights the complexity of the cellular response mediated by this transcriptional regulator.

## Discussion

Previous works suggested that the ZraPSR system is involved in the ESR in *S. enterica* because the deletion of *zraP* increased its susceptibility to polymyxin B [17]. In addition, *E. coli* gene expression databases ([//genexpdb.ou.edu](http://genexpdb.ou.edu)) show that *zraPSR* genes are induced by a set of conditions that cause cellular stress [metals, (zinc, cadmium), antibiotics (rifampycin, bicyclomycin), metabolism (anaerobic, carbon monoxide), biofilm]. Consequently, we decided to analyze the exact role of the ZraPSR system in response to extracellular stress.

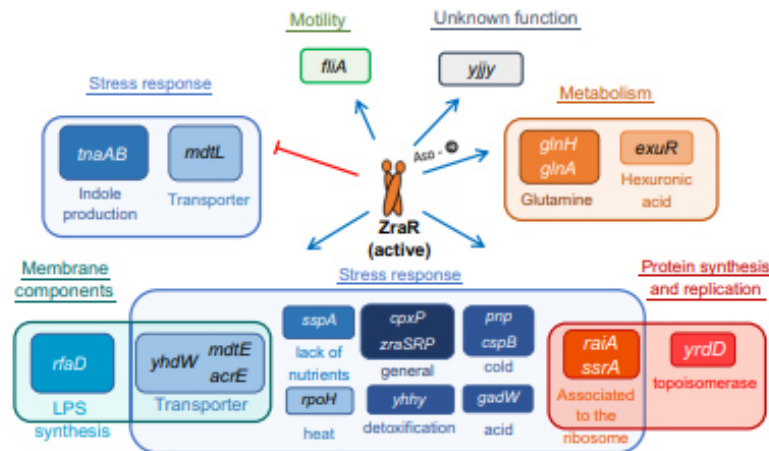


Fig. 4. The ZraR regulon. Genes regulated by ZraR were grouped into categories according to their cellular function.

**Is ZraPSR a novel ESR?**

The analysis of the ZraR regulon (Fig. 4) shows that the majority of ZraR-activated genes encode stress response proteins (chaperones, detoxification enzymes, stress response regulators, transporters). In addition to these elements, we note that ZraR activates the expression of important enzymes for the implementation of LPS (RafD). All these observations could explain the observed susceptibility phenotypes of  $\Delta zra$  mutants to some antimicrobials targeting the envelope. The activation of repair and envelope synthesis genes by ZraR could contribute to recover cell equilibrium in the presence of stress. In addition, we have shown that ZraPSR helps maintaining envelop integrity. The Live-Dead microscopy experiments reveal that in the presence of antimicrobials (polymyxin B, benzethonium chloride) that cause a defect in membrane integrity, the  $\Delta zraR$  and  $\Delta zraP$  mutants have a more pronounced loss of membrane integrity than the WT strain (Fig. 2B–C). In addition, exposure to mecillinam, an inhibitor of cell wall polymerization which results in an abnormal cell shape, causes a defect of this process in the mutants (Fig. 2D). This result is evocative of the Cpx system. Indeed, CpxR mutants are more sensitive to mecillinam and other  $\beta$ -lactams. It was shown that mecillinam induces the transcription of *cpxP* which results in cell protection, probably by inhibiting the activation of the system, since over-activation of CpxA abolishes the effect of *cpxP* and leads to aberrant cell shape. The fine control of the Cpx ESR is thus crucial to maintain cell wall homeostasis [27].

**Response to antimicrobial agents**

High-throughput screening using the Biolog technology showed that deletion of *zraP* resulted in a

significant increase in susceptibility to five classes of biocides (Table 1). In agreement with the results of this work, which underscore the importance of the Zra system in antimicrobial resistance, it has been shown recently that ZraP is one of the overproduced proteins in the presence of the antimicrobial peptide magainin I [28]. More generally, we have shown that the deletion of genes coding for ZraSR also resulted in a significant increase in sensitivity to several antimicrobials (Fig. 1).

The phenotype of the *zraP* and *zraS* mutants toward drug susceptibility is qualitatively largely similar. This observation is counter-intuitive because ZraP has a repressive effect on ZraR activation by ZraS, although it agrees with published data on the Cpx system showing that both CpxP [17] and CpxR [19] deletion mutants have a reduced tolerance to polymyxin. In addition, deregulation of the CpxAR two-component systems is associated with excessive stress response. For instance, binding of mammalian PGRPs (peptidoglycan recognition proteins) activates CpxA–CpxR and kills bacteria by inducing membrane depolarization and reactive oxygen species production [29]. In addition, as mentioned above, fine tuning of CpxA is essential to maintain cell wall homeostasis [27]. This suggests that activation of the Cpx system must be tightly regulated to meet its protecting effect. Similarly, the feedback inhibition of ZraSR by ZraP may be necessary to counteract a sustained deleterious activation.

Conversely, as shown in Fig. 1a, the deletion of *zra* genes increases the resistance to methyl viologen and gentamicin. This may be explained by the fact that extra-cytoplasmic stress signaling systems are interconnected [4]. Thus, the deletion of *zra* could lead to over-activation of another specific system that increases the resistance. A similar observation was made in a  $\Delta cpxA$  mutant in the presence of gentamicin [30]. Therefore, it would be interesting to measure the



expression of other ESRs under stressful conditions in a  $\Delta zraSR$  context. The deletion of *zra* confers susceptibility to biocides targeting different cellular mechanisms: protein synthesis (tetracycline, puromycin), DNA synthesis (lomefloxacin) or structures of the bacterial envelope (benzethonium chloride, domiphen bromide, polymyxin B, ampicillin, mecillinam, amoxicillin). The demonstration that Zra has a role in antimicrobial resistance is reminiscent of other ESRs. Indeed, Psp, Bae, Cpx, Rcs and Cpx were shown to increase resistance to several antibiotics ( $\beta$ -lactams, quinolones, antimicrobial peptides) and antimicrobials (bile salts, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (for a review, see Ref. [31]). In some cases, this antimicrobial resistance relies on the up-regulation of efflux pumps [31]. The characterization of the ZraR regulon shows that it up-regulates *mdtE* and *acrE* (Fig. 4), two multidrug exporters whose expression may encounter for the resistance to the antibiotics not involved in envelop stress response.

#### Specificity of the stress response

Although they share some inducing conditions, the main ESRs, Cpx, Rcs, Bae, Psp and sigmaE have quite distinct regulons [32]. The ZraR regulon shows little or no overlap with those of the above systems. ZraR up-regulates *raiA*, *fliA* and *cpxP* similarly to PspF, sigmaE, and CpxR, respectively. It also up-regulates *rpoH* and *sspA* like CpxR and sigmaE do (Fig. S3). Unexpectedly, despite its bEBP activator properties, ChIP-Seq and RT-qPCR results showed that ZraR can repress gene transcription. *tnaA* and *tnaB*, are among the most strongly regulated genes and are repressed by ZraR with a 20-fold and a 50-fold drop in expression, respectively, when comparing WT to the  $\Delta zraR$  strain (Table 4). Strikingly, PspF, CpxR, sigma E and ZraR also down-regulate *tnaAB* genes. TnaB transports tryptophan from the medium to the cytoplasm where it is used by the enzyme TnaA to generate indole. This process is affected by temperature, pH and the presence of antibiotics [33]. Indole has been described as a signal molecule associated with several bacterial functions, including drug resistance [34]. In particular, it increases the expression of genes encoding the export systems *mdtAE*, *cusB*, *emrK* and *yceL*, via the activation of the Bae and Cpx systems [35]. Furthermore, indole induces the expression of the RpoE, Bae, Cpx, Psp and Zra systems [17,32]. Therefore, the repression of gene expression influencing its production could constitute a negative feedback. As a matter of fact, control of indole production is essential because at high extracellular concentrations (mM) it can inhibit cell growth and division in *E. coli* through its role as ionophore of H<sup>+</sup> ions [36]. ZraP activates *mdtE* expression, while it reduces the amount of indole by down-regulating *tnaAB*. It is possible that ZraR counteracts the reduction of the multidrug resistance protein expression due to the decrease of indole production, and fosters antibiotic resistance.

#### ZraPSR response mechanism

The genes of the ZraR regulon are also involved in replication and protein synthesis (Fig. 4). Consequently, the lack of the Zra system confers sensitivity to antimicrobial stresses targeting these mechanisms (Fig. 1a). Moreover, we show that the expressions of *zraS* and more strongly *zraP* are induced by compounds that target not only the envelope but also replication and protein synthesis (Fig. 1b). As mentioned above, other characterized ESRs also confer resistance to drugs that do not target the envelope. In the present study, we therefore propose that inhibiting translation or replication may be detrimental for maintaining the envelope integrity over time or during division. This effect may be more pronounced in the *zra* mutants.

Interestingly, the ExuR, RpoH, FliA, CspB and CspA regulators and the *ryhB*, *ssrA* and *gcvB* regulatory RNAs are found in the ZraR regulon (Table 3). It suggests that the ZraSR-mediated response mechanism may indirectly involves response effectors other than those evidenced by the ChIP-Seq experiment. It would be worth the effort to validate this hypothesis by carrying out a transcriptomic analysis. This would broaden our understanding of the system's contribution to intrinsic antimicrobial resistance in *E. coli*.

The characterization of ZraP as a chaperone [17] suggested that envelope stress causes this protein to participate in the prevention of protein aggregation. Elimination of the ZraP C-terminal domain involved in oligomerization impacted the survival of the cells upon polymyxin B treatment (Fig. 3). Although this protein retains the chaperone function *in vitro*, it is defective in the signaling function of the Zra system [17] (Fig. 3). These observations suggest that the function of ZraP, in the ESR response, is mainly to modulate the response of the system and that the response involves activation of the expression of other effectors of extracellular stress response by ZraR. In addition, we have shown that most of the Zra features are common with other ESR systems; it allows us to propose that the Zra system is a novel ESR conserved among Proteobacteria.

## Materials and Methods

#### Bacterial strains and culture conditions

The strains used in this work are summarized in Table S1 (supplementary material) and are all derivatives of *E. coli* K-12. Bacterial cells were grown in LB medium or M63 minimal medium supplemented with 0.4% glucose. ZnSO<sub>4</sub> heptahydrate, 99.999% pure on trace metal basis, was purchased from Sigma-Aldrich. Antibiotics and drugs were purchased from Sigma-Aldrich. The plasmids used in this study are listed in Table S2.



### Biolog PHENOTYPE MicroArrays

The drug sensitivity profile of  $\Delta zraP$  W3110 was determined using Biolog Phenotype MicroArrays (PMs 21–25). Each 96-well plate contains 24 different chemical agents at 4 different concentrations. These drugs are divided in eight groups based on their structure and function: anions, cations, cyclic compounds, organic compounds, membrane function compounds, chelators, antibiotics and nitrogen compounds. *E. coli* WT W3110 and  $\Delta zraP$  W3110 cells were streaked on LB agar and were grown overnight at 37 °C. Individual colonies were picked up from the surface of agar plates by gently rubbing a sterile swab across the surface. Then cells were suspended in sterile inoculating fluid (IF, Biolog™) at a density corresponding to 85% transmittance in the Biolog turbidimeter. Then 100  $\mu$ L of the bacterial inoculum was transferred into each well. Inoculated PM plates were placed in the OmniLog instrument for either 24 or 48 h at 37 °C. Bacterial growth was estimated by following tetrazolium dye reduction to colorimetrically monitor the respiration of cells. Data were automatically collected every 15 min.

### Drugs susceptibility assay

To verify the results of chemical sensitivity performed with Biolog Phenotype MicroArrays, survival stress assays were performed. Each strain was inoculated in fresh LB medium and grown to an  $OD_{600}$  of 0.1 at 37 °C. The cultures were challenged with the indicated antibiotic at the concentrations listed in Table S3. Cells were incubated in microtubes at 37 °C, 550 rpm for 1 h and plated on LB plates overnight at 37 °C according to Ref. [17]. The survival percentage was calculated as follows: survival (%) = CFU (colony-forming units) of surviving cells/CFU of non-challenged cells. Relative survival rate of the mutant ( $\Delta zraP$  or  $\Delta zraR$ ) was calculated as the ratio of survival percentage (WT/mutant).

Plasmid *pBad18-zraP* was obtained by subcloning the full length ORF of *zraP* in *pBad18* between the *SacI* and *Sall* restriction sites. *E. coli*  $\Delta zraR$  W3110 containing *pBad18-zraP*, were grown over night in LB media with 34  $\mu$ g/mL chloramphenicol. For inoculation, the pre-culture was diluted 100 times in fresh media and grown at 37 °C under 200 rpm agitation, in the presence or in the absence of 0.02% of arabinose, with or without 500  $\mu$ M zinc. Polymyxins B (2  $\mu$ g/mL) was added when cell reached an  $OD_{600}$  of 0.35 to 0.45. After 1 h of treatment, cells were diluted  $10^2$  to  $10^5$  times, and 10  $\mu$ L was spotted twice for drop counting. Dilutions containing 5 to 30 cells were counted.

### Environmental stress assays

Cells were grown until  $OD_{600} = 0.1$  and then exposed to environmental stress in LB medium or in

M63 sucrose for the condition with malic acid. The following concentrations were used: 33 mM malic acid, 0.05% bile salts, 3 mM indole, 1.5 mM  $H_2O_2$  and 500 mM NaCl. Cells were incubated under agitation in microtubes at 37 °C, 550 rpm, for 1 h and plated on LB agar plates. The number of bacteria was estimated after overnight incubation at 37 °C.

### Microscopy imaging and analysis

Overnight cultures were diluted at 1:100 in fresh LB medium and grown to an  $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$  at 37 °C. Cell samples were then treated with either antibiotics (tetracycline 50  $\mu$ g/mL, mecillinam 5  $\mu$ g/mL, polymyxin B 0.25  $\mu$ g/mL) or antimicrobial reagents (benzethonium chloride 0.002%) in the same conditions as the one used in the drug susceptibility assays. The ratios of dead cells after treatment were estimated using the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (ThermoFisher Scientific). Cells were stained with Syto9 and propidium iodide for 15 min and transferred to a slide mounted with 1% agarose in LB medium [37]. Conventional wide-field fluorescence microscopy imaging was carried out on an Eclipse Ti-E microscope (Nikon), equipped with  $\times 100/1.45$  oil Plan Apo Lambda phase objective, FLash4 V2 CMOS camera (Hamamatsu), and using NIS software for image acquisition. Acquisition settings were 10 ms for Syto9 and 10 ms for propidium iodide using 50% power of a FLuo LED Spectra X light source at 488- and 560-nm excitation wavelengths, respectively. Cell counting was performed using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### Luminescence assays

Reporter gene constructs were all introduced in the plux plasmid containing the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* and a p15A low-copy number origin of replication as described in Ref. [38]. The construction of *pzraS::lux* and *pzraP::lux* plasmids was described in Ref. [18]. The assays were conducted in 96-well plates. The wells were filled with 200  $\mu$ L of LB medium supplemented with metals or antibiotics, inoculated with  $10^5$  bacteria harvested at  $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$ . The plate was sealed using gas-permeable Breathe Easy membrane (Sigma Aldrich) and placed into a "TECAN Infinite Pro" plate-reader equilibrated at 37 °C and programmed to measure  $OD_{600\text{ nm}}$  and luminescence every 20 min, after a 1-min period of shaking, for 24 h.

### Overproduction and purification of the ZraR protein

BL21(DE3) strain containing the pET-zraR plasmid was grown to mid-log phase in LB medium before addition of 1 mM IPTG to induce the expression of ZraR. After 2 h at 37 °C, cells were harvested by



centrifugation and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The cell pellet was resuspended in buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, Halt protease inhibitor (Thermo)] and lysed by three passages in a French press. The extract was clarified by centrifugation at  $30,000g$  for 20 min. Sodium chloride was added at a concentration of 200 mM, and the suspension was stirred for 30 min on ice before centrifugation at  $100,000g$  for 90 min to remove the membranes. Ammonium sulfate (20%) was added to the supernatant. Precipitated proteins were pelleted by centrifugation at  $20,000g$  for 15 min and solubilized in buffer A. The supernatant was loaded into an anion-exchange chromatography HiTrap Q HP column (GE Healthcare). Proteins were eluted with a linear gradient of NaCl, from 0 to 1 L. The fractions containing ZraR (750 mM NaCl) were concentrated using 5-kDa cutoff Vivaspin 6 concentrators (Sartorius Stedim Biotech). The purity of ZraR was checked on 12% SDS-PAGE.

### ChIP-Seq

The WT strain W3110 was grown at  $37^{\circ}\text{C}$  in LB medium supplemented to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.6.  $\text{ZnSO}_4$  (500  $\mu\text{M}$ ) was added at the start of the culture. The cells were collected and cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 30 min with shaking, then quenched using 100 mM glycine for an additional 30 min of incubation at  $4^{\circ}\text{C}$ . Chromatin immunoprecipitation assay was performed as described in Ref. [39]. Cells were lysed by sonication, and the supernatant was split into two samples. One sample was mixed with anti-ZraR antibodies to immunoprecipitate ZraR-DNA complexes (input sample), and the other was left untreated as a control. After overnight incubation at  $4^{\circ}\text{C}$ , the samples were added to pre-washed agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) and incubated for 3 h at  $4^{\circ}\text{C}$  on a rotating wheel. The samples were briefly centrifuged at 4000 rpm to precipitate agarose beads. Beads were then washed and resuspended in elution buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA and 1% SDS] prior to incubation at  $65^{\circ}\text{C}$  overnight to reverse the cross-linking. DNA was purified with a PCR purification kit (Qiagen). Semi-quantitative PCR was carried out to assess the enrichment of the immunoprecipitated samples. The primers were designed to amplify *zraP\_zraS* intergenic region as a positive control. DNA quality control, library preparation and sequencing were performed by the MGX platform. Library preparation was performed with TruSeq@ChIP Sample preparation kit with 5 ng of DNA. Samples were sequenced on Illumina HiSeq2500 in single reads. Reads were aligned to whole reference genome *E. coli* K12 W3110, accession number NC\_007779, using BWA-backtrack software. ChIP peak identifications were performed using MACS2. Input samples were compared to the reference input controls. MACS2 calculate a *p*-value for each position of the genome using a dynamic Poisson law. Finally, the correction for

multiple tests of Benjamini-Hochberg is used to estimate the false discovery rates. The most statistically significant peak calls at each genome position were then visually verified using the Artemis genome browser (Sanger Institute).

### RNA extraction

Three independent cultures of WT W3110 and  $\Delta zraR$  W3110 were grown at  $37^{\circ}\text{C}$  in LB medium to an  $\text{OD}_{600}$  of 1.  $\text{ZnSO}_4$  (500  $\mu\text{M}$ ) was added at the start of the culture. Cells were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using the frozen acid-phenol method as described in Ref. [40] and then treated with RNase-free DNaseI according to the manufacturer's recommendations (Ambion, USA). The absence of genomic DNA contamination was checked by PCR.

### qRT-PCR analysis

cDNA was synthesized using random hexamers and REVERTAID H-RT reverse transcriptase (ThermoFisher). qPCR was performed using the LightCycler@ fast-start DNA masterplus SYBR Green I kit from Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Amplification and detection of the specific products were carried out with the LightCycler System; the programs used were as follows: denaturation ( $95^{\circ}\text{C}$ , 10 min), PCR ( $95^{\circ}\text{C}$ , 15 s;  $T_m^*$ , 15 s;  $72^{\circ}\text{C}$ , 20 s)  $\times 45$ , and melting curve ( $95^{\circ}\text{C}$ , 1 s;  $65^{\circ}\text{C}$ , 1 min;  $65^{\circ}\text{C}$  to  $95^{\circ}\text{C}$  at 0.11  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ).  $T_m$  values were experimentally determined using direct PCR. Primers were designed using the method described in Ref. [41] and listed in Table S4. Data analysis was performed with the Lightcycler Relative Quantification software (Roche Applied Science). The *fabZ* gene was selected as a reference gene for data normalization. The expression of *fabZ* is constitutive and stable in the *zraR* deletion mutant. To estimate the effect of the *zraR* deletion on the expression of genes identified with ChIP-Seq, qPCR was conducted on at least three biological replicates of each strain. This experiment was carried out in triplicate. A *t*-test was computed to measure the significance associated with each differential expression value, and an error rate (*p*-value), measuring the risk of false predictions of differentially expressed genes, was associated with each tested gene. A gene expression value was decided to be biological significantly when the *p*-value was less than 0.05 and the expression ratio was  $\geq 2$ .

### Analysis of the promoter sequences

The sequence motif of the ZraR regulator was constructed as follows. Starting from the previously identified binding sequence of ZraR to the *zraS* promoter [42], we scanned the promoter regions of all genes where a direct regulatory effect was validated



(200 bp upstream of start codon) and located the sites with highest score. We observed that many of these sites exhibited A-tracts in the central region instead of a T-tract of the consensus (6 nucleotides), which is a typical signature of a flexible region involved in indirect readout by helix-turn-helix dimeric transcription factors [24]. Based on this observation, we modified the scanning algorithm to give an equal weight to A or T nucleotides in this central region. The resulting sites were filtered for a minimal log<sub>2</sub>-oddscore of 3.5, resulting in a binding site in the promoter region of 18 validated genes (Fig. S5). The sequence motif was constructed from these 18 putative binding sequences. This analysis was carried using the BiopPython package [43] and the WebLogo website [44].

### Immunodetection of proteins

Polyclonal antibodies against ZraR were obtained from Covalab (Villeurbanne, France) by immunization of a rabbit with the purified protein. After migration on 12% SDS PAGE, the proteins were electrotransferred to a PVDF membrane. Anti-ZraR antibodies were used, at a dilution of 1:3000. The detection was performed by autoradiography using HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) and chemiluminescent Immobilon Western substrate (Millipore).

### Acknowledgments

K.R. and C.B. were supported by a grant from French Ministry of Education and Research, R.T. was supported by a grant from Université Grenoble Alpes (IRS—2015). C.L. and J.C. were supported by the ATIP-avenir program in partnership with the FINOVI foundation. This work was supported by funds from CNRS and Université Lyon 1. We thank S. Meyer for its expert annotation of the consensus sequences. We thank J. Fontecilla-Camps for editing the manuscript.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021>.

Received 25 June 2018;

Received in revised form 24 September 2018;

Accepted 26 October 2018

Available online 30 October 2018

#### Keywords:

antibiotic;

zinc;

ChIP-seq

#### Abbreviations used:

ESR, envelope stress response; LPS, lipopolysaccharide; ChIP-Seq, chromatin immunoprecipitation followed by sequencing; bEBP, bacterial enhancer binding protein; TCS, two-component systems.

### References

- [1] S. Runkel, H.C. Wells, G. Rowley, Living with stress: a lesson from the enteric pathogen *Salmonella enterica*, *Adv. Appl. Microbiol.* 83 (2013) 87–144.
- [2] G. Rowley, M. Spector, J. Kormanec, M. Roberts, Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 383–394.
- [3] T.L. Raivio, Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response, *Biochim. Biophys. Acta* 1843 (2014) 1529–1541.
- [4] M. Grabowicz, T.J. Silhavy, Envelope stress responses: an interconnected safety net, *Trends Biochem. Sci.* 42 (2017) 232–242.
- [5] G. Laloux, J.F. Collet, Major tom to ground control: how lipoproteins communicate extracytoplasmic stress to the decision center of the cell, *J. Bacteriol.* 199 (2017).
- [6] D.M. MacRitchie, D.R. Buelow, N.L. Price, T.L. Raivio, Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems, *Adv. Exp. Med. Biol.* 631 (2008) 80–110.
- [7] C.P. Zschiedrich, V. Keidel, H. Szurmant, Molecular mechanisms of two-component signal transduction, *J. Mol. Biol.* 428 (2016) 3752–3775.
- [8] S. Hunke, R. Keller, V.S. Muller, Signal integration by the Cpx-envelope stress system, *FEMS Microbiol. Lett.* 326 (2012) 12–22.
- [9] K. Otto, T.J. Silhavy, Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 2287–2292.
- [10] M. Grabowicz, T.J. Silhavy, Redefining the essential trafficking pathway for outer membrane lipoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 4769–4774.
- [11] T.L. Raivio, S.K. Leblanc, N.L. Price, The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity, *J. Bacteriol.* 195 (2013) 2755–2767.
- [12] T.L. Raivio, D.L. Popkin, T.J. Silhavy, The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 5263–5272.
- [13] X. Zhou, R. Keller, R. Volkmer, N. Krauss, P. Scheerer, S. Hunke, Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 9805–9814.
- [14] K. Tschauner, P. Homschemeyer, V.S. Muller, S. Hunke, Dynamic interaction between the CpxA sensor kinase and the periplasmic accessory protein CpxP mediates signal recognition in *E. coli*, *PLoS One* 9 (2014), e107383.
- [15] G.L. Thede, D.C. Arthur, R.A. Edwards, D.R. Buelow, J.L. Wong, T.L. Raivio, et al., Structure of the periplasmic stress response protein CpxP, *J. Bacteriol.* 193 (2011) 2149–2157.
- [16] S. Quan, P. Koldewey, T. Tapley, N. Kirsch, K.M. Ruane, J. Pfizenmaier, et al., Genetic selection designed to stabilize proteins uncovers a chaperone called Spy, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 262–269.
- [17] C. Appia-Ayme, A. Hall, E. Patrick, S. Rajadural, T.A. Clarke, G. Rowley, ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a

- repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR, *Biochem. J.* 442 (2012) 85–93.
- [18] I. Petit-Hartlein, K. Rome, E. de Rosny, F. Molton, C. Duboc, E. Gueguen, et al., Biophysical and physiological characterization of ZraP from *Escherichia coli*, the periplasmic accessory protein of the atypical ZraSR two-component system, *Biochem. J.* 472 (2015) 205–216.
- [19] B. Audrain, L. Ferrieres, A. Zairi, G. Soubigou, C. Dobson, J.Y. Coppee, et al., Induction of the Cpx envelope stress pathway contributes to *Escherichia coli* tolerance to antimicrobial peptides, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 7770–7779.
- [20] M.W. Bader, W.W. Navarre, W. Shiau, H. Nikaido, J.G. Frye, M. McClelland, et al., Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides, *Mol. Microbiol.* 50 (2003) 219–230.
- [21] B.R. Bochner, Global phenotypic characterization of bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 33 (2009) 191–205.
- [22] M. Bush, R. Dixon, The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of sigma54-dependent transcription, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76 (2012) 497–529.
- [23] V. Shingler, Signal sensory systems that impact sigma(5)(4) -dependent transcription, *FEMS Microbiol. Rev.* 35 (2011) 425–440.
- [24] J. Cevost, C. Vaillant, S. Meyer, B. Rost, ThreaDNA: predicting DNA mechanics' contribution to sequence selectivity of proteins along whole genomes, *Bioinformatics* 34 (2018) 609–616.
- [25] M. Naughtin, Z. Haftek-Terreau, J. Xavier, S. Meyer, M. Silvain, Y. Jaszczyszyn, et al., DNA physical properties and nucleosome positions are major determinants of HIV-1 integrase selectivity, *PLoS One* 10 (2015), e0129427.
- [26] S.A. Sevier, H. Levine, Properties of gene expression and chromatin structure with mechanically regulated elongation, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 5924–5934.
- [27] A. Delhaye, J.F. Collet, G. Laloux, Fine-tuning of the cpx envelope stress response is required for cell wall homeostasis in *Escherichia coli*, *MBio* 7 (2016) e00047-16.
- [28] M.H. Cardoso, K.C. de Almeida, E.S. Candido, A.M. Murad, S. C. Dias, O.L. Franco, Comparative NanoUPLC-MS(E) analysis between magainin I-susceptible and -resistant *Escherichia coli* strains, *Sci. Rep.* 7 (2017) 4197.
- [29] D.R. Kashyap, M. Wang, L.H. Liu, G.J. Boons, D. Gupta, R. Dziarski, Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems, *Nat. Med.* 17 (2011) 676–683.
- [30] M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, J. Wierzbowski, G. Cottarel, J.J. Collins, Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death, *Cell* 135 (2008) 679–690.
- [31] R.L. Guest, T.L. Raivio, Role of the Gram-negative envelope stress response in the presence of antimicrobial agents, *Trends Microbiol.* 24 (2016) 377–390.
- [32] S. Bury-Mone, Y. Nomane, N. Reymond, R. Barbet, E. Jacquet, S. Imbeaud, et al., Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*, *PLoS Genet.* 5 (2009), e1000651.
- [33] T.H. Han, J.H. Lee, M.H. Cho, T.K. Wood, J. Lee, Environmental factors affecting indole production in *Escherichia coli*, *Res. Microbiol.* 162 (2011) 108–116.
- [34] J. Kim, W. Park, Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *J. Microbiol.* 53 (2015) 421–428.
- [35] H. Hirakawa, Y. Inazumi, T. Masaki, T. Hirata, A. Yamaguchi, Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 55 (2005) 1113–1126.
- [36] C. Chimerel, C.M. Field, S. Pinero-Fernandez, U.F. Keyser, D.K. Summers, Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1590–1594.
- [37] C. Lesterlin, N. Duabry, Investigating bacterial chromosome architecture, *Methods Mol. Biol.* 1431 (2016) 61–72.
- [38] J. Cayron, E. Prudent, C. Escoffier, E. Gueguen, M.A. Mandrand-Berthelot, D. Pignol, et al., Pushing the limits of nickel detection to nanomolar range using a set of engineered bioluminescent *Escherichia coli*, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24 (2017) 4–14.
- [39] S.E. Davis, R.A. Mooney, E.I. Kanin, J. Grass, R. Landick, A. Z. Ansari, Mapping *E. coli* RNA polymerase and associated transcription factors and identifying promoters genome-wide, *Methods Enzymol.* 498 (2011) 449–471.
- [40] M. Maes, E. Messens, Phenol as grinding material in RNA preparations, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 4374.
- [41] B. Thornton, C. Basu, P.C.R. Real-time, (qPCR) primer design using free online software, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 39 (2011) 145–154.
- [42] S. Leonhartsberger, A. Huber, F. Lottspeich, A. Bock, The hydH/G genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system, *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 93–105.
- [43] P.J.A. Cock, T. Antao, J.T. Chang, B.A. Chapman, C.J. Cox, A. Dalke, et al., Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics, *Bioinformatics* 25 (2009) 1422–1423.
- [44] G.E. Crooks, G. Hon, J.M. Chandonia, S.E. Brenner, WebLogo: a sequence logo generator, *Genome Res.* 14 (2004) 1188–1190.



### 3 – Identification d'un problème chez la souche $\Delta zraR$

Les gènes régulés par le système ZraPSR sont impliqués dans de nombreuses fonctions comme la réponse au stress, le métabolisme, la motilité, la synthèse protéique et la réplication ou des fonction inconnues (Rome et al. 2018). Dans le but d'identifier de nouveaux acteurs de la réponse au stress chez *Escherichia coli*, notre étude s'est focalisée sur deux gènes, *tnaA* et *tnaB*, qui sont les plus fortement différentiellement exprimés entre la souche sauvage et mutante  $\Delta zraR$ . Ces deux gènes codent l'import du tryptophane et la synthèse d'indole.

Les gènes *tnaA* et *tnaB*, présentant des différences d'expression les plus importantes, sont réprimés par ZraR avec un fold change de  $-19.5$  et  $-49.9$  respectivement (Table 4 de (Rome et al. 2018)). Le transporteur TnaB importe le tryptophane du milieu vers l'intérieur de la cellule et la tryptophanase, TnaA, catalyse la réaction permettant de former de l'indole à partir du tryptophane. Cette molécule est un composé organique qui est relié à diverses fonctions bactériennes comme la formation de biofilm, la virulence et la résistance aux antimicrobiens (J. Kim et Park 2015).

D'après les bases de données, la souche *Escherichia coli* W3110 a un élément transposable de type IS au sein de l'opéron *tna*. L'opéron *tna* de la souche WT W3110 et  $\Delta zraR$  W3110 ont été amplifiés par PCR et séquencés. Les résultats sont présentés dans la figure 37. Chez la souche WT, il y a bien un élément génétique mobile au sein du gène *tnaB*. En revanche, étonnamment, cet élément transposable n'est pas retrouvé chez le mutant  $\Delta zraR$  W3110. Premièrement, nous avons pensé que cela aurait pu être dû au saut de l'élément transposable mais celui-ci aurait laissé une cicatrice et ce n'est pas le cas.

Dans l'équipe de recherche, nous travaillons principalement avec deux souches d'*Escherichia coli* : la souche K12 W3110 et la souche K12 BW25113. La souche K12 W3110 possède un élément transposable dans le gène *tnaB* alors que la souche K12 BW25113 n'en possède pas. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'antérieurement à ma thèse, il y aurait pu avoir une inversion entre le mutant  $\Delta zraR$  W3110 et  $\Delta zraR$  BW25113 ou que le mutant aurait été réalisé par inadvertance chez la mauvaise souche. Cette différence pourrait à elle seule expliquer que la différence d'expression des gènes *tna* entre la souche WT W3310 et le mutant  $\Delta zraR$  « W3110 ». Donc à la suite de cette découverte, il a été décidé de refaire le mutant  $\Delta zraR$  chez la souche W3110 et les analyses des cibles.



Figure 37 : Alignement des séquençages du gène *tnaB* de WT W3110 et  $\Delta zraR$  W3110

La représentation de l'alignement de la région intergénique des deux bactéries a été réalisé avec le logiciel MUSCLE. Une étoile (\*) est placée sous les nucléotides identiques entre les deux séquences. Les nucléotides en rouge correspondent à la fin du gène *tnaA* et les nucléotides en bleu correspondent au gène *tnaB*.

## 4. Erratum : Validation des cibles de ZraR

### 4.1 - Nouvelles analyses RT-qPCR

La mutation de *zraR* a été refaite chez la souche *E. coli* K12 W3110 à l'aide la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko et Wanner 2000b). La cassette de délétion été transduite et le gène de résistance à la kanamycine a été excisé à l'aide du plasmide pCP20. L'opéron *tna* a de nouveau été séquencé et cette fois, la région est identique entre la souche WT W3110 et le nouveau mutant  $\Delta zraR$  W3110.

Dans un premier temps, le niveau d'expression de chaque unité transcriptionnelle, identifiée par le ChIP-seq (table 3, (Rome et al. 2018)), a été évalué chez la souche sauvage et le mutant  $\Delta zraR$  par RT-qPCR. Les résultats sont présentés dans le tableau 8. Il apparaît que sur 25 gènes testés, seuls 5 gènes présentent une différence d'expression significative entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta zraR$ . Parmi ces 5 gènes, l'expression du gène *zraP* est 63 fois moins importante chez le mutant  $\Delta zraR$  par rapport à la souche sauvage. Ce gène était déjà

identifié comme régulé par ZraR. L'expression de *bax*, *cspB*, *fau* et *yrdD* est significativement supérieure chez le mutant  $\Delta zraR$  par rapport à la souche sauvage (Tableau 8). Le gène *yjjY* a une expression supérieure chez le mutant  $\Delta zraR$  par rapport à la souche sauvage. Cette différence n'est pas significative mais la p-value est très proche de 0.05 (p=0.06) donc le gène sera également pris en compte. Cela semble signifier que ZraR jouerait un rôle de répresseur sur l'expression de ces gènes. Les gènes *bax*, *yrdD* et *yjjY* codent des protéines de fonction inconnue. Le gène *cspB* code une protéine impliquée dans la réponse au stress thermique (cold shock-protein). Enfin le gène *fau* code une enzyme du type 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase. Ces enzymes sont responsables de la résistance aux antifolates et l'utilisation de l'acide folinique (Ogwang et al. 2011).

Tableau 8 : Expression des unités transcriptionnelles entre la souche WT et  $\Delta zraR$  déterminée par RT-qPCR

Unité de transcription	Fonction du produit	Fold-change WT/ $\Delta zraR$	p-value
<b><i>bax</i></b>	<b>Protéine putative conservée</b>	<b>-1.67</b>	<b>0.0286 (*)</b>
<i>cpxP</i>	Chaperonne et modulateur du système CpxAR	-1.14	n.s.
<i>cspA</i>	Protéine de réponse aux températures basses	1.12	n.s.
<b><i>cspB</i></b>	Protéine de réponse aux températures basses	<b>-4.2</b>	<b>0.0148 (*)</b>
<i>exuR</i>	Répresseur transcriptionnel du transport et du catabolisme des galacturonates et glucuronates	-1.14	n.s.
<b><i>fau</i></b>	<b>5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase</b>	<b>-3.3</b>	<b>0.0286 (*)</b>
<i>fliA</i>	Facteur sigma impliqué dans la transcription des gènes de la motilité	-1.4	n.s.
<i>gadW</i>	Activateur transcriptionnel en réponse au stress acide	-1.05	n.s.
<i>glnA</i>	Glutamine synthétase	-1.32	n.s.
<i>glnH</i>	Transporteur de la glutamine	1.04	n.s.
<i>mdtL</i>	Transporteur ABC de drogue putatif	1.06	n.s.
<i>pnp</i>	Polyribonucléotide phosphorylase répondant aux températures basses	1.13	n.s.
<i>raiA</i>	Inhibiteur et facteur de stabilité des ribosomes	1.1	n.s.
<i>rfaD</i>	Epimérase impliqué dans la synthèse du LPS	1.02	n.s.
<i>rpoH</i>	Facteur sigma impliqué dans la transcription des gènes de la motilité	-1.44	n.s.
<i>sspA</i>	Régulateur de réponse aux carences nutritives	-1.04	n.s.
<i>ssrA</i>	ARNmt impliqué dans la trans-translation	-1.17	n.s.
<i>tnaA</i>	Enzyme catalysant la production d'indole	-1.8	n.s.
<i>wecD</i>	Enzyme participant à la synthèse de l'antigène commun des entérobactéries	1.01	n.s.
<i>yhdW</i>	SBP du transporteur ABC YhdWXYZ	-1.36	n.s.
<i>yhdX</i>	TMD du transporteur ABC YhdWXYZ	-1.17	n.s.
<i>yhhY</i>	Acétyltransférase	1.25	n.s.
<b><i>yjjY</i></b>	<b>Protéine putative</b>	<b>-1.4</b>	<b>0.0571</b>
<b><i>yrdD</i></b>	<b>ADN topoisomérase putative</b>	<b>-1.74</b>	<b>0.0301 (*)</b>
<b><i>zraP</i></b>	<b>Protéine chaperonne</b>	<b>63.08</b>	<b>0.0002 (*)</b>



## 4.2 - Analyses phénotypiques

### 4.2.1 – Le système ZraR n'est pas impliqué dans la production d'indole

La production d'indole est réalisée par deux protéines, TnaA et TnaB. Le transporteur TnaB transporte le tryptophane du milieu vers l'intérieur de la cellule et la tryptophanase, TnaA, catalyse la réaction permettant de former de l'indole à partir du tryptophane (Figure 38A). Par la suite, l'indole est capable de diffuser à travers la membrane. Cette molécule est un composé organique qui est relié à diverses fonctions bactériennes comme la formation de biofilm, la virulence et la résistance aux antimicrobiens (J. Kim et Park 2015).

Les gènes *tnaA* et *tnaB* présentaient initialement des différences d'expression très importantes (19,5 et 49,9 fois inférieur chez la souche  $\Delta zraR$  W3110 par rapport à la souche WT W3110) (Table 3, (Rome et al. 2018)). Les nouvelles analyses de RT-qPCR n'ont pas retrouvé de différences significatives d'expression de ces gènes entre la souche WT W3110 et  $\Delta zraR$  W3110. Néanmoins, la production d'indole a été évaluée chez la souche sauvage et le mutant  $\Delta zraR$ . Étant donné que la souche *E. coli* K12 W3110 présente un élément génétique dans le gène *tnaB* ce qui a pour conséquence une production faible d'indole chez cette souche, l'évaluation de la production d'indole a été réalisée chez la souche BW25113.

Pour évaluer la production d'indole, une technique de colorimétrie, développée au laboratoire, faisant appel au réactif de Kovacs a été utilisée. En présence d'indole, le réactif de Kovacs forme un composé coloré. La densité optique (D.O.) a été lue à 566nm, correspondant à l'absorbance maximum de ce dérivé formé. A l'aide de la courbe standard et de la loi de Beer-Lambert, la concentration d'indole a été quantifiée dans les surnageants de cultures bactériennes. Cette réaction colorimétrique permet donc de quantifier l'indole dans le milieu extracellulaire. La spécificité de cette méthode a été vérifiée en réalisant un contrôle négatif sur le milieu seul (non montré). En milieu riche, la concentration extracellulaire d'indole est de 500 $\mu$ M pour la souche sauvage (WT) et pour la souche  $\Delta zraR$  (Figure 38B). La délétion du régulateur ZraR n'entraîne donc pas une modification de la production d'indole.

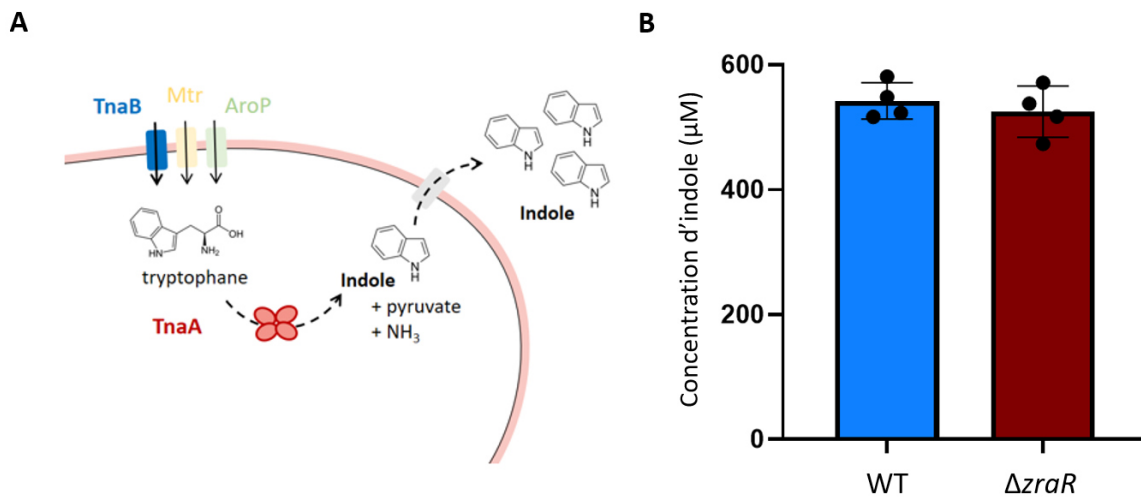


Figure 38 : Effet de la mutation de *zraR* sur la production d'indole

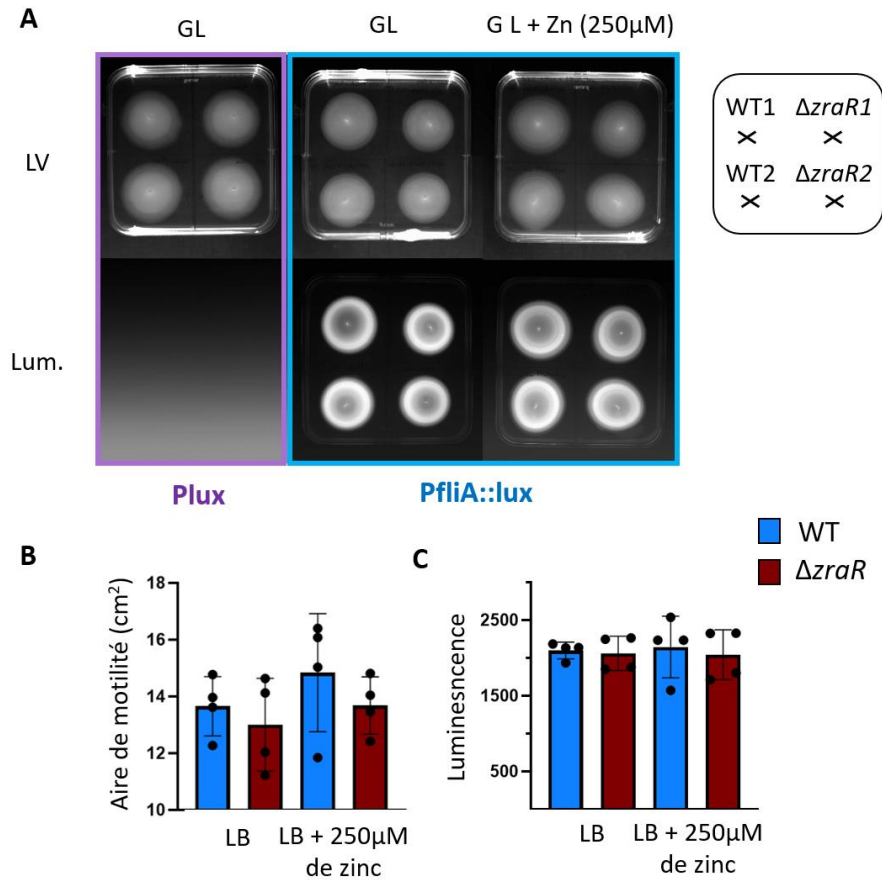
(A) Schématisation du fonctionnement de *TnaA* et *TnaB* adapté de Kim J et al (J. Kim et Park 2015) : *TnaB* est un transporteur qui permet au tryptophane extracellulaire d'entrer dans la cellule, celui-ci est récupéré par *TnaA* qui catalyse la réaction permettant de former de l'indole à partir du tryptophane. (B) Dosage de la concentration extracellulaire d'indole en milieu riche LB grâce au réactif de KOVACS

#### 4.2.2 – Le système *ZraR* n'est pas impliqué dans la motilité de type swimming

Le gène *fliA*, qui code un régulateur positif de la motilité, avait été identifié comme un gène régulé positivement par *ZraR*. Mais il n'a pas été retrouvé lors des nouvelles analyses de RT-qPCR. Afin de visualiser l'impact de la régulation de *ZraR* au niveau physiologique, l'effet de la délétion du gène *zraR* sur la mobilité a été analysé. Pour cela, les bactéries ont été incubées dans une gélose permettant la mobilité en présence ou non de l'activateur du système, le zinc en concentration sub-inhibitrice. L'expression du gène *fliA*, chez les bactéries WT et  $\Delta zraR$  contenant le plasmide *PfliA::lux*, dans lequel l'opéron *lux* a été placé sous le contrôle du promoteur du gène *fliA*, a été mesurée par suivi de la luminescence.

D'une part, il n'y a pas de différence de motilité entre la souche WT W3110 et la souche mutante  $\Delta zraR$  W3110 (Figure 39). D'autre part, la luminescence, correspondant à l'activité du promoteur du gène *fliA*, ne présente pas de différence entre la souche WT et la souche  $\Delta zraR$  (Figure 39). De plus, aucune différence n'est observée entre les conditions avec et sans zinc.

La délétion de *ZraR* ne semble pas avoir d'influence sur le phénotype de motilité ni l'activité du promoteur du gène *fliA*. Les observations préalablement déduites reflétaient une différence de souche et non un impact de la mutation.



**Figure 39 :** Etude de l'impact de la délétion de *zraR* sur la motilité et l'activité du promoteur du gène *fliA*

(A) Sur un milieu GL 0,3% supplémenté ou non avec 250µM de zinc, une colonie de chaque souche bactérienne a été piquée au centre de la gélose. La souche sauvage (WT) et la souche mutante  $\Delta zraR$  contenant le plasmide *pLux* ou *PfliA::lux* ont été testés. Au bout de 24h d'incubation à 37°C, une image en lumière visible est réalisée puis dans l'obscurité (partie supérieure), l'acquisition d'une image correspondant aux photons émis pendant 2 min est réalisée (partie inférieure). Cette expérience a été réalisée en quatre réplicats sur des cultures biologiquement indépendantes. (B) Le diamètre de motilité a été mesuré et il est présenté dans le graphique. (C) Le niveau de luminescence a été mesurée et il est présenté dans le graphique.

#### 4.2.3 – Le système ZraR régule des gènes impliqués dans l’export de la loméfloxacin

Le système Zra est impliqué dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques. La délétion du gène *zraR* induit notamment une sensibilité supérieure à la loméfloxacin. La loméfloxacin rentre dans la cellule puis inhibe l’activité de la topoisomérase. Un des mécanismes de résistance à cet antibiotique est l’export de la molécule à l’extérieur de la cellule. Dans le but d’analyser l’accumulation de la loméfloxacin à l’intérieur de la cellule, une approche d’HPLC a été utilisée afin de quantifier la molécule à l’intérieur de la cellule (Chapitre IV, partie 3.7).

La concentration intracellulaire de loméfloxacin a été suivie au cours du temps après addition de l’antibiotique. Chez la souche sauvage, une accumulation progressive de loméfloxacin est visible allant de  $3.2 \times 10^{-9}$  ng de loméfloxacin par cellule à 30min jusqu’à  $1 \times 10^{-7}$  ng de loméfloxacin par cellule à 120min (augmentation de 23 fois) (Figure 40). La même accumulation est visible chez le mutant  $\Delta zraR$ . Néanmoins, 120 minutes après l’addition de loméfloxacin, il y a 2,6 fois plus de loméfloxacin à l’intérieur du mutant par rapport à la souche sauvage (Figure 40). Cette observation est cohérente avec la sensibilité supérieure du mutant à la loméfloxacin.

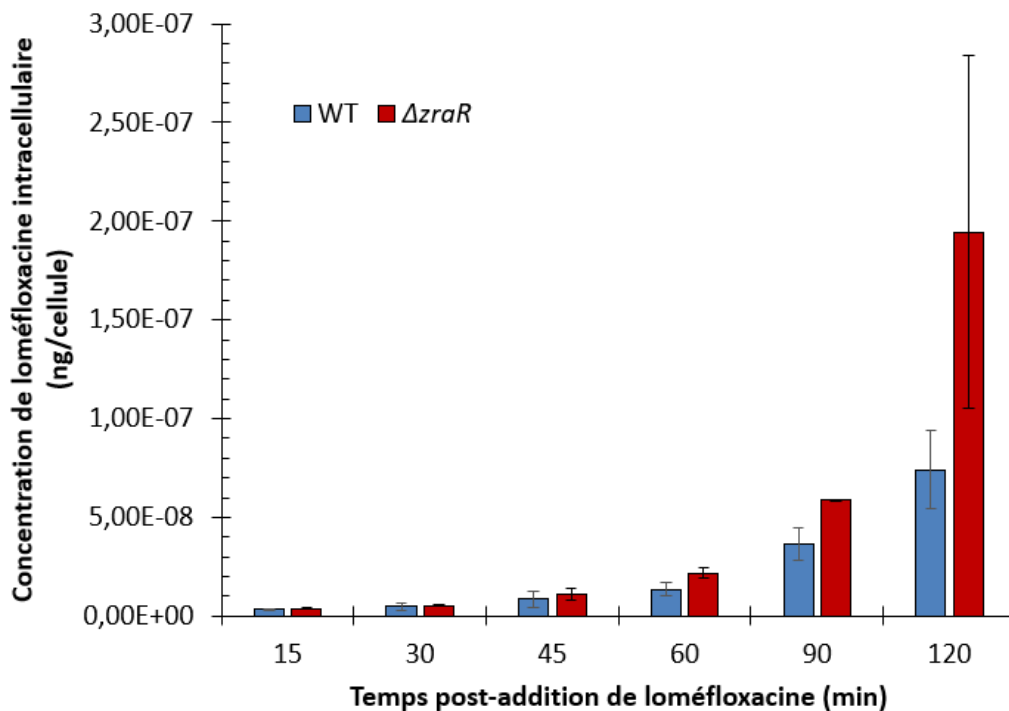


Figure 40 : Quantification de l’accumulation de la loméfloxacin à l’intérieur de la cellule

Deux cultures biologiquement indépendantes de cellules WT W3110 et  $\Delta zraR$  W3110 ont été placées en contact avec  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  de loméfloxacin. Une aliquote a été prélevée 30, 45, 60, 90 et 120min après incubation avec l’antibiotique. Les cellules ont été lysées à l’aide d’un tampon contenant de l’ACN et du TFA. Les solutions correspondant au contenu intracellulaire des bactéries ont été analysé par HPLC. La quantité de loméfloxacin a été mesurée et rapportée par cellule (ng/cellule).

#### 4.2.4 – Rôle de YrdD et YjjY dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques

Parmi les gènes présentant une différence d'expression entre la souche WT et la souche mutante  $\Delta zraR$ , deux gènes de fonctions inconnues ont été étudiés, *yrdD* et *yjjY*. Précédemment, Nichols et al. avait déjà montré que les mutants de ces gènes présentaient à la fois des fitness négatifs et positifs en présence d'antibiotiques chez *E. coli* (Nichols et al. 2011). Par exemple, le mutant  $\Delta yrdD$  présentait un gain de fitness d'un facteur 2 en présence de chloramphénicol et une perte de fitness d'un facteur 2,5 fois en présence de norfloxacine. Le mutant  $\Delta yjjY$  présentait un gain de fitness en présence d'éthanol et de polymyxine B d'un facteur de 4.5 et 2.7 ainsi qu'une perte de fitness en présence du chlorure de benzalkonium et de mécillinam d'un facteur 5,4 et 5,7 respectivement. En s'appuyant sur le potentiel rôle des produits de ces gènes dans la réponse aux antibiotiques, l'effet de la délétion de ces gènes a été étudié en présence d'antibiotiques.

##### 4.2.4.1 - Implication de YrdD dans la réponse aux antibiotiques

Le gène *yrdD* est 1.75 fois moins exprimé chez la souche WT par rapport à la souche mutante  $\Delta zraR$  (tableau 8). Ce gène est le premier gène d'un opéron composé de *yrdD*, *tsaC*, *aroE* et *yrdB*. Il code une protéine de 180 acides aminés conservée chez les entérobactéries. Sa séquence est similaire à la région C terminale de fixation du zinc de l'ADN topoisomérase de type I. Même si sa fonction reste inconnue, des études génétiques ont montré que YrdD pourrait jouer un rôle dans la réparation de l'ADN (Budke et Kuzminov 2010). Par la suite, Z. Cheng *et al* ont montré que YrdD est capable de fixer le zinc et le fer. Lorsqu'elle est liée au zinc, elle est capable de se lier à l'ADN simple brin (Cheng et al. 2014).

Afin de visualiser l'impact de la délétion du gène *yrdD* sur la sensibilité aux antibiotiques, les pourcentages de survie ont été déterminés par rapport à la condition sans antibiotique (Figure 41A). Chez *E. coli*, en présence de polymyxine B (0.5µg/µL) et de tétracycline (35µg/µL), aucune différence de survie n'est visible entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta yrdD$  alors qu'en présence de loméfloxacin (0.2µg/µL), la souche  $\Delta yrdD$  a un pourcentage de survie 5 fois inférieur à celui de la souche sauvage (Figure 41A). La délétion de *yrdD* entraîne une susceptibilité à la loméfloxacin. Cette observation est cohérente avec la perte de fitness du mutant en présence de norfloxacine préalablement observé par Nichols et al. (Nichols et al. 2011). Afin de vérifier que ce phénotype est bien dû à la délétion du gène *yrdD* et non à un effet polaire de sa délétion sur l'ensemble de l'opéron *yrdD-tsaC-aroE-yrdB*, un plasmide de complémentation a été créé. Pour cela, le gène *yrdD* ainsi que son promoteur ont été clonés dans le vecteur pUC18. En présence de loméfloxacin (0.2µg/µL), la souche  $\Delta yrdD$  a un pourcentage de survie 2 fois inférieur à celui de la souche sauvage. Lorsque le mutant possède le plasmide pUC18-*yrdD*, le pourcentage de survie est identique à celui de la souche sauvage (Figure 41B). Chez le mutant  $\Delta yrdD$ , la réintroduction du gène *yrdD* restaure donc un phénotype sauvage. Cela signifie que la délétion de *yrdD* n'a pas eu d'effet polaire sur l'ensemble de l'opéron et que YrdD est responsable de la résistance intrinsèque à la loméfloxacin.

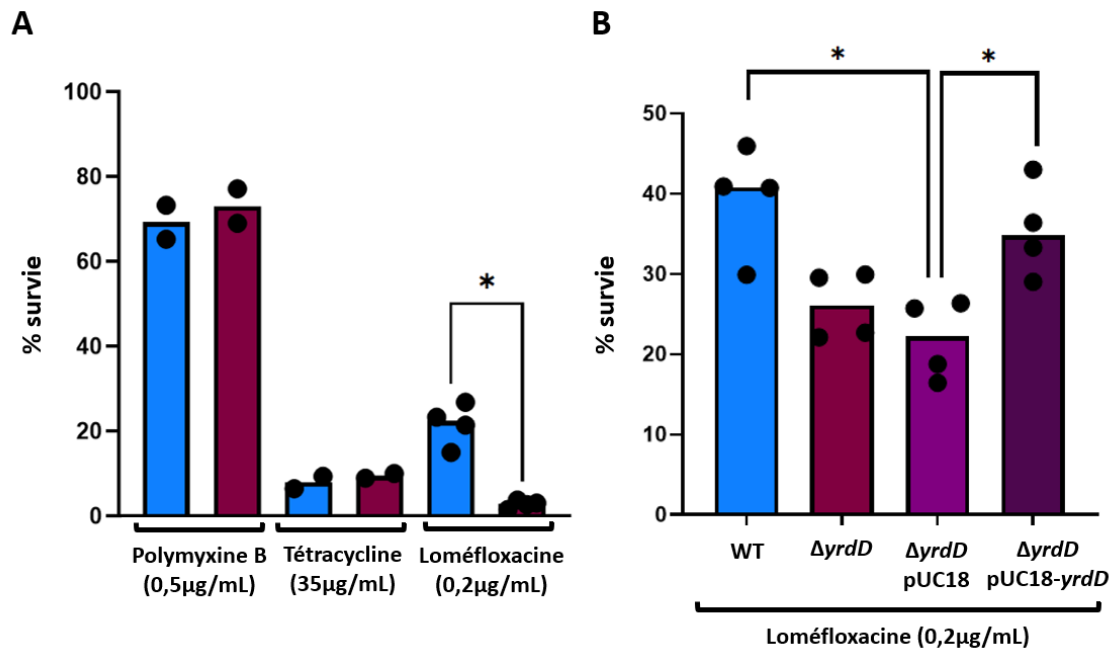


Figure 41 : Impact de la délétion de *yrdD* sur la survie en présence d'antibiotiques

Les pourcentages de survie en présence de différents antibiotiques sont présentés pour la souche sauvage WT et la souche mutante  $\Delta yrdD$ . Cette expérience a été réalisée en 2 réplicats pour la polymyxine B et tétracycline ou 4 réplicats pour la loméfloxacine sur des cultures biologiquement indépendantes. Le test de Mann-Whitney a été réalisé et une différence ( $p < 0,05$ ) est indiquée par \*.

#### 4.2.4.2 - Etude préliminaire de la fonction de YrdD

Chez *E. coli* K12, une étude a montré que la relaxation de l'ADN induit la répression de *yrdD* (Peter et al. 2004). De ce fait les auteurs ont supposé que *yrdD* pouvait être impliqué dans le maintien de la topologie du chromosome. De plus, Budke et Kuzminov ont proposé que YrdD pourrait potentiellement interagir avec l'endonucléase V et l'aider dans sa fonction de réparation de l'ADN (Budke et Kuzminov 2010). Afin d'en savoir plus sur la fonction de YrdD, l'impact de la délétion de *yrdD* sur la topologie de l'ADN a été étudié.

Une technique simple permet de visualiser l'état de relâchement de l'ADN (Shure, Pulleyblank, et Vinograd 1977). Pour cela, l'ADN plasmidique de pBAD18 de la souche WT et  $\Delta yrdD$  W3110 a été extrait dans différentes conditions. Les échantillons sont déposés sur un gel contenant de la chloroquine. La chloroquine est un agent intercalant qui se fixe préférentiellement sur l'ADN relâché et provoque son étirement. Le gel a été analysé à l'aide du logiciel ImageJ. Ce logiciel permet de comparer l'intensité des bandes entre différentes conditions de traitement. Il est obtenu un graphique qui représente en ordonnée les niveaux de gris correspondant à l'intensité des bandes séparées sur gel de chloroquine et en abscisse la distance de migration en pixels. Chaque pic représente une bande et ceux se situant plus à gauche correspondent aux bandes ayant le moins migré.

Donc plus l'intensité des pics est importante à gauche, plus l'ADN est relâché, et inversement si les pics ont une intensité plus forte à droite, l'ADN est surenroulé. En effet, l'étirement de la molécule d'ADN va ralentir sa vitesse de migration.



Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induit des cassures dans l'ADN. Cela paraît donc cohérent que les cellules qui ont subi un traitement avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aient un ADN moins enroulé que les cellules qui n'ont pas subi de stress (Figure 42). Cela constitue une validation de notre méthode.

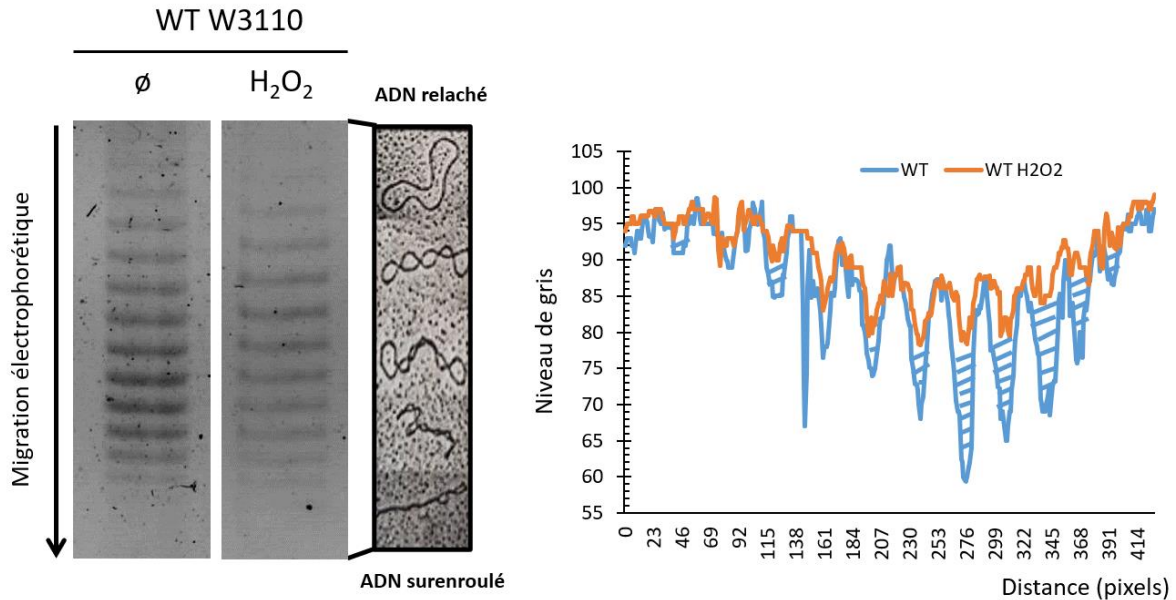
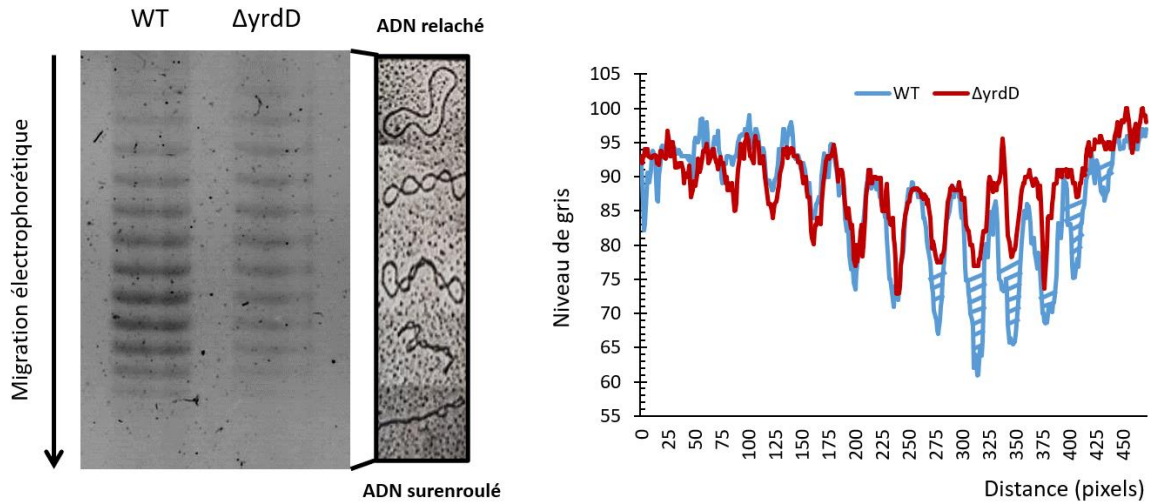


Figure 42 : Effet d'un stress oxydant sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidique extrait de la souche sauvage d'E. coli W3110

L'ADN plasmidique (1200ng) extrait d'une culture d'E. coli W3110 stressé ou non avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 1h a été déposé sur un gel d'agarose 0.8% contenant 2,5µg/mL de chloroquine. À la suite de la migration, le gel a été révélé au BET. Le gel a été analysé avec le logiciel ImageJ donnant le niveau de gris du haut au bas du gel sous forme de graphique.

Cette fois-ci, la même expérience a été réalisée en comparant la topologie de l'ADN chez la souche sauvage WT avec celle chez le mutant  $\Delta yrdD$ . Il apparaît que les pics sont moins importants du côté droit du graphique pour le mutant que pour la souche sauvage (Figure 43). Cela signifie que l'ADN est moins enroulé chez le mutant que chez la souche sauvage. La délétion de *yrdD* semble donc impacter la topologie de l'ADN.



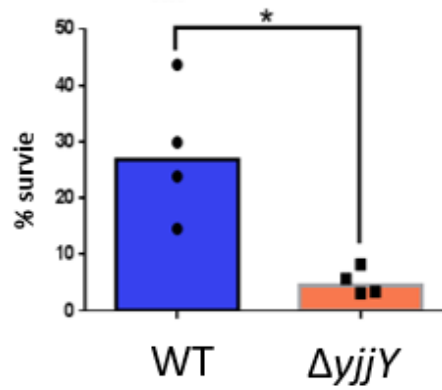
**Figure 43 :** Effet de la mutation du gène *yrdD* sur le niveau d'enroulement de l'ADN plasmidiques extrait de la souche sauvage et mutante *ΔyrdD* d'*E. coli* W3110

L'ADN plasmidique (1200ng) extrait d'une culture d'*E. coli* WT ou *ΔyrdD* W3110 a été déposé sur un gel d'agarose 0.8% contenant 2,5µg/mL de chloroquine. À la suite de la migration, le gel a été révélé au BET. Le gel a été analysé avec le logiciel ImageJ donnant le niveau de gris du haut au bas du gel sous forme de graphique.

#### 4.2.4.3 - Etude de l'implication de *YjjY* dans la réponse aux antibiotiques

Le gène *yjjY* est 1.4 fois moins exprimé chez la souche WT par rapport à la souche mutante *ΔzraR* (tableau 8). Ce gène code une petite protéine de 46 acides aminés de fonction inconnue. Il a été très peu étudié. Une seule publication le mentionne sous le nom STM4599 et montre que sa délétion chez *Salmonella enterica* entraîne une réduction du swarming (Bogomolnaya et al. 2014). De plus, Nichols et al ont montré que la délétion de *yjjY* avait un impact fort sur le fitness de *E. coli* en présence d'antimicrobien (Nichols et al. 2011).

Afin de visualiser l'impact de la délétion du gène *yjjY* sur la sensibilité aux antibiotiques, les pourcentages de survie ont été déterminés par rapport à la condition sans antibiotique (Figure 44). Chez *E. coli*, en présence de loméfloxacin (0.2µg/µL), la souche *ΔyjjY* a un pourcentage de survie 2 fois inférieur à celui de la souche sauvage (Figure 44). *YjjY* semble donc être impliqué dans la résistance intrinsèque à la loméfloxacin.



*Figure 44 : Etude de l'impact de la délétion du gène yjjY la survie en présence de loméfloxacine*

*Les pourcentages de survie en présence de loméfloxacine sont présentés pour la souche sauvage WT et la souche mutante  $\Delta yjjY$ . Cette expérience a été réalisée en 4 réplicats sur des cultures biologiquement indépendantes.*

*Le test de Mann-Whitney a été réalisé et une différence ( $p < 0,05$ ) est indiquée par \*.*

## 5 – Conclusion

Afin d'appréhender le mécanisme moléculaire de la réponse au stress médiée par le système Zra, les gènes régulés par le régulateur ZraR ont été identifiés par ChIP-seq. A partir de l'identification des sites de fixation potentielle de ZraR, l'expression des gènes cibles a été évaluée par qRT-PCR entre la souche WT et la souche  $\Delta zraR$ . Cela avait permis de valider 23 cibles. Néanmoins, une erreur a été détectée concernant la souche  $\Delta zraR$ , le mutant a donc été refait et les analyses ont été reproduites. Bien que les souches de *Escherichia coli* K12 soient très proches, il est important de noter que les phénotypes tels que la motilité ou la production d'indole peuvent être très différents.

Parmi 40 cibles identifiées par ChIP-seq, l'expression différentielle de six cibles entre la souche WT et le mutant  $\Delta zraR$  a été confirmée par RT-qPCR. Contrairement à ce qui avait été précédemment montré, le système Zra n'est pas impliqué dans la régulation de la production d'indole ou de la motilité en milieu riche. Parmi les gènes régulés par ZraR, deux gènes ont été étudiés dans le contexte de la réponse aux antibiotiques. Cette étude a permis d'identifier deux nouveaux acteurs, YjjY et YrdD, qui sont impliqués dans la résistance intrinsèque à la loméfloxacin chez *E. coli*. Du fait de leur régulation négative par le système Zra, ces gènes ne participeraient peut-être pas à la réponse aux antibiotiques médiée par le système Zra.

Enfin la loméfloxacin s'accumule de manière plus importante chez le mutant  $\Delta zraR$  par rapport à chez la souche WT. Donc le système Zra régule certainement des gènes codants des protéines impliquées dans l'export de la loméfloxacin qui n'ont pas encore été identifiés. C'est pourquoi, l'identification du régulon de ZraR tendrait à révéler de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.

---

## Chapitre VII – Etude du transporteur Yhd chez trois entérobactéries

---

### 1 – Introduction

Les transporteurs ABC sont l'une des plus grandes familles présentes à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes. Les bactéries utilisent couramment des transporteurs ABC (ATP-binding Cassette) pour l'échange de molécules avec leur environnement. Les ABC transporteurs peuvent jouer un rôle d'import ou d'export de molécules. Ils varient dans leur spécificité et peuvent se lier à une grande variété de ligands, notamment des cations, des acides aminés, des polysaccharides et des polypeptides.

L'opéron *yhdWXYZ*, aussi appelé *aapJQMP*, code un transporteur ABC putatif. Il est constitué de quatre composants : YhdW, une protéine de liaison périplasmique qui fixe le ligand, YhdY et YhdX, deux protéines transmembranaires à travers lesquelles le ligand est transporté, et YhdZ, un dimère d'ATPase cytoplasmique qui stimule le processus de transport (Figure 45). Cet opéron a été identifié lors du crible par ChIP-seq comme étant une cible de ZraR (Chapitre VI). Plusieurs études ont été menées auparavant chez plusieurs bactéries. Premièrement, chez *Rhizobium leguminosarum*, ce transporteur a été caractérisé en 1996 comme un transporteur impliqué dans l'import d'une large variété d'acides aminés mais également l'export de certains acides aminés comme le glutamate (Walshaw et Poole 1996). D'autre part, chez *Brucella melitensis*, la protéine YhdW (aussi appelée AapJ) a été identifiée comme surexprimée lors d'un choc thermique et il a été proposé qu'elle serait impliquée dans la réponse au stress (Teixeira-Gomes, Cloeckert, et Zygmunt 2000). Les mêmes auteurs avaient également montré que cette protéine a un fort pouvoir immunogène chez le mouton (Teixeira-Gomes et al. 1997). De plus, des analyses *in silico* ont prédit des interactions potentielles entre YhdW et des protéines humaines chez les *E. coli* pathogènes ainsi que *Shigella*. (Bose, Venkatesh, et Mande 2017a; 2019). Enfin, une étude précédente avait montré que la délétion de *yhdW* avait un impact sur le fitness de *E. coli* en présence d'antibiotiques tels que la ciprofloxacine (-3.5) ou le mécillinam (-2.8) (Nichols et al. 2011).

Du fait du rôle potentiel du transporteur Yhd dans la résistance aux antibiotiques et dans l'interaction hôte-pathogène, la conservation de ce transporteur a été recherchée chez les entérobactéries dans un premier temps. Puis le transporteur a été étudié sur le plan fonctionnel chez *Escherichia coli* K12, notamment son rôle dans la résistance aux antibiotiques. Enfin, le rôle du transporteur a été étudié chez des bactéries pathogènes, dans l'interaction entre *Citrobacter rodentium* DSB100 et la souris ainsi qu'entre *Dickeya dadantii* 3937 et différents modèles de plantes.

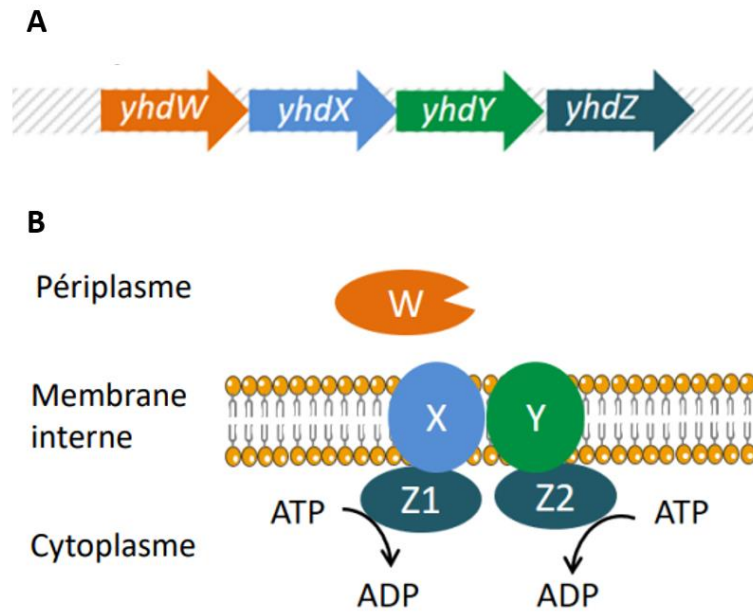


Figure 45 : Schématisation de l'organisation de l'opéron yhd et du transporteur Yhd

(A) L'opéron yhd est composé de quatre gènes : yhdW, yhdX, yhdY et yhdZ. (B) Le transporteur est composé de : YhdW qui est une protéine périplasmique qui fixe le substrat, YhdX et YhdY qui sont des domaines transmembranaires et YhdZ qui est une ATPase qui énergise le transport.

## 2 – Distribution de Yhd chez les entérobactéries

Les analyses *in silico* ont permis d'annoter cet opéron comme un ABC transporteur. Il est composé de 4 gènes : yhdW codant une protéine fixatrice du substrat, yhdX et yhdY codant tout deux des domaines transmembranaires et yhdZ codant une ATPase (Figure 45).

Afin d'évaluer la conservation du transporteur dans l'ordre des *Enterobacteriales*, une étude phylogénétique a été réalisée. Le programme KOALA (KEGG Orthology And Links Annotation) qui classe les protéines dans des groupes d'orthologie (KO) à l'aide d'un algorithme, a été utilisé. YhdZ est classé dans le groupe K09972 et il semble être retrouvé uniquement chez les protéobactéries et les cyanobactéries. Etant donné que les ATPases sont les composants des ABC transporteurs les plus conservés au cours de l'évolution, les séquences protéiques correspondant à l'ATPase du système, YhdZ, ont été récoltées puis un arbre phylogénétique a été réalisé (Figure 46).

Cela a permis de montrer que l'ATPase YhdZ d'*E. coli* possède des orthologues chez de nombreuses espèces d'entérobactéries. Mais celle-ci n'est pas conservée chez toutes les entérobactéries. Par exemple, elle n'est pas présente chez le genre *Salmonella*. De plus en analysant la séquence génétique, il apparaît que le gène yhdW est un pseudogène chez certaines bactéries comme plusieurs *E. coli* ou *S. sonnei* Ss046. En raison d'une mutation induisant un décalage de cadre lecture à partir du codon 23, un codon stop apparaît et la protéine est tronquée (symbolisé par un carré vide dans la Figure 46). Ce phénomène semble être uniquement retrouvé dans certaines espèces du genre *Escherichia* et *Shigella*.



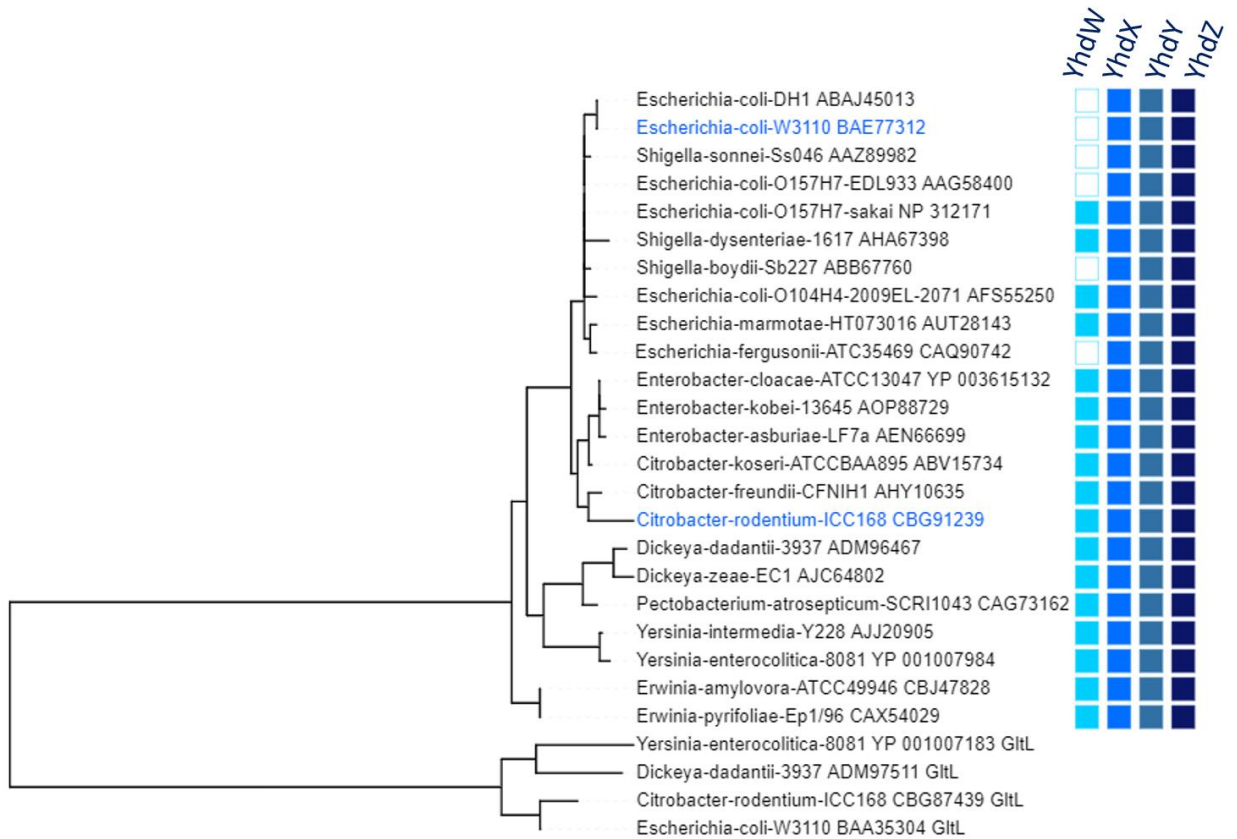


Figure 46 : Arbre phylogénétique de l'ATPase, YhdZ, et présence des autres éléments du transporteur chez les entérobactéries

L'arbre a été construit avec PhyML (LG) en utilisant un alignement protéique de 23 séquences de YhdZ issues du groupe d'orthologue K09972 et ayant un pourcentage d'identité supérieur à 75%. L'arbre a été enraciné en utilisant les séquences d'une autre ATPase apparentée, GltL comme groupe extérieur. A côté de chaque bactérie, la présence ou l'absence des protéines du transporteur est symbolisée par un carré rempli (■) ou vide (□).

### 3 – Fonction du transporteur Yhd chez trois entérobactéries : *E. coli* W3110, *D. dadantii* 3937 et *C. rodentium* DSB100

Afin d'étudier le transporteur dans différents contextes d'interaction hôte-bactérie, trois types de bactérie ont été sélectionnés : la souche de laboratoire non pathogène *Escherchia coli* K12 W3110, le pathogène murin *Citrobacter rodentium* DSB100 et le phytopathogène *Dickeya dadantii* 3937. Les pourcentages d'identités génétiques et protéiques ont été calculés pour chaque élément du système. Les pourcentages d'identité sont très élevés (Figure 47). Les pourcentages d'identité sont plus importants entre *E. coli* et *C. rodentium* qu'entre *D. dadantii* et *C. rodentium* ainsi qu'entre *D. dadantii* et *E. coli*. Cela semble cohérent puisque *C. rodentium* et *E. coli* font partie de la même famille et ont un ancêtre commun plus proche que celui de *D. dadantii*. La prédiction de la topologie des protéines à domaines transmembranaires (TMDs), YhdX et YhdY, indique qu'ils possèdent chacun 8 domaines transmembranaires excepté YhdX de *D. dadantii* qui en possède 7 (Figure 48). La topologie de YhdY et YhdX est très similaire entre les trois bactéries. Deux régions opératrices ont été prédites *in silico* pour cet opéron, la première se trouve en amont du gène *yhdW* et la seconde en amont du gène *yhdX*. Le pourcentage d'identité est également élevé compte tenu des nombreux remaniements qui ont lieu au sein des génomes bactériens. Ces forts pourcentages d'identité pourraient être en corrélation avec des régulations et des fonctions identiques.

Néanmoins, comme exposé plus haut, une différence flagrante réside dans le fait qu'il y ait eu un décalage du cadre de lecture chez *E. coli* K12. Le gène *yhdW* est un pseudogène et il ne code pas une protéine avec sa fonction initiale. Dans la suite de ce chapitre, le système sera étudié chez ces trois modèles.

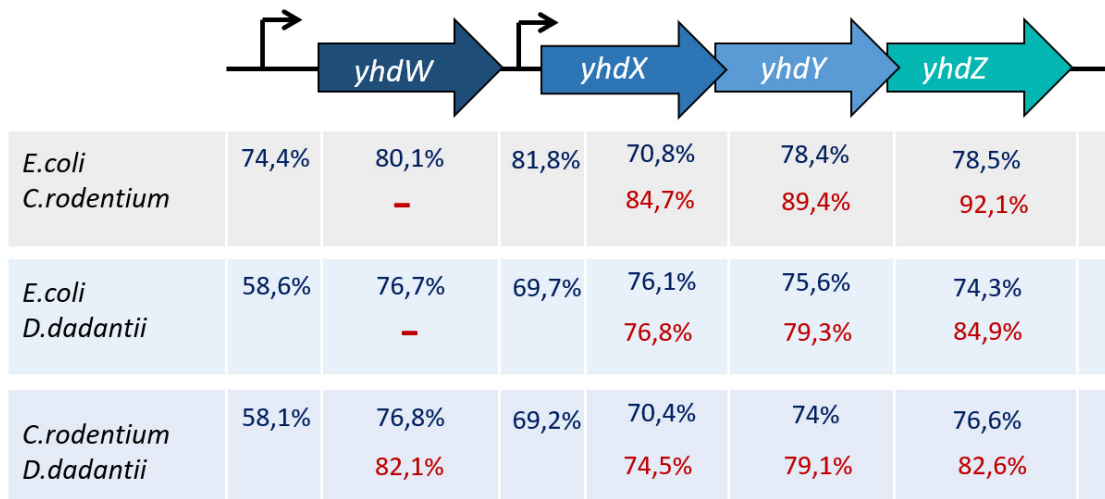
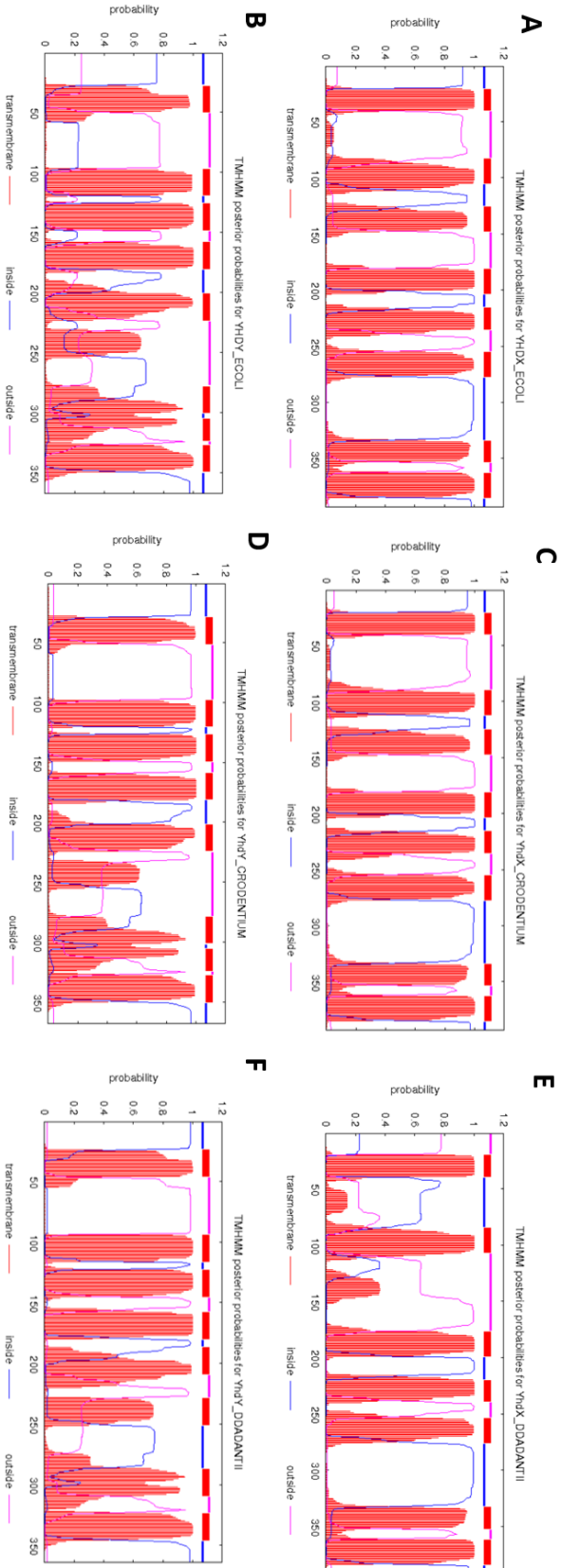


Figure 47 : Comparaison du transporteur Yhd entre *E. coli*, *C. rodentium* et *D.dadantii* au niveau génétique et protéique

L'ordre des gènes est le même pour *E. coli*, *C. rodentium* et *D. dadantii*. En dessous de chacun des gènes *yhd*, l'identité génétique (calculée avec MUSCLE) est indiquée en bleu et l'identité protéique (calculée avec clustal Omega) est indiquée en rouge. De plus, deux promoteurs ont été prédits bio informatiquement pour cet opéron. Le premier est en amont du gène *yhdW* et le second est en amont du gène *yhdX*.



**Figure 48 :** Prédiction de la topologie transmembranaires des domaines TMDs du transporteur Yhd avec le logiciel TMHMM 2.0

Les topologies transmembranaires à partir des séquences protéiques de YhdX et YhdY chez *E. coli* (A et B) ; de YhdX et YhdY chez *C. rodentium* (C et D) et de YhdX et YhdY chez *D. dadantii* (E et F) ont été prédites. Les domaines transmembranaires sont en couleur rouge, les domaines périplasmiques sont en bleus et les domaines sont en roses.

### 3.1 – Quel est le rôle du transporteur Yhd chez un organisme non pathogène, *E. coli* K12 ?

#### 3.1.1 - L'expression de l'opéron *yhd* est régulée par ZraR

A l'aide d'un CHIP-seq, le gène *yhdW* a été identifié comme une cible du régulateur ZraR. L'expression du gène *yhdW* et celle des gènes *yhdXYZ* ont été étudiées en RT-qPCR. L'expression de *yhdW* et *yhdX* est 1,36 et 1,17 fois supérieure chez le mutant  $\Delta zraR$  par rapport à la souche sauvage (Tableau 8) cependant ces différences ne sont pas ressorties comme significatives à la suite des tests statistiques. L'activité du promoteur a été évaluée en plaçant les promoteurs de *yhdW* et *yhdX* en amont de gènes rapporteurs, l'opéron *lux*. L'activité de la fusion *PyhdW::lux* est 1.6 fois supérieure en milieu riche, LB, chez le mutant  $\Delta zraR$  par rapport à la souche sauvage (Figure 49). De la même façon, l'activité de la fusion *PyhdX::lux* est 1.2 fois supérieure en milieu riche, LB, chez le mutant  $\Delta zraR$  par rapport à la souche sauvage (Figure 49). L'expression de ces gènes serait donc sous le contrôle de ZraR.

L'expression du gène *yhdW* et de l'opéron *yhdXYZ* est 2 fois supérieure en milieu minimum contenant du glucose, M63G, par rapport au milieu riche, LB, chez la souche sauvage. En revanche, l'activité du promoteur de *yhdW* ne présente pas de différence entre la condition LB et M63 Glycérol (M63Y) contrairement à l'activité du promoteur de *yhdXYZ*. (Figure 49).

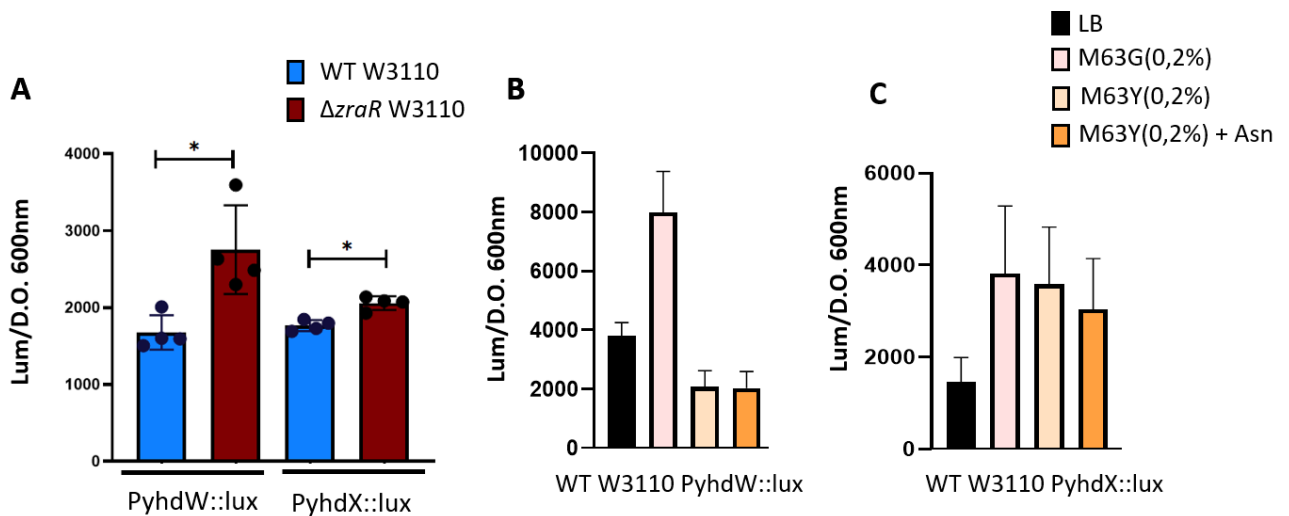


Figure 49 : Profil d'induction de la fusion *yhdW::lux* et *yhdX::lux* de *E. coli*

Les gènes de l'opéron *lux* sont sous le contrôle du promoteur de *yhdW* ou de *yhdX*. (A) L'activité du promoteur de *yhdW* ou de *yhdX* est étudiée dans le contexte génétique de la souche sauvage WT (en bleu) ou mutante  $\Delta zraR$  (en rouge) en milieu riche, LB. (B et C) L'activité du promoteur de *yhdW* ou de *yhdX* est étudiée dans le contexte de la souche sauvage WT W3110. Le profil d'induction du promoteur est analysé en mesurant la luminescence maximale en milieu riche, LB, ou en milieu minimum avec du glucose 0.2%, M63G, ou en milieu minimum avec du glycérol 0.2%, M63Y, ou en M63Y additionné d'asparagine (Asn) ou de valine (Val). Les valeurs de luminescence obtenues sont normalisées par la D.O. 600nm correspondante. L'expérience a été réalisée sur quatre cultures biologiquement indépendantes. Le test de Mann-Whitney a été réalisé et une différence ( $p < 0,05$ ) est indiquée par \*.

### 3.1.2 – L'expression de l'opéron *yhd* est régulée par $\sigma^{54}$

L'ARN polymérase nécessite un facteur sigma pour se fixer au niveau de l'ADN et débiter la transcription. Un site de fixation du facteur  $\sigma^{54}$  dans la zone promotrice en amont de *yhdW* a été identifié grâce à une approche de ChIP-seq (Bonocora et al. 2015). En revanche le promoteur en amont du gène *yhdX* n'a pas été caractérisé. L'activité de la région promotrice en amont de *yhdW* (*PyhdW*) et de la région promotrice en amont de *yhdX* (*PyhdX*) a été mesurée dans le contexte de la bactérie *E.coli* MG1655 sauvage et mutante  $\Delta rpoN$ .

Comme précédemment, les activités de *PyhdW::lux* et *PyhdX::lux* sont supérieures en milieu minimum, M63G, par rapport au milieu riche, LB. En accord avec la présence d'un promoteur reconnu par  $\sigma^{54}$  dans la région promotrice en amont de *yhdW*, la mutation de *rpoN* provoque une diminution significative de l'activité de *PyhdW::lux*. Un résultat similaire est observé pour la région promotrice de *yhdX* (Figure 50). Cela signifie que le gène *yhdX* possède également un promoteur de type  $\sigma^{54}$ . Néanmoins, la mutation de *rpoN* n'abolit pas totalement l'activité des zones promotrices, suggérant l'existence d'un second promoteur.

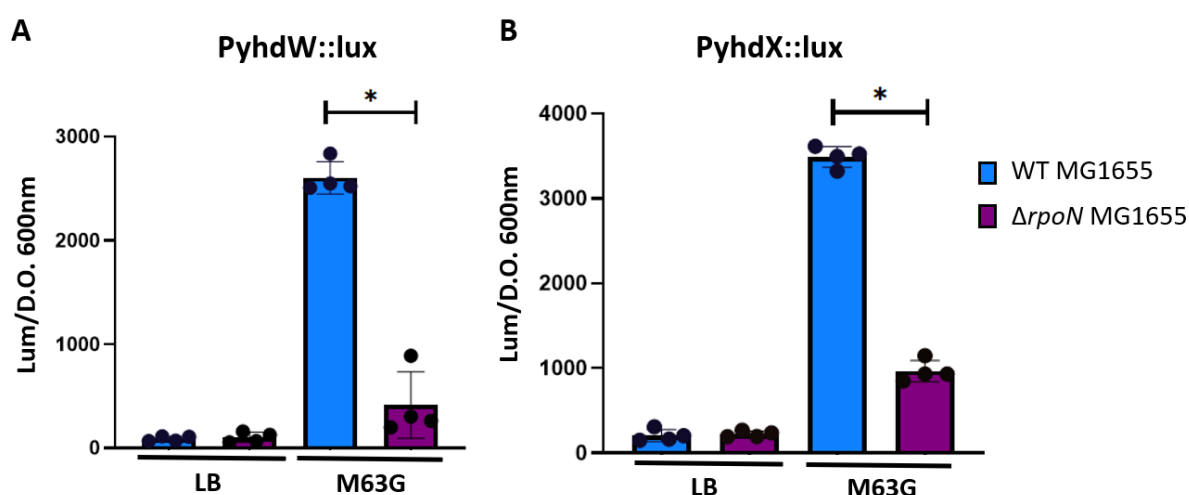


Figure 50 : Influence de la délétion de *rpoN* sur l'expression de *yhdW* et *yhdX*

Les gènes de l'opéron *lux* sont sous le contrôle du promoteur de *yhdW* (A) ou de *yhdX* (B). L'activité du promoteur est étudiée dans le contexte génétique de la souche sauvage WT (en bleu) ou mutante  $\Delta rpoN$  (en violet). Le profil d'induction du promoteur est analysé en mesurant la luminescence maximale en milieu riche, LB, ou en milieu minimum, M63G. Les valeurs de luminescence obtenues sont normalisées par la D.O. 600nm correspondante. L'expérience a été réalisée sur quatre cultures biologiquement indépendantes. Le test de Mann-Whitney a été réalisé et une différence ( $p < 0,05$ ) est indiquée par \*.

### 3.1.2 – YhdW est-elle produite ? Et sous quelle forme ?

Le gène *yhdW* chez *E. coli* W3110 est un pseudogène. En effet, la délétion d'une base a engendré un décalage du cadre de lecture à partir du codon 23. Dans la figure 52, la partie supérieure représente le gène *yhdW* codant la protéine YhdW sans décalage de cadre de lecture. Cette protéine sera nommée YhdW initiale. Elle est composée de 341 acides aminés.

Cette mutation aurait comme conséquence la production d'une protéine différente. Dans la partie inférieure, les protéines pouvant être produites sont représentées. Si la

traduction débute toujours au niveau du codon start, ATG, une première protéine peut être produite. Elle possède 78 acides aminés. Parmi ces acides aminés, 23 sont communs avec la protéine YhdW initiale et 55 acides aminés sont complètement différents (Figure 52). Si la traduction commence à partir d'un codon start alternatif, GTG, une seconde protéine peut être prédite. Le cadre de lecture est le même que pour la protéine initiale donc elle possède 305 acides aminés qui sont identiques avec ceux de la protéine YhdW initiale (Figure 52). Cette seconde protéine est celle que l'on retrouve dans les bases de données.

Afin de vérifier si la protéine de 305 acides aminés est produite, le cadre de lecture du gène *yhdW* de *C. rodentium* a été cloné dans le vecteur pSEVA inductible à l'anhydrotetracycline (ATC). Un TAG 8 histidines a été placé dans le cadre de lecture de la protéine de 305 acides aminés. Après 5h d'induction par l'ATC, le contenu cellulaire a été déposé sur un gel d'acrylamide et un western blot a été réalisé avec des anticorps contre le TAG histidine (Figure 51). Une protéine de 35kDa couplée à un TAG histidine a été utilisée comme témoin. Cette protéine est bien détectée par le western blot. En revanche, la protéine de 305 acides aminés n'est pas détectée.

Le pseudogène *yhdW* ne code pas de protéine de 305 acides aminés mais il code peut-être une petite protéine de 78 acides aminés qui n'a plus du tout une fonction de SBP.

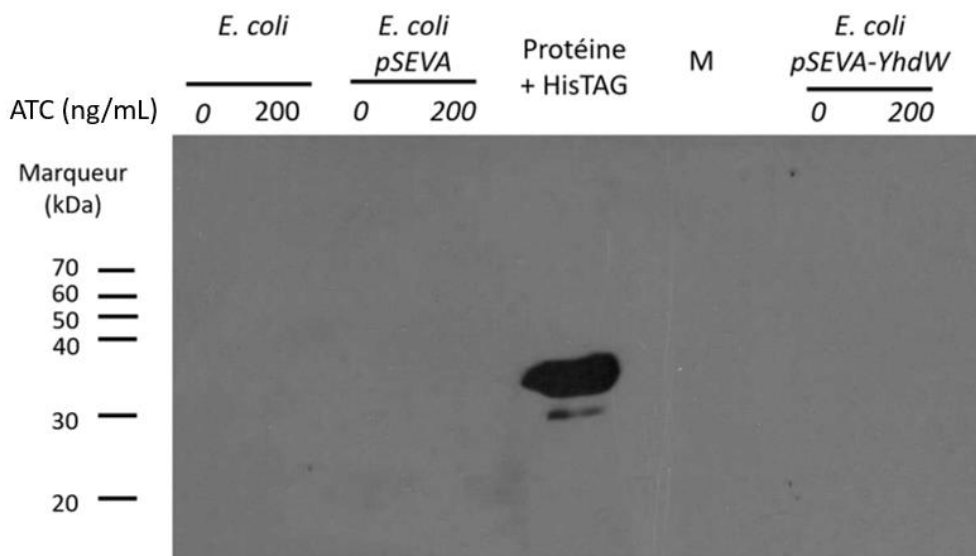


Figure 51 : Test de surproduction de YhdW avec un TAG histidine

Afin de visualiser si la protéine YhdW de 305 acides aminés est produite, l'ORF de *yhdW* suivi d'un TAG histidine a été cloné devant un promoteur inductible à l'anhydrotetracycline (ATC) dans le vecteur pSEVA. A la suite des cultures, le western blot a été réalisé avec des anticorps anti-his. Les extraits cellulaires pour les cellules sans plasmide, les cellules contenant le plasmide vide pSEVA et les cellules contenant le plasmide pSEVA-YhdW préalablement induites ou non avec 200ng/mL d'ATC ont été déposés sur gel. Une protéine connue contenant un His-TAG a également été déposée sur le gel comme témoin positif.



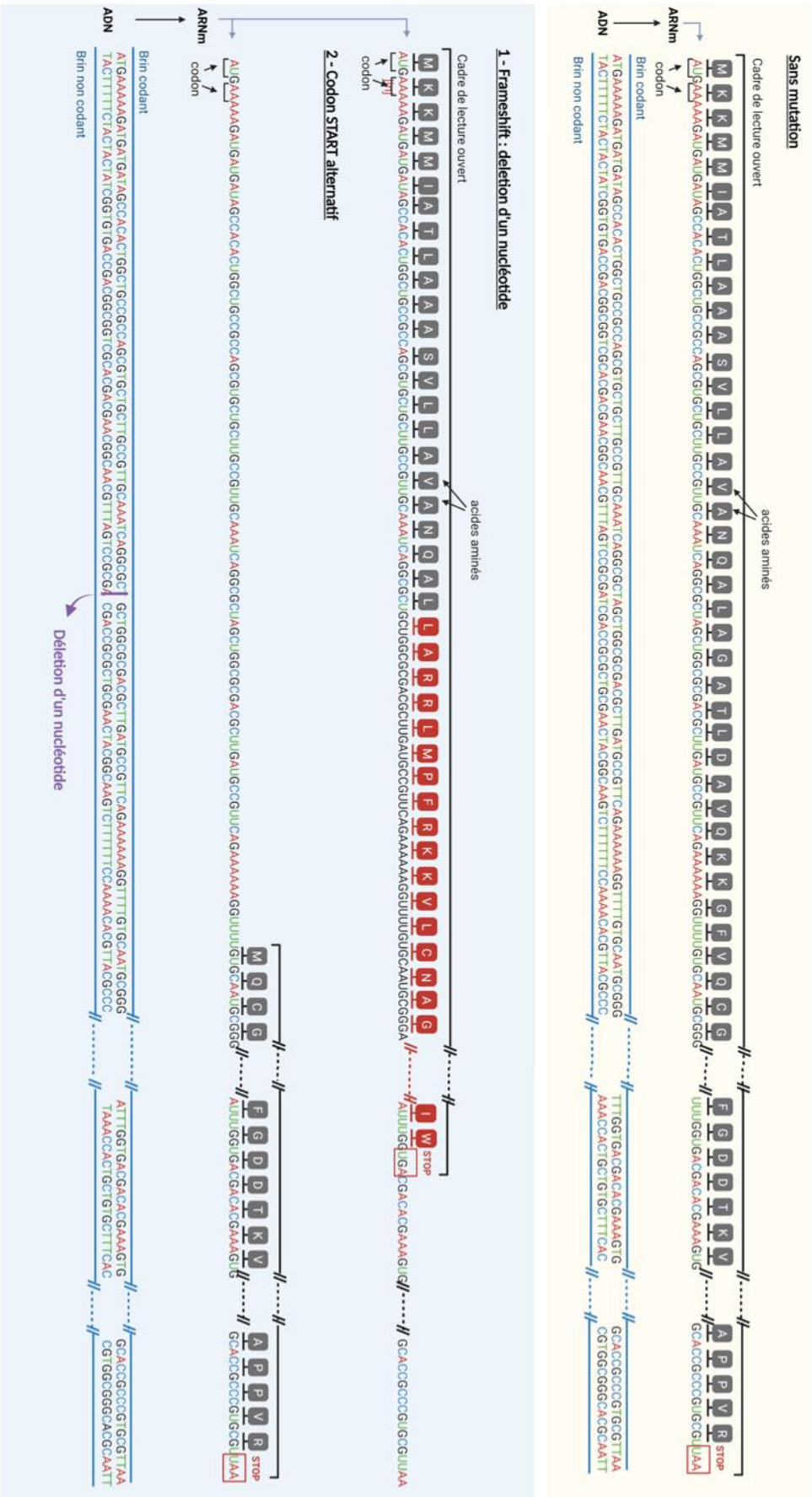


Figure 52 : Transcription et traduction du gène yhdW chez E. coli K12 W3110

La partie supérieure de la figure (en jaune) représente la transcription et la traduction du gène yhdW lorsqu'il n'y a pas de mutation. Elles aboutissent à une protéine de 341 acides aminés. La partie inférieure de la figure (en bleu) représente le gène yhdW avec une mutation correspondant à la déletion d'un nucléotide au niveau du codon 23. Si la traduction débute toujours au niveau du codon start, cette mutation aboutit à un décalage du cadre de lecture qui engendre une composition en acides aminés différente (en rouge) et un codon stop prématuré. Une protéine de 78 acides aminés est produite. En revanche, si la traduction commence au niveau du codon start alternatif, une protéine de 305 acides aminés est produite. Cette protéine est très similaire à la protéine de 341 acides aminés.

### 3.1.3 - Le système Yhd est impliqué dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques

ZraR régule la transcription de l'opéron *yhdW-Z*, et le système ZraPSR est impliqué dans la résistance à certains antibiotiques. Parmi les mécanismes de résistance aux antibiotiques, il est connu que certains transporteurs ABC participent à la détoxification de toxines ou d'antibiotiques. La résistance intrinsèque à certains antibiotiques, contrôlée par ZraPSR, pourrait être médiée totalement ou en partie par YhdW-Z. Afin d'étudier la potentielle implication de ce transporteur dans la résistance aux antibiotiques, la délétion de l'opéron *yhdWXYZ* a été réalisée selon la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko et Wanner 2000b). Pour vérifier que la délétion de ce gène n'entraîne pas de défaut de croissance, un suivi de la croissance au cours du temps a été réalisé en milieu riche et en milieu minimum (non montré). La bactérie délétée de l'opéron *yhdWXYZ* ( $\Delta yhdWXYZ$ ) a une croissance similaire à celle de la bactérie sauvage (WT) dans les deux types de milieux. Une mutation du système Zra entraîne une plus forte sensibilité à un panel d'antibiotiques. Afin de visualiser l'impact de la délétion de l'opéron *yhdWXYZ* sur la sensibilité aux antibiotiques, les pourcentages de survie ont été déterminés par rapport à la condition sans antibiotique (Figure 53). Chez *E. coli*, en présence de loméfloxacin (0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L) et de mécillina (5 $\mu$ g/ $\mu$ L), la souche  $\Delta yhdWXYZ$  a un pourcentage de survie 4 et 2 fois inférieur à celui de la souche sauvage (Figure 53). Ce transporteur semble donc être impliqué dans la résistance intrinsèque à ces antibiotiques. En revanche, aucune différence de sensibilité n'est observée pour la tétracycline, la puromycine et l'ampicilline.

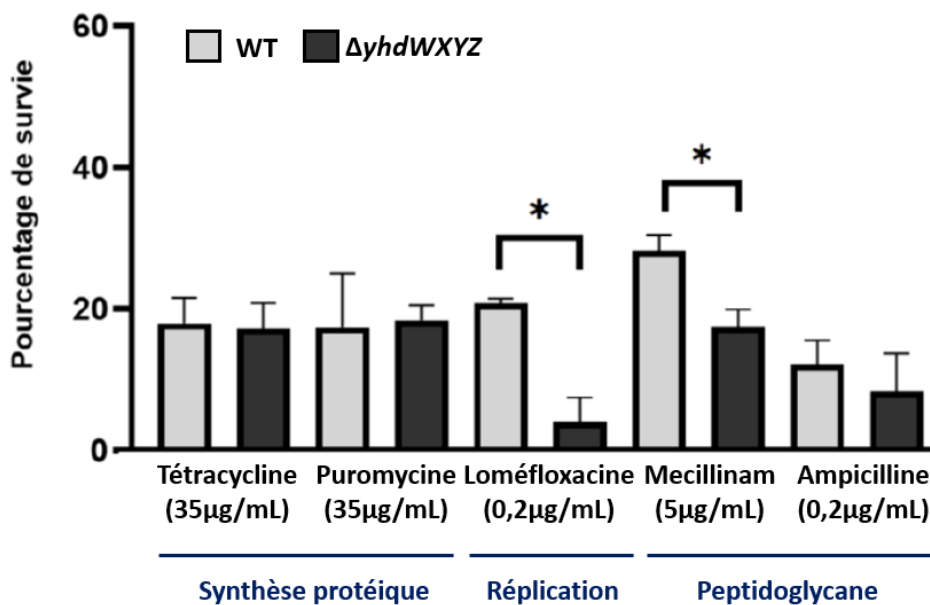


Figure 53 : Pourcentages de survie de *E.coli* WT et  $\Delta yhdWXYZ$  en présence de différents antibiotiques

Les pourcentages de survie en présence de différents antibiotiques sont présentés pour la souche sauvage WT et la souche mutante  $\Delta yhdWXYZ$ . Cette expérience a été réalisée en 4 réplicats sur des cultures biologiquement indépendantes. Le test de Mann-Whitney a été réalisé et une différence ( $p < 0.05$ ) est indiquée par \*.

Les ABC transporteurs assurent l'import ou l'export de molécules ou d'ions. Les phénotypes observés (sensibilité supérieure du mutant  $\Delta yhdWXYZ$ ) suggèrent que ce transporteur pourrait être impliqué dans l'export de la loméfloxacin. Afin de déterminer la quantité intracellulaire de loméfloxacin, un test a été mis au point en se basant sur la publication de Vergalli *et al.* (Vergalli et al. 2018). La loméfloxacin est une molécule fluorescente, son suivi est possible par mesure de la fluorescence. Afin de déterminer ses longueurs d'ondes d'excitation et d'émission, des spectres d'excitation et d'émission de la loméfloxacin ont été réalisés (Chapitre IV, partie 3.7, Figure 26). Puis le contenu intracellulaire a été séparé par HPLC et la loméfloxacin a été détecté par le fluorimètre. A l'aide de la courbe standard (Chapitre IV, partie 3.7, Figure 27), une relation a pu être établie entre la quantité de loméfloxacin et l'intensité de l'aire du pic de fluorescence.

La concentration intracellulaire de loméfloxacin a été suivie au cours du temps après l'addition de l'antibiotique. Chez la souche sauvage, une accumulation progressive de loméfloxacin est visible allant de  $3.2 \times 10^{-9}$  ng de loméfloxacin par cellule à 30min jusqu'à  $1 \times 10^{-7}$  ng de loméfloxacin par cellule à 120min (augmentation de 23 fois). La même accumulation est visible chez le mutant. Néanmoins, 120 minutes après l'addition de loméfloxacin, il y a 1,8 fois plus de loméfloxacin à l'intérieur du mutant par rapport à la souche sauvage (Figure 54). Cette expérience nécessite plus de répétition mais cette observation est cohérente avec la sensibilité supérieure du mutant à la loméfloxacin.

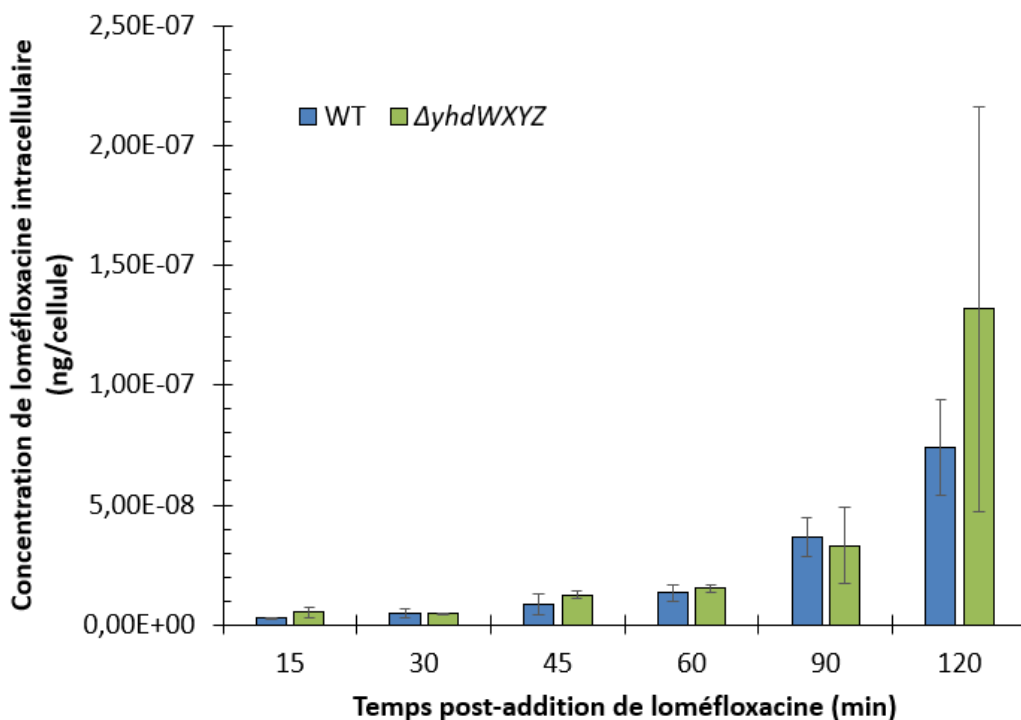


Figure 54 : Quantification de la loméfloxacin à l'intérieur de la cellule

Les deux cultures biologiquement indépendantes de cellules WT W3110 et  $\Delta yhdWXYZ$  W3110 ont été placées en contact avec  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  de loméfloxacin. Une aliquote a été prélevée 30, 45, 60, 90 et 120min après incubation avec l'antibiotique. Les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon contenant de l'ACN et du TFA. Les solutions correspondant au contenu intracellulaire des bactéries ont été analysées par HPLC. La quantité de loméfloxacin a été évaluée et elle a été calculée par cellule (ng/cellule).

### 3.2 – Quel est le rôle du transporteur Yhd chez le pathogène murin, *Citrobacter rodentium* ?

Chez *C. rodentium*, le transporteur Yhd possède une protéine fixatrice du substrat, YhdW, entière. Dans un premier temps, la protéine YhdW a été purifiée par chromatographie d'affinité et les interactions avec ses potentiels substrats ont été déterminées par FTSA. Dans un second temps, l'activité des promoteurs de l'opéron a été analysée dans différentes conditions de culture. Enfin, la fonction du transporteur Yhd dans la pathogénie de *C. rodentium* a été évaluée.

#### 3.2.1 – Quelle est la fonction du transporteur Yhd ?

##### 3.2.1.1 – Quel est le ligand de la protéine YhdW ?

Le transporteur Yhd est annoté *in silico* comme un transporteur ABC qui est impliqué dans le transport d'acides aminés. De plus, il est connu que la spécificité des substrats des ABC transporteurs est déterminée à la fois par la SBP et les protéines transmembranaires. Afin de déterminer si Yhd transporte des acides aminés, et lesquels, la production et la purification de YhdW ont été réalisées puis sa capacité de fixation d'une variété de ligands a été mesurée.

##### 3.2.1.1.1 – Production et purification de YhdW couplée à un TAG histidine

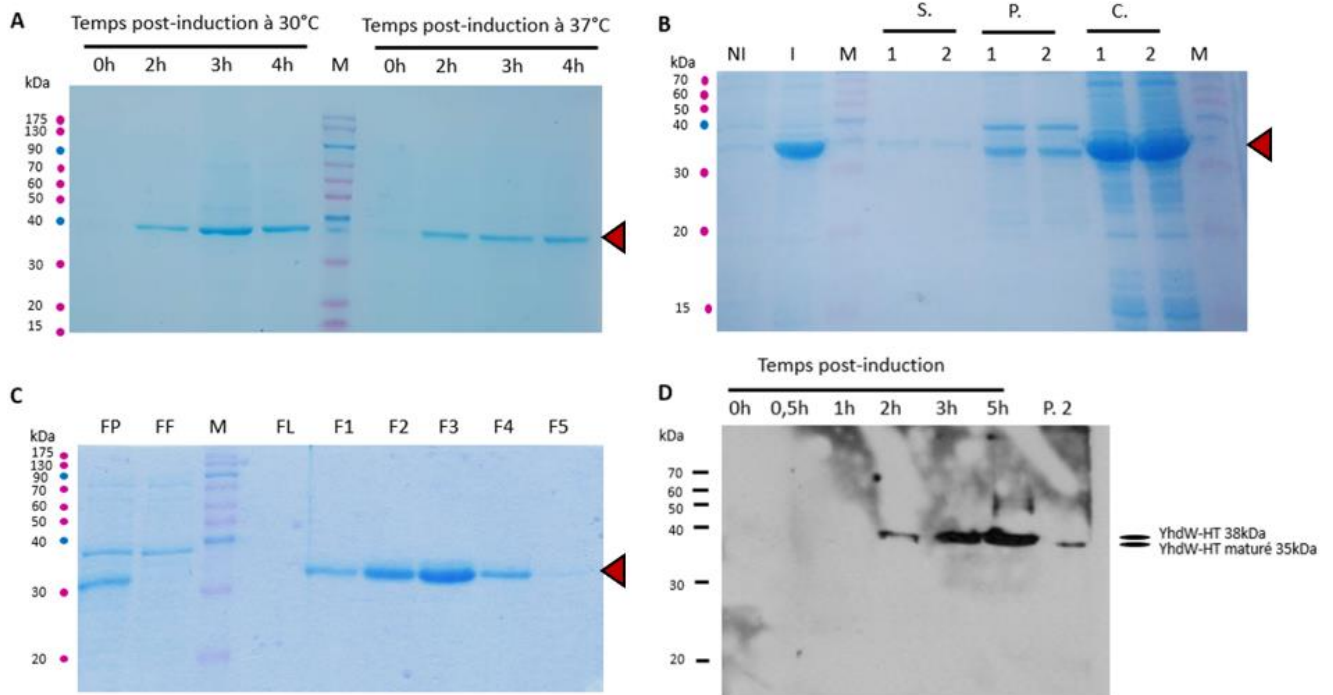
La protéine YhdW a été identifiée *in silico* comme étant une SBP. Ces protéines possèdent un peptide signal qui leur permet d'être adressées vers le périplasme. La séquence protéique de YhdW a donc été analysée à l'aide du logiciel SignalP-5.0 afin d'identifier la présence d'un signal peptide potentiel (Figure 55). Cette analyse montre que YhdW possède un peptide signal avec une forte probabilité. Etant donné que le peptide signal est clivé lors de la translocation à travers la membrane, la protéine sera sous forme précurseur dans le cytoplasme et sous forme mature dans le périplasme.

Afin de produire et purifier la protéine YhdW, le cadre de lecture du gène *yhdW* de *C. rodentium* a été cloné en amont d'une étiquette 8 histidines dans le vecteur de surexpression pET30 inducible à l'IPTG. La surproduction a ensuite été effectuée dans la souche *E. coli BL21*. Après induction par l'IPTG, l'accumulation de la protéine YhdW est contrôlée sur gel d'acrylamide (Figure 56). L'accumulation est optimale au bout de 3h après induction à une température de 30°C (Figure 56A). Cette condition a été sélectionnée pour la suite des expériences. Une expérience similaire a été réalisée et un western blot a été réalisé avec des anticorps contre le Tag histidine (Figure 56D). A partir de 1h après induction, la protéine est visualisable, elle est sous forme précurseur. A partir de 3h après induction, les deux formes de la protéine sont visualisables.

Pour réaliser une extraction spécifique de la forme mature de la protéine, une extraction différentielle a été réalisée. À la suite de la surproduction, les cellules ont été resuspendues dans du tampon tris-EDTA additionné de sucrose puis elles ont été centrifugées, et le surnageant récupéré (S. sur la figure 56B). Cette expérience a été réalisée en deux fois. Les cellules ont ensuite été resuspendues avec l'eau pendant 5 min qui permet de récupérer à la suite de la centrifugation seulement la fraction périplasmique. Enfin les cellules ont été resuspendues dans de l'eau. Les fractions périplasmiques ont été purifiées sur colonne Ni-







**Figure 56 :** Production et purification de YhdW avec le TAG histidine

**A-** Afin de **contrôler la surproduction de YhdW avec le TAG histidine**, une aliquote de la culture est déposée sur gel d'acrylamide après 0, 2h, 3h et 4h d'induction par l'IPTG à une température de 30°C ou 37°C. La protéine est indiquée par une flèche rouge et la taille des fragments du marqueur de taille est également indiquée.

**B-** Pour **isoler la fraction périplasmique de YhdW avec le TAG histidine**, une extraction différentielle a été réalisée. A la suite de l'induction (I) la présence de la protéine a été contrôlée par rapport à la condition non induite (NI). Les cellules ont été resuspendues dans du tampon tris-EDTA additionné à du sucrose pendant 10min à 4°C. Ensuite, elles ont été centrifugées et deux fractions de surnageant ont été récupérées (S. 1 et 2). Les cellules ont ensuite été resuspendues dans de l'eau afin d'induire un choc osmotique qui détériore la membrane externe et permet de libérer le contenu de l'espace périplasmique. Deux fractions de surnageant correspondant aux fractions périplasmiques ont été récupérées (P. 1 et 2). Enfin les cellules ont été resuspendues dans de l'eau et les fractions ont été déposées (C. 1 et 2).

**C-** Les **fractions périplasmiques ont été purifiées sur une colonne NI-NTA**. Un échantillon de la fraction périplasmique a été déposé sur le gel (FP). Puis la fraction périplasmique a été passée sur la colonne Ni-NTA et le liquide récolté à la sortie de la colonne a été déposé sur le gel (FF). Après un lavage avec 10mM d'imidazole, la solution à la sortie de la colonne a été déposé que gel (FL). Pour décrocher la protéine, une solution à 250mM d'imidazole a été passée sur la colonne et des fractions de 2mL ont été collectées (F1 à F5).

**D-** Afin de visualiser les **différentes formes de la protéine YhdW avec le TAG histidine**, un western blot a été réalisé avec des anticorps anti-His. Des aliquotes de cultures ont été déposées 0, 0.5h, 1h, 2h, 3h et 5h après induction. La deuxième fraction périplasmique de l'extraction a également été déposée (P. 2). La protéine est sous deux formes : non maturée de 38kDa et maturée de 35kDa.



### [3.2.1.1.2 – Identification du ligand à l'aide du Fluorescence Thermal Shift Assay](#)

Chez *C. rodentium*, le transporteur YhdWXYZ a été prédit *in silico* comme un ABC transporteur d'acides aminés. Afin de déterminer la molécule transportée par ce système, la protéine YhdW a été surexprimée et purifiée puis la technique de fluorescence thermal shift assay, FTSA, a été utilisée afin de d'établir la fixation d'un ligand sur la protéine. Une étude a précédemment montré que cette technique peut permettre d'identifier les molécules transportées par les ABC transporteurs (Giuliani, Frank, et Collart 2008b). Cette technique a notamment été utilisée pour déterminer le substrat de NspS chez *V. cholerae* et DalS chez *S. enterica* (Cockerell et al. 2014; Osborne et al. 2012).

Cette technique soumet la protéine à un gradient de température qui permet d'évaluer la température de dénaturation en présence de ligands potentiels, à l'aide d'un colorant fluorescent (SYPRO orange). La liaison de la protéine avec un ligand de faible poids moléculaire peut augmenter la stabilité thermique de la protéine. Une différence importante de la température de dénaturation peut donner des indications sur les substrats de la protéine. La température de fusion ( $T_m$ ) a été déterminée à la fois pour la protéine seule et la protéine avec les différents acides aminés. La différence de  $T_m$  ( $\Delta T_m$ ) entre la protéine seule et la protéine avec un substrat a été calculée. Un premier crible a été réalisé avec l'ensemble des acides aminés. La différence de  $T_m$  est élevée pour 4 acides aminés qui sont l'asparagine (N), la cystéine (C), la glutamine (Q) et la sérine (S) (Figure 57A).

Une nouvelle expérience avec des concentrations croissantes de ces acides aminés a mis en évidence une forte affinité de la protéine pour l'asparagine et à un plus faible degré pour la cystéine (Figure 57B).

### [3.2.1.1.3 – Test de croissance avec de l'asparagine comme seule source de carbone](#)

L'asparagine pourrait être un des acides aminés transportés par le système Yhd. Afin de tester cette hypothèse, des tests de croissance ont été réalisés en milieu minimum additionné d'asparagine. Dans un milieu minimum contenant de l'asparagine, si le transporteur est responsable de son import, le mutant  $\Delta yhdWXYZ$  devrait avoir un défaut de croissance par rapport à la souche sauvage. Le résultat du test de croissance ne montre pas de défaut de croissance du mutant  $\Delta yhdWXYZ$  par rapport à la souche sauvage (Figure 58).

Néanmoins, cela peut s'expliquer par le fait que la bactérie puisse compenser cette délétion par la synthèse endogène de l'acide aminé. La synthèse endogène de l'asparagine à partir de l'aspartate peut être réalisée par deux enzymes codées par les gènes *asnA* et *asnB* chez *E. coli*. Chez *C. rodentium*, un orthologue de chacune de ces deux enzymes a été retrouvé. Lorsque ces deux gènes sont mutés, la souche est auxotrophe à l'asparagine (Figure 59A). Des tests de croissance en milieu minimum additionné d'asparagine ont été réalisés pour comparer la croissance du double mutant  $\Delta asnAasnB$  avec celle du triple mutant  $\Delta asnAasnByhdWXYZ$ . En présence d'asparagine, aucune différence n'a été identifiée entre ces deux mutants. Cela montre soit que YhdWXYZ n'est pas responsable de l'import d'asparagine ou soit que l'import d'asparagine s'effectue par un autre transporteur (Figure 59B).

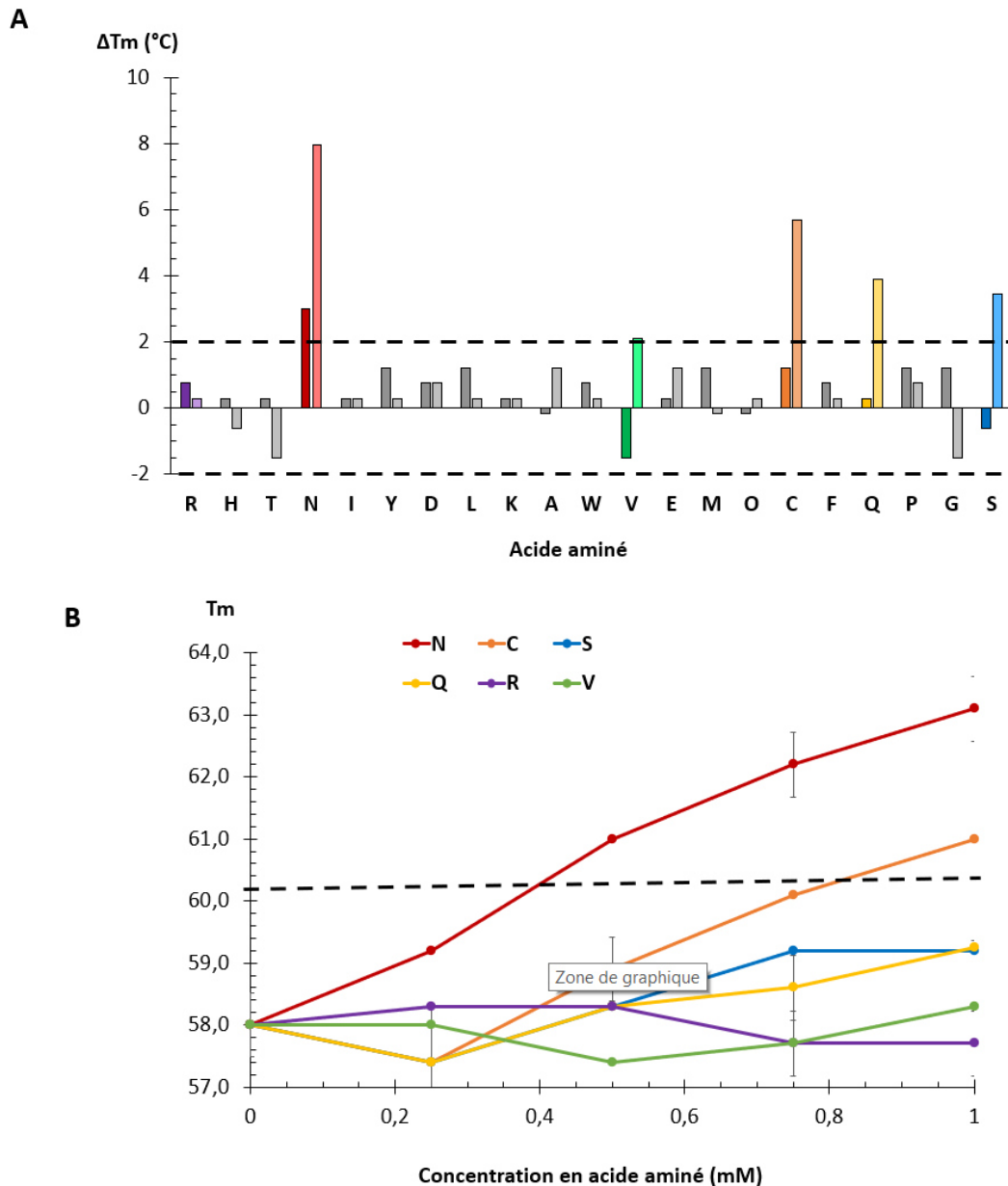
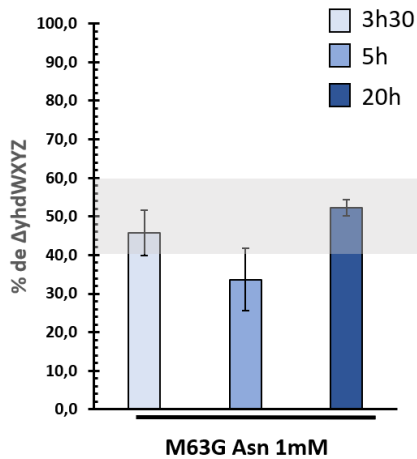


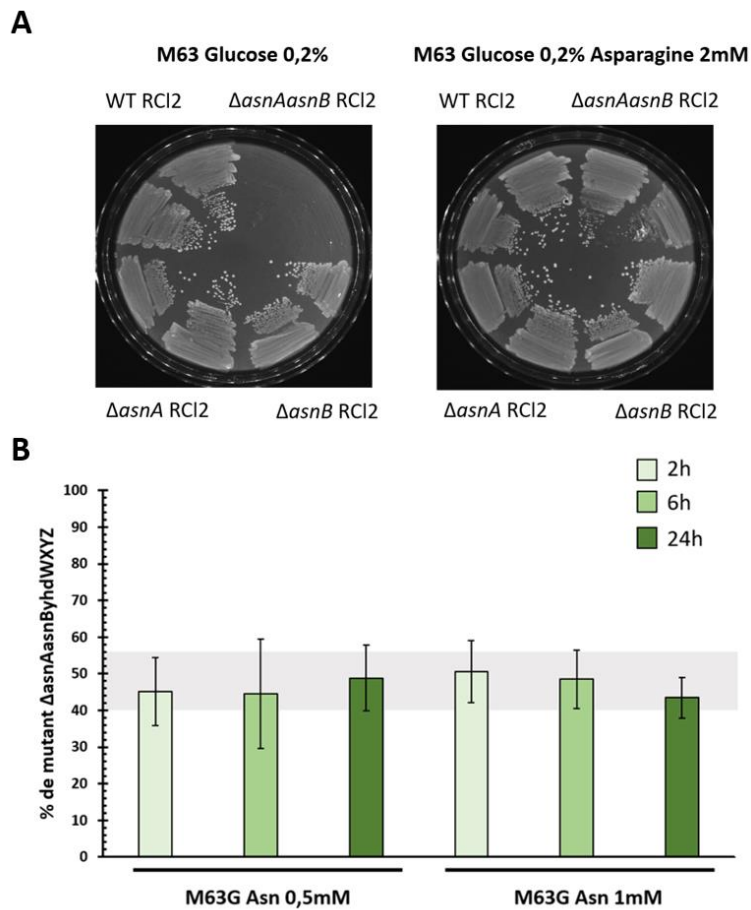
Figure 57 : Etude de l'interaction de YhdW avec les acides aminés par fluorescent thermal shift assay

A- La protéine YhdW-8His (1,5 $\mu$ M) a été incubée en présence d'un panel d'acides aminés à une concentration de 0,2mM (couleur foncée) ou 1mM (couleur claire). Les échantillons sont soumis à un gradient de température. La température de demi-dénaturation,  $T_m$ , a été calculée en se basant sur la fluorescence du colorant SyPRO Orange. Les données sont représentées sous forme d'histogramme, les barres représentent la différence de  $T_m$  calculée ( $\Delta T_m$ ) entre les échantillons avec la protéine en contact avec le ligand et les échantillons avec la protéine seule. La ligne en pointillé délimite le seuil de 2°C indiquant une différence positive de fixation (N=2). B- La protéine YhdW-8his (2,5 $\mu$ M) a été incubée avec ou sans 0,25mM; 0,5mM; 0,75mM ou 1mM d'acide aminé. La température de demi-dénaturation,  $T_m$ , est représentée pour chaque condition (N=3).



**Figure 58 :** Test de compétition entre la souche  $\Delta yhdWXYZ$  et la souche sauvage

A partir de précultures en milieu riche, les cellules ont été lavées dans du M63 et resuspendues à des D.O.  $_{600nm}$  identiques. Un mélange 1:1 des deux souches WT et  $\Delta yhdWXYZ$  (*Kan<sup>R</sup>*) a été inoculé à une D.O.  $_{600nm}$  de 0.05 dans du M63 glucose 0.2%. Les cultures ont été incubées sous agitation à 37°C. Au bout de 3h30, 5h et 20h de culture, les cultures ont été diluées et étalées sur milieu GL et milieu GL contenant de la kanamycine. Le pourcentage du mutant par rapport aux cellules totales a été calculé (N = 2).



**Figure 59 :** Obtention d'un mutant auxotrophe et test de compétition

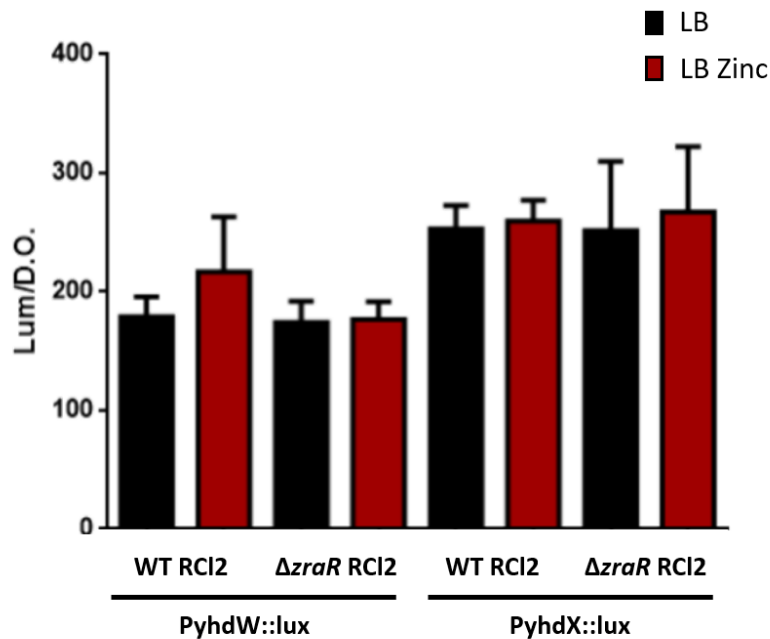
(A) Les souches WT,  $\Delta asnA$ ,  $\Delta asnB$  et  $\Delta asnAasnB$  ont été striées sur milieu minimum contenant du glucose 0.2% et un milieu minimum contenant du glucose 0.2% et de l'asparagine 2mM. Seul le double mutant  $\Delta asnAasnB$  est auxotrophe à l'asparagine. (B) A partir de précultures en milieu riche, les cellules ont été lavées dans du M63 et resuspendues à des D.O.  $_{600nm}$  identiques. Un mélange 1 :1 des deux souches  $\Delta asnAasnB$  et  $\Delta asnAasnB yhdWXYZ$  (*Kan<sup>R</sup>*) a été inoculé à une D.O.  $_{600nm}$  de 0.05 dans du M63 glucose 0.2% et 1mM d'asparagine. Les cultures ont été incubées sous agitation à 37°C. Au bout de 2h, 6h et 24h de culture, les cultures ont été diluées et étalées sur milieu GL et milieu GL contenant de la kanamycine. Le pourcentage du triple mutant par rapport aux cellules totales a été calculé (N = 4).

### 3.2.2 – Analyse de l’activité des promoteurs du système Yhd chez *C. rodentium*

#### 3.2.2.1 – L’expression du système Yhd chez *C. rodentium* n’est pas régulée par ZraR

Précédemment, chez *E. coli*, nous avons vu que la transcription de *yhd* est régulée par le régulateur ZraR. De la même façon, les régions promotrices des gènes *yhdW* et *yhdX* ont été placées en amont des gènes rapporteurs *luxCDABE*. Ainsi le niveau de luminescence reflète l’activité des promoteurs. Chez *Citrobacter rodentium*, l’activité du promoteur du gène *yhdW* et celle du gène *yhdX* ont été étudiées dans le contexte de la souche sauvage, WT et de la souche mutante,  $\Delta zraR$  (Figure 60). De plus, deux conditions ont été étudiées, le milieu riche, LB, et le milieu riche additionné de zinc, LB Zinc. Cette seconde condition a été sélectionnée car le régulateur ZraR est fortement exprimé en présence de zinc chez *E. coli*.

L’activité des deux promoteurs n’est pas impactée par la délétion du gène *zraR*. L’activité des promoteurs est similaire en milieu LB et en milieu LB Zinc (Figure 60). L’expression des gènes *yhd* n’est donc pas régulée par ZraR et ni par la présence de zinc. Enfin, en milieu riche, l’activité des promoteurs reste très faible.



**Figure 60** : Profil d’activité des promoteurs de *yhdW* et *yhdX* chez la souche sauvage de *C. rodentium* et le mutant  $\Delta zraR$

Les gènes de l’opéron *lux* sont sous le contrôle du promoteur du gène *yhdW* ou du gène *yhdX*. Le profil d’induction du promoteur est analysé en mesurant la luminescence émise toutes les 20 minutes pendant 24h à 37°C. L’activité des deux promoteurs est mesurée dans le contexte génétique de la souche sauvage WT ou mutante  $\Delta zraR$  en milieu riche, LB (en noir), et en milieu LB additionné avec 500 $\mu$ M de zinc, LB zinc (en rouge). Les valeurs de luminescence obtenues sont normalisées par la D.O. 600nm correspondante. L’expérience a été réalisée sur quatre cultures biologiquement indépendantes.

3.2.2.2 – L’expression du système Yhd chez *C. rodentium* est induite en milieu minimum, plus fortement en présence d’asparagine

Nos expériences de FTSA ont montré que YhdW pouvait fixer l’asparagine, en cohérence avec la prédiction de fonction de transport des acides aminés pour ce transporteur ABC. De plus, chez *Rhizobium leguminosarum*, il a été décrit comme un transporteur avec une spécificité large pour les acides aminés aromatiques (Walshaw et Poole 1996). Il est donc intéressant de mesurer l’activité des promoteurs de ce système en milieu minimum. Comme précédemment, l’activité des deux promoteurs est notée comme faible en milieu riche, LB. En revanche, l’activité de *PyhdW ::lux* et *PyhdX ::lux* est respectivement 20 et 2 fois supérieure en milieu minimum par rapport au milieu riche (Figure 61,  $p > 0.05$ ). L’addition de méthionine dans le milieu n’influence pas l’activité des promoteurs qui est la même qu’en milieu minimum. Au contraire, l’addition d’asparagine et de cystéine induit l’activité des promoteurs. En effet, l’activité du promoteur de *yhdW* est 4 et 2 fois supérieure en présence d’asparagine et de cystéine par rapport à la condition en milieu minimum (Figure 61,  $p > 0.05$ ). De la même façon, l’activité du promoteur de *yhdX* est 6 et 2 fois supérieure en présence d’asparagine et de cystéine par rapport à la condition en milieu minimum (Figure 61,  $p > 0.05$ ). L’expression du transporteur est induite en milieu minimum et d’autant plus en milieu minimum contenant de l’asparagine ou de la cystéine. Ces résultats, ainsi que ceux du FTSA suggèrent fortement que ce transporteur est impliqué dans le transport des acides aminés.

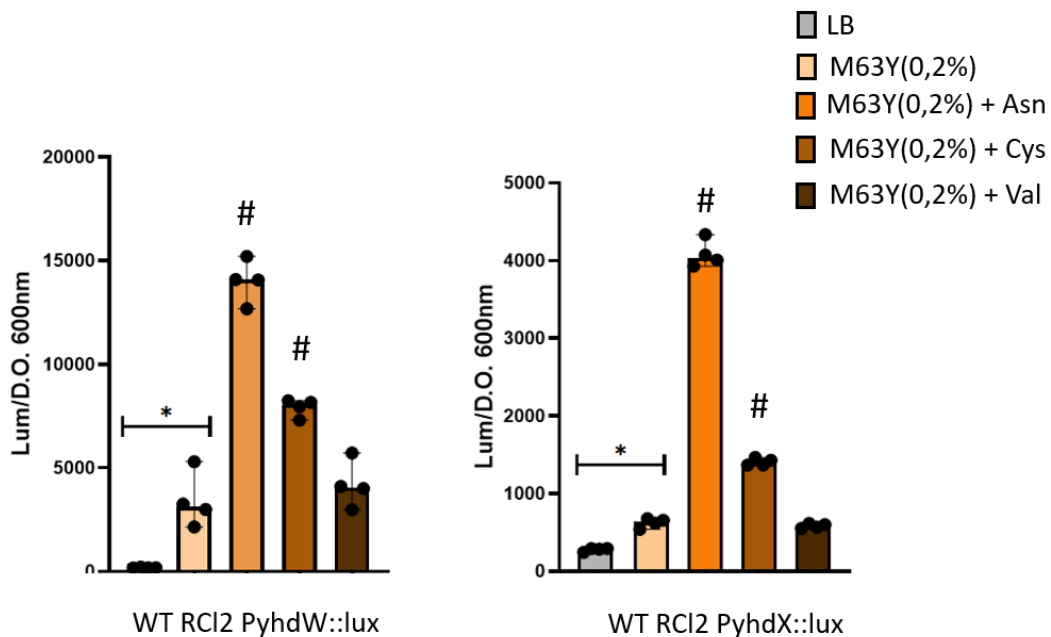


Figure 61 : Profil d’activité des promoteurs de *yhdW* et *yhdX* chez la souche sauvage

Les gènes de l’opéron *lux* sont sous le contrôle du promoteur de *yhdW* ou du promoteur de *yhdXYZ*. L’activité du promoteur est étudiée dans le contexte génétique de la souche sauvage (WT) chez *C.rodentium* RCI2. Le profil d’induction du promoteur est analysé en mesurant la luminescence émise toutes les 20 minutes pendant 24h à 37°C, en milieu riche, LB, milieu minimum contenant du glycérol 0.2%, M63Y, additionné ou non avec de l’asparagine 2mM (Asn), de la cystéine 2mM (Cys) ou de la méthionine 2mM (Met). Cette figure représente la luminescence maximale normalisée par la D.O. 600nm correspondante pour chacune des conditions de culture. Le test de Mann-Whitney a été réalisé et une différence ( $p < 0,05$ ) est indiquée par \* entre deux conditions ou par # entre la condition donnée et la condition M63Y.

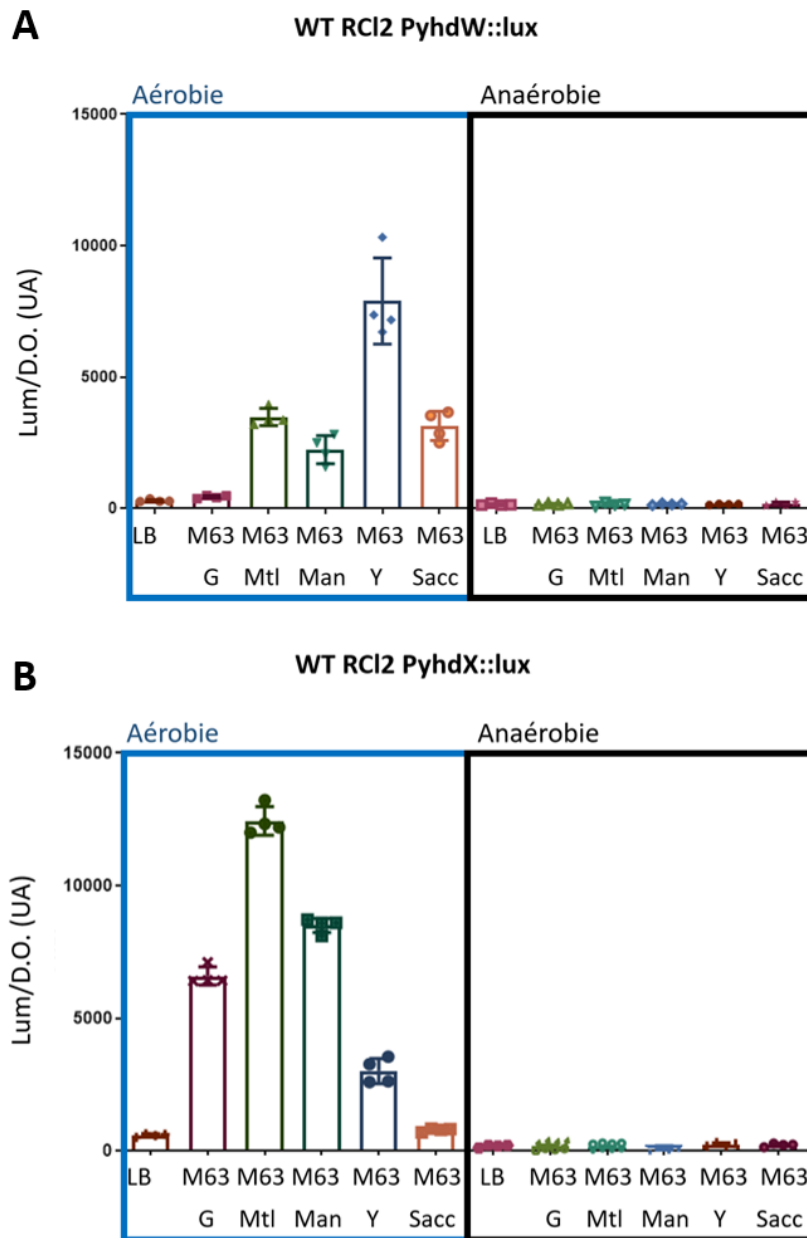
### 3.2.2.3 – L'expression du système Yhd n'est pas induite en anaérobie

Lors de l'infection du tractus intestinal de la souris, *Citrobacter rodentium* va se diriger au niveau de l'épithélium du colon afin d'adhérer intimement avec les entérocytes. A l'intérieur du mucus recouvrant l'épithélium, *Citrobacter* se trouve dans un environnement pauvre en nutriments et en oxygène. L'activité des promoteurs de *yhdW* et *yhdXYZ* a donc été étudiée dans différents milieux minimums et en condition aérobie ou anaérobie.

Comme cela a été montré précédemment, l'activité des deux promoteurs est supérieure en milieu minimum par rapport au milieu riche (Figure 62). Néanmoins, l'activité varie en fonction des sources de carbone. En effet, l'induction de l'activité du promoteur de *yhdW* n'est pas visible en milieu minimum contenant du glucose au contraire des milieux minimums contenant d'autres sources de carbone. L'activité du promoteur *yhdX* est, quant à elle, fortement induite en milieu minimum contenant du glucose, du mannitol, du mannose ou du glycérol mais celle-ci est faible en milieu minimum contenant du saccharose (Figure 62).

D'autre part, l'activité des deux promoteurs a été évaluée en condition anaérobie. La condition anaérobie a été obtenue en déposant une couche de paraffine à la surface des puits lors de la croissance et de la mesure de la fluorescence. En condition anaérobie, l'activité des deux promoteurs est très faible (Figure 62). Le transporteur est donc induit en milieu pauvre mais pas en condition anaérobie.





**Figure 62 :** Profil d'activité des promoteurs de *yhdW* et *yhdX* chez la souche sauvage en aérobiose et en anaérobiose

Les gènes de l'opéron *lux* sont sous le contrôle du promoteur de *yhdW* (A) ou du promoteur de *yhdXYZ* (B). L'activité du promoteur est étudiée dans le contexte génétique de la souche sauvage (WT) chez *C. rodentium* RCI2. Le profil de l'induction du promoteur est analysé en mesurant la luminescence émise toutes les 20 minutes pendant 24h à 37°C, en milieu riche, LB, milieu minimum, M63, contenant du glycérol 0.2% (Y), du manitol 0.2% (Mtl), du mannose 0.2% (Man), du glycérol 0.2% (Y) ou du saccharose 0.2% (Sacc). Cette figure représente la luminescence maximale normalisée par la D.O. 600nm correspondante pour chacune des conditions de culture. Les conditions de cultures en aérobiose sont encadrées en bleu et celles en anaérobiose en noir.

### 3.2.3 – Le système YhdWXYZ participe à la pathogénie de *C. rodentium*

Les expériences précédentes laissent penser que le transporteur YhdWXYZ est impliqué dans le transport d'acides aminés. Au cours d'une infection, les réseaux métaboliques de l'hôte et de la bactérie pathogène deviennent interconnectés (cross-talk). Le métabolisme des acides aminés influence à la fois la virulence de la bactérie et les réponses de l'hôte, qui déterminent l'issue de l'infection (Ren et al. 2018; Olive et Sassetti 2016). De plus, afin de déchiffrer les échanges entre l'hôte et le pathogène au cours d'une infection, Bose *et al.* ont étudié les interactions *in silico* entre les protéines des *E. coli* pathogènes et de *Shigella* avec les protéines de l'Homme (Bose, Venkatesh, et Mande 2017b; 2019). Dans ces études, 17 interactions entre la protéine YhdW et des protéines de l'Homme ont été identifiées. Les auteurs concluent que cette protéine pourrait être une cible thérapeutique potentielle contre les souches de *Shigella* et d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques (Bose, Venkatesh, et Mande 2019).

Ces faits suggèrent que ce transporteur pourrait jouer un rôle dans la virulence des bactéries pathogènes. Afin d'évaluer l'importance de ce système dans la pathogénie, son implication dans l'infection de *Citrobacter rodentium* chez la souris C57BL/6 a été évaluée. Un protocole similaire à celui utilisé précédemment a été mis en place (Chapitre V, partie 3.2.3). Au jour 0, une solution de PBS ou une solution de  $10^9$  CFU de bactéries WT ou  $\Delta yhdW$  ou  $\Delta yhdWXYZ$  a été inoculée par gavage oral à 5 souris. Ensuite, le poids des souris a été suivi quotidiennement. Le pourcentage de poids par rapport au Jour 0 présente une variabilité élevée en fonction des individus. Néanmoins, les souris infectées semblent avoir une prise de poids moins importante que les souris non infectées (Figure 63A). La charge bactérienne dans les fèces a été évaluée par dilution et étalement. Comme attendu, la concentration chez le groupe infecté avec la bactérie WT augmente et atteint un plateau à partir du 6<sup>ième</sup> jour post-infection ( $4 \times 10^6$  CFU/g). A partir du 11<sup>ième</sup> jour, la concentration bactérienne commence à diminuer correspondant à la phase de clairance où l'hôte commence à éliminer l'infection (Figure 63B). Aucune différence n'est visible entre les souris infectées par les souches mutantes et les souris infectées par la souche sauvage.

Le 14<sup>ième</sup> jour post-infection, les souris ont été sacrifiées et leur colon a été prélevé. Etant donné que *Citrobacter rodentium* est responsable de légère colite chez le modèle murin C57BL/6, le rapport du poids sur la longueur du colon a été évalué. Ainsi, une augmentation significative est visible chez les souris infectées en comparaison du groupe de souris non infectées ( $p > 0.05$ ) (Figure 63C). En revanche aucune différence n'est visible entre les souris infectées par la bactérie WT et les souris infectées par la bactérie  $\Delta yhdW$  ou  $\Delta yhdWXYZ$  (Figure 63C). Parallèlement, des coupes de colon ont été réalisées et colorées avec la coloration HE (Hématoxyline et éosine, figure 63E). L'infection par *Citrobacter rodentium* provoque une élongation des cryptes intestinales (CCH, colonic crypt hyperplasia). La longueur de dix cryptes correctement orientées chez chaque souris a été mesurée. Les cryptes sont symbolisées par un trait noir dans la figure 63D. La taille des cryptes est significativement supérieure chez les souris infectées par rapport aux souris non infectées ( $p > 0.0001$ ). Aucune différence n'est observée entre le groupe de souris infectées avec les bactéries WT et  $\Delta yhdWXYZ$  (Figure 63D). En revanche, les souris infectées avec le mutant  $\Delta yhdW$  présente des longueurs de cryptes significativement plus faibles ( $p > 0.001$ ) que les souris infectées avec la souche WT.

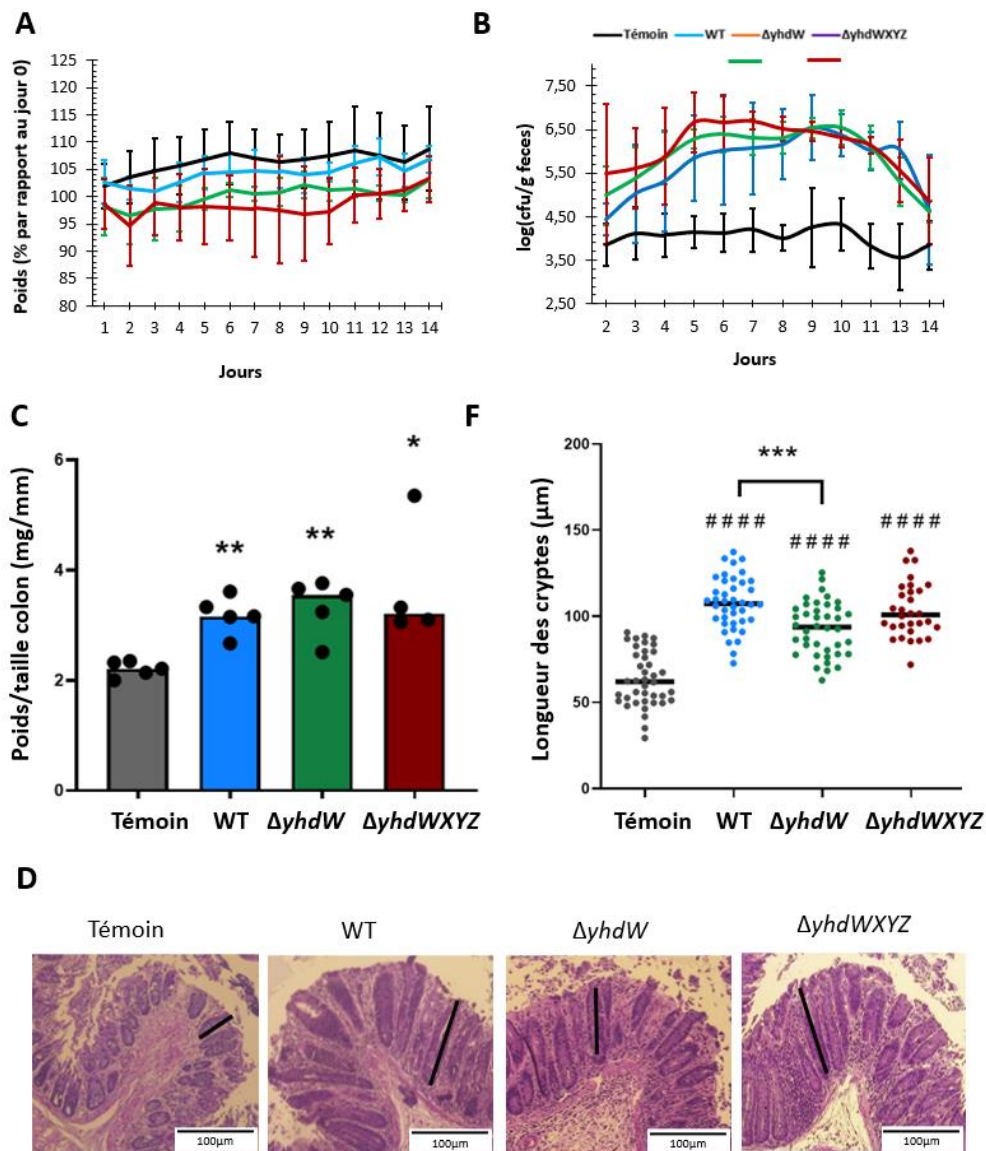


Figure 63 : Impact de la délétion de yhdW et yhdWXYZ sur la pathogénie de *C. rodentium* au jour 14

Les souris C57BL/6 ont été infectées par gavage oral avec une solution de PBS, une solution bactérienne de WT RCI2 ou ces mutants  $\Delta yhdW$  ou  $\Delta yhdWXYZ$  ( $n=5$ ). (A) Le poids des souris a été suivi quotidiennement. Le pourcentage du poids des souris par rapport au jour de l'infection est présenté pour chaque jour post-infection. (B) Les fèces ont été collectées quotidiennement, pesées, broyées dans du PBS et étalées sur MacConkey Sorbitol. La concentration bactérienne a été déterminée en CFU/gramme de fèces. (C) Les souris ont été sacrifiées au 14<sup>ème</sup> jour et leur colon a été prélevé. Il a été pesé et mesuré, ce qui a permis de déterminer un ratio poids/longueur du colon en mg/mm. Le test statistique de Mann-Whitney a été réalisé et une différence  $p < 0.05$  et  $p < 0.01$  entre les conditions d'infection et la condition contrôle est indiquée respectivement par \* et \*\*. (D et F) Les colons ont été fixés, inclus dans de la paraffine et coupés en fine lamelle au microtome puis colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine (D). (F) Dix cryptes intestinales correctement orientées ont été mesurées par souris. Le test statistique de Mann-Whitney a été réalisé. Une différence  $p < 0.0001$  entre les conditions d'infection et la condition contrôle est indiquée par ##### et une différence  $p < 0.001$  entre l'infection avec une souche mutante et l'infection avec la souche sauvage est indiquée par \*\*\*.

À la suite de ces observations préliminaires de l'effet de YhdW sur le pouvoir pathogène de *Citrobacter rodentium*, l'expérience a été réalisée de nouveau sur 10 souris par condition. Comme précédemment, le poids des souris se révèle très variable. Le poids des souris infectées par la souche  $\Delta yhdW$  est très proche de celles non infectées alors que le poids des souris infectées par la souche  $\Delta yhdWXYZ$  est proche de celui des souris infectées par la souche WT (Figure 64A). La charge bactérienne a également été évaluée. La quantité d'entérobactéries naturellement présente dans le tube digestif des souris est faible, aux alentours de  $10^3 - 10^4$  CFU/g. A partir de 2 jours post-infection, une forte augmentation de la charge bactérienne est visible chez les souris infectées par la souche WT. Une augmentation similaire de la charge bactérienne est visible chez les souches infectées par  $\Delta yhdW$  ou  $\Delta yhdWXYZ$  mais elle est significativement plus faible le quatrième et le sixième jour post-infection en comparaison avec les souris infectées par la souche sauvage (Figure 64B).

Afin de mieux évaluer la temporalité de l'infection, cinq souris par conditions ont été sacrifiées au jour 7 et cinq autres ont été sacrifiées entre le jour 11 et 14 en fonction de leur état de santé. De la même façon, leur colon a été prélevé afin d'établir un rapport entre le poids et la longueur des colons ainsi que d'évaluer l'état du colon par histologie. Au jour 7 et au jour 11-14, le ratio poids/longueur est supérieur chez les souris infectées en comparaison avec les souris témoin mais aucune différence n'est visualisable entre les différents groupes de souris infectées (Figure 64C). Enfin, les coupes histologiques ont été analysées et les cryptes correctement orientées ont été mesurées. Au jour 7, la longueur des cryptes est légèrement supérieure dans la condition infectée par rapport à la condition contrôle ( $p < 0.0001$ ). En revanche, au jour 11-14, la longueur des cryptes est 2 fois supérieure chez les souris infectées avec les souches mutantes par rapport aux souris non infectées ( $p < 0.0001$ ). La longueur des cryptes est significativement ( $p < 0.001$ ) inférieure chez les souris  $\Delta yhdW$  et  $\Delta yhdWXYZ$  en comparaison avec les souris WT (Figure 64D, cryptes symbolisées par un trait noir dans la figure 65).

La coloration au PAS permet d'identifier les cellules caliciformes car les polysaccharides présents dans le mucus sont oxydés par l'acide périodique. Dans la figure 65, cette coloration permet de mettre en évidence que les souris infectées ont des cellules caliciformes plus petites et probablement moins de mucus que les souris non infectées. Chez les souris infectées par la souche WT, au jour 7, quelques cellules caliciformes sont encore visibles mais au fond des cryptes intestinales (flèche jaune sur figure 65) alors qu'au jour 11-14, les cellules caliciformes ne sont plus présentes. Chez les souris infectées par les souches  $\Delta yhdW$  ou  $\Delta yhdWXYZ$ , la déplétion en cellules caliciformes semble plus faible que les souris infectées par la souche WT. En effet, chez ces souris, au jour 11-14, des cellules caliciformes sont toujours observables. D'autre part, jour 7, l'épithélium des souris infectées est plus endommagé que celui des souris témoin (épithélium endommagé symbolisé par une flèche rouge sur la figure 65). En revanche, jour 11-14, l'épithélium des souris infectées par les souches  $\Delta yhdW$  ou  $\Delta yhdWXYZ$  semblent en meilleur état que celui des souris infectées par la souche WT.

Ces observations ont été réalisées avec l'aide du Docteur Thierry Marchal qui est spécialiste en histopathologie. Pour aller plus loin dans l'analyse, avec son aide, un score de pathogénie sera mis en place en évaluant non seulement la déplétion en cellules caliciformes mais également en évaluant notamment l'état de l'épithélium, la présence d'œdème, la présence de cellules immunitaires dans les tissus et le niveau de division par mitose.

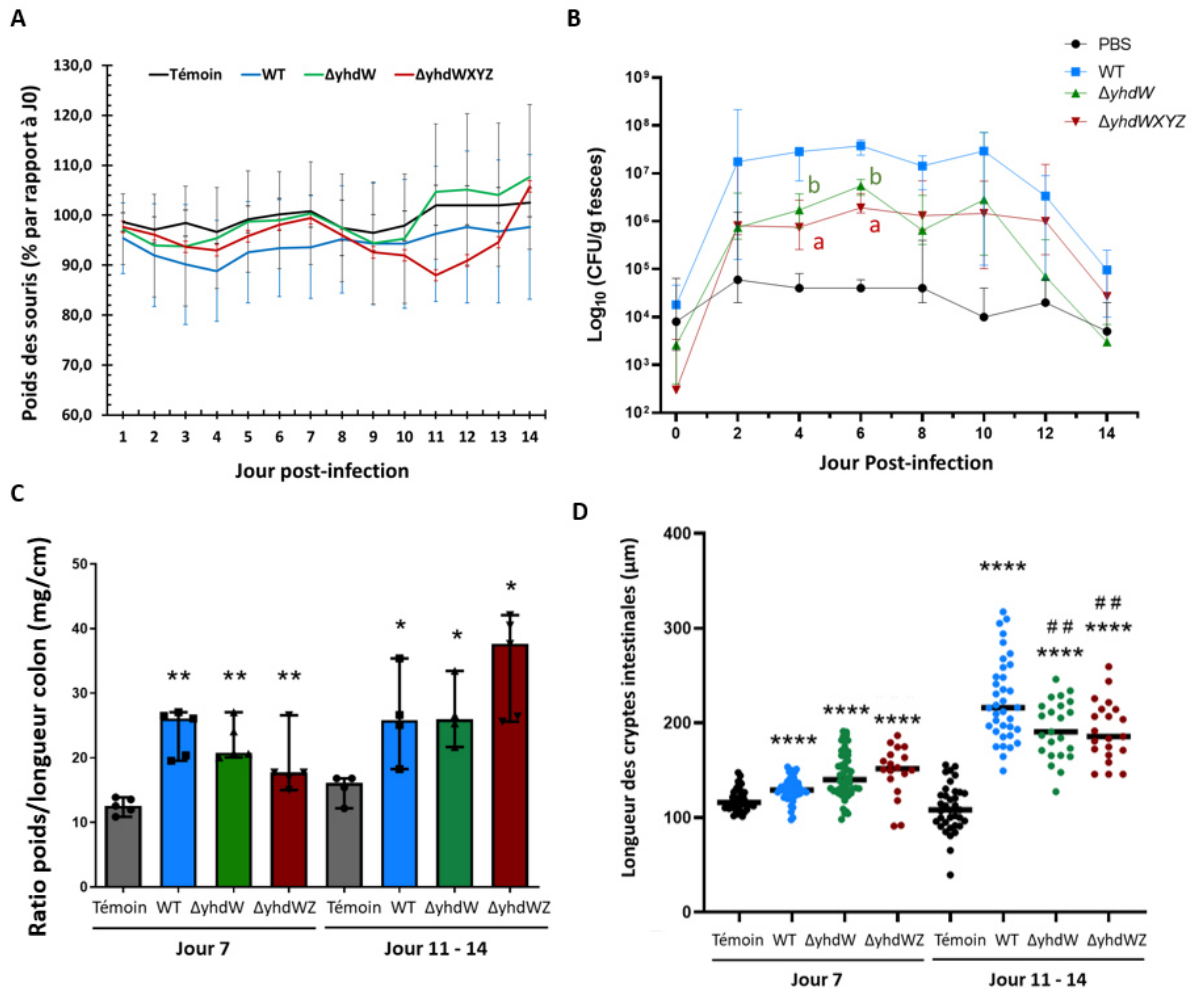


Figure 64: Impact de la délétion de yhdW et yhdWXYZ sur la pathogénie de *C. rodentium* au Jour 7 et 11-14

Les souris C57BL/6 ont été infectées par gavage oral avec une solution de PBS, une solution bactérienne de WT RCI2  $\Delta yhdW$  ou  $\Delta yhdWXYZ$  RCI2 ( $n=10$ ). (A) Le poids des souris a été suivi quotidiennement. Le pourcentage du poids des souris par rapport au jour de l'infection est présenté pour chaque jour post-infection. (B) Les fèces ont été collectées quotidiennement, pesées, broyées dans du PBS et étalées sur MacConkey Sorbitol. La concentration bactérienne a été déterminée en CFU/gramme de fèces. (C) Les souris ont été sacrifiées au 7<sup>ème</sup> jour et au 11-14<sup>ème</sup> jour et leur colon a été prélevé. Il a été pesé et mesuré, ce qui a permis de déterminer un ratio poids/longueur du colon en mg/cm. Le test statistique de Mann-Whitney a été réalisé et une différence  $p < 0.05$  et  $p < 0.01$  entre les conditions d'infection et la condition contrôle est indiquée respectivement par \* et \*\*. (D) Le test statistique de Mann-Whitney a été réalisé. Une différence  $p < 0.0001$  entre les conditions d'infection et la condition contrôle est indiquée par \*\*\*\* et une différence  $p < 0.01$  entre l'infection avec une souche mutante et l'infection avec la souche sauvage est indiquée par ##.



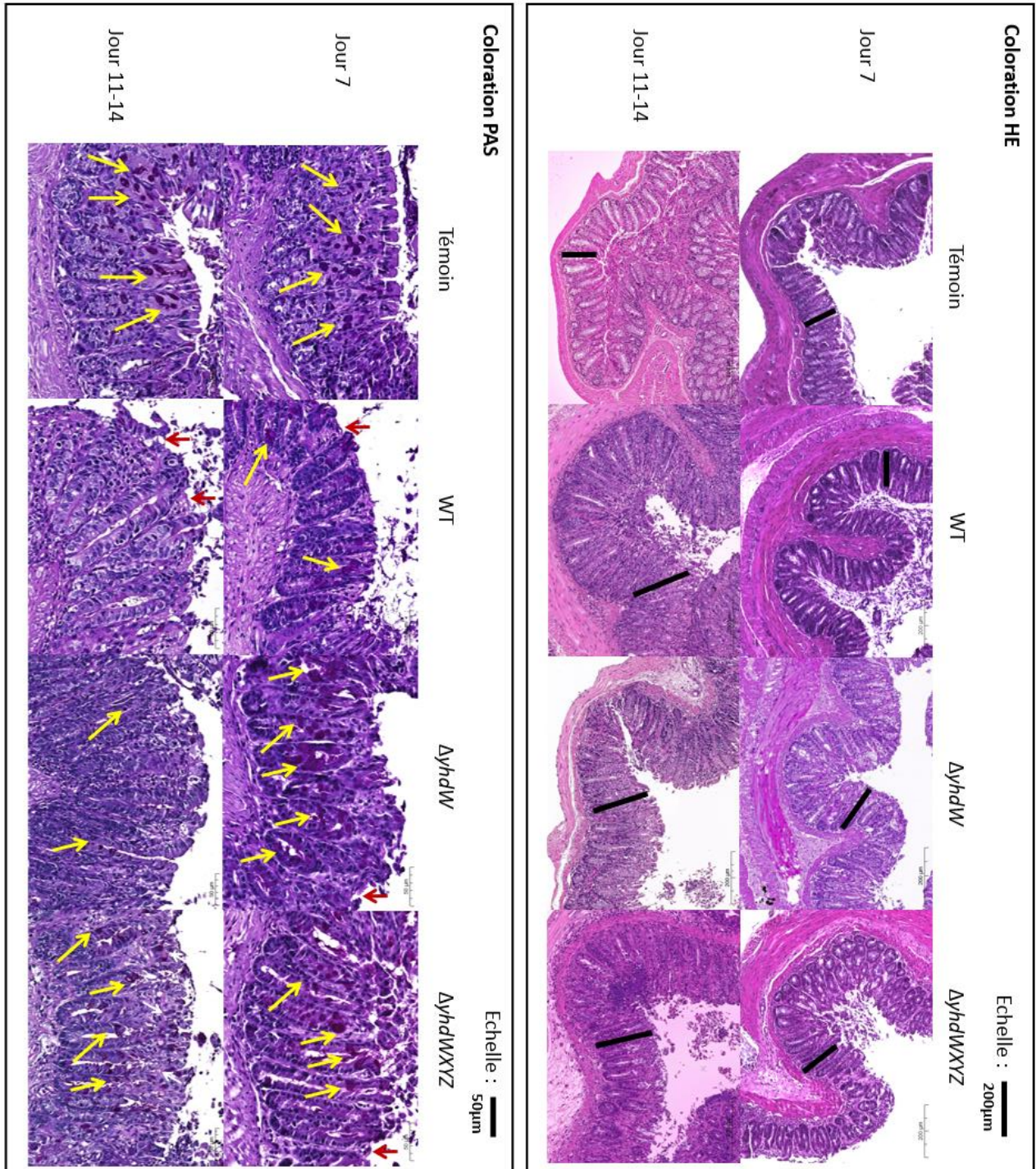


Figure 65 : Photographies des coupes de colon de souris infectées ou non infectées

Les souris C57BL/6 ont été infectées par gavage oral avec une solution de PBS, une solution bactérienne de WT RCl2  $\Delta yhdW$  ou  $\Delta yhdWXYZ$  RCl2 (n=10). Les souris ont été sacrifiées au 7 et au 11-14ième jour. Les colons ont été fixés, inclus dans de la paraffine et coupés en fine lamelle au microtome puis colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine (A) ou du PAS (B). Les cryptes sont symbolisées par un trait noir, les cellules calciformes sont symbolisées par une flèche jaune et les lésions de l'épithélium sont symbolisées par une flèche rouge.



### 3.3 – Le transporteur Yhd n’est pas impliqué dans la virulence du phytopathogène *D. dadantii*

*Dickeya dadantii* est un phytopathogène qui est responsable de la pourriture molle chez différentes plantes (Chapitre I, partie 2.2.2.1). Afin d’évaluer si le transporteur YhdWXYZ était impliqué dans la pathogénie de *D. dadantii* 3937, le mutant  $\Delta yhdWXYZ$  a été réalisé selon la méthode de contre-sélection à l’aide du gène *sacB* (Link, Phillips, et Church 1997) (Chapitre IV, partie 2.6.4).

Des infections ont été réalisées sur des feuilles d’endives avec la souche sauvage et le mutant  $\Delta yhdWXYZ$ . Le modèle « endive » est couramment utilisé au laboratoire et permet d’observer si les gènes mutés ont un impact important sur le pouvoir pathogène de *D. dadantii* en évaluant l’étendue des symptômes de macération. Après 24h d’infection avec des bactéries WT ou  $\Delta yhdWXYZ$ , les résultats sont présentés sous forme de photographies et de graphiques représentant l’aire d’infection de la bactérie sur feuille d’endive. Un témoin a été réalisé avec du M63 et, comme attendu, aucun symptôme n’est visualisable. Les aires d’infection de la souche sauvage et de la souche mutante ne présentent pas de différence (Figure 66). Des résultats similaires ont été observés lors d’infections de pomme de terre et de fève (données non présentées). Donc les gènes *yhdWXYZ* ne sont pas nécessaires pour l’infection d’endives, de pomme de terre et de fève par le phytopathogène *D. dadantii*.

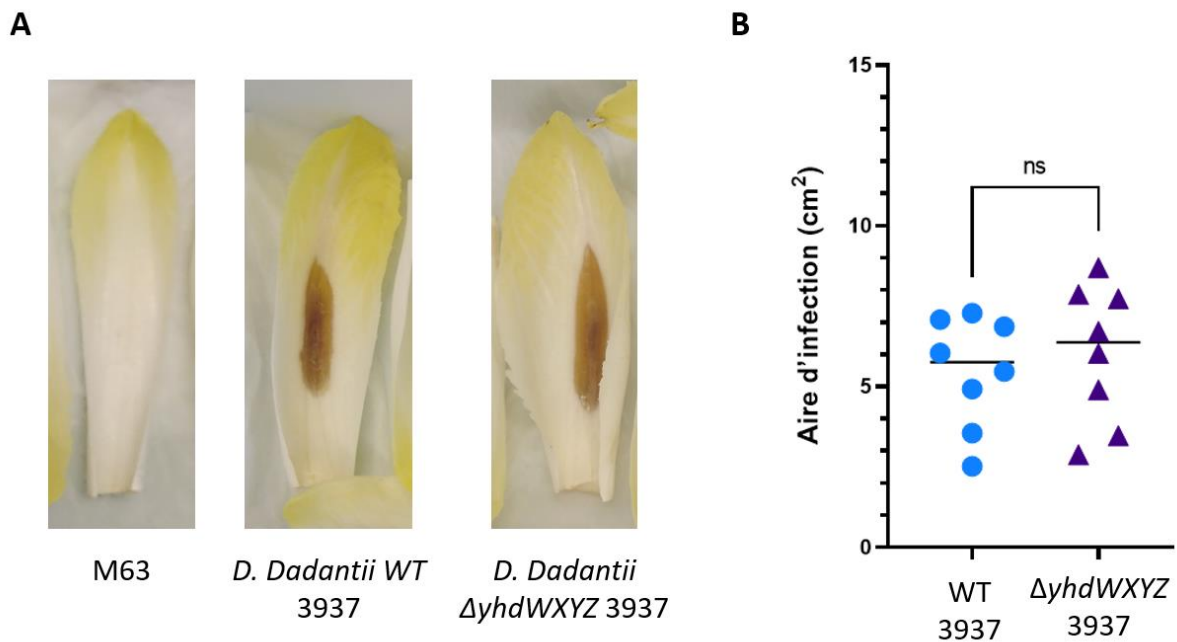


Figure 66 : Test d’infection d’endives par les souches *D. dadantii* WT et  $\Delta yhdWXYZ$

Les endives ont été infectées avec  $10^8$  CFU/mL de *D. dadantii* WT ou  $\Delta yhdWXYZ$  préalablement resuspendues dans du milieu M63 ( $n=7$ ). Un contrôle a été réalisé avec du M63 seul. Les endives ont ensuite été placées à 30°C dans une atmosphère humide. Au bout de 24h, les aires d’infection ont été évaluées. Le test de Mann-Whitney a été réalisé et il n’y a pas de différence significative entre l’infection avec la souche sauvage ou la souche mutante.

#### 4 – Conclusion

Le transporteur YhdWXYZ a été identifié *in silico* comme un transporteur ABC d'acides aminés. Il est retrouvé chez de nombreuses entérobactéries notamment celles de la famille des *Enterobacteriaceae*, *Pectobacteriaceae* et *Yersiniaceae*. Cependant, les analyses de séquences montrent que chez certaines bactéries, la protéine YhdW est tronquée, comme chez *E. coli*. C'est pourquoi, nous avons décrypté le rôle du transporteur chez deux bactéries possédant ou non cette protéine, *E. coli* et *C. rodentium*.

Chez *E. coli*, le transporteur Yhd a été retrouvé parmi les cibles potentielles du régulateur ZraR lors d'une expérience de ChIP-seq. Les analyses par RT-qPCR montrent que la différence d'expression de l'opéron n'est pas significative entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta zraR$ . Cependant, l'analyse des fusions *PyhdW::lux* et *PyhdX::lux* dénote d'une différence faible mais significative d'activité du promoteur entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta zraR$ . Le système pourrait donc être régulé négativement par le système Zra dans certaines conditions. De plus, l'activité supérieure des promoteurs *PyhdW* et *PyhdX* en milieu minimum est dépendante du facteur  $\sigma^{54}$ . Chez *E. coli*, le système Yhd ne possède pas de SBP. Nous montrons qu'il est impliqué dans la résistance au mécilinam et à la loméfloxacin. En absence du transporteur, la loméfloxacin s'accumule plus que chez la souche sauvage. Le transporteur Yhd pourrait donc être impliqué dans l'export de loméfloxacin.

Chez *C. rodentium*, le système YhdWXYZ est présent dans son intégralité. L'affinité de la SBP pour différents acides aminés a été analysée. YhdW a une affinité importante pour l'asparagine et de façon moins importante pour la cystéine. De plus, l'activité des promoteurs est supérieure en milieu minimum et d'autant plus en milieu minimum contenant de l'asparagine ou de la cystéine. Néanmoins, la délétion du transporteur n'a pas d'impact sur la croissance de *C. rodentium* WT ni de *C. rodentium* auxotrophe à l'asparagine en milieu minimum. Cela suggère l'existence d'un transporteur alternatif, comme c'est le cas chez *E. coli*. *C. rodentium* étant un pathogène murin, l'implication du transporteur Yhd a été testée au cours de l'infection. La délétion du transporteur impacte le phénomène d'hyperplasie des cryptes coloniques et la charge bactérienne dans les fèces. Cela indique que Yhd est important pour la virulence de la bactérie. Enfin, contrairement au modèle animal, le transporteur Yhd ne participe pas à la virulence de la bactérie phytopathogène *D. dadantii*.



---

Quatrième partie :

Conclusion

---

---

## Chapitre VIII – Discussion et perspectives

---

### 1 - Le système Zra, un système de réponse au stress

#### 1.1 – Conservation du système Zra chez les entérobactéries pathogènes

Le génome des bactéries subit de nombreux réarrangements et la conservation d'un élément peut témoigner de l'avantage qu'il confère aux bactéries qui le possèdent. La conservation de Zra a été étudiée et cela a permis de montrer que le système est conservé chez certaines bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, des *Yersiniaceae* et des *Budviciaceae* (Figure 28). Chez les *Enterobacteriaceae*, ce système est conservé seulement chez le clade d'*Escherichia* et celui de *Klebsiella* (Figure 29). Les trois éléments du système ZraPSR ont co-évolué et sont retrouvés ensemble chez toutes les entérobactéries où le système est présent. La coévolution des trois gènes tendrait à montrer que les trois éléments du système sont importants pour son fonctionnement.

Afin d'expliquer la conservation partielle du système Zra, deux scénarios d'évolution peuvent être proposés. Le premier est celui de la présence de Zra chez l'ancêtre commun aux entérobactéries ensuite il a été conservé ou perdu chez les membres de l'ordre. En effet, la perte de gènes n'est pas rare chez les bactéries (Bolotin et Hershberg 2016). Le second est celui de l'acquisition du transporteur Zra par transfert horizontal de gènes (THG). En effet, les éléments provenant de THG représentent environ 1% du génome des bactéries (Oliveira et al. 2017). Cette étude ne permet pas de privilégier un scénario par rapport à l'autre. Mais le mélange de ces deux scénarios peut également être envisagé c'est-à-dire que le système Zra pourrait être présent chez l'ancêtre commun des entérobactéries puis être perdu et ensuite être de nouveau acquis par THG chez certaines entérobactéries. Pour répondre à cette question, des arbres phylogénétiques avec un grand nombre de protéines ZraS, ZraR ou ZraP chez différentes espèces ont été réalisés mais ils n'ont pas permis de conclusion univoque. L'analyse devrait être réalisée sur un nombre de séquence supérieur afin d'être plus robuste. Si cet arbre est structuré comme celui des espèces, cela signifiera que l'évolution de Zra suit le scénario 1 et dans le cas contraire, des THGs pourront être identifiés.

Enfin, le système est conservé chez une majorité de pathogènes comme les genres *Shigella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Yersinia* ou *Serratia*. Cette conservation pourrait témoigner d'un avantage sélectif que confère le système. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier le système chez le pathogène *Citrobacter rodentium* mais il serait intéressant d'évaluer le rôle du système dans la pathogénie d'autres entérobactéries pathogènes.

## 1.2 – Quelle est la fonction du système Zra ?

### 1.2.1 – Le système Zra est activé par les métaux mais n'est pas impliqué dans l'homéostasie métallique

Chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*, le système Zra a été montré comme fortement induit par le zinc (Appia-Ayme et al. 2011; Petit-Härtlein et al. 2015; Leonhartsberger et al. 2001). De par cette forte induction, il avait premièrement été proposé comme un système impliqué dans l'homéostasie du zinc (Leonhartsberger et al. 2001). Néanmoins, plusieurs études indépendantes montrent que Zra n'est pas impliqué dans ce phénomène (Petit-Härtlein et al. 2015; van der Weel et al. 2019).

Afin d'évaluer la fonction du système Zra chez *Citrobacter rodentium*, l'activité de ses promoteurs a tout d'abord été analysée. Le système est fortement induit par le cuivre et le zinc (Figure 31). En revanche la délétion de *zraR* ou *zraP* n'a pas d'impact sur la sensibilité à des concentrations croissantes de zinc ou de cuivre (Figure 34). Cela n'exclut pas pour autant que le système puisse réguler des effecteurs de la réponse au stress métallique. En effet, l'étude de Choudhary *et al.* a mis en évidence que les gènes *nik*, le gène *zntA* et les gènes *cusABC*, qui sont respectivement responsables de l'import du nickel, l'export du zinc et du cuivre, présentaient une expression inférieure chez le mutant  $\Delta zraR$  comparé à la souche sauvage en RNAseq (Choudhary et al. 2020). La délétion du système Zra pourrait être compensée par la redondance fonctionnelle des mécanismes impliqués dans l'homéostasie métallique. En effet, il existe de nombreux systèmes responsables de la régulation de la concentration en métaux intracellulaire. Par exemple, dans la littérature, la tolérance au cuivre est médiée par un réseau complexe de régulateur qui modulent l'import et de l'export de cuivre (Giachino et Waldron 2020).

Néanmoins, la fonction première du système Zra ne serait pas de participer à l'homéostasie métallique. De la même façon, les systèmes Cpx et Bae sont connus pour être induits par le cuivre et le zinc respectivement mais ils participent surtout à la réponse au stress de l'enveloppe (Leblanc, Oates, et Raivio 2011; Yamamoto et Ishihama 2006). Le zinc et le cuivre pourraient être des signaux témoignant d'un défaut d'intégrité membranaire qui activerait la réponse au stress.

### 1.2.2 – Le système Zra est impliqué dans la résistance aux antimicrobiens

Si le système Zra ne semble pas jouer de rôle dans l'homéostasie métallique, son rôle dans la résistance aux antimicrobiens a été mis en évidence chez *E. coli*. Le système Zra est impliqué dans la résistance intrinsèque aux antimicrobiens ciblant la synthèse protéique, la synthèse de l'ADN ou les structures de l'enveloppe (Rome et al. 2018).

Afin de caractériser le fonctionnement du système Zra chez *C. rodentium*, nous avons étudié l'effet de la mutation des éléments de ce système sur la sensibilité à certains antibiotiques. La délétion des éléments du système Zra entraîne une augmentation de la sensibilité à certains antimicrobiens notamment au chlorure de benzéthonium et à la polymyxine B. Ces deux biocides ciblent l'enveloppe bactérienne. Le chlorure de benzéthonium est un agent de surface cationique. Il peut compromettre l'intégrité



membranaire en perturbant la bicouche lipidique de la membrane externe (Merchel Piovesan Pereira et Tagkopoulos 2019). La polymyxine B est un lipopeptide cyclique qui pénètre à l'intérieur de la membrane externe avec la tête polaire à l'extérieur de la bicouche lipidique. Il en résulte une désorganisation des membranes aboutissant à la mort cellulaire (Tsubery et al. 2002).

L'hôte possède des peptides antimicrobiens qui ont des effets similaires à ces deux molécules. Par exemple, au contact du peptide antimicrobien, Maigainin I, des protéines sont surproduites et notamment ZraP (Cardoso et al. 2017). La présence de ZraP révèle que le système Zra est sûrement activé en présence de peptides antimicrobiens. Cela concorde avec la sensibilité supérieure du système pour ce type de molécule. Ces observations laissent penser que le système Zra est impliqué dans la réponse au stress de l'enveloppe. De plus, notre équipe a montré que les mutants du système *zra* présentaient des défauts d'intégrité membranaires supérieurs en présence d'antimicrobiens (Rome et al. 2018).

Un crible plus approfondi des phénotypes des mutants  $\Delta zraR$  et  $\Delta zraP$  en présence d'un panel plus important de biocides notamment de peptides antimicrobiens sera réalisé afin d'améliorer la caractérisation de l'implication du système ZraPSR dans la résistance aux antibiotiques chez *C. rodentium*.

### 1.2.3 – Le système ZraSR est impliqué dans la pathogénie de *C. rodentium* mais pas ZraP

Le système ZraPSR pourrait être impliqué dans la résistance aux peptides antimicrobiens ainsi qu'aux stress au sein de l'hôte. Nous nous sommes demandé si le système jouait un rôle dans la pathogénie de *C. rodentium* sur la souris. Une étude avait préalablement montré l'effet de la délétion des gènes *zraS* et *zraR* sur la virulence de *C. rodentium*. Il s'est avéré que les souches  $\Delta zraSR$  provoquent un retard de mortalité des souris C3H/HeJ par rapport à la souche sauvage (Thomassin et al. 2017).

Nous nous sommes alors interrogés sur l'effet de la délétion de *zraP* sur la virulence de *C. rodentium*. Dans notre étude, le poids des souris, la charge bactérienne dans les fèces et l'état histologique du colon des souris C57BL/6 ne présentent pas de différence entre le mutant  $\Delta zraP$  et la souche sauvage WT. Donc ZraP ne semble pas être impliqué dans la pathogénie de *C. rodentium*. Néanmoins, le rôle de ZraP reste flou. Cette protéine possède une activité chaperonne lorsqu'elle est liée au zinc et elle jouerait un rôle de rétrocontrôle du système ZraSR (Appia-Ayme et al. 2011; Petit-Härtlein et al. 2015) (Figure 31 et 32). Le rétrocontrôle des systèmes à deux composants est important car l'emballement de ces systèmes peut être néfaste pour la cellule. Parfois les protéines de l'immunité innée exploitent cette propriété pour lutter contre les bactéries. En effet, les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP, pour peptidoglycan recognition proteins) sont détectées par Cpx et vont induire une activation très forte de CpxAR qui aboutit à un effet toxique à cause de la dépolarisation de la membrane et de la production de ROS (Kashyap et al. 2014).

L'implication du système ZraPSR dans la pathogénie pourrait être dû à un défaut de survie à l'intérieur de l'hôte et/ou à un défaut de virulence. Pour conclure, il serait intéressant d'étudier plus amplement le système et son régulon. D'une part, il serait intéressant d'évaluer la régulation directe ou indirecte par Zra de facteurs de virulence de *C. rodentium*. Par exemple, le LEE (locus d'effacement des entérocytes) de *C. rodentium* est composé de gènes codant le système de sécrétion de type III ainsi que ses effecteurs. Les effecteurs sont responsables de la modulation de la réponse immunitaire et du métabolisme cellulaire (Berger et al. 2018). Si le système Zra module le LEE ou un autre facteur de virulence, un lien direct serait établi entre le système Zra et la pathogénie.

D'autre part, comme nous l'avons vu, la bactérie est soumise à de nombreux stress lors de l'infection. Le système Zra pourrait donc être impliqué dans la survie au sein de l'hôte *via* sa résistance supérieure aux antimicrobiens mais également au stress acide, au stress oxydatif ou encore au stress osmotique. De plus, l'étude de Choudhary *et al.* a mis en évidence que les gènes *soxS*, *sodC*, *sodB*, *sufABCDE*, *katE*, *sodA*, *katG*, *groS* et *groL* qui sont responsables de la réponse au stress oxydatif, présentaient une expression inférieure chez le mutant  $\Delta zraR$  comparé à la souche *E. coli* sauvage en RNAseq (Choudhary et al. 2020). Le système pourrait donc être impliqué dans la réponse au stress oxydant en plus de la réponse au stress antimicrobien et cela permettrait à la bactérie de survivre à l'intérieur de son hôte.

### 1.3 – Quels sont les gènes régulés par le système Zra ?

Dans la littérature, les ESRs ont un rôle prépondérant dans la réponse au stress via la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes. Ainsi, nous avons supposé que le régulateur ZraR n'intervenait pas seulement au niveau du locus *zra* mais qu'il pouvait réguler d'autres *loci*. Pour répondre à cette question, avant ma thèse, un ChIP-seq avait été réalisé chez *E. coli* afin d'identifier les interactions de ZraR avec l'ADN. A l'aide de cette technique, 148 sites de fixation potentiels de ZraR à l'ADN ont été identifiés. Une quarantaine de sites de fixation situés au niveau de promoteur ont été retenus.

L'expression des gènes potentiellement régulés par ZraR a été étudiée chez *E. coli* WT et le mutant  $\Delta zraR$  par RT-qPCR. Six gènes sont ressortis avec une expression différentielle significative entre la bactérie WT et la bactérie  $\Delta zraR$ . Parmi eux, l'expression du gène *zraP* est 63 fois inférieure chez la souche  $\Delta zraR$  par rapport à la souche WT. Cela valide notre étude puisque c'est le seul gène qui était connu comme régulé par ZraR. Les cinq autres gènes sont régulés négativement par ZraR : *yrdD*, *fau*, *cspB*, *bax* et *yjyY* (Tableau 8 ; Figure 67). Bien que la différence d'expression du gène *yhdW* ne soit pas ressortie comme significative, l'activité de son promoteur semble sous le contrôle de ZraR donc nous l'avons rajouté aux cibles de ZraR (Figure 49). Le gène *cspB* code une protéine de type « cold-shock protein » qui participent à la réponse aux températures basses. Le gène *yhdW* code une SBP d'un transporteur ABC mais nous reviendrons plus en détail sur ce transporteur par la suite. Le gène *fau* code une enzyme du type 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase. Ces enzymes sont responsables de la résistance aux antifolates et l'utilisation de l'acide folinique (Ogwang et al. 2011). Le gène *bax* code une « putative glycoside hydrolase » et il est surexprimé lors d'un stress osmotique (Gunasekera, Csonka, et Paliy 2008; Weber et Jung 2002; Withman et al. 2013). Enfin les gènes *yjyY* et *yrdD* codent des protéines de fonction inconnue.

Le gène *yrdD* code une protéine possédant un domaine de fixation à l'ADN similaire à ceux des topoisomérases I. Cette protéine peut se fixer à l'ADN simple brin lorsqu'elle est liée au zinc (Cheng et al. 2014). Il a été proposé que YrdD puisse avoir un rôle dans la réparation de l'ADN (Cheng et al. 2014; Budke et Kuzminov 2010). Dans cette étude, nous avons montré que la délétion de *yrdD* augmentait la sensibilité de *E. coli* à la loméfloxacin (Figure 41). La loméfloxacin est un antibiotique de type quinolone qui empêche l'action de la topoisomérase IV et de l'ADN gyrase lors de la transcription et la réplication. YrdD pourrait être impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN. De plus, nous avons montré que YrdD pourrait jouer un rôle dans la modulation de la topologie de l'ADN (Figure 43). L'analyse de la fixation de YrdD avec l'ADN en présence de quinolone, de stress oxydant, de stress acide et de mutagène pourrait permettre de décrypter le fonctionnement de cette protéine. Le gène *yjyY* code une petite protéine de fonction inconnue. La délétion de ce gène provoque également une sensibilité supérieure à la loméfloxacin. Néanmoins le mécanisme d'action reste à découvrir.

Le système Zra, lui-même, est impliqué dans la résistance intrinsèque à la loméfloxacin (Rome et al. 2018). Le suivi de la concentration intracellulaire de loméfloxacin a montré que celle-ci était supérieure chez le mutant  $\Delta zraR$  par rapport à la souche sauvage. La résistance à la loméfloxacin médiée par le système Zra est sûrement liée à la régulation d'exportateurs de cet antibiotique (Figure 67).

Il est très surprenant que le système Zra régule négativement des gènes impliqués dans la réponse au stress ou aux antibiotiques comme *cspB*, *yjyY*, *yrdD* ou *yhdW*. Néanmoins cette régulation a lieu en milieu riche additionné en zinc. On peut se demander si celle-ci est différente dans d'autres conditions de culture. Cela laisse supposer que le régulateur ZraR régule également d'autres gènes. En faveur de cette hypothèse, l'étude de CHIP-seq de Choudhary *et al.* a identifié seulement un nouveau gène régulé par ZraR, *mgtA*, alors que leur étude de RNAseq a mis en évidence la régulation indirecte de gènes impliqués notamment dans le métabolisme et la motilité (Choudhary et al. 2020).

Enfin ZraR est prédit comme étant un activateur transcriptionnel de type «bacterial Enhancer-Binding Protein» (bEBP). Les bEBPs sont des activateurs de transcription qui s'assemblent sous forme hexamérique et utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour remodeler la conformation de l'ARN polymérase contenant le facteur sigma alternatif  $\sigma 54$  (Bush et Dixon 2012). Parmi les cibles de ZraR, les gènes *zraP* et *yhdW* ont des promoteurs reconnus par  $\sigma 54$  alors que les gènes *bax* et *yjyY* ont des promoteurs reconnus par  $\sigma 70$ . Même si cela peut paraître surprenant, il a été montré qu'un autre bEPC, NtrC, présente également une activité régulatrice faisant intervenir les deux facteurs  $\sigma 54$  et  $\sigma 70$  (Schumacher et al. 2013). Les bEBPs et notamment ZraR pourraient donc interagir avec plusieurs facteurs sigma. Afin de vérifier cette hypothèse, l'interaction direct entre le régulateur et l'ADN pourrait être visualisée par des expériences de retard sur gel (ou electrophoretic mobility shift assay).

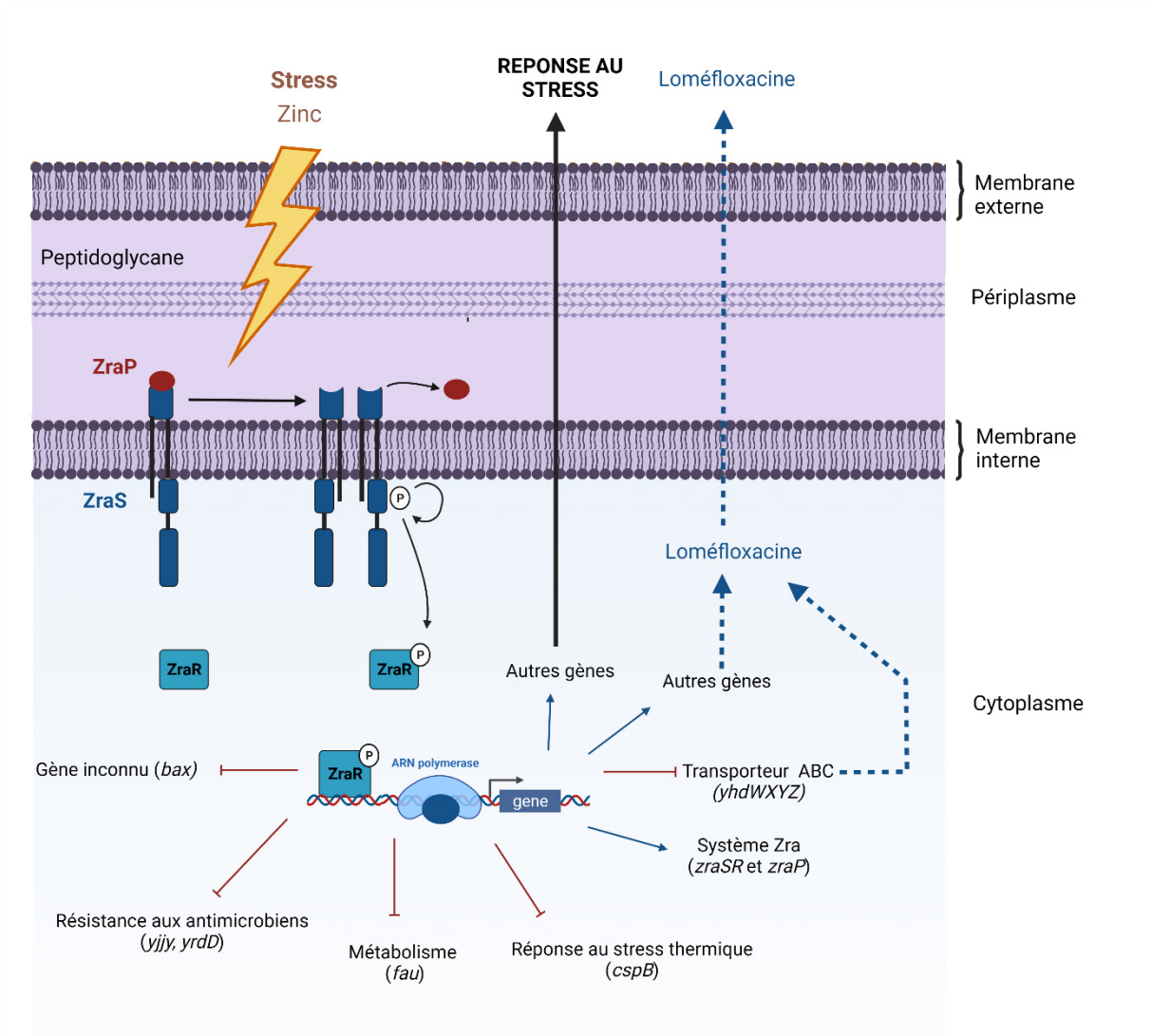


Figure 67 : Schématisation du fonctionnement du système ZraPSR

Le système Zra est capable de détecter des signaux extracellulaires de stress symbolisés par un éclair jaune. En réponse au stress, le senseur ZraS active le régulateur ZraR par phosphorylation qui joue alors son rôle de facteur de transcription au niveau de différents loci. Il va notamment moduler négativement l'expression des gènes *bax*, *yjjY*, *yrdD*, *fau*, *cspB* et positivement l'expression du locus *zra*. Néanmoins, il pourrait surement réguler d'autres gènes impliqués dans la réponse au stress et en particulier l'export de la loméfloxacine.

## 2 – Le transporteur Yhd, deux architectures pour deux fonctions

Les protéines du transporteur ABC, YhdWXYZ, sont retrouvées chez de nombreuses entérobactéries notamment celles de la famille des *Enterobacteriaceae*, *Pectobacteriaceae* et *Yersiniaceae* (Figure 46). Cependant, dans certaines souches d'*E. coli*, le gène *yhdW* est présent sous forme de pseudogène. Afin de comprendre la fonction du transporteur Yhd, il a été étudié chez *E. coli* et *C. rodentium*.

### 2.1 – Chez *E. coli*, Yhd est impliqué dans la résistance aux antimicrobiens

Chez *E. coli*, le transporteur Yhd avait été identifié comme une cible potentiel du régulateur ZraR par ChIP-seq (Table 3, (Rome et al. 2018)). L'activité des promoteurs de *yhd* a été étudiée à l'aide fusions transcriptionnelles. Cela a permis de montrer que l'activité des promoteurs du transporteur Yhd est sous le contrôle de ZraR (Figure 49). Sachant que le régulateur ZraR est impliqué dans la résistance aux antimicrobiens (Rome et al. 2018), l'impact de la délétion du transporteur sur la résistance aux antibiotiques a été analysé. Ainsi, nous avons montré que le transporteur Yhd est impliqué dans la résistance au mécillinaam et à la loméfloxacin (Figure 53).

Les transporteurs ABC qui sont responsables de la résistance aux antibiotiques sont de type MDR (pour MultiDrug resistance). Ce sont des exportateurs couplés à des systèmes de la membrane externe qui transportent les antibiotiques à l'extérieur de la cellule. Il est difficile d'inférer un fonctionnement du transporteur Yhd en se basant sur ces transporteurs car ils sont très différents sur le plan de leur séquence protéique.

Même si le fonctionnement de ce système reste inconnu, il y a une accumulation de loméfloxacin intracellulaire chez le mutant  $\Delta yhdWXYZ$  par rapport à la souche sauvage (Figure 54). Ces résultats suggèrent que le système YhdWXYZ est impliqué dans l'export de la loméfloxacin à l'extérieur de la cellule. En revanche ce scénario ne pourrait pas expliquer la résistance au mécillinaam qui est un antibiotique qui cible le peptidoglycane.

### 2.2 – Chez *C. rodentium*, Yhd transporte les acides aminés

Chez *C. rodentium*, le transporteur Yhd contient une SBP fonctionnelle. La protéine a été purifiée et la liaison de YhdW avec les acides aminés a été analysée par FTSA. Les résultats montrent que YhdW a une affinité pour l'asparagine et de façon moins importante pour la cystéine (Figure 57). L'affinité de YhdW pour les acides aminés est relativement restreinte contrairement au transporteur Yhd de *Rhizobium leguminosarum* qui aurait une affinité pour une large gamme de substrats (Walshaw et Poole 1996).

L'activité des promoteurs du transporteur est en accord en avec les résultats du FTSA. En effet l'activité est induite en milieu minimum et d'autant plus en présence d'asparagine ou de cystéine (Figure 61). Les transporteurs sont généralement induits en présence de leur substrat. Par exemple, le maltose induit, via le régulateur MalT, la production de son transporteur, MalFGK<sub>2</sub>-E. (Reimann et Wolfe 2011). En comparaison, chez *E. coli*, l'activité des

promoteurs *yhd* est également induite en milieu minimum de manière dépendante de  $\sigma_{54}$  (Figure 49 et 50) mais aucune induction par le milieu minimum additionné en asparagine ou cystéine n'est visible.

Afin d'évaluer si le transporteur est impliqué dans l'import de l'asparagine, la croissance en milieu minimum a tout d'abord été étudiée chez la souche sauvage et la souche mutante  $\Delta yhdWXYZ$ . La souche  $\Delta yhdWXYZ$  ne présente pas de défaut de croissance en milieu minimum par rapport à la souche sauvage (Figure 58). Néanmoins, cela pourrait s'expliquer par le fait que la bactérie puisse compenser cette délétion par la synthèse endogène de l'acide aminé. La synthèse endogène de l'asparagine à partir de l'aspartate peut être réalisée par deux enzymes codées par les gènes *asnA* et *asnB* chez *E. coli*. Chez *C. rodentium*, un orthologue de chacune de ces deux enzymes a été retrouvé. Lorsque ces deux gènes sont mutés, la souche est auxotrophe à l'asparagine (Figure 59A). Des tests de croissance en milieu minimum additionné en asparagine ont été réalisés pour comparer la croissance du double mutant  $\Delta asnAasnB$  avec celle du triple mutant  $\Delta asnAasnByhdWXYZ$ . En présence d'asparagine, aucune différence n'a été identifiée entre ces deux mutants. Cela semble montrer que *YhdWXYZ* n'est pas responsable de l'import d'asparagine ou que la délétion est compensée par le fonctionnement d'un autre transporteur (Figure 59B). Chez *E. coli*, le transporteur AnsP est le transporteur de l'asparagine. Aucun orthologue de ce système n'a été retrouvé chez *C. rodentium* mais elle pourrait posséder un autre transporteur de l'asparagine.

Le système pourrait être activé dans des conditions particulière, ce qui expliquerait que nous ne voyons pas d'effet de sa délétion. Il pourrait également être impliqué dans le transport d'autre métabolites. Le contenu intracellulaire de métabolites notamment d'acides aminés de la souche sauvage et de la souche mutante  $\Delta yhdWXYZ$  pourrait être analysé par HPLC.

### 2.3 – Yhd est impliqué dans la virulence de *Citrobacter rodentium*

Nous avons évalué l'implication de ce transporteur dans la pathogénie de *C. rodentium*. Pour cela, le poids des souris et la charge bactérienne dans les fèces ont été suivis au cours de l'infection. Lorsque les souris ont été sacrifiées, l'état de leur colon a été observé. Une première expérience nous a permis de montrer que *YhdW* était impliqué dans la pathogénie (Figure 63). En effet, la délétion de *yhdW* diminuait le symptôme d'hyperplasie des cryptes du colon. Cette expérience a été répétée avec un nombre supérieur d'individus et l'état du colon a été analysé au jour 7 et au jour 11-14. Cette seconde expérience montre que la quantité des mutants  $\Delta yhdWXYZ$  et  $\Delta yhdW$  dans les fèces était inférieure à celle de la souche sauvage (Figure 64). De plus, l'hyperplasie des cryptes du colon était significativement inférieure chez les souris infectées par les deux mutants que chez les souris infectées par la souche sauvage. Il a également été noté que la déplétion en cellules caliciformes et les dégâts sur l'épithélium semblaient plus faibles chez les mutants que chez la souche sauvage (Figure 65). Pour quantifier de manière plus précise ces phénomènes, un score de pathogénie sera mis en place avec l'aide du docteur Thierry Marchal. Les scores de pathogénie sont couramment utilisés afin d'évaluer la pathogénie de *C. rodentium*. Ils peuvent varier un peu en fonction des études mais globalement, ils évaluent l'hyperplasie, l'intégrité de l'épithélium, la présence d'œdème,



la présence de cellules immunitaires et la déplétion en cellules à mucus (Bouladoux, Harrison, et Belkaid 2017; Buschor et al. 2017).

Deux hypothèses pourraient expliquer l'implication de ce système dans la virulence de *Citrobacter rodentium*. La première est que le système Yhd importe des molécules essentielles à la survie de la bactérie au sein de son hôte comme l'asparagine. La seconde est que YhdW interagirait avec des protéines de l'hôte et pourrait moduler la virulence de cette bactérie.

Une étude de Tian *et al.* a abouti aux mêmes hypothèses. En effet, Tian *et al.* ont étudié la SBP YhdW chez *Brucella abortus*. Cette bactérie possède deux gènes *yhdW* (ou *aapJ*) nommés *aapJ1* et *aapJ2* codant des SBP. *aapJ1* est le premier gène de l'opéron *aapJQMP* alors que *aapJ2* se trouve excentré dans le chromosome. Ils ont montré que AapJ2 est impliqué dans la virulence aux stades précoces de l'infection de *B. abortus* chez la souris et est nécessaire à la survie dans les macrophages. Le mutant  $\Delta aapJ2$  ne présentait pas de différence au niveau de son LPS ni de sensibilité supérieure aux peptides antimicrobiens, au stress oxydatif ou au pH acide. Les auteurs n'ont pas élucidé le mécanisme de fonctionnement mais proposent que AapJ2 pourrait soit être impliqué dans le transport d'acides aminés soit moduler la réponse immunitaire.

Concernant l'interaction de YhdW avec des protéines de l'hôte, cette hypothèse est soutenue par la publication de Bose *et al.* En effet, ils ont étudié les interactions *in silico* entre les protéines des *E. coli* pathogène et de *Shigella* avec celles de l'Homme et ils ont identifié 17 interactions entre la protéine YhdW et des protéines de l'Homme (Bose, Venkatesh, et Mande 2017b; 2019). Néanmoins cela reste des prédictions, il est nécessaire de vérifier ces interactions d'un point de vue biologique.

Enfin nous nous sommes demandé si le transporteur pouvait également avoir un effet sur la virulence d'un phytopathogène. Donc nous avons étudié l'effet de la délétion de *yhdWXYZ* sur la virulence de *Dickeya dadantii*. *D. dadantii* est un phytopathogène impliqué dans la pourriture molle notamment grâce à la sécrétion d'enzymes pectinolytiques (Van Gijsegem et al. 2021). La quantification de la macération de l'endive par la souche WT ou le mutant  $\Delta yhdWXYZ$  montre que le transporteur Yhd n'est pas impliqué dans la pathogénie de *D. dadantii* sur l'endive (Figure 66). Ce n'est pas étonnant car on sait que les mécanismes de virulence entre les pathogènes animaux et végétaux ont très peu de points communs (Warriner et Namvar 2010; Crous et al. 2007).

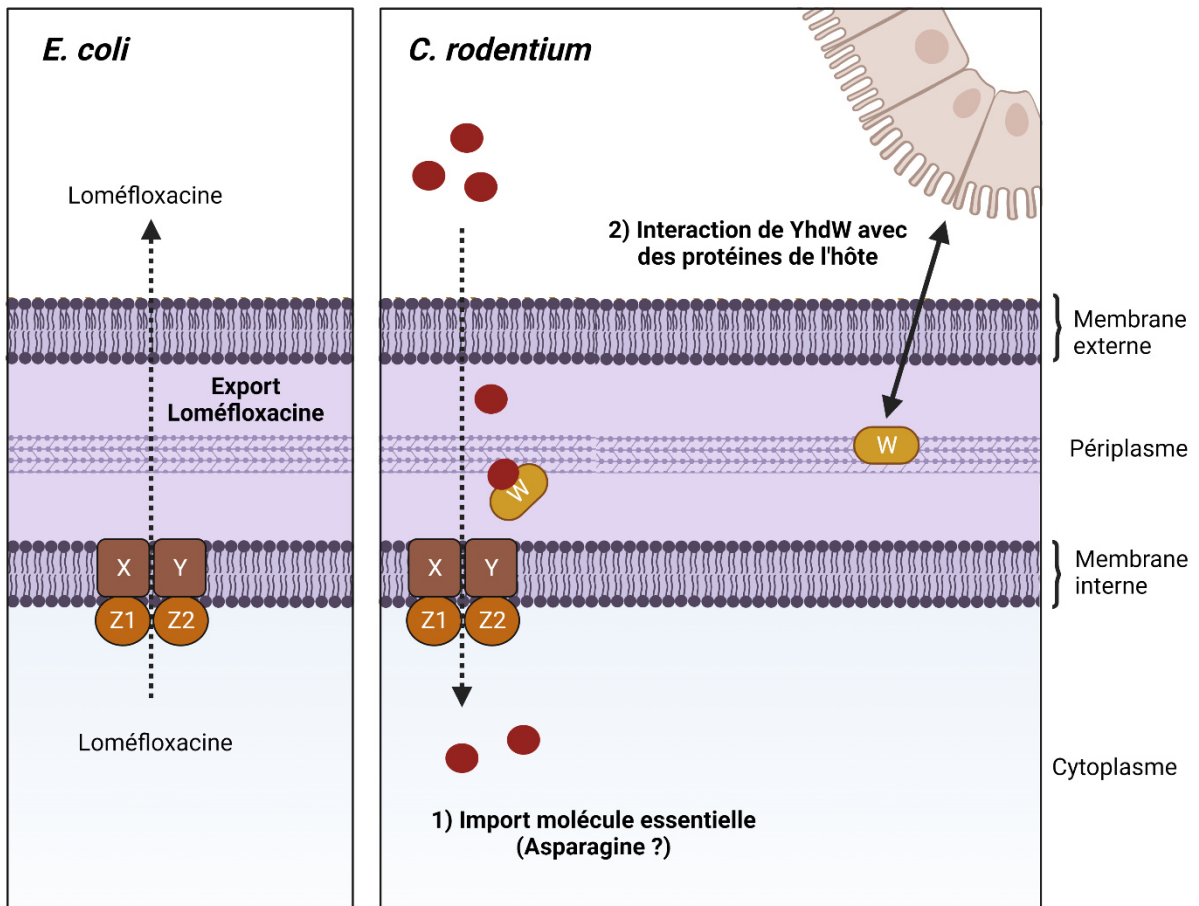


Figure 68 : Hypothèses du fonctionnement du transporteur Yhd chez *E. coli* et *C. rodentium*

Chez *E. coli*, le transporteur Yhd pourrait être impliqué dans l'export de la loméfloxacine. A contrario, chez *C. rodentium*, le transporteur serait impliqué dans l'import d'acides aminés. Le transporteur est important pour la virulence chez la souris. Cela pourrait être dû fait que d'une part, le transporteur importerait des métabolites essentiels à la survie au sein de l'hôte (1) ou que d'autre part, YhdW interagirait avec des protéines de l'hôte et pourrait moduler la virulence de cette bactérie (2).

---

## Bibliographie

---

- Abe, Hiroyuki, Akira Miyahara, Taku Oshima, Kosuke Tashiro, Yoshitoshi Ogura, Satoru Kuhara, Naotake Ogasawara, Tetsuya Hayashi, et Toru Tobe. 2008. « Global Regulation by Horizontally Transferred Regulators Establishes the Pathogenicity of *Escherichia coli* ». *DNA Research* 15 (1): 25-38. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsm033>.
- Adeolu, Mobolaji, Seema Alnajjar, Sohail Naushad, et Radhey S. Gupta. s. d. « Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (12): 5575-99. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>.
- Alba, Benjamin M., Jennifer A. Leeds, Christina Onufryk, Chi Zen Lu, et Carol A. Gross. 2002. « DegS and YaeL Participate Sequentially in the Cleavage of RseA to Activate the  $\Sigma$ E-Dependent Extracytoplasmic Stress Response ». *Genes & Development* 16 (16): 2156-68. <https://doi.org/10.1101/gad.1008902>.
- Alnajjar, Seema, et Radhey S. Gupta. 2017. « Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Delineate Six Main Clades within the Family Enterobacteriaceae and Support the Reclassification of Several Polyphyletic Members of the Family ». *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 54 (octobre): 108-27. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.024>.
- Amar, Agustina, Magdalena Pezzoni, Ramón A. Pizarro, et Cristina S. Costa. 2018. « New Envelope Stress Factors Involved in  $\Sigma$ E Activation and Conditional Lethality of RpoE Mutations in *Salmonella Enterica* ». *Microbiology (Reading, England)* 164 (10): 1293-1307. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000701>.
- Appia-Ayme, Corinne, Andrea Hall, Elaine Patrick, Shiny Rajadurai, Thomas Clarke, et Gary Rowley. 2011. « ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR ». *The Biochemical journal* 442 (novembre): 85-93. <https://doi.org/10.1042/BJ20111639>.
- Arts, Isabelle S., Alexandra Gennaris, et Jean-François Collet. 2015. « Reducing Systems Protecting the Bacterial Cell Envelope from Oxidative Damage ». *FEBS Letters* 589 (14): 1559-68. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.057>.
- Audrain, Bianca, Lionel Ferrières, Amira Zairi, Guillaume Soubigou, Curtis Dobson, Jean-Yves Coppée, Christophe Beloin, et Jean-Marc Ghigo. 2013. « Induction of the Cpx Envelope Stress Pathway Contributes to *Escherichia coli* Tolerance to Antimicrobial Peptides ». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (24): 7770-79. <https://doi.org/10.1128/AEM.02593-13>.
- Bach, S. J., T. A. McAllister, D. M. Veira, V. P. J. Gannon, et R. A. Holley. 2011. « Transmission and Control of *Escherichia coli* O157:H7 — A Review ». *Canadian Journal of Animal Science*, mars. <https://doi.org/10.4141/A02-021>.
- Baker, Tania A., et Robert T. Sauer. 2012. « ClpXP, an ATP-Powered Unfolding and Protein-Degradation Machine ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, AAA ATPases: structure and function, 1823 (1): 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.007>.

- Bao, Huan, et Franck Duong. 2014. « Nucleotide-Free MalK Drives the Transition of the Maltose Transporter to the Inward-Facing Conformation\* ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (14): 9844-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545525>.
- Beasley, DeAnna E., Amanda M. Koltz, Joanna E. Lambert, Noah Fierer, et Rob R. Dunn. 2015. « The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome ». *PLoS ONE* 10 (7): e0134116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134116>.
- Becker, Lynne A., Iel-Soo Bang, Marie-Laure Crouch, et Ferric C. Fang. 2005. « Compensatory Role of PspA, a Member of the Phage Shock Protein Operon, in RpoE Mutant Salmonella Enterica Serovar Typhimurium ». *Molecular Microbiology* 56 (4): 1004-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04604.x>.
- Beek, Josy ter, Albert Guskov, et Dirk Jan Slotboom. 2014. « Structural diversity of ABC transporters ». *The Journal of General Physiology* 143 (4): 419-35. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411164>.
- Berger, Cedric N., Valerie F. Crepin, Theodoros I. Roumeliotis, James C. Wright, Nicolas Serafini, Meirav Pevsner-Fischer, Lu Yu, et al. 2018. « The Citrobacter rodentium type III secretion system effector EspO affects mucosal damage repair and antimicrobial responses ». *PLoS Pathogens* 14 (10): e1007406. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007406>.
- Bernal-Cabas, Margarita, Juan Alfonso Ayala, et Tracy L. Raivio. 2015. « The Cpx Envelope Stress Response Modifies Peptidoglycan Cross-Linking via the L,D-Transpeptidase LdtD and the Novel Protein YgaU ». *Journal of Bacteriology* 197 (3): 603-14. <https://doi.org/10.1128/JB.02449-14>.
- Bernhardt, Anne, Markus Wehrl, Birgit Paul, Thomas Hochmuth, Matthias Schumacher, Kathleen Schütz, et Michael Gelinsky. 2015. « Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature ». *PLOS ONE* 10 (6): e0129205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129205>.
- Berntsson, Ronnie P. -A., Sander H. J. Smits, Lutz Schmitt, Dirk-Jan Slotboom, et Bert Poolman. 2010. « A Structural Classification of Substrate-Binding Proteins ». *FEBS Letters*, Gothenburg Special Issue: Molecules of Life, 584 (12): 2606-17. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.043>.
- Bodelón, Gustavo, Elvira Marín, et Luis Ángel Fernández. 2009. « Role of Periplasmic Chaperones and BamA (YaeT/Omp85) in Folding and Secretion of Intimin from Enteropathogenic Escherichia coli Strains ». *Journal of Bacteriology* 191 (16): 5169-79. <https://doi.org/10.1128/JB.00458-09>.
- Bogomolnaya, Lydia M., Lindsay Aldrich, Yuri Ragoza, Marissa Talamantes, Katharine D. Andrews, Michael McClelland, et Helene L. Andrews-Polymenis. 2014. « Identification of Novel Factors Involved in Modulating Motility of Salmonella enterica Serotype Typhimurium ». *PLoS ONE* 9 (11): e111513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111513>.
- Bolotin, Evgeni, et Ruth Hershberg. 2016. « Bacterial Intra-Species Gene Loss Occurs in a Largely Clocklike Manner Mostly within a Pool of Less Conserved and Constrained Genes ». *Scientific Reports* 6 (1): 35168. <https://doi.org/10.1038/srep35168>.
- Bonocora, Richard P., Carol Smith, Pascal Lapierre, et Joseph T. Wade. 2015. « Genome-Scale Mapping of Escherichia coli  $\sigma$ 54 Reveals Widespread, Conserved Intragenic Binding ». *PLoS Genetics* 11 (10): e1005552. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005552>.
- Bontemps-Gallo, Sébastien, Edwige Madec, et Jean-Marie Lacroix. 2015. « The Two-Component System CpxAR Is Essential for Virulence in the Phytopathogen Bacteria

- Dickeya Dadantii EC3937 ». *Environmental Microbiology* 17 (11): 4415-28. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12874>.
- Borths, Elizabeth L., Bert Poolman, Rikki N. Hvorup, Kaspar P. Locher, et Douglas C. Rees. 2005. « In Vitro Functional Characterization of BtuCD-F, the Escherichia Coli ABC Transporter for Vitamin B12 Uptake ». *Biochemistry* 44 (49): 16301-9. <https://doi.org/10.1021/bi0513103>.
- Bose, Tungadri, K. V. Venkatesh, et Sharmila S. Mande. 2017a. « Computational Analysis of Host–Pathogen Protein Interactions between Humans and Different Strains of Enterohemorrhagic Escherichia Coli ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00128>.
- . 2017b. « Computational Analysis of Host–Pathogen Protein Interactions between Humans and Different Strains of Enterohemorrhagic Escherichia Coli ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00128>.
- . 2019. « Investigating Host-Bacterial Interactions among Enteric Pathogens ». *BMC Genomics* 20 (1): 1022. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6398-2>.
- Bouladoux, Nicolas, Oliver J. Harrison, et Yasmine Belkaid. 2017. « The mouse model of infection with Citrobacter rodentium ». *Current protocols in immunology* 119 (novembre): 19.15.1-19.15.25. <https://doi.org/10.1002/cpim.34>.
- Brenner, Don J., et J. J. Farmer. 2015. « Enterobacteriaceae ». In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-24. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222>.
- Brissette, J. L., M. Russel, L. Weiner, et P. Model. 1990. « Phage Shock Protein, a Stress Protein of Escherichia Coli ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (3): 862-66. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.862>.
- Budke, Brian, et Andrei Kuzminov. 2010. « Production of Clastogenic DNA Precursors by the Nucleotide Metabolism in Escherichia Coli ». *Molecular Microbiology* 75 (1): 230-45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06994.x>.
- Buelow, Daelynn R., et Tracy L. Raivio. 2005. « Cpx Signal Transduction Is Influenced by a Conserved N-Terminal Domain in the Novel Inhibitor CpxP and the Periplasmic Protease DegP ». *Journal of Bacteriology* 187 (19): 6622-30. <https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6622-6630.2005>.
- Burgess, R. R. 2001. « Sigma Factors ». In *Encyclopedia of Genetics*, édité par Sydney Brenner et Jefferey H. Miller, 1831-34. New York: Academic Press. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1192>.
- Bury-Moné, Stéphanie, Yanoura Nomane, Nancie Reymond, Romain Barbet, Eric Jacquet, Sandrine Imbeaud, Annick Jacq, et Philippe Bouloc. 2009. « Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in Escherichia Coli ». *PLOS Genetics* 5 (9): e1000651. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000651>.
- Buschor, Stefanie, Miguelangel Cuenca, Stephanie S. Uster, Olivier P. Schären, Maria L. Balmer, Miguel A. Terrazos, Christian M. Schürch, et Siegfried Hapfelmeier. 2017. « Innate immunity restricts Citrobacter rodentium A/E pathogenesis initiation to an early window of opportunity ». *PLoS Pathogens* 13 (6): e1006476. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006476>.
- Bush, Matthew, et Ray Dixon. 2012. « The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of  $\sigma^{54}$ -Dependent Transcription ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 76 (3): 497-529. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-12>.

- Cabiscol, E., E. Piulats, P. Echave, E. Herrero, et J. Ros. 2000. « Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (35): 27393-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003140200>.
- Cardoso, Marlon H., Keyla C. de Almeida, Elizabete de S. Cândido, André M. Murad, Simoni C. Dias, et Octávio L. Franco. 2017. « Comparative NanoUPLC-MSE analysis between magainin I-susceptible and -resistant *Escherichia coli* strains ». *Scientific Reports* 7 (juin): 4197. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04181-y>.
- CARLIER, V. 1997. « Le stress bactérien et ses applications en microbiologie des aliments ». *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 70 (4): 355-62.
- Carlson, J H, et T J Silhavy. 1993. « Signal sequence processing is required for the assembly of LamB trimers in the outer membrane of *Escherichia coli*. » *Journal of Bacteriology* 175 (11): 3327-34.
- Castanié-Cornet, Marie-Pierre, Kaymeuang Cam, Bénédicte Bastiat, Adeline Cros, Patricia Bordes, et Claude Gutierrez. 2010. « Acid Stress Response in *Escherichia Coli*: Mechanism of Regulation of GadA Transcription by RcsB and GadE ». *Nucleic Acids Research* 38 (11): 3546-54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq097>.
- Castanié-Cornet, Marie-Pierre, Kaymeuang Cam, et Annick Jacq. 2006. « RcsF Is an Outer Membrane Lipoprotein Involved in the RcsCDB Phosphorelay Signaling Pathway in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 188 (12): 4264-70. <https://doi.org/10.1128/JB.00004-06>.
- Castelli, María E., et Eleonora García Véscovi. 2011. « The Rcs Signal Transduction Pathway Is Triggered by Enterobacterial Common Antigen Structure Alterations in *Serratia marcescens* ». *Journal of Bacteriology* 193 (1): 63-74. <https://doi.org/10.1128/JB.00839-10>.
- Cavaliere, Paola, et Françoise Norel. 2016. « Recent Advances in the Characterization of Crl, the Unconventional Activator of the Stress Sigma Factor  $\Sigma$ S/RpoS ». *Biomolecular Concepts* 7 (3): 197-204. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0006>.
- Chaba, Rachna, Benjamin M. Alba, Monica S. Guo, Jungsan Sohn, Nidhi Ahuja, Robert T. Sauer, et Carol A. Gross. 2011. « Signal integration by DegS and RseB governs the  $\sigma$ E-mediated envelope stress response in *Escherichia coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (5): 2106-11.
- Challis, Gregory L., et David A. Hopwood. 2003. « Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (Suppl 2): 14555-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934677100>.
- Chandrangu, Pete, Christopher Rensing, et John D. Helmann. 2017. « Metal Homeostasis and Resistance in Bacteria ». *Nature reviews. Microbiology* 15 (6): 338-50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>.
- Chassaing, Benoit, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2013. « The  $\sigma$ E Pathway Is Involved in Biofilm Formation by Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 195 (1): 76-84. <https://doi.org/10.1128/JB.01079-12>.
- Chaverroche, Marie-Kim, Jean-Marc Ghigo, et Christophe d'Enfert. 2000. « A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* ». *Nucleic Acids Research* 28 (22): e97.
- Chen, Hong-Han, Chien-Che Chang, Yu-Han Yuan, et Shwu-Jen Liaw. 2020. « A CpxR-Regulated ZapD Gene Involved in Biofilm Formation of Uropathogenic *Proteus Mirabilis* ». *Infection and Immunity* 88 (7): e00207-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00207-20>.



- . s. d. « A CpxR-Regulated zapD Gene Involved in Biofilm Formation of Uropathogenic *Proteus mirabilis* ». *Infection and Immunity* 88 (7): e00207-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00207-20>.
- Cheng, Zishuo, Guoqiang Tan, Wu Wang, Xiaolu Su, Aaron P. Landry, Jianxin Lu, et Huang Ding. 2014. « Iron and Zinc Binding Activity of *Escherichia Coli* Topoisomerase I Homolog YrdD ». *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 27 (2): 229-36. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9698-z>.
- Choudhary, Kumari Sonal, Julia A. Kleinmanns, Katherine Decker, Anand V. Sastry, Ye Gao, Richard Szubin, Yara Seif, et Bernhard O. Palsson. 2020. « Elucidation of Regulatory Modes for Five Two-Component Systems in *Escherichia Coli* Reveals Novel Relationships ». *MSystems* 5 (6). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00980-20>.
- Chung, C T, S L Niemela, et R H Miller. 1989. « One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (7): 2172-75.
- Clarke, David J. 2010. « The Rcs Phosphorelay: More than Just a Two-Component Pathway ». *Future Microbiology* 5 (8): 1173-84. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.83>.
- Cockerell, Steven R., Alex C. Rutkovsky, Josiah P. Zayner, Rebecca E. Cooper, Lindsay R. Porter, Sam S. Pendergraft, Zach M. Parker, Marcus W. McGinnis, et Ece Karatan. 2014. « *Vibrio cholerae* NspS, a homologue of ABC-type periplasmic solute binding proteins, facilitates transduction of polyamine signals independent of their transport ». *Microbiology* 160 (Pt 5): 832-43. <https://doi.org/10.1099/mic.0.075903-0>.
- Collinet, Bruno, Harumi Yuzawa, Thomas Chen, Christian Herrera, et Dominique Missiakas. 2000. « RseB Binding to the Periplasmic Domain of RseA Modulates the RseA:ΣE Interaction in the Cytoplasm and the Availability of ΣE-RNA Polymerase \* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (43): 33898-904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006214200>.
- Collins, James W., Kristie M. Keeney, Valerie F. Crepin, Vijay A. K. Rathinam, Katherine A. Fitzgerald, B. Brett Finlay, et Gad Frankel. 2014. « *Citrobacter Rodentium*: Infection, Inflammation and the Microbiota ». *Nature Reviews. Microbiology* 12 (9): 612-23. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3315>.
- Crepin, Valerie F., James W. Collins, Maryam Habibzay, et Gad Frankel. 2016. « *Citrobacter Rodentium* Mouse Model of Bacterial Infection ». *Nature Protocols* 11 (10): 1851-76. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.100>.
- Crous, P. W., K. Schubert, U. Braun, G. S. de Hoog, A. D. Hocking, H. -D. Shin, et J. Z. Groenewald. 2007. « Opportunistic, Human-Pathogenic Species in the Herpotrichiellaceae Are Phenotypically Similar to Saprobic or Phytopathogenic Species in the Venturiaceae ». *Studies in Mycology, The genus and similar dematiaceous hyphomycetes*, 58 (janvier): 185-217. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.07>.
- Danese, P. N., et T. J. Silhavy. 1998. « CpxP, a Stress-Combative Member of the Cpx Regulon ». *Journal of Bacteriology* 180 (4): 831-39. <https://doi.org/10.1128/JB.180.4.831-839.1998>.
- Dartigalongue, C., D. Missiakas, et S. Raina. 2001. « Characterization of the *Escherichia Coli* Sigma E Regulon ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (24): 20866-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100464200>.
- Darwin, A. J., et V. L. Miller. 2001. « The Psp Locus of *Yersinia Enterocolitica* Is Required for Virulence and for Growth in Vitro When the Ysc Type III Secretion System Is

- Produced ». *Molecular Microbiology* 39 (2): 429-44. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02235.x>.
- Darwin, Andrew J. 2013. « Stress Relief during Host Infection: The Phage Shock Protein Response Supports Bacterial Virulence in Various Ways ». *PLOS Pathogens* 9 (7): e1003388. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003388>.
- Dassa, E., et P. Bouige. 2001. « The ABC of ABCs: A Phylogenetic and Functional Classification of ABC Systems in Living Organisms ». *Research in Microbiology* 152 (3-4): 211-29. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01194-9](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01194-9).
- Datsenko, Kirill A., et Barry L. Wanner. 2000a. « One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12): 6640-45.
- . 2000b. « One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in Escherichia Coli K-12 Using PCR Products ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (12): 6640-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
- Davidson, Amy L., Elie Dassa, Cedric Orelle, et Jue Chen. 2008. « Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72 (2): 317-64. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>.
- De la Cruz, Miguel A., Jason K. Morgan, Miguel A. Ares, Jorge A. Yáñez-Santos, James T. Riordan, et Jorge A. Girón. 2016. « The Two-Component System CpxRA Negatively Regulates the Locus of Enterocyte Effacement of Enterohemorrhagic Escherichia coli Involving  $\sigma_{32}$  and Lon protease ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (février). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00011>.
- De Las Peñas, A, L Connolly, et C A Gross. 1997. « SigmaE is an essential sigma factor in Escherichia coli ». *Journal of Bacteriology* 179 (21): 6862-64. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6862-6864.1997>.
- Debnath, Irina, J. Paul Norton, Amelia E. Barber, Elizabeth M. Ott, Bijaya K. Dhakal, Richard R. Kulesus, et Matthew A. Mulvey. 2013. « The Cpx Stress Response System Potentiates the Fitness and Virulence of Uropathogenic Escherichia Coli ». *Infection and Immunity* 81 (5): 1450-59. <https://doi.org/10.1128/IAI.01213-12>.
- Delepelaire, Philippe. 2019. « Bacterial ABC Transporters of Iron Containing Compounds ». *Research in Microbiology, ABC systems in microorganisms*, 170 (8): 345-57. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.10.008>.
- Delhaye, Antoine, Jean-François Collet, et Géraldine Laloux. 2016. « Fine-Tuning of the Cpx Envelope Stress Response Is Required for Cell Wall Homeostasis in Escherichia Coli ». *MBio* 7 (1): e00047-00016. <https://doi.org/10.1128/mBio.00047-16>.
- Delhaye, Antoine, Géraldine Laloux, et Jean-François Collet. 2019. « The Lipoprotein NlpE Is a Cpx Sensor That Serves as a Sentinel for Protein Sorting and Folding Defects in the Escherichia Coli Envelope ». *Journal of Bacteriology* 201 (10): e00611-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00611-18>.
- DiGiuseppe, Patricia A., et Thomas J. Silhavy. 2003. « Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System ». *Journal of Bacteriology* 185 (8): 2432-40. <https://doi.org/10.1128/JB.185.8.2432-2440.2003>.
- Elderkin, Sarah, Patricia Bordes, Susan Jones, Mathieu Rappas, et Martin Buck. 2005. « Molecular Determinants for PspA-Mediated Repression of the AAA Transcriptional Activator PspF ». *Journal of Bacteriology* 187 (9): 3238-48. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3238-3248.2005>.

- Engel, Philipp, et Nancy A. Moran. 2013. « The gut microbiota of insects – diversity in structure and function ». *FEMS Microbiology Reviews* 37 (5): 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>.
- Erickson, J. W., et C. A. Gross. 1989. « Identification of the Sigma E Subunit of Escherichia Coli RNA Polymerase: A Second Alternate Sigma Factor Involved in High-Temperature Gene Expression ». *Genes & Development* 3 (9): 1462-71.
- Faner, Rosa, Oriol Sibila, Alvar Agustí, Eric Bernasconi, James D. Chalmers, Gary B. Huffnagle, Chaysavanh Manichanh, et al. 2017. « The Microbiome in Respiratory Medicine: Current Challenges and Future Perspectives ». *The European Respiratory Journal* 49 (4). <https://doi.org/10.1183/13993003.02086-2016>.
- Fang, Ferric, Elaine R. Frawley, Timothy Tapscott, et Andres Vazquez-Torres. 2016. « Bacterial Stress Responses during Host Infection ». *Cell Host & Microbe* 20 (août): 133-43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.009>.
- Farmer, J. J., M. K. Farmer, et Barry Holmes. 2010. « The Enterobacteriaceae: General Characteristics ». In *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470688618.taw0051>.
- Ferrières, Lionel, Aoife Thompson, et David J.YR 2009 Clarke. s. d. « Elevated levels of  $\sigma$ S inhibit biofilm formation in Escherichia coli: a role for the Rcs phosphorelay ». *Microbiology* 155 (11): 3544-53. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032722-0>.
- Fetsch, Erin E., et Amy L. Davidson. 2002. « Vanadate-Catalyzed Photocleavage of the Signature Motif of an ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (15): 9685-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.152204499>.
- Fink, Mitchell P. 2002. « Reactive Oxygen Species as Mediators of Organ Dysfunction Caused by Sepsis, Acute Respiratory Distress Syndrome, or Hemorrhagic Shock: Potential Benefits of Resuscitation with Ringer's Ethyl Pyruvate Solution ». *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 5 (2): 167-74.
- Fitzgerald, Devon M., Richard P. Bonocora, et Joseph T. Wade. 2014. « Comprehensive Mapping of the Escherichia Coli Flagellar Regulatory Network ». *PLOS Genetics* 10 (10): e1004649. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004649>.
- Francez-Charlot, Anne, Bruno Laugel, Alice Van Gemert, Nelly Dubarry, Florent Wiorowski, Marie-Pierre Castanié-Cornet, Claude Gutierrez, et Kaymeuang Cam. 2003. « RcsCDB His-Asp Phosphorelay System Negatively Regulates the FlhDC Operon in Escherichia Coli ». *Molecular Microbiology* 49 (3): 823-32. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03601.x>.
- Gao, Hong, Wei Dai, Lu Zhao, Junxia Min, et Fudi Wang. 2018. « The Role of Zinc and Zinc Homeostasis in Macrophage Function ». *Journal of Immunology Research* 2018: 6872621. <https://doi.org/10.1155/2018/6872621>.
- Gao, Yue-Dong, Yuqi Zhao, et Jingfei Huang. 2014. « Metabolic Modeling of Common Escherichia coli Strains in Human Gut Microbiome ». *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/694967>.
- Giachino, Andrea, et Kevin J. Waldron. 2020. « Copper Tolerance in Bacteria Requires the Activation of Multiple Accessory Pathways ». *Molecular Microbiology* 114 (3): 377-90. <https://doi.org/10.1111/mmi.14522>.
- Giannakopoulou, Natalia, Nilmini Mendis, Lei Zhu, Samantha Gruenheid, Sebastien P. Faucher, et Hervé Le Moual. 2018. « The Virulence Effect of CpxRA in Citrobacter Rodentium Is

- Independent of the Auxiliary Proteins NlpE and CpxP ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00320>.
- Gilson, E., C. F. Higgins, M. Hofnung, G. Ferro-Luzzi Ames, et H. Nikaido. 1982. « Extensive Homology between Membrane-Associated Components of Histidine and Maltose Transport Systems of Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli ». *The Journal of Biological Chemistry* 257 (17): 9915-18.
- Giuliani, Sarah E., Ashley M. Frank, et Frank R. Collart. 2008a. « Functional Assignment of Solute-Binding Proteins of ABC Transporters Using a Fluorescence-Based Thermal Shift Assay ». *Biochemistry* 47 (52): 13974-84. <https://doi.org/10.1021/bi801648r>.
- . 2008b. « Functional Assignment of Solute-Binding Proteins of ABC Transporters Using a Fluorescence-Based Thermal Shift Assay ». *Biochemistry* 47 (52): 13974-84. <https://doi.org/10.1021/bi801648r>.
- Gottesman, S., P. Trisler, et A. Torres-Cabassa. 1985. « Regulation of Capsular Polysaccharide Synthesis in Escherichia Coli K-12: Characterization of Three Regulatory Genes ». *Journal of Bacteriology* 162 (3): 1111-19. <https://doi.org/10.1128/jb.162.3.1111-1119.1985>.
- Grauso, Marta, Annaïg Lan, Mireille Andriamihaja, Frédéric Bouillaud, et François Blachier. 2019. « Hyperosmolar Environment and Intestinal Epithelial Cells: Impact on Mitochondrial Oxygen Consumption, Proliferation, and Barrier Function in Vitro ». *Scientific Reports* 9 (1): 11360. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47851-9>.
- Greene, Nicholas P., Elise Kaplan, Allister Crow, et Vassilis Koronakis. 2018. « Antibiotic Resistance Mediated by the MacB ABC Transporter Family: A Structural and Functional Perspective ». *Frontiers in Microbiology* 9 (mai): 950. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00950>.
- Guan, Ningzi, et Long Liu. 2020. « Microbial Response to Acid Stress: Mechanisms and Applications ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (1): 51-65. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>.
- Gueguen, Erwan, et Eric Cascales. 2013. « Promoter Swapping Unveils the Role of the Citrobacter Rodentium CTS1 Type VI Secretion System in Interbacterial Competition ». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (1): 32-38. <https://doi.org/10.1128/AEM.02504-12>.
- Guest, Randi L., Junshu Wang, Julia L. Wong, et Tracy L. Raivio. 2017. « A Bacterial Stress Response Regulates Respiratory Protein Complexes To Control Envelope Stress Adaptation ». *Journal of Bacteriology* 199 (20): e00153-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00153-17>.
- Gunasekera, Thusitha S., Laszlo N. Csonka, et Oleg Paliy. 2008. « Genome-Wide Transcriptional Responses of Escherichia coli K-12 to Continuous Osmotic and Heat Stresses ». *Journal of Bacteriology* 190 (10): 3712-20. <https://doi.org/10.1128/JB.01990-07>.
- Haardt, Martin, Bettina Kempf, Elke Faatz, et Erhard Bremer. 1995. « The Osmoprotectant Proline Betaine Is a Major Substrate for the Binding-Protein-Dependent Transport System ProU of Escherichia Coli K-12 ». *Molecular and General Genetics MGG* 246 (6): 783-96. <https://doi.org/10.1007/BF00290728>.
- Han, Bing, Priya Sivaramakrishnan, Chih-Chun J. Lin, Isaiah A.A. Neve, Jingquan He, Li Wei Rachel Tay, Jessica N. Sowa, et al. 2017. « Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity ». *Cell* 169 (7): 1249-1262.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.036>.
- Hernday, Aaron D., Bruce A. Braaten, Gina Broitman-Maduro, Patrick Engelberts, et David A. Low. 2004. « Regulation of the Pap Epigenetic Switch by CpxAR: Phosphorylated CpxR

- Inhibits Transition to the Phase ON State by Competition with Lrp ». *Molecular Cell* 16 (4): 537-47. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.020>.
- Heusipp, Gerhard, M. Alexander Schmidt, et Virginia L. Miller. 2003. « Identification of rpoE and nadB as host responsive elements of *Yersinia enterocolitica* ». *FEMS Microbiology Letters* 226 (2): 291-98. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00613-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00613-X).
- Hews, Claire L., Timothy Cho, Gary Rowley, et Tracy L. Raivio. 2019. « Maintaining Integrity Under Stress: Envelope Stress Response Regulation of Pathogenesis in Gram-Negative Bacteria ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00313>.
- Hollenstein, Kaspar, Roger J. P. Dawson, et Kaspar P. Locher. 2007. « Structure and Mechanism of ABC Transporter Proteins ». *Current Opinion in Structural Biology* 17 (4): 412-18. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.07.003>.
- Howery, Kristen E., Katy M. Clemmer, et Philip N. Rather. 2016. « The Rcs Regulon in *Proteus Mirabilis*: Implications for Motility, Biofilm Formation, and Virulence ». *Current Genetics* 62 (4): 775-89. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0579-1>.
- Hu, Linda I., Bui Khanh Chi, Misty L. Kuhn, Ekaterina V. Filippova, Arti J. Walker-Peddakotla, Katrin Bäsell, Dörte Becher, Wayne F. Anderson, Haike Antelmann, et Alan J. Wolfe. 2013. « Acetylation of the Response Regulator RcsB Controls Transcription from a Small RNA Promoter ». *Journal of Bacteriology* 195 (18): 4174-86. <https://doi.org/10.1128/JB.00383-13>.
- Humphreys, Sue, Andrew Stevenson, Andrew Bacon, A. Barbara Weinhardt, et Mark Roberts. 1999. « The Alternative Sigma Factor,  $\zeta$ E, Is Critically Important for the Virulence of *Salmonella typhimurium* ». *Infection and Immunity* 67 (4): 1560-68.
- Humphries, Romney M., Thomas P. Griener, Stefanie L. Vogt, George L. Mulvey, Tracy Raivio, Michael S. Donnenberg, Pavel I. Kitov, Michael Surette, et Glen D. Armstrong. 2010. « N-Acetylglucosamine-Induced Retraction of Bundle-Forming Pili Regulates Virulence-Associated Gene Expression in Enteropathogenic *Escherichia Coli* ». *Molecular Microbiology* 76 (5): 1111-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07192.x>.
- Hung, Danielle L., Tracy L. Raivio, C. Hal Jones, Thomas J. Silhavy, et Scott J. Hultgren. 2001. « Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili ». *The EMBO Journal* 20 (7): 1508-18. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1508>.
- Hussein, Nahla A., Seung-Hyun Cho, Géraldine Laloux, Rania Siam, et Jean-François Collet. 2018. « Distinct Domains of *Escherichia Coli* IgaA Connect Envelope Stress Sensing and Down-Regulation of the Rcs Phosphorelay across Subcellular Compartments ». *PLOS Genetics* 14 (5): e1007398. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007398>.
- Isaac, Daniel D., Jerome S. Pinkner, Scott J. Hultgren, et Thomas J. Silhavy. 2005. « The Extracytoplasmic Adaptor Protein CpxP Is Degraded with Substrate by DegP ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (49): 17775-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508936102>.
- Jacobson, Amanda, Lilian Lam, Manohary Rajendram, Fiona Tamburini, Jared Honeycutt, Trung Pham, Will Van Treuren, et al. 2018. « A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to *Salmonella* Infection ». *Cell Host & Microbe* 24 (2): 296-307.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.002>.
- Janda, J., et S. Abbott. 2021. « The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes ». *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>.

- Janda, J. Michael, et Sharon L Abbott. 2006. *The Enterobacteria*. Washington, D.C.: ASM Press.
- Janda, J. Michael, et Sharon L. Abbott. 2011. « Revisiting Bacterial Gastroenteritis, Part I: Issues, Possible Approaches, and an Ever-Expanding List of Etiologic Agents ». *Clinical Microbiology Newsletter* 33 (10): 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.04.002>.
- Johansen, Jesper, Anders Aamann Rasmussen, Martin Overgaard, et Poul Valentin-Hansen. 2006. « Conserved Small Non-Coding RNAs That Belong to the  $\Sigma E$  Regulon: Role in Down-Regulation of Outer Membrane Proteins ». *Journal of Molecular Biology* 364 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.004>.
- Jones, C. H., P. N. Danese, J. S. Pinkner, T. J. Silhavy, et S. J. Hultgren. 1997. « The Chaperone-Assisted Membrane Release and Folding Pathway Is Sensed by Two Signal Transduction Systems ». *The EMBO Journal* 16 (21): 6394-6406. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6394>.
- Jones, Peter M., et Anthony M. George. 2013. « Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 48 (1): 39-50. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.735644>.
- Jones, Susan E., Louise J. Lloyd, Kum K. Tan, et Martin Buck. 2003. « Secretion Defects That Activate the Phage Shock Response of Escherichia coli ». *Journal of Bacteriology* 185 (22): 6707-11. <https://doi.org/10.1128/JB.185.22.6707-6711.2003>.
- Jordan, I. King, Igor B. Rogozin, Yuri I. Wolf, et Eugene V. Koonin. 2002. « Essential Genes Are More Evolutionarily Conserved than Are Nonessential Genes in Bacteria ». *Genome Research* 12 (6): 962-68. <https://doi.org/10.1101/gr.87702>.
- Josenhans, Christine, et Sebastian Suerbaum. 2002. « The Role of Motility as a Virulence Factor in Bacteria ». *International Journal of Medical Microbiology* 291 (8): 605-14. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>.
- Jovanovic, G., L. Weiner, et P. Model. 1996. « Identification, Nucleotide Sequence, and Characterization of PspF, the Transcriptional Activator of the Escherichia Coli Stress-Induced Psp Operon ». *Journal of Bacteriology* 178 (7): 1936-45. <https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1936-1945.1996>.
- Jovanovic, Goran, Louise J. Lloyd, Michael P. H. Stumpf, Antony J. Mayhew, et Martin Buck. 2006. « Induction and Function of the Phage Shock Protein Extracytoplasmic Stress Response in Escherichia Coli ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (30): 21147-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602323200>.
- Karlinsey, Joyce E., Michael E. Maguire, Lynne A. Becker, Marie-Laure V. Crouch, et Ferric C. Fang. 2010. « The Phage Shock Protein PspA Facilitates Divalent Metal Transport and Is Required for Virulence of Salmonella Enterica Sv. Typhimurium ». *Molecular Microbiology* 78 (3): 669-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07357.x>.
- Kashyap, Des Raj, Annemarie Rompca, Ahmed Gaballa, John D. Helmann, Jefferson Chan, Christopher J. Chang, Iztok Hozo, Dipika Gupta, et Roman Dziarski. 2014. « Peptidoglycan Recognition Proteins Kill Bacteria by Inducing Oxidative, Thiol, and Metal Stress ». *PLoS Pathogens* 10 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004280>.
- Kempf, Bettina, et E. Bremer. 1998. « Uptake and Synthesis of Compatible Solutes as Microbial Stress Responses to High-Osmolality Environments ». *Archives of Microbiology* 170 (5): 319-30. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>.



- Khadka, Nawal K., Chinta M. Aryal, et Jianjun Pan. 2018. « Lipopolysaccharide-Dependent Membrane Permeation and Lipid Clustering Caused by Cyclic Lipopeptide Colistin ». *ACS Omega* 3 (12): 17828-34. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02260>.
- Kim, Jisun, et Woojun Park. 2015. « Indole: A Signaling Molecule or a Mere Metabolic Byproduct That Alters Bacterial Physiology at a High Concentration? » *Journal of Microbiology* 53 (7): 421-28. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5273-3>.
- Kim, Jung-Gun, Byoung Keun Park, Sung-Uk Kim, Doil Choi, Baek Hie Nahm, Jae Sun Moon, John S. Reader, Stephen K. Farrand, et Ingyu Hwang. 2006. « Bases of Biocontrol: Sequence Predicts Synthesis and Mode of Action of Agrocin 84, the Trojan Horse Antibiotic That Controls Crown Gall ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (23): 8846-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602965103>.
- Kleerebezem, M., W. Crielaard, et J. Tommassen. 1996. « Involvement of Stress Protein PspA (Phage Shock Protein A) of Escherichia Coli in Maintenance of the Protonmotive Force under Stress Conditions ». *The EMBO Journal* 15 (1): 162-71.
- Klein, Gracjana, Anna Stupak, Daria Biernacka, Pawel Wojtkiewicz, Buko Lindner, et Satish Raina. 2016. « Multiple Transcriptional Factors Regulate Transcription of the RpoE Gene in Escherichia Coli under Different Growth Conditions and When the Lipopolysaccharide Biosynthesis Is Defective ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (44): 22999-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.748954>.
- Kobayashi, Hideki, Mami Yamamoto, et Rikizo Aono. 1998. « Appearance of a Stress-Response Protein, Phage-Shock Protein A, in Escherichia Coli Exposed to Hydrophobic Organic Solvents ». *Microbiology (Reading, England)* 144 ( Pt 2) (février): 353-59. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-2-353>.
- Kobayashi, Ryuji, Toshiharu Suzuki, et Masasuke Yoshida. 2007. « Escherichia Coli Phage-Shock Protein A (PspA) Binds to Membrane Phospholipids and Repairs Proton Leakage of the Damaged Membranes ». *Molecular Microbiology* 66 (1): 100-109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05893.x>.
- Kwon, Eunju, Dong Young Kim, Carol A. Gross, John D. Gross, et Kyeong Kyu Kim. 2010. « The Crystal Structure Escherichia Coli Spy ». *Protein Science* 19 (11): 2252-59. <https://doi.org/10.1002/pro.489>.
- Laan, M. van der, M. L. Urbanus, C. M. Ten Hagen-Jongman, N. Nouwen, B. Oudega, N. Harms, A. J. M. Driessen, et J. Luirink. 2003. « A Conserved Function of YidC in the Biogenesis of Respiratory Chain Complexes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (10): 5801-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0636761100>.
- Laroussi, Mounir. 2005. « Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State-of-the-Art ». *Plasma Processes and Polymers* 2 (5): 391-400. <https://doi.org/10.1002/ppap.200400078>.
- Lasaro, Melissa, Zhi Liu, Rima Bishar, Kathryn Kelly, Sujay Chattopadhyay, Sandip Paul, Evgeni Sokurenko, Jun Zhu, et Mark Goulian. 2014. « Escherichia coli Isolate for Studying Colonization of the Mouse Intestine and Its Application to Two-Component Signaling Knockouts ». *Journal of Bacteriology* 196 (9): 1723-32. <https://doi.org/10.1128/JB.01296-13>.
- Leblanc, Shannon K. D., Christopher W. Oates, et Tracy L. Raivio. 2011. « Characterization of the Induction and Cellular Role of the BaeSR Two-Component Envelope Stress

- Response of *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 193 (13): 3367-75. <https://doi.org/10.1128/JB.01534-10>.
- Lee, Chang-Chun, Yen Sun, Shuo Qian, et Huey W. Huang. 2011. « Transmembrane Pores Formed by Human Antimicrobial Peptide LL-37 ». *Biophysical Journal* 100 (7): 1688-96. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.018>.
- Lee, Jae Hoon, Veronica Ancona, et Youfu Zhao. 2018. « Lon Protease Modulates Virulence Traits in *Erwinia Amylovora* by Direct Monitoring of Major Regulators and Indirectly through the Rcs and Gac-Csr Regulatory Systems ». *Molecular Plant Pathology* 19 (4): 827-40. <https://doi.org/10.1111/mpp.12566>.
- Lee, Yvonne M., Patricia A. DiGiuseppe, Thomas J. Silhavy, et Scott J. Hultgren. 2004. « P Pilus Assembly Motif Necessary for Activation of the CpxRA Pathway by PapE in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 186 (13): 4326-37. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4326-4337.2004>.
- Lemire, Joseph A., Joe J. Harrison, et Raymond J. Turner. 2013. « Antimicrobial Activity of Metals: Mechanisms, Molecular Targets and Applications ». *Nature Reviews Microbiology* 11 (6): 371-84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.
- Leonhartsberger, S., A. Huber, F. Lottspeich, et A. Böck. 2001. « The HydH/G Genes from *Escherichia Coli* Code for a Zinc and Lead Responsive Two-Component Regulatory System ». *Journal of Molecular Biology* 307 (1): 93-105. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4451>.
- Lesterlin, Christian, et Nelly Duabrry. 2016. « Investigating Bacterial Chromosome Architecture ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1431: 61-72. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3631-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3631-1_6).
- Li, Ganwu, Claudia Laturnus, Christa Ewers, et Lothar H. Wieler. 2005. « Identification of Genes Required for Avian *Escherichia coli* Septicemia by Signature-Tagged Mutagenesis ». *Infection and Immunity* 73 (5): 2818-27. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2818-2827.2005>.
- Li, Hui, et Michael Gänzle. 2016. « Some Like It Hot: Heat Resistance of *Escherichia Coli* in Food ». *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01763>.
- Li, Mi, Kai Liu, Yonghong Liu, Chenghai Gao, et Xiangxi Yi. 2021. « *Bruguierivorax Albus* Gen. Nov. Sp. Nov. Isolated from Mangrove Sediment and Proposal of *Bruguierivoracaceae* Fam. Nov ». *Current Microbiology* 78 (2): 856-66. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02311-w>.
- Link, A J, D Phillips, et G M Church. 1997. « Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. » *Journal of Bacteriology* 179 (20): 6228-37.
- Linné, Carl von (1707-1778) Auteur du texte. 1788. *Philosophie botanique de Charles Linné ,... Dans laquelle sont expliqués les fondements de la botanique, avec les définitions de ses parties, les exemples des termes, des observations sur les plus rares. Enrichie de figures. Traduite du latin par Fr.-A. Quesné.* <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k6565416v>.
- Linton, Kenneth J., et Christopher F. Higgins. 1998. « The *Escherichia Coli* ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins ». *Molecular Microbiology* 28 (1): 5-13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00764.x>.
- Litvak, Yael, Mariana X Byndloss, Renée M Tsolis, et Andreas J Bäumler. 2017. « Dysbiotic Proteobacteria Expansion: A Microbial Signature of Epithelial Dysfunction ». *Current Opinion in Microbiology, Antimicrobials \* Bacterial Systems Biology*, 39 (octobre): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.07.003>.

- Liu, Ming-Che, Kuan-Ting Kuo, Hsiung-Fei Chien, Yi-Lin Tsai, et Shwu-Jen Liaw. 2015. « New Aspects of RpoE in Uropathogenic *Proteus Mirabilis* ». *Infection and Immunity* 83 (3): 966-77. <https://doi.org/10.1128/IAI.02232-14>.
- Lloyd, Louise J., Susan E. Jones, Goran Jovanovic, Prasad Gyaneshwar, Matthew D. Rolfe, Arthur Thompson, Jay C. Hinton, et Martin Buck. 2004. « Identification of a New Member of the Phage Shock Protein Response in *Escherichia Coli*, the Phage Shock Protein G (PspG) ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (53): 55707-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408994200>.
- López, Carolina, Susana K. Checa, et Fernando C. Soncini. 2018. « CpxR/CpxA Controls ScsABCD Transcription To Counteract Copper and Oxidative Stress in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium ». *Journal of Bacteriology* 200 (16): e00126-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00126-18>.
- Mächtel, Rebecca, Alessandra Narducci, Douglas A. Griffith, Thorben Cordes, et Cédric Orelle. 2019. « An Integrated Transport Mechanism of the Maltose ABC Importer ». *Research in Microbiology, ABC systems in microorganisms*, 170 (8): 321-37. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.09.004>.
- MacRitchie, Dawn M., Nicole Acosta, et Tracy L. Raivio. 2012. « DegP Is Involved in Cpx-Mediated Posttranscriptional Regulation of the Type III Secretion Apparatus in Enteropathogenic *Escherichia coli* ». *Infection and Immunity* 80 (5): 1766-72. <https://doi.org/10.1128/IAI.05679-11>.
- MacRitchie, Dawn M., Jordan D. Ward, Anna Z. Nevesinjac, et Tracy L. Raivio. 2008. « Activation of the Cpx Envelope Stress Response Down-Regulates Expression of Several Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Genes in Enteropathogenic *Escherichia coli* ». *Infection and Immunity* 76 (4): 1465-75. <https://doi.org/10.1128/IAI.01265-07>.
- Maes, M., et E. Messens. 1992. « Phenol as Grinding Material in RNA Preparations ». *Nucleic Acids Research* 20 (16): 4374. <https://doi.org/10.1093/nar/20.16.4374>.
- Majdalani, Nadim, et Susan Gottesman. 2005. « The Rcs Phosphorelay: A Complex Signal Transduction System ». *Annual Review of Microbiology* 59: 379-405. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.050405.101230>.
- Majdalani, Nadim, David Hernandez, et Susan Gottesman. 2002. « Regulation and Mode of Action of the Second Small RNA Activator of RpoS Translation, RprA ». *Molecular Microbiology* 46 (3): 813-26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03203.x>.
- Mao, Y., M. P. Doyle, et J. Chen. 2001. « Insertion Mutagenesis of Wca Reduces Acid and Heat Tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7 ». *Journal of Bacteriology* 183 (12): 3811-15. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3811-3815.2001>.
- Mariscotti, Javier F., et Francisco García-del Portillo. 2009. « Genome Expression Analyses Revealing the Modulation of the *Salmonella* Rcs Regulon by the Attenuator IgaA ». *Journal of Bacteriology* 191 (6): 1855-67. <https://doi.org/10.1128/JB.01604-08>.
- Maxson, Michelle E., et Andrew J. Darwin. 2004. « Identification of Inducers of the *Yersinia Enterocolitica* Phage Shock Protein System and Comparison to the Regulation of the RpoE and Cpx Extracytoplasmic Stress Responses ». *Journal of Bacteriology* 186 (13): 4199-4208. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4199-4208.2004>.
- McEwen, J., et P. M. Silverman. 1982. « Mutations in Genes CpxA and CpxB Alter the Protein Composition of *Escherichia Coli* Inner and Outer Membranes ». *Journal of Bacteriology* 151 (3): 1553-59.

- McMahon, Kenneth J., Maria E. Castelli, Eleonora García Vescovi, et Mario F. Feldman. 2012. « Biogenesis of Outer Membrane Vesicles in *Serratia marcescens* Is Thermoregulated and Can Be Induced by Activation of the Rcs Phosphorelay System ». *Journal of Bacteriology* 194 (12): 3241-49. <https://doi.org/10.1128/JB.00016-12>.
- McMahon, M. Ann S., Jiru Xu, John E. Moore, Ian S. Blair, et David A. McDowell. 2007. « Environmental Stress and Antibiotic Resistance in Food-Related Pathogens ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (1): 211-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00578-06>.
- Mellies, Jay L., Simon J. Elliott, Vanessa Sperandio, Michael S. Donnenberg, et James B. Kaper. 1999. « The Per Regulon of Enteropathogenic *Escherichia Coli* : Identification of a Regulatory Cascade and a Novel Transcriptional Activator, the Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator (Ler) ». *Molecular Microbiology* 33 (2): 296-306. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01473.x>.
- Meng, Jiao, Glenn Young, et Jingyu Chen. 2021. « The Rcs System in Enterobacteriaceae: Envelope Stress Responses and Virulence Regulation ». *Frontiers in Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.627104>.
- Merchel Piovesan Pereira, Beatriz, et Ilias Tagkopoulos. 2019. « Benzalkonium Chlorides: Uses, Regulatory Status, and Microbial Resistance ». *Applied and Environmental Microbiology* 85 (13): e00377-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00377-19>.
- Miller, Jeffrey H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. [Cold Spring Harbor, N.Y.]: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mitchell, Angela M., et Thomas J. Silhavy. 2019. « Envelope stress responses: balancing damage repair and toxicity ». *Nature reviews. Microbiology* 17 (7): 417-28. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0199-0>.
- Momose, Yoshika, Kazuhiro Hirayama, et Kikuji Itoh. 2008. « Competition for Proline between Indigenous *Escherichia Coli* and *E. Coli* O157:H7 in Gnotobiotic Mice Associated with Infant Intestinal Microbiota and Its Contribution to the Colonization Resistance against *E. Coli* O157:H7 ». *Antonie Van Leeuwenhoek* 94 (2): 165-71. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9222-6>.
- Motyka, Agata, Sabina Zoledowska, Wojciech Sledz, et Ewa Lojkowska. 2017. « Molecular Methods as Tools to Control Plant Diseases Caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* Spp: A Minireview ». *New Biotechnology* 39 (Pt B): 181-89. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.08.010>.
- Muller, Cécile, Iel-Soo Bang, Jyoti Velayudhan, Joyce Karlinsey, Kai Papenfort, Jörg Vogel, et Ferric C. Fang. 2009. « Acid Stress Activation of the  $\Sigma$ E Stress Response in *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium ». *Molecular Microbiology* 71 (5): 1228-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06597.x>.
- Murray, Patrick R., Ken S. Rosenthal, et Michael A. Pfaller. 2020. *Medical Microbiology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Nagakubo, Satoshi, Kunihiko Nishino, Takahiro Hirata, et Akihito Yamaguchi. 2002. « The Putative Response Regulator BaeR Stimulates Multidrug Resistance of *Escherichia Coli* via a Novel Multidrug Exporter System, MdtABC ». *Journal of Bacteriology* 184 (15): 4161-67. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4161-4167.2002>.
- Nichols, Robert J., Saunak Sen, Yoe Jin Choo, Pedro Beltrao, Matylda Zietek, Rachna Chaba, Sueyoung Lee, et al. 2011. « Phenotypic Landscape of a Bacterial Cell ». *Cell* 144 (1): 143-56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.052>.

- Nickerson, Nicholas N., Christine C. Jao, Yiming Xu, John Quinn, Elizabeth Skippington, Mary Kate Alexander, Anh Miu, et al. 2018. « A Novel Inhibitor of the LolCDE ABC Transporter Essential for Lipoprotein Trafficking in Gram-Negative Bacteria ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02151-17>.
- Oberto, Jacques. 2013. « SyntTax: A Web Server Linking Synteny to Prokaryotic Taxonomy ». *BMC Bioinformatics* 14 (janvier): 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-4>.
- Octavia, Sophie, et Ruiting Lan. 2014. « The Family Enterobacteriaceae ». In *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*, édité par Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, et Fabiano Thompson, 225-86. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1\\_167](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_167).
- Ogwang, Sam, Hoa T. Nguyen, Marissa Sherman, Saralee Bajaksouzian, Michael R. Jacobs, W. Henry Boom, Guo-Fang Zhang, et Liem Nguyen. 2011. « Bacterial Conversion of Folinic Acid Is Required for Antifolate Resistance \* ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (17): 15377-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231076>.
- Ohshima, Takayuki, Kanako Okuyama, et Masayuki Sato. 2002. « Effect of Culture Temperature on High-Voltage Pulse Sterilization of Escherichia Coli ». *Journal of Electrostatics, Selected Papers from the 2000 IEJ-ESA Joint Symposium*, 55 (3): 227-35. [https://doi.org/10.1016/S0304-3886\(01\)00206-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3886(01)00206-6).
- Olivares-Pérez, Jaime, Ahmed Eid Kholif, Saul Rojas-Hernández, Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour, Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem, Adrian Zaragoza Bastida, David Velázquez-Reynoso, et al. 2015. « Prevalence of Bovine Subclinical Mastitis, Its Etiology and Diagnosis of Antibiotic Resistance of Dairy Farms in Four Municipalities of a Tropical Region of Mexico ». *Tropical Animal Health and Production* 47 (8): 1497-1504. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0890-8>.
- Olive, Andrew J., et Christopher M. Sassetti. 2016. « Metabolic Crosstalk between Host and Pathogen: Sensing, Adapting and Competing ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (4): 221-34. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.12>.
- Oliveira, Pedro H., Marie Touchon, Jean Cury, et Eduardo P. C. Rocha. 2017. « The Chromosomal Organization of Horizontal Gene Transfer in Bacteria ». *Nature Communications* 8 (1): 841. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00808-w>.
- Orelle, Cédric, Olivier Dalmas, Philippe Gros, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2003. « The Conserved Glutamate Residue Adjacent to the Walker-B Motif Is the Catalytic Base for ATP Hydrolysis in the ATP-Binding Cassette Transporter BmrA \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 47002-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308268200>.
- Osborne, Suzanne E., Brian R. Tuinema, Mac C. Y. Mok, Pui Sai Lau, Nhat Khai Bui, Ana M. Tomljenovic-Berube, Waldemar Vollmer, Kun Zhang, Murray Junop, et Brian K. Coombes. 2012. « Characterization of DaIS, an ATP-Binding Cassette Transporter for d-Alanine, and Its Role in Pathogenesis in Salmonella Enterica\* ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (19): 15242-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348227>.
- Otto, Karen, et Thomas J. Silhavy. 2002. « Surface Sensing and Adhesion of Escherichia Coli Controlled by the Cpx-Signaling Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (4): 2287-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.042521699>.
- Paget, Mark S. 2015. « Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution ». *Biomolecules* 5 (3): 1245-65. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>.
- Pannen, Derk, Maria Fabisch, Lisa Gausling, et Karin Schnetz. 2016. « Interaction of the RcsB Response Regulator with Auxiliary Transcription Regulators in Escherichia Coli ». *The*

- Journal of Biological Chemistry* 291 (5): 2357-70.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.696815>.
- Papanastasiou, Malvina, Georgia Orfanoudaki, Marina Koukaki, Nikos Kountourakis, Marios Frantzeskos Sardis, Michalis Aivaliotis, Spyridoula Karamanou, et Anastassios Economou. 2013. « The Escherichia Coli Peripheral Inner Membrane Proteome \* ». *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (3): 599-610.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M112.024711>.
- Peter, Brian J., Javier Arsuaga, Adam M. Breier, Arkady B. Khodursky, Patrick O. Brown, et Nicholas R. Cozzarelli. 2004. « Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in Escherichia coli ». *Genome Biology* 5 (11): R87.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-11-r87>.
- Petit-Härtlein, Isabelle, Kevin Rome, Eve de Rosny, Florian Molton, Carole Duboc, Erwan Gueguen, Agnès Rodrigue, et Jacques Covès. 2015. « Biophysical and Physiological Characterization of ZraP from Escherichia Coli, the Periplasmic Accessory Protein of the Atypical ZraSR Two-Component System ». *The Biochemical Journal* 472 (2): 205-16.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20150827>.
- Petty, Nicola K., Theresa Feltwell, Derek Pickard, Simon Clare, Ana L. Toribio, Maria Fookes, Kevin Roberts, et al. 2011. « Citrobacter Rodentium Is an Unstable Pathogen Showing Evidence of Significant Genomic Flux ». *PLoS Pathogens* 7 (4): e1002018.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002018>.
- Pichoff, Sebastien, Shishen Du, et Joe Lutkenhaus. 2019. « Roles of FtsEX in Cell Division ». *Research in Microbiology, ABC systems in microorganisms*, 170 (8): 374-80.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.07.003>.
- Pogliano, J., A. S. Lynch, D. Belin, E. C. Lin, et J. Beckwith. 1997. « Regulation of Escherichia Coli Cell Envelope Proteins Involved in Protein Folding and Degradation by the Cpx Two-Component System ». *Genes & Development* 11 (9): 1169-82.  
<https://doi.org/10.1101/gad.11.9.1169>.
- Pogliano, K. J., et J. Beckwith. 1993. « The Cs Sec Mutants of Escherichia Coli Reflect the Cold Sensitivity of Protein Export Itself ». *Genetics* 133 (4): 763-73.
- Poliakov, Anton, Calum W. Russell, Lalit Ponnala, Harold J. Hoops, Qi Sun, Angela E. Douglas, et Klaas J. van Wijk. 2011. « Large-Scale Label-Free Quantitative Proteomics of the Pea Aphid-Buchnera Symbiosis ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 10 (6): M110.007039. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.007039>.
- Porter, J. R. 1976. « Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of His Discovery of Bacteria. » *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 40 (2): 260-69.
- Price, Claire E., et Arnold J. M. Driessen. 2010. « Biogenesis of Membrane Bound Respiratory Complexes in Escherichia Coli ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Molecular Chaperones and Intracellular Protein Transport*, 1803 (6): 748-66.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.019>.
- Price, Nancy L., et Tracy L. Raivio. 2009. « Characterization of the Cpx Regulon in Escherichia Coli Strain MC4100 ». *Journal of Bacteriology* 191 (6): 1798-1815.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00798-08>.
- Pristovšek, Primož, Kaushik Sengupta, Frank Löhr, Birgit Schäfer, Markus Wehland von Trebra, Heinz Rüterjans, et Frank Bernhard. 2003. « Structural Analysis of the DNA-Binding Domain of TheErwinia Amylovora RcsB Protein and Its Interaction with the RcsAB Box \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (20): 17752-59.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M301328200>.



- Procko, Erik, Megan L. O'Mara, W. F. Drew Bennett, D. Peter Tieleman, et Rachelle Gaudet. 2009. « The Mechanism of ABC Transporters: General Lessons from Structural and Functional Studies of an Antigenic Peptide Transporter ». *The FASEB Journal* 23 (5): 1287-1302. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121855>.
- Quiocho, F. A., J. C. Spurlino, et L. E. Rodseth. 1997. « Extensive Features of Tight Oligosaccharide Binding Revealed in High-Resolution Structures of the Maltodextrin Transport/Chemosensory Receptor ». *Structure (London, England: 1993)* 5 (8): 997-1015. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00253-0](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00253-0).
- Raffa, Robert G., et Tracy L. Raivio. 2002. « A Third Envelope Stress Signal Transduction Pathway in Escherichia Coli ». *Molecular Microbiology* 45 (6): 1599-1611. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03112.x>.
- Raivio, T. L., et T. J. Silhavy. 1997. « Transduction of Envelope Stress in Escherichia Coli by the Cpx Two-Component System ». *Journal of Bacteriology* 179 (24): 7724-33. <https://doi.org/10.1128/jb.179.24.7724-7733.1997>.
- Raivio, Tracy L. 2014. « Everything old is new again: An update on current research on the Cpx envelope stress response ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Protein trafficking and secretion in bacteria*, 1843 (8): 1529-41. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.018>.
- Raivio, Tracy L., Shannon K. D. Leblanc, et Nancy L. Price. 2013. « The Escherichia Coli Cpx Envelope Stress Response Regulates Genes of Diverse Function That Impact Antibiotic Resistance and Membrane Integrity ». *Journal of Bacteriology* 195 (12): 2755-67. <https://doi.org/10.1128/JB.00105-13>.
- Ramaen, Odile, Christina Sizun, Olivier Pamard, Eric Jacquet, et Jean-Yves Lallemand. 2005. « Attempts to characterize the NBD heterodimer of MRP1: transient complex formation involves Gly771 of the ABC signature sequence but does not enhance the intrinsic ATPase activity ». *Biochemical Journal* 391 (3): 481-90. <https://doi.org/10.1042/BJ20050897>.
- Ranquet, Caroline, Sandrine Ollagnier-de-Choudens, Laurent Loiseau, Frédéric Barras, et Marc Fontecave. 2007. « Cobalt Stress in Escherichia Coli. The Effect on the Iron-Sulfur Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (42): 30442-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702519200>.
- Redford, Peter, et Rodney A. Welch. 2006. « Role of Sigma E-Regulated Genes in Escherichia coli Uropathogenesis ». *Infection and Immunity* 74 (7): 4030-38. <https://doi.org/10.1128/IAI.01984-05>.
- Reimann, Sylvia A., et Alan J. Wolfe. 2011. « Exposure to Glycolytic Carbon Sources Reveals a Novel Layer of Regulation for the MalT Regulon ». *International Journal of Microbiology* 2011: 107023. <https://doi.org/10.1155/2011/107023>.
- Ren, Wenkai, Ranjith Rajendran, Yuanyuan Zhao, Bie Tan, Guoyao Wu, Fuller W. Bazer, Guoqiang Zhu, et al. 2018. « Amino Acids As Mediators of Metabolic Cross Talk between Host and Pathogen ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00319>.
- Rhodiou, Virgil A., Won Chul Suh, Gen Nonaka, Joyce West, et Carol A. Gross. 2006. « Conserved and Variable Functions of the SigmaE Stress Response in Related Genomes ». *PLoS Biology* 4 (1): e2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040002>.
- Ríos-Covián, David, Patricia Ruas-Madiedo, Abelardo Margolles, Miguel Gueimonde, Clara G. de los Reyes-Gavilán, et Nuria Salazar. 2016. « Intestinal Short Chain Fatty Acids and

- Their Link with Diet and Human Health ». *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>.
- Rolhion, Nathalie, Frédéric Antonio Carvalho, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2007. « OmpC and the  $\Sigma$ E Regulatory Pathway Are Involved in Adhesion and Invasion of the Crohn's Disease-Associated Escherichia Coli Strain LF82 ». *Molecular Microbiology* 63 (6): 1684-1700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05638.x>.
- Romanowski, Eric G., Nicholas A. Stella, John E. Romanowski, Kathleen A. Yates, Deepinder K. Dhaliwal, Anthony St. Leger, et Robert M. Q. Shanks. s. d. « The Rcs stress response system regulator GumB modulates *Serratia marcescens* induced inflammation and bacterial proliferation in a rabbit keratitis model and cytotoxicity in vitro ». *Infection and Immunity* 0 (ja): IAI.00111-21. <https://doi.org/10.1128/IAI.00111-21>.
- Rome, Kévin, Céline Borde, Raleb Taher, Julien Cayron, Christian Lesterlin, Erwan Gueguen, Eve De Rosny, et Agnès Rodrigue. 2018. « The Two-Component System ZraPSR Is a Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli* ». *Journal of Molecular Biology* 430 (24): 4971-85. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021>.
- Rowley, Gary, Michael Spector, Jan Kormanec, et Mark Roberts. 2006. « Pushing the Envelope: Extracytoplasmic Stress Responses in Bacterial Pathogens ». *Nature Reviews Microbiology* 4 (5): 383-94. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1394>.
- Royet, Kévin, Nicolas Parisot, Agnès Rodrigue, Erwan Gueguen, et Guy Condemine. 2018. « Identification by Tn-seq of *Dickeya dadantii* genes required for survival in chicory plants ». *Molecular Plant Pathology* 20 (2): 287-306. <https://doi.org/10.1111/mpp.12754>.
- Russell, A. D. 2003. « Lethal Effects of Heat on Bacterial Physiology and Structure ». *Science Progress* 86 (Pt 1-2): 115-37. <https://doi.org/10.3184/003685003783238699>.
- Sassone-Corsi, Martina, et Manuela Raffatellu. 2015. « No Vacancy: How beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (9): 4081-87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403169>.
- Schumacher, Jörg, Volker Behrends, Zhensheng Pan, Dan R. Brown, Franziska Heydenreich, Matthew R. Lewis, Mark H. Bennett, et al. 2013. « Nitrogen and Carbon Status Are Integrated at the Transcriptional Level by the Nitrogen Regulator NtrC in Vivo ». *MBio* 4 (6): e00881-00813. <https://doi.org/10.1128/mBio.00881-13>.
- Shimizu, Takeshi, Kimitoshi Ichimura, et Masatoshi Noda. 2015. « The Surface Sensor NlpE of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Contributes to Regulation of the Type III Secretion System and Flagella by the Cpx Response to Adhesion ». *Infection and Immunity*, décembre, IAI.00881-15. <https://doi.org/10.1128/IAI.00881-15>.
- Shin, Na-Ri, Tae Woong Whon, et Jin-Woo Bae. 2015. « Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota ». *Trends in Biotechnology* 33 (9): 496-503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.
- Shure, Mavis, David E. Pulleyblank, et Jerome Vinograd. 1977. « The problems of eukaryotic and prokaryotic DNA packaging and in vivo conformation posed by superhelix density heterogeneity ». *Nucleic Acids Research* 4 (5): 1183-1205.
- Silhavy, Thomas J., Daniel Kahne, et Suzanne Walker. 2010. « The Bacterial Cell Envelope ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5): a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.

- Sinensky, Michael. 1974. « Homeoviscous Adaptation—A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (2): 522-25.
- SKERMAN, V. B. D., VICKI MCGOWAN, et P. H. A.YR 1980 SNEATH. s. d. « Approved Lists of Bacterial Names ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 30 (1): 225-420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>.
- Sklar, Joseph G., Tao Wu, Daniel Kahne, et Thomas J. Silhavy. 2007. « Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli* ». *Genes & Development* 21 (19): 2473-84. <https://doi.org/10.1101/gad.1581007>.
- Skovierova, Henrieta, Gary Rowley, Bronislava Rezuchova, Dagmar Homerova, Claire Lewis, Mark Roberts, et Jan Kormanec. 2006. « Identification of the SigmaE Regulon of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium ». *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 5): 1347-59. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28744-0>.
- Slamti, Leyla, et Didier Lereclus. 2019. « The Oligopeptide ABC-Importers Are Essential Communication Channels in Gram-Positive Bacteria ». *Research in Microbiology, ABC systems in microorganisms*, 170 (8): 338-44. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.07.004>.
- Smith, Paul C, Nathan Karpowich, Linda Millen, Jonathan E Moody, Jane Rosen, Philip J Thomas, et John F Hunt. 2002. « ATP Binding to the Motor Domain from an ABC Transporter Drives Formation of a Nucleotide Sandwich Dimer ». *Molecular Cell* 10 (1): 139-49. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00576-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00576-2).
- Sohn, Jungsan, Robert A. Grant, et Robert T. Sauer. 2009. « OMP Peptides Activate the DegS Stress-Sensor Protease by a Relief of Inhibition Mechanism ». *Structure* 17 (10): 1411-21. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.07.017>.
- Soriano, Erika V., Kanagalaghatta R. Rajashankar, Jeremiah W. Hanes, Shridhar Bale, Tadhg P. Begley, et Steven E. Ealick. 2008. « Structural Similarities between Thiamin-Binding Protein and Thiaminase-I Suggest a Common Ancestor », *Biochemistry* 47 (5): 1346-57. <https://doi.org/10.1021/bi7018282>.
- Sperandeo, Paola, Rachele Cescutti, Riccardo Villa, Cristiano Di Benedetto, Daniela Candia, Gianni Dehò, et Alessandra Polissi. 2007. « Characterization of LptA and LptB, Two Essential Genes Implicated in Lipopolysaccharide Transport to the Outer Membrane of *Escherichia Coli* ». *Journal of Bacteriology* 189 (1): 244-53. <https://doi.org/10.1128/JB.01126-06>.
- Spiess, C., A. Beil, et M. Ehrmann. 1999. « A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein ». *Cell* 97 (3): 339-47. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80743-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80743-6).
- Stadtman, E. R. 1993. « Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions ». *Annual Review of Biochemistry* 62: 797-821. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.004053>.
- Stock, J. B., B. Rauch, et S. Roseman. 1977. « Periplasmic Space in *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia Coli* ». *The Journal of Biological Chemistry* 252 (21): 7850-61.
- Stocks, S. M. 2004. « Mechanism and Use of the Commercially Available Viability Stain, BacLight ». *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 61 (2): 189-95. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20069>.
- Studier, F. W., et B. A. Moffatt. 1986. « Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes ». *Journal of Molecular Biology* 189 (1): 113-30. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).

- Sueki, Anna, Frank Stein, Mikhail M. Savitski, Joel Selkrig, et Athanasios Typas. 2020. « Systematic Localization of Escherichia coli Membrane Proteins ». *mSystems* 5 (2): e00808-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00808-19>.
- Szmelcman, S, et M Hofnung. 1975. « Maltose transport in Escherichia coli K-12: involvement of the bacteriophage lambda receptor ». *Journal of Bacteriology* 124 (1): 112-18. <https://doi.org/10.1128/jb.124.1.112-118.1975>.
- Tamames, Javier. 2001. « Evolution of gene order conservation in prokaryotes ». *Genome Biology* 2 (6): research0020.1-research0020.11.
- Teixeira-Gomes, Ana P., Axel Cloeckaert, Guy Bézard, Raúl A. Bowden, Gérard Dubray, et Michel S. Zygmunt. 1997. « Identification and Characterization of Brucella Ovis Immunogenic Proteins Using Two-Dimensional Electrophoresis and Immunoblotting ». *ELECTROPHORESIS* 18 (8): 1491-97. <https://doi.org/10.1002/elps.1150180824>.
- Teixeira-Gomes, Ana P., Axel Cloeckaert, et Michel S. Zygmunt. 2000. « Characterization of Heat, Oxidative, and Acid Stress Responses in Brucella melitensis ». *Infection and Immunity* 68 (5): 2954-61. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.2954-2961.2000>.
- Thomas, Christoph, Stephen G. Aller, Konstantinos Beis, Elisabeth P. Carpenter, Geoffrey Chang, Lei Chen, Elie Dassa, et al. 2020. « Structural and Functional Diversity Calls for a New Classification of ABC Transporters ». *FEBS Letters* 594 (23): 3767-75. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13935>.
- Thomason, Lynn C., Nina Costantino, et Donald L. Court. 2007. « E. Coli Genome Manipulation by P1 Transduction ». *Current Protocols in Molecular Biology* 79 (1): 1.17.1-1.17.8. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0117s79>.
- Thomassin, Jenny-Lee, Natalia Giannakopoulou, Lei Zhu, Jeremy Gross, Kristiana Salmon, Jean-Mathieu Leclerc, France Daigle, Hervé Le Moual, et Samantha Gruenheid. 2015. « The CpxRA Two-Component System Is Essential for Citrobacter rodentium Virulence ». *Infection and Immunity* 83 (5): 1919-28. <https://doi.org/10.1128/IAI.00194-15>.
- Thomassin, Jenny-Lee, Jean-Mathieu Leclerc, Natalia Giannakopoulou, Lei Zhu, Kristiana Salmon, Andrea Portt, France Daigle, Hervé Le Moual, et Samantha Gruenheid. 2017. « Systematic Analysis of Two-Component Systems in Citrobacter Rodentium Reveals Positive and Negative Roles in Virulence ». *Infection and Immunity* 85 (2): e00654-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00654-16>.
- Thornton, Brenda, et Chhandak Basu. 2011. « Real-Time PCR (QPCR) Primer Design Using Free Online Software ». *Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (2): 145-54. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.
- Tirado-Lee, Leidamarie, Allen Lee, Douglas C. Rees, et Heather W. Pinkett. 2011. « Classification of a Haemophilus Influenzae ABC Transporter HI1470/71 through Its Cognate Molybdate Periplasmic Binding Protein, Mola ». *Structure* 19 (11): 1701-10. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.10.004>.
- Tobe, T., et C. Sasakawa. 2001. « Role of Bundle-Forming Pilus of Enteropathogenic Escherichia Coli in Host Cell Adherence and in Microcolony Development ». *Cellular Microbiology* 3 (9): 579-85. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00136.x>.
- Tobe, Toru, Hiroki Ando, Hiroko Ishikawa, Hiroyuki Abe, Kosuke Tashiro, Tetsuya Hayashi, Satoru Kuhara, et Nakaba Sugimoto. 2005. « Dual Regulatory Pathways Integrating the RcsC–RcsD–RcsB Signalling System Control Enterohaemorrhagic Escherichia Coli Pathogenicity ». *Molecular Microbiology* 58 (1): 320-33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04828.x>.

- Tschauner, Karolin, Patrick Hörnschemeyer, Volker Steffen Müller, et Sabine Hunke. 2014. « Dynamic Interaction between the CpxA Sensor Kinase and the Periplasmic Accessory Protein CpxP Mediates Signal Recognition in *E. Coli* ». *PloS One* 9 (9): e107383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107383>.
- Tsubery, Haim, Itzhak Ofek, Sofia Cohen, Miriam Eisenstein, et Mati Fridkin. 2002. « Modulation of the Hydrophobic Domain of Polymyxin B Nonapeptide: Effect on Outer-Membrane Permeabilization and Lipopolysaccharide Neutralization ». *Molecular Pharmacology* 62 (5): 1036-42. <https://doi.org/10.1124/mol.62.5.1036>.
- Valko, M., H. Morris, et M. T. D. Cronin. 2005. « Metals, Toxicity and Oxidative Stress ». *Current Medicinal Chemistry* 12 (10): 1161-1208.
- Van Gijsegem, Frédérique, Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat, Yvan Kraepiel, Ewa Lojkowska, Lucy N. Moleleki, Vladimir Gorshkov, et Iris Yedidia. 2021. « Molecular Interactions of *Pectobacterium* and *Dickeya* with Plants ». In *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*, édité par Frédérique Van Gijsegem, Jan M. van der Wolf, et Ian K. Toth, 85-147. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_4).
- Van Houdt, Rob, et Chris W. Michiels. 2005. « Role of Bacterial Cell Surface Structures in *Escherichia Coli* Biofilm Formation ». *Research in Microbiology* 156 (5-6): 626-33. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.005>.
- Venkatesh, G. Raja, Frant Carlot Kembou Koungni, Andreas Paukner, Thomas Stratmann, Birgit Blissenbach, et Karin Schnetz. 2010. « BglJ-RcsB Heterodimers Relieve Repression of the *Escherichia coli* bgl Operon by H-NS ». *Journal of Bacteriology* 192 (24): 6456-64. <https://doi.org/10.1128/JB.00807-10>.
- Vergalli, Julia, Estelle Dumont, Jelena Pajović, Bertrand Cinquin, Laure Maigre, Muriel Masi, Matthieu Réfrégiers, et Jean-Marie Pagés. 2018. « Spectrofluorimetric Quantification of Antibiotic Drug Concentration in Bacterial Cells for the Characterization of Translocation across Bacterial Membranes ». *Nature Protocols* 13 (6): 1348-61. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.036>.
- Vetter, I. R., et A. Wittinghofer. 1999. « Nucleoside Triphosphate-Binding Proteins: Different Scaffolds to Achieve Phosphoryl Transfer ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 32 (1): 1-56. <https://doi.org/10.1017/s0033583599003480>.
- Villeger, S., A. Ricard, et M. Sixou. 2004. « Sterilization of Dental Bacteria in a N2-O2 Microwaves Post-Discharge, at Low Pressure: Influence of Temperature ». *The European Physical Journal Applied Physics* 26 (3): 203-8. <https://doi.org/10.1051/epjap:2004034>.
- Vogel, Jörg, et Kai Papenfort. 2006. « Small Non-Coding RNAs and the Bacterial Outer Membrane ». *Current Opinion in Microbiology* 9 (6): 605-11. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.006>.
- Vogelstein, B., et D. Gillespie. 1979. « Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (2): 615-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.615>.
- Vogt, Stefanie L., Anna Z. Nevesinjac, Romney M. Humphries, Michael S. Donnenberg, Glen D. Armstrong, et Tracy L. Raivio. 2010. « The Cpx Envelope Stress Response Both Facilitates and Inhibits Elaboration of the Enteropathogenic *Escherichia Coli* Bundle-Forming Pilus ». *Molecular Microbiology* 76 (5): 1095-1110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07145.x>.

- Vogt, Stefanie L., Roland Scholz, Yun Peng, Randi L. Guest, Nichollas E. Scott, Sarah E. Woodward, Leonard J. Foster, Tracy L. Raivio, et B. Brett Finlay. 2019. « Characterization of the *Citrobacter Rodentium* Cpx Regulon and Its Role in Host Infection ». *Molecular Microbiology* 111 (3): 700-716. <https://doi.org/10.1111/mmi.14182>.
- Waldron, Kevin J., et Nigel J. Robinson. 2009. « How Do Bacterial Cells Ensure That Metalloproteins Get the Correct Metal? » *Nature Reviews. Microbiology* 7 (1): 25-35. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2057>.
- Wall, Erin A., Nadim Majdalani, et Susan Gottesman. 2020. « IgaA Negatively Regulates the Rcs Phosphorelay via Contact with the RcsD Phosphotransfer Protein ». *PLOS Genetics* 16 (7): e1008610. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008610>.
- Walsh, Nathan P, Benjamin M Alba, Baundauna Bose, Carol A Gross, et Robert T Sauer. 2003. « OMP Peptide Signals Initiate the Envelope-Stress Response by Activating DegS Protease via Relief of Inhibition Mediated by Its PDZ Domain ». *Cell* 113 (1): 61-71. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00203-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00203-4).
- Walshaw, D. L., et P. S. Poole. 1996. « The General L-Amino Acid Permease of *Rhizobium Leguminosarum* Is an ABC Uptake System That Also Influences Efflux of Solutes ». *Molecular Microbiology* 21 (6): 1239-52. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00078.x>.
- Wang, Da, et Carol A Fierke. 2013. « The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli* ». *Metallomics: integrated biometal science* 5 (4): 372-83. <https://doi.org/10.1039/c3mt20217h>.
- Wang, Dongping, Schuyler S. Korban, et Youfu Zhao. 2009. « The Rcs Phosphorelay System Is Essential for Pathogenicity in *Erwinia Amylovora* ». *Molecular Plant Pathology* 10 (2): 277-90. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00531.x>.
- Wang, Dongping, Mingsheng Qi, Bernarda Calla, Schuyler S. Korban, Steven J. Clough, Peter J. A. Cock, George W. Sundin, Ian Toth, et Youfu Zhao. 2012. « Genome-Wide Identification of Genes Regulated by the Rcs Phosphorelay System in *Erwinia amylovora* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 25 (1): 6-17. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0207>.
- Wang, Guangshun. 2014. « Human Antimicrobial Peptides and Proteins ». *Pharmaceuticals* 7 (5): 545-94. <https://doi.org/10.3390/ph7050545>.
- Wang, Guangshun, Biswajit Mishra, Raquel F. Eband, et Richard M. Eband. 2014. « High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments ». *Biochimica et biophysica acta* 1838 (9): 2160-72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.016>.
- Wang, Jin. 2004. « The Complex Kinetics of Protein Folding in Wide Temperature Ranges ». *Biophysical Journal* 87 (4): 2164-71. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.042812>.
- Warriner, Keith, et Azadeh Namvar. 2010. « The Tricks Learnt by Human Enteric Pathogens from Phytopathogens to Persist within the Plant Environment ». *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology – Plant biotechnology*, 21 (2): 131-36. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.004>.
- Weber, Arnim, et Kirsten Jung. 2002. « Profiling Early Osmostress-Dependent Gene Expression in *Escherichia coli* Using DNA Macroarrays ». *Journal of Bacteriology* 184 (19): 5502-7. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5502-5507.2002>.
- Weel, Laura van der, Karel S. As, Wijnb J. C. Dekker, Lieke van den Eijnden, Ward van Helmond, Christo Schiphorst, Wilfred R. Hagen, et Peter-Leon Hagedoorn. 2019. « ZraP, the Most



- Prominent Zinc Protein under Zinc Stress Conditions Has No Direct Role in in-Vivo Zinc Tolerance in Escherichia Coli ». *Journal of Inorganic Biochemistry* 192 (mars): 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.12.013>.
- Winer, Jane, Christopher Kwang S. Jung, Irene Shackel, et P. Mickey Williams. 1999. « Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes in Vitro ». *Analytical Biochemistry* 270 (1): 41-49. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4085>.
- Withman, Benjamin, Thusitha S. Gunasekera, Pavani Beesetty, Richard Agans, et Oleg Paliy. 2013. « Transcriptional Responses of Uropathogenic Escherichia coli to Increased Environmental Osmolality Caused by Salt or Urea ». *Infection and Immunity* 81 (1): 80-89. <https://doi.org/10.1128/IAI.01049-12>.
- Wood, Janet M. 2015. « Bacterial responses to osmotic challenges ». *Journal of General Physiology* 145 (5): 381-88. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411296>.
- Woodcock, D M, P J Crowther, J Doherty, S Jefferson, E DeCruz, M Noyer-Weidner, S S Smith, M Z Michael, et M W Graham. 1989. « Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. » *Nucleic Acids Research* 17 (9): 3469-78.
- Wullt, Björn, Göran Bergsten, Hugh Connell, Piotr Röllano, Negash Gebretsadik, Richard Hull, et Catharina Svanborg. 2000. « P Fimbriae Enhance the Early Establishment of Escherichia Coli in the Human Urinary Tract ». *Molecular Microbiology* 38 (3): 456-64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02165.x>.
- Yamaguchi, Saori, Dylan A. Reid, Eli Rothenberg, et Andrew J. Darwin. 2013. « Changes in Psp protein binding partners, localization and behavior upon activation of the Yersinia enterocolitica phage shock protein response ». *Molecular microbiology* 87 (3): 656-71. <https://doi.org/10.1111/mmi.12122>.
- Yamamoto, Kaneyoshi, et Akira Ishihama. 2006. « Characterization of Copper-Inducible Promoters Regulated by CpxA/CpxR in Escherichia Coli ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (7): 1688-95. <https://doi.org/10.1271/bbb.60024>.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, et J. Messing. 1985. « Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and PUC19 Vectors ». *Gene* 33 (1): 103-19. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90120-9).
- Young, J. M., et D.-C. Park. 2007. « Relationships of Plant Pathogenic Enterobacteria Based on Partial AtpD, CarA, and RecA as Individual and Concatenated Nucleotide and Peptide Sequences ». *Systematic and Applied Microbiology* 30 (5): 343-54. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.03.002>.
- Zhao, Changguang, Na Tang, Yanping Wu, Yuanyuan Zhang, Zhen Wu, Wanmeng Li, Xiuhui Qin, Jixun Zhao, et Guozhong Zhang. 2012. « First Reported Fatal Morganella Morganii Infections in Chickens ». *Veterinary Microbiology* 156 (3-4): 452-55. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.021>.
- Zhao, Qin, Chengcheng Wang, Chengyuan Wang, Hui Guo, Zhihao Bao, Minhua Zhang, et Peng Zhang. 2015. « Structures of FoIT in Substrate-Bound and Substrate-Released Conformations Reveal a Gating Mechanism for ECF Transporters ». *Nature Communications* 6 (1): 7661. <https://doi.org/10.1038/ncomms8661>.
- Zhou, Lu, Xiang-He Lei, Barry R. Bochner, et Barry L. Wanner. 2003. « Phenotype Microarray Analysis of Escherichia Coli K-12 Mutants with Deletions of All Two-Component

Systems ». *Journal of Bacteriology* 185 (16): 4956-72.  
<https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4956-4972.2003>.

---

# Annexes

---

➤ Posters :

**- A novel envelope stress response that contributes to intrinsic antibiotic tolerance in *Escherichia coli***

*Céline Borde \**, *Kevin Rome \**, *Julien Cayron*, *Erwan Gueguen*, *Cristian Lesterlin*, *Eve De Rosny*, *Agnès Rodrigue*.

Poster présenté lors de l'école thématique de microbiologie moléculaire à Carry-le-rouet (France) en octobre 2018

**- Different regulation and function of an ABC transporter in two Enterobacteria.**

*Céline Borde*, *Virginie Gueguen-Chaignon*, *Géraldine Effantin*, *Julie Ulmann*, *Severine Balmand*, *Caroline Romestaing*, *Thierry Marchal*, *Agnès Rodrigue*.

Poster présenté lors de EMBO Workshop Bacterial networks (BacNet19) à Sant Feliu de Guíxols (Espagne) en septembre 2019.

**- Comprendre la réponse au stress médiée par le zinc et Zra dans la virulence des bactéries à Gram négatif.**

*Céline Borde*, *Julie Ulmann*, *Séverine Balmand*, *Caroline Romestaing*, *Agnès Rodrigue*.

Poster présenté lors de la journée de la FR BioEEnViS à Lyon en janvier 2019.

**- Envelope stress response, how ZraPSR protects bacteria from antimicrobials.**

*Céline Borde \**, *Kevin Rome \**, *Julien Cayron*, *Christian Lesterlin*, *Erwan Gueguen*, *Agnès Rodrigue*.

Poster présenté lors de EMBO Workshop Bacterial networks (BacNet19) à Sant Feliu de Guíxols (Espagne) en septembre 2019.

Céline Borde<sup>1\*</sup>, Kevin Rome<sup>1\*</sup>, Julien Cayron<sup>3</sup>, Erwan Gueguen<sup>1</sup>, Christian Lesterlin<sup>3</sup>, Eve De Rosny<sup>2</sup>, Agnès Rodrigue<sup>1</sup>

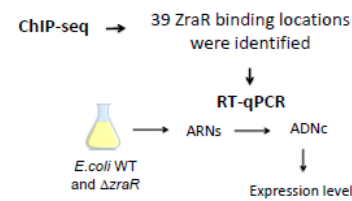
<sup>1</sup> MAP, UMR 5240, Villeurbanne, France. <sup>2</sup> IBS, UMR 5075, Grenoble, France. <sup>3</sup> IBCP

During their lifecycle, bacteria are exposed to continuous changes in their environment, some of which are stressful and can damage the cell envelope. To deal with this problem, bacteria have evolved systems collectively called « Envelope Stress Response » or ESR, dedicated to the detection and repair of damaged components.

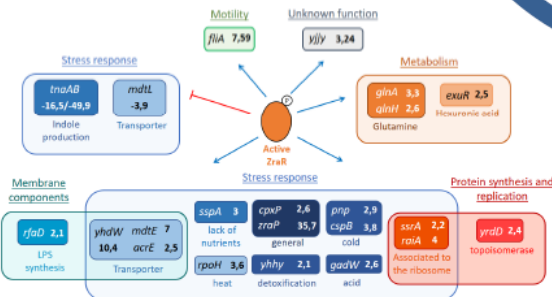
The *E. coli* ZraPSR system is composed of a two component system ZraSR that comprises a membrane associated sensor kinase ZraS, a cytoplasmic response regulator ZraR and a periplasmic protein ZraP (Fig 1). The expression of *zraP* and *zraSR* is induced by Zn<sup>2+</sup> through the zraSR phosphorelay, although it is not involved in zinc resistance in *E. coli* (Petit-härtlein *et al.*, 2015). Interestingly, we previously showed that ZraP displays chaperone properties and is a repressor of the expression of the ZraP-SR system (Petit-härtlein *et al.*, 2015). Moreover, the deletion of *zraP* in *S. typhimurium* impaired its resistance to polymyxin B, a cationic antimicrobial peptide (Appia-ayme *et al.*, 2012) suggesting that it may be involved in biocide resistance mechanisms.

Here, we have investigated the function of ZraP-SR in antimicrobial resistance and characterized the regulon of ZraR in *E. coli*. We show that ZraP and ZraSR are important to maintain membrane integrity in the presence of biocides targeting the envelope, suggesting that Zra is a novel ESR. We finally demonstrate, using ChIP-Seq, that ZraR controls a regulon of genes of diverse functions that may be critical to maintain envelope integrity and cell survival under stressful conditions.

### 3. ZraR orchestrates a complex cellular network



A total of 22 genes or operons showed significantly different expression between two strains



### Introduction

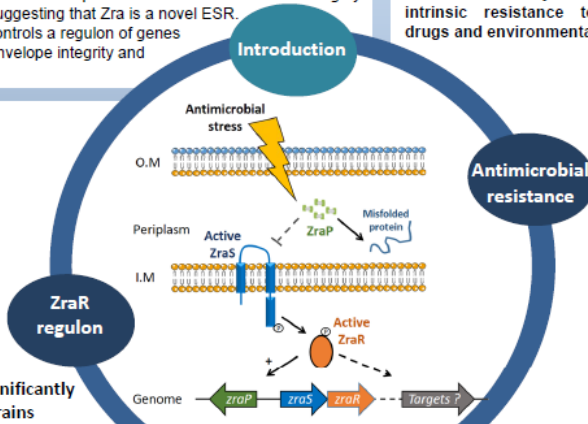


Fig 1 : ZraPSR signaling pathway

**Fig 4 : The ZraR regulon.** Genes regulated by ZraR were grouped into categories according to their cellular function. The fold change, the ratio of gene expression of strain WT to strain  $\Delta zraR$ , is indicated for each gene.

ZraR activates the expression of 20 genes and represses the expression of 2 genes

ZraR acts on different essential cellular functions: metabolism, mobility, basic cell cycle functions, stress response and an unknown function.

Zra system has a multifactorial action

The ZraR regulon shows little overlap with CpxR, PspF and  $\sigma E$ .

Although these systems have a common role in responding to stress, they do not regulate the same targets. Their multiplicity in the bacteria can be explained by their essential and complementary actions.

### Fig 5 : Common response mechanisms between ZraR and the other ESRs.

Regulon comparison of the ZraR, CpxR, PspF and  $\sigma E$  was performed by compiling our qRT-PCR results and transcriptomic data published by S. Bury-Moné, *et al.* Common TUs between ZraR and at least one other regulator are displayed in blue for induced TUs or in red for repressed TUs.

### Conclusion

We show that the deletion of *zra* confers susceptibility to biocides targeting different cellular mechanisms: protein synthesis (tetracycline, puromycin), DNA synthesis (lomefloxacin) or structures of the bacterial envelope (benzethonium chloride, domiphen bromide, polymyxin B, ampicillin, mecillinam, amoxicillin). In addition, The Live-Dead microscopy experiments reveal that in the presence of antimicrobials (polymyxin B, benzethonium chloride) that cause a defect in membrane integrity, the  $\Delta zraR$  and  $\Delta zraP$  mutants have a more pronounced loss of membrane integrity than the WT strain.

To understand how this system act in stress response, the ZraR regulon was studied. The analysis of the regulon shows that the majority of ZraR-activated genes encode stress response proteins (chaperones, detoxification enzymes, stress response regulators, transporters). In addition to these elements, we note that ZraR activates the expression of important enzymes for the implementation of LPS (RafD). All these observations could explain the observed susceptibility phenotypes of  $\Delta zra$  mutants to some antimicrobials targeting the envelope. The activation of repair and envelope synthesis genes by ZraR could contribute to recover cell equilibrium in the presence of stress.

In conclusion, we have shown that ZraPSR helps maintaining envelope integrity. Some of the Zra features are common with other ESR systems; it allows us to propose that the Zra system is a novel ESR conserved among Proteobacteria.

### 1. ZraPSR are involved in antibiotic and environmental stresses resistance

$\Delta zraR$  and  $\Delta zraP$  mutants are sensitive to several antibiotics

$\Delta zraR$  and  $\Delta zraP$  mutants are sensitive to acid stress and osmotic stress.

ZraP is not the only effector of the pathway

The ZraPSR system confers intrinsic resistance to several drugs and environmental stresses

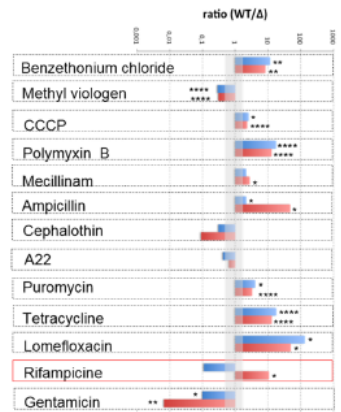


Fig 2 : Relative survival rate of the  $\Delta zraP$  or  $\Delta zraR$  mutants, compared to the wild type strain. \* p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,01; \*\*\* p  $\leq$  0,001; \*\*\*\* p  $\leq$  0,0001. Student's t test

Condition	Stress	Survival Ratio (WT/ $\Delta zraP$ )	Survival Ratio (WT/ $\Delta zraR$ )
Malic acid	pH	8,97 ****	8,20 ****
Bile salts	Membrane	2,42 *	1,01
Indole	Membrane	1,44	1,46
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidative	1,05	1,21
NaCl	Osmotic	1,60 *	1,78 *

Tab 1 : Sensitivity of the  $\Delta zraP$  and  $\Delta zraR$  mutants to environmental stresses. Survival ratio of the mutant ( $\Delta zraP$  or  $\Delta zraR$ ) were calculated as the ratio of survival percentages (WT/mutant).

### 2. ZraPSR are important for membrane integrity in the presence of membrane targeting biocides

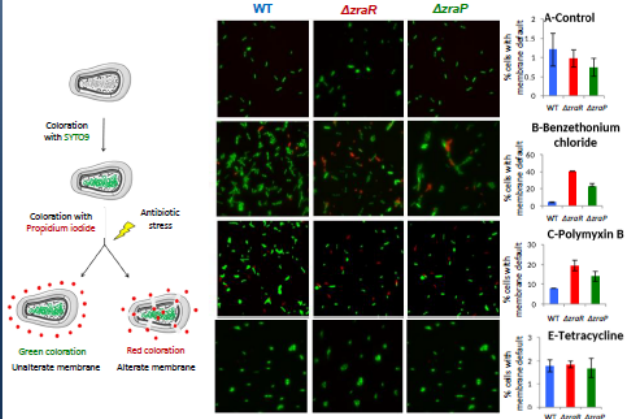


Fig 3 : Visualization of membrane default of the  $\Delta zraP$ ,  $\Delta zraR$  mutants and WT strain in the presence of antibiotics. Fluorescence microscopy of cells stained with Syto9 and propidium iodide after exposure to drugs. More than 600 cells were counted. Representative fields are shown. Right panels (A-E-C-D): %number of red cells/ total number of cells.

In the presence of drugs that target the envelope (polymyxin B and benzethonium chloride), the  $\Delta zra$  mutants displayed significantly more red-labelled cells than WT, showing that their membrane integrity was more affected.

In the presence of tetracycline, which targets translation, no significant differences were obtained between the  $\Delta zra$  mutants and the WT strain.

This highlights the importance of the Zra system for envelope maintenance.

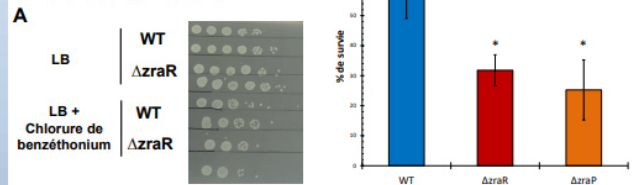


L'enveloppe bactérienne, structure la plus externe, est essentielle à l'intégrité cellulaire. Des systèmes de Réponse au Stress de l'Enveloppe ou ESR sont spécialisés dans la détection des dommages et leur réparation. Récemment nous avons découvert que le système à deux-composants Zra est un nouvel ESR essentiel à l'antibiorésistance (Rome K et al 2018). Beaucoup d'antibiotiques, qu'ils ciblent ou non la paroi cellulaire, génèrent un stress de l'enveloppe. La stratégie que nous développons est d'affaiblir les souches pathogènes en affectant leur capacité à réparer les enveloppes endommagées. Le but du projet est de décrypter la voie de signalisation des composants ZraP-ZraSR, en utilisant des approches combinées, afin de valider le système Zra comme un nouvel élément, crucial pour la croissance, la virulence et la résistance aux antibiotiques des bactéries. Cela permettra d'établir les bases pour la conception d'inhibiteurs.

Dans ce contexte, nos résultats récents montrent que le système à deux composants atypique appelé Zra pour « zinc resistance associated » est un nouvel ESR qui fait le lien entre la susceptibilité aux antibiotiques, la réparation et le maintien de l'enveloppe bactérienne via la détection du zinc. Ce lien doit être établi de façon claire. Nos résultats suggèrent que des dommages de l'enveloppe provoquent un afflux de zinc dans le périplasme de telle sorte que le zinc est le signal vrai qui active le système de réponse au stress Zra. Les métaux de transition et en particulier le Zn sont de plus en plus reconnus comme jouant des rôles majeurs à l'interface bactérie/hôte. La séquestration ou la concentration du Zn sont des mécanismes importants de l'immunité innée. Ce projet devrait fournir un des premiers exemples sur la façon dont les bactéries utilisent la signalisation par le Zn pour échapper aux défenses de l'hôte et devrait étendre nos connaissances sur les interactions bactéries/hôte et sur la virulence bactérienne. Dans le présent projet les connaissances acquises sur *E. coli* sont étendues au modèle de pathogène murin, *Citrobacter rodentium*.

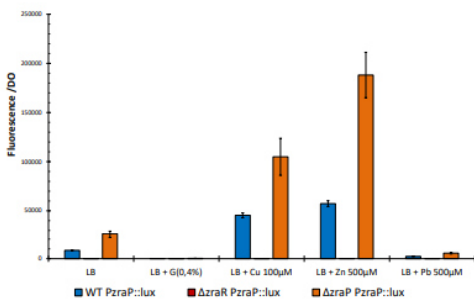
## 1. ZraPSR est impliqué dans la résistance aux antimicrobiens chez *C. rodentium*

Des mutations dans *zraP* ou *zraSR* affectent la survie des bactéries en présence d'antimicrobiens ciblant l'enveloppe :  
- Polymyxine B  
- Chlorure de benzéthonium



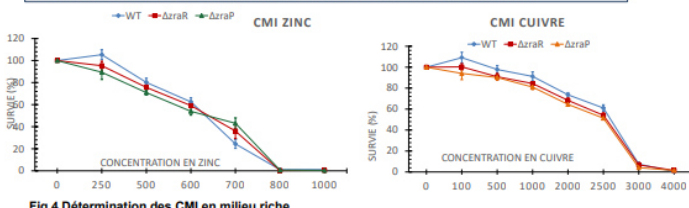
**Fig 2 :** A-CMI en présence de chlorure de benzéthonium. B-Relative survival rate of the ΔzraP or ΔzraR mutants, compared to the wild type strain. \* p ≤ 0,05, Student's t test

## 2. Le zinc est le signal de stress – ZraP est un répresseur de ZraPSR



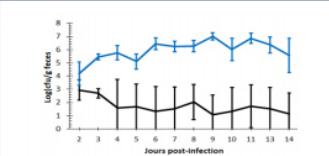
**Fig 3** profil d'induction de *zraP* dans des mutants ΔzraP or ΔzraR et en présence de cations divalents (des résultats identiques sont obtenus avec la fusion *zraS::lux*)

## 3. Le système Zra n'est pas impliqué dans l'homeostasie des métaux

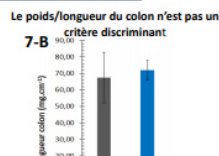
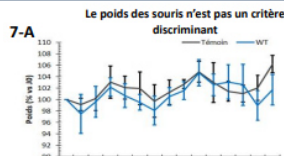


**Fig 4** Détermination des CMI en milieu riche

De façon similaire à *E. coli*, le zinc induit l'expression de *zraP*. Le Zn constitue un signal de stress. ZraP exerce un retro-contrôle négatif sur l'expression du système Zra.



**Fig. 6:** Suivi du nombre de bactéries au cours de temps post-infection sur milieu Mc Conkey sorbitol

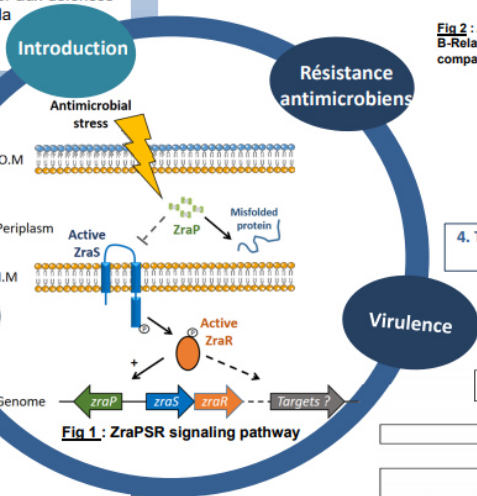


**Fig. 7:** détermination d'un score de pathologie

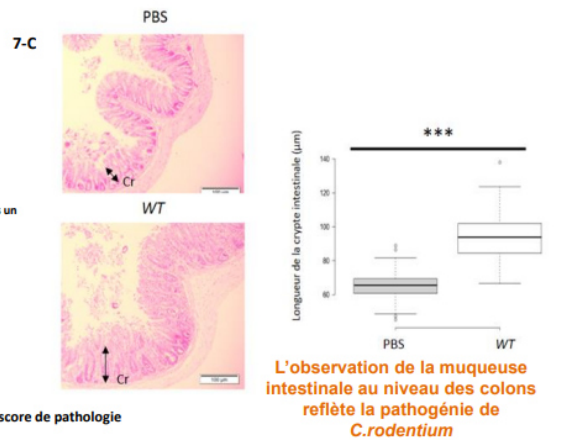
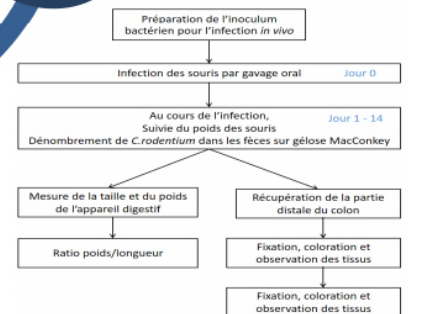
## Conclusion

Le système ZraP-SR est un nouvel ESR (Envelope Stress response) découvert chez *E. coli*. Il participe au maintien de l'intégrité membranaire par des mécanismes restant à découvrir. Ici nous avons transposé l'étude de ce système chez la bactérie *C. rodentium*. Ce pathogène, murin uniquement, reproduit le processus infectieux des *E. coli* pathogènes pour l'homme (EHEC, EPEC). Ce modèle nous permet donc d'évaluer le rôle de *zra* dans la virulence des bactéries à Gram négatif.

Nous montrons que *zra* est important pour la résistance intrinsèque de *C. rodentium* à certains antimicrobiens, en particulier ceux ciblant l'enveloppe bactérienne, confirmant le rôle d'ESR chez *C. rodentium*. Comme *E. coli*, *zra* répond à la présence de Zn dans le milieu de culture, confirmant que ce métal est le signal de stress perçu *in vivo*. En effet, la délétion de *zra* n'entraîne pas de sensibilité accrue au Zn. Enfin, nous avons mis au point un protocole d'infection des souris par *C. rodentium*. Le suivi du nombre de bactéries post-infection montre qu'il est possible de faire une numération directe des bactéries dans les fèces. De façon intéressante, l'observation microscopique de la muqueuse des colons atteste d'une augmentation de son épaisseur quand la souche sauvage a été inoculée. Cette observation est donc un bon critère d'évaluation du pouvoir pathogène de la bactérie. Ces expériences préliminaires vont nous permettre d'évaluer le pouvoir pathogène des mutants *zra*, ainsi que de certains genes régulés par ZraR.



## 4. Tests de virulence de *C. rodentium* sur la souris





Border C<sup>1</sup>, Gueguen-chaignon V<sup>2</sup>, Effantin G<sup>1</sup>, Ulmann J<sup>3</sup>, Balmand S<sup>4</sup>, Romestaing C<sup>3</sup>, Marchal T<sup>5</sup>, Rodrigue A<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MAP, UMR 5240, Villeurbanne, France. <sup>2</sup> Protein Science Facility, IBCP, Lyon, France. <sup>3</sup> Animalerie dubois, Villeurbanne, France. <sup>4</sup> BF2i, UMR203, Villeurbanne, France. <sup>5</sup> UPSP ICE 2011.03.101, Marcy-l'Étoile, France.

## INTRODUCTION

The ATP-binding cassette (ABC) transporters play a role in many processes in cells, from prokaryotes to humans. Bacteria commonly employ ABC transporters for substrate exchange with the environment. They can bind a wide variety of ligands, including cations, amino acids and polypeptides. Although ABC transporters are well annotated in bacterial genomes, their substrate specificity remains difficult to predict (1).

Among them, the system Yhd is predicted to be a putative polar amino acid transporter (1). It is composed of four components: a periplasmic substrate binding protein (SBP), YhdW; two transmembrane proteins YhdXY, and a cytoplasmic ATPase, YhdZ (Fig. 1). This ABC transporter has never been investigated. However recently it has been identified in the regulon of a two-component system (TCS), ZraPSR. This system is an ESR pathway (Envelope Stress Response), activated by a variety of stresses including antimicrobial agents that in turn activates the transcription of more than 20 genes that contribute to the repair of challenged cells (2).

In the present work we investigated the conservation of the YhdW-Z transporter, its regulation and its role in two enterobacteria *E.coli* and *C.rodentium*, a mouse pathogen in order to depict its function.

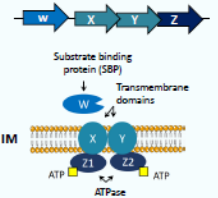
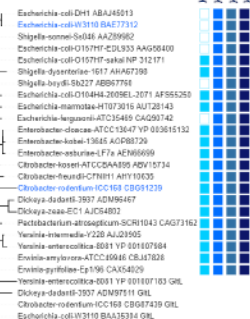


Figure 1 : YhdWXYZ transporter

## RESULTS

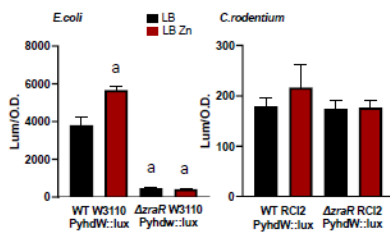
### CONSERVATION OF YhdWXYZ

**Figure 2 : Phylogeny of the ATPase, YhdZ, in enterobacteriaceae**  
The tree was constructed with PhyML (LG) using a protein alignment of 23 sequences. The tree was rooted using sequences of another related ATPase, GltA, as outgroup. Next to each bacterium, the presence or absence of the transporter's proteins is symbolized by a filled (■) or empty square (□).



YhdWXYZ transporter are orthologs in *C.rodentium* and *E. coli* but in *E.coli*, yhdW is a pseudogene and the SBP is not present.

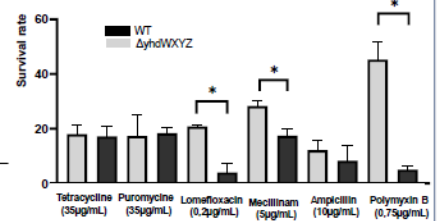
### STRESS RESPONSE



**Figure 3 : Expression of yhdW in *E.coli* and *C.rodentium* strains under the control of ZraSR**  
The expression of yhdW was measured using lux fusions. The bacteria were grown in rich medium, LB, supplemented or not with zinc (Zn), 500µM. The values represent the maximum of fluorescence over O.D. 600 nm recorded at 37 °C. Statistical analyses (Mann-whitney test) were carried out with (a) denotes p<0.05. N=4

In *E.coli* yhdWXYZ is upregulated by the TCS ZraPSR, but not in *C.rodentium*.

ZraPSR contributes to the adaptation of bacteria to antibiotic stresses (2).  
Is YhdWXYZ involved in antibiotic response?

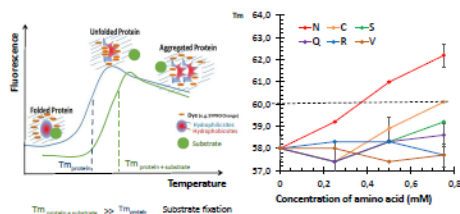


**Figure 4 : Survival percentages in the presence of different antibiotics for *E.coli* WT and  $\Delta$ yhdWXYZ strains.**  
Statistical analyses (wilcoxon test) were carried out (\*, p<0.05). N = 4

Deletion of yhdW-Z induced a greater sensitivity to the antibiotics, polymyxin B, mecillinam and lomefloxacin. In *E. coli*, YhdWXYZ is one of the mediators of ZraPSR response to antibiotics.

### AMINO ACID IMPORTER

YhdW-Z is predicted to be a polar amino acid transporter. Is YhdWXYZ implicated in amino acid transport?  
Using a thermal shift assay (TSA), the ligand specificity of the SBP, YhdW, was screened.

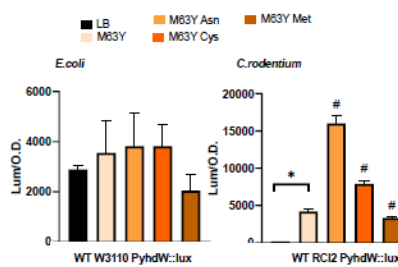


**Figure 5 : Fluorescence thermal shift assay to determine the YhdW binding substrate.**

(A) The TSA principle. When the temperature increases, the protein unfolds and these hydrophobic regions are exposed, the dye can bind to them, resulting in an increase in fluorescence. A significant difference in melting temperature (Tm) denotes an increased thermal stability and substrate binding. (B) Purified YhdW-SBP (2.5µM) was incubated with 0.25mM, 0.5mM or 0.75mM of amino acids. 20 amino acids were tested, only significant results are represented. Tm were monitored based on fluorescence of the indicator dye SyPro Orange. Dashed line indicates the 2 °C cut off for positivity; (n = 3).

The thermal stability of the protein increases proportionally with the concentration of asparagine

YhdW binds asparagine



**Figure 6 : Induction profile of yhdW in *E.coli* and *C.rodentium* strains in the presence of amino acids**

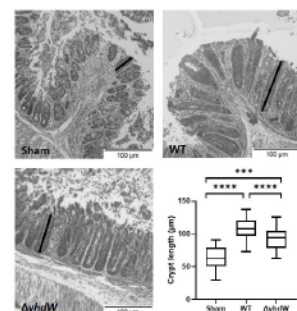
The bacteria were grown in, LB; minimal medium with glycerol 0.2% (M63Y); supplemented or not with asparagine 2mM (Asn); 2mM cysteine (Cys), or methionine 2mM (Met). The values represent the maximum of fluorescence over O.D. 600 nm recorded at 37 °C. Statistical analyses (Mann-whitney test) were carried out with: \* denotes p<0,05 and # denotes p<0,05 compared to M63Y condition. N = 4

In *C.rodentium*, YhdWXYZ is upregulated in minimal medium and even more in the presence of asparagine but not in *E.coli*.

### IMPORTANCE IN THE HOST-PATHOGEN RELATIONSHIP

Recent discoveries revealed that some amino acids, such as arginine, asparagine and tryptophan, are key elements in the competition between the host and the pathogen (3).

By transporting asparagine, is Yhd involved in the infection capacity of *C.rodentium* ?



**Figure 6 : Histological analysis of infected mice 15 days after infection.** Groups of four mice were treated with PBS (A), *C.rodentium* WT (B) or *C.rodentium*  $\Delta$ yhdW (C). Results were quantified by measuring 10 well-oriented colonic crypts per sample (D). Statistical analyses (wilcoxon test) were carried out (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001 and \*\*\*\*, p<0.0001)

An infection of *C.rodentium* results in colonic crypt hyperplasia. The deletion of yhdW decreases significantly this effect compared to infection with a WT strain.

YhdWXYZ transporter contributes to pathogenicity.

## CONCLUSION

The ABC transporter, YhdWXYZ, is conserved in some enterobacteria including *C.rodentium* and *E.coli* but its function remains unknown. In *E.coli*, the operon yhdWXYZ is regulated by a two component system (TCS), ZraPSR. This TCS by regulating genes expression contributes to the adaptation of bacteria to many stresses (2). Interestingly, deletion of yhdW-Z induced a greater sensitivity to the antibiotics, polymyxin B, mecillinam and lomefloxacin. In *E. coli*, YhdWXYZ is thus the one of the mediators of ZraPSR response to antibiotics. Its mechanism of action remains to be elucidated.

On the opposite, in the mouse pathogen, *C.rodentium*, the expression of the yhdW-Z operon was induced in minimal medium as compared to rich medium. This may suggest that it is involved in the metabolism. Using a thermal shift assay (TSA) we show that the SBP binds asparagine (Asn). Moreover, the expression of yhdW-Z was induced by Asn. This strongly suggests that YhdW-Z is an Asn importer. The deletion of yhdWXYZ in *C.rodentium* reduced the pathogenicity of the strain on mice. This suggests that YhdW-Z is crucial during interaction with the host.

The YhdW-Z proteins are well conserved among enterobacteria. However in some *E. coli* strains, yhdW is present as a pseudogene. This clearly indicates that yhdWXYZ operon has evolved divergently allowing the acquisition of a different function and a very different regulation between *E.coli* and *C.rodentium*.



Céline Borde<sup>1\*</sup>, Kevin Rome<sup>1\*</sup>, Julien Cayron<sup>2</sup>, Christian Lesterlin<sup>2</sup>, Erwan Gueguen<sup>1</sup>, Agnès Rodrigue<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MAP, UMR 5240, Villeurbanne, France. <sup>2</sup> MMSB, UMR5086, Lyon, France. agnes.rodrigue@insa-lyon.fr

During their lifecycle, bacteria are exposed to continuous changes in their environment, some of which are stressful and can damage the cell envelope. To deal with this problem, bacteria have evolved systems collectively called « Envelope Stress Response » or ESR, dedicated to the detection and repair of damaged components.

The *E. coli* ZraPSR system is composed of a two component system ZraSR that comprises a membrane associated sensor kinase ZraS, a cytoplasmic response regulator ZraR and a periplasmic protein ZraP (Fig 1). The expression of *zraP* and *zraSR* is induced by Zn<sup>2+</sup> through the *zraSR* phosphorelay, although it is not involved in zinc resistance in *E. coli* (Petit-Härtlein *et al.*, 2015). Interestingly, we previously showed that ZraP displays chaperone properties and is a repressor of the expression of the ZraP-SR system (Petit-Härtlein *et al.*, 2015). Moreover, the deletion of *zraP* in *S. typhimurium* impaired its resistance to polymyxin B, a cationic antimicrobial peptide (Appia-Ayme *et al.*, 2012) suggesting that it may be involved in biocide resistance.

Here, we have investigated the function of ZraP-SR in antimicrobial resistance and characterized the regulon of ZraR in *E. coli*. We show that ZraP and ZraSR are important to maintain membrane integrity in the presence of biocides targeting the envelope, suggesting that Zra is a novel ESR. We demonstrate, using ChIP-Seq, that ZraR controls a regulon of genes of diverse functions that may be critical to maintain envelope integrity and cell survival under stressful conditions. The function of some of these genes was investigated.

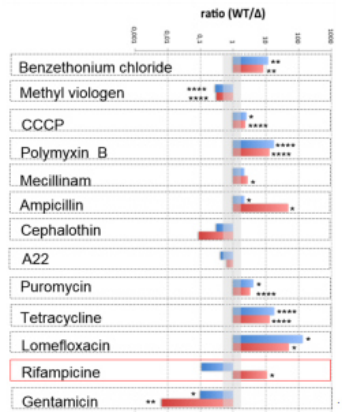
### 1. ZraPSR are involved in antibiotic and environmental stresses resistance

$\Delta zraR$  and  $\Delta zraP$  mutants are sensitive to several antibiotics

$\Delta zraR$  and  $\Delta zraP$  mutants are sensitive to acid stress and osmotic stress.

**ZraP is not the only effector of the pathway**

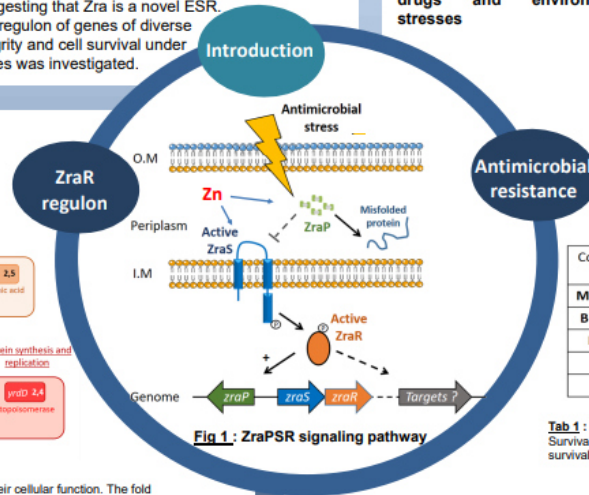
**The ZraPSR system confers intrinsic resistance to several drugs and environmental stresses**



**Fig 2 :** Relative survival rate of the  $\Delta zraP$  or  $\Delta zraR$  mutants, compared to the wild type strain. \* p ≤ 0.05; \*\* p ≤ 0.01; \*\*\* p ≤ 0.001; \*\*\*\* p ≤ 0.0001, Student's t test

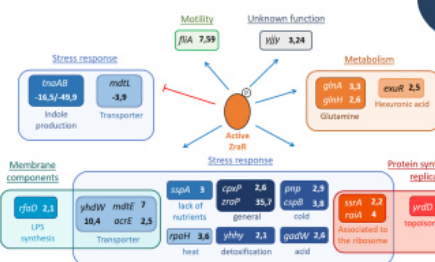
Condition	Stress	Survival Ratio (WT/ $\Delta zraP$ )	Survival Ratio (WT/ $\Delta zraR$ )
Malic acid	pH	8,97 ****	8,20 ****
Bile salts	Membrane	2,42 *	1,01
Indole	Membrane	1,44	1,46
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidative	1,05	1,21
NaCl	Osmotic	1,60 *	1,78 *

**Tab 1 :** Sensitivity of the *zraP* and *zraR* mutants to environmental stresses. Survival ratio of the mutant ( $\Delta zraP$  or  $\Delta zraR$ ) were calculated as the ratio of survival percentages (WT/mutant).



**Fig 1 :** ZraPSR signaling pathway

### 3. ZraR orchestrates a complex cellular network



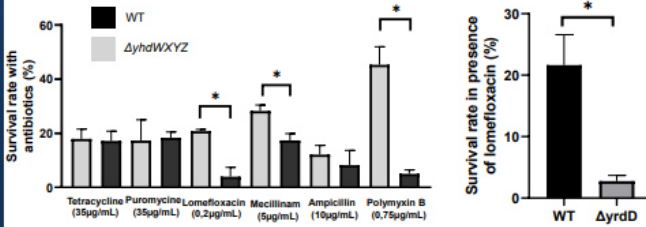
**Fig 4 :** The ZraR regulon identified using ChIP-Seq and RT-qPCR. Genes regulated by ZraR were grouped into categories according to their cellular function. The fold change, the ratio of gene expression of strain WT to strain  $\Delta zraR$ , is indicated for each gene.

ZraR activates the expression of 20 genes and represses the expression of 2 genes

ZraR acts on different essential cellular functions: metabolism, mobility, basic cell cycle functions, stress response and an unknown function.

### 4. Effectors that contribute to cell adaptation via ZraSR

To investigate the molecular mechanisms underlying the capacity of the *zra* system to protect cells against biocides, the involvement of some *zraR*-regulated genes was tested.



**Fig 5 :** Sensitivity of *yhdW-Z* and *yrdD* mutants to antibiotics. Survival ratio of the mutants were calculated as the ratio of survival percentages (WT/mutant). (\*, p < 0.05). N = 4, Mann Whitney test.

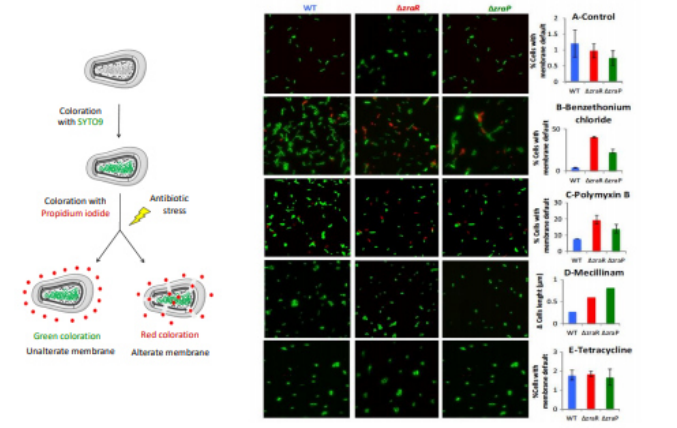
**The *yhdW-Z* ABC-transporter and the *yrdD* topoisomerase contribute to antimicrobial resistance**

### Conclusion

We show that the deletion of *zra* confers susceptibility to biocides targeting different cellular mechanisms: protein synthesis (tetracycline, puromycin), DNA synthesis (lomefloxacin) or structures of the bacterial envelope (benzethonium chloride, domiphen bromide, polymyxin B, ampicillin, mecillinam, amoxicillin). In addition, The Live-Dead microscopy experiments revealed that in the presence of antimicrobials (polymyxin B, benzethonium chloride, mecillinam) that cause a defect in membrane integrity, the  $\Delta zraR$  and  $\Delta zraP$  mutants have a more pronounced loss of membrane integrity than the WT strain

To understand how this system acts in stress response, the ZraR regulon was identified. The analysis of the regulon shows that the majority of ZraR-activated genes encode stress response proteins (chaperones, detoxification enzymes, stress response regulators, transporters). In addition to these elements, we note that ZraR activates the expression of important enzymes for the implementation of LPS (RafD). All these observations could explain the observed susceptibility phenotypes of  $\Delta zra$  mutants to some antimicrobials targeting the envelope. The activation of repair and envelope synthesis genes by ZraR could contribute to recover cell equilibrium in the presence of stress. We also show that other factors, not directly related to envelope maintenance are important for cell survival when cells are exposed to biocides. Indeed, we confirm that an ABC-transporter (*yhdW-Z*) and a topoisomerase (*yrdD*), regulated by *zraR*, play a crucial role toward cell resistance to some antibiotics. This highlights the role of *zra* as a master regulator of stress response. As the only known inducer of the expression of *zra* is Zn, we postulate that Zn is the stress signal perceived by bacteria when their membrane integrity is impaired. (Rome K *et al.*, 2018)

### 2. ZraPSR are important for membrane integrity in the presence of membrane targeting biocides



**Fig 3 :** Visualization of membrane default of the *zraP*, *zraR* mutants and WT strain in the presence of antibiotics. Fluorescence microscopy of cells stained with Syto9 and propidium iodide after exposure to drugs. More than 600 cells were counted. Representative fields are shown. Right panels (A-B-C-D): % = number of red cells/total number of cells.

In the presence of drugs that target the envelope (polymyxin B and benzethonium chloride) or its synthesis (mecillinam), the  $\Delta zra$  mutants displayed significantly more red-labelled cells than WT, showing that their membrane integrity was more affected.

In the presence of tetracycline, which targets translation, no significant differences were obtained between the  $\Delta zra$  mutants and the WT strain.

**This highlights the importance of the Zra system for envelope maintenance.**





THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON 1

NOM : BORDE

DATE de SOUTENANCE : 07/10/2021

Prénoms : Céline

**TITRE : Rôles du système à deux composants, Zra, et du tranporteur ABC, Yhd, dans la réponse au stress chez les entérobactéries**

NATURE : Doctorat

Ecole doctorale : Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)

Spécialité : Microbiologie Moléculaire

RESUME :

Les entérobactéries peuvent être retrouvées dans différentes niches trophiques comme le sol ou le tube digestif d'un mammifère. Le passage d'un environnement à un autre peut aboutir à des conditions physico-chimiques défavorables ou une exposition à des antimicrobiens. Cela peut générer une altération de la membrane qui est directement en contact avec l'environnement. Afin de détecter les stress membranaires et y répondre, les bactéries possèdent des systèmes appelés ESR (Envelope Stress Response).

Dans ce travail de thèse, la résistance intrinsèque aux antimicrobiens a été étudiée notamment via l'étude un nouvel ESR, le système Zra. Ce système est composé d'un senseur, ZraS, d'un régulateur transcriptionnel, ZraR, et d'une protéine périplasmique, ZraP. Tous les éléments de ce système sont conservés chez certaines membres des familles des *Enterobacteriaceae*, des *Yersiniaceae* et des *Budviciaceae*. Chez *Escherichia coli* et *Citrobacter rodentium*, Zra est activé en présence du zinc mais il n'est pas impliqué dans l'homéostasie métallique. En revanche, Zra est impliqué dans la résistance intrinsèque aux antimicrobiens. Afin de comprendre le lien entre le système Zra et la résistance intrinsèque aux antimicrobiens, les gènes cible du régulateur ZraR ont été identifiés par CHIP-seq et leur expression confirmée par qRT-PCR. Suite à ces analyses, certains gènes ont été sélectionnés pour une étude approfondie de leur fonction. Un opéron, codant un tranporteur ABC (ATP Binding Cassette), a été particulièrement étudié. Ce tranporteur est conservé chez la majorité des membres de l'ordre des *Enterobacteriales*. Chez *E.coli*, il est impliqué dans la résistance à certains antibiotiques. Par ailleurs, il est important dans la pathogénie de *C. rodentium*.

Nos travaux ont permis d'identifier de nouveaux acteurs de la résistance intrinsèque aux antibiotiques et pourraient permettre de développer de molécules les ciblant afin de potentialiser l'effet des antibiotiques connus.

MOTS-CLÉS : ESR ; Antibiogramme ; Réponse au stress ; Tranporteur ABC ; Pathogénie ; *Escherichia coli* ; *Citrobacter rodentium*

Laboratoire : Laboratoire Microbiologie, Adaptation et Pathogénie  
UMR5240 UCBL-INSA-CNRS-BayerCropSciences  
Campus de la Doua – Bâtiment Lwoff, 10 rue Raphael Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex

Directeur de thèse : Agnès RODRIGUE

Composition du jury : Géraldine LALOUX  
Jean-Michel BETTON  
Philippe DELEPELAIRE  
Marc LEMAIRE  
Cécile JOURLIN  
Agnès RODRIGUE

<

