



HAL
open science

Explorations ciblées des systèmes de régulation à deux composants Agt, Roc et Cus de *Pseudomonas aeruginosa*

Victor Simon

► **To cite this version:**

Victor Simon. Explorations ciblées des systèmes de régulation à deux composants Agt, Roc et Cus de *Pseudomonas aeruginosa*. Virologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV077 . tel-04842243

HAL Id: tel-04842243

<https://theses.hal.science/tel-04842243v1>

Submitted on 17 Dec 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Unité de recherche : Institut de Biologie Structurale

**Explorations ciblées des systèmes de régulation à deux composants
Agt, Roc et Cus de Pseudomonas aeruginosa**

**Targeted explorations of the two-component regulatory systems Agt,
Roc et Cus of Pseudomonas aeruginosa**

Présentée par :

Victor SIMON

Direction de thèse :

Sylvie ELSÉN

CHARGE DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Rapporteurs :

Erwan GUEGUEN

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université Lyon 1- Claude Bernard

Sophie BLEVES

PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Aix-Marseille Université

Thèse soutenue publiquement le **18 octobre 2023**, devant le jury composé de :

Sylvie ELSÉN

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Alpes

Directrice de thèse

Hans GEISELMANN

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

William NASSER

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Examineur

Sophie ABBY

CHARGE DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Examinatrice

Erwan GUEGUEN

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université Lyon 1- Claude Bernard

Rapporteur

Sophie BLEVES

PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Aix-Marseille Université

Rapporteuse



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury, à commencer par les rapporteurs de ma thèse, Sophie Bleves et Erwan Gueguen, et les examinateurs, Sophie Abby, William Nasser et Hans Geiselmann. Je vous suis reconnaissant d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail.

De plus, j'aimerais remercier les membres de mon comité de suivi individuel, Agnès Rodrigue, Christophe Bordi et Thomas Hindré qui m'ont accompagné et conseillé tout au long de mon doctorat.

Je souhaite remercier l'Ecole Doctorale de Chimie et des Sciences de la Vie de l'Université Grenoble Alpes pour le financement de ma thèse.

Merci Sylvie pour toute l'énergie que tu as insufflé dans mon encadrement depuis mon stage de M2. Malgré les épreuves qu'on a pu traverser, tu ne m'as jamais laissé tomber et ta détermination a toujours suscité mon admiration. À tes côtés, j'ai énormément appris sur Pseudo, sur la régulation et sur le reste ! Avec nos deux caractères assez différents, on s'est apprivoisé, formant le binôme « régulation », au dialecte unique et cherchant l'or dans nos tubes de β -gal. Merci pour tout cela.

J'aimerais remercier Ina de m'avoir accueilli dans son équipe. Ton engouement pour la science restera une source d'inspiration pour moi. Je te suis aussi reconnaissant pour ta bienveillance et ta confiance qui m'ont été d'un grand soutien.

Merci à tous les membres de PBRC pour cette épopée humaine et scientifique. Les nombreux échanges que j'ai pu avoir avec vous me marquèrent souvent. Je garde en mémoire beaucoup de moments de solidarité et de convivialité qui ont rendu ces 3 années si particulières. Je remercie les personnes qui m'ont accompagné lors de mes premiers pas en laboratoire, durant mes différents stages au cours de ma formation et auprès de qui j'ai découvert la recherche : Jonathan, Hugues, Joël et Pauline.

J'aimerais remercier Joël et François pour votre soutien lorsque j'explorais l'enseignement et que je m'essayais à cette science singulière qu'est la pédagogie.

Merci à Julian de m'avoir montré la voie en initiant ce projet de thèse et de m'avoir continuellement guidé dans mes explorations bio-informatiques.

Merci à Manon pour toutes les discussions que nous avons partagées, pour ton soutien moral et pour ton dynamisme entraînant.

Je suis reconnaissant envers tous mes camarades de thèse dont j'ai eu la chance de croiser la route. L'esprit d'entraide et de bienveillance qui nous a réunis a été d'une grande aide au cours de cette épreuve. Merci en particulier à Adèle, Clara, Pat et Serena pour tous les moments de détente stratégique.

Un merci tout spécial à ma famille, mon frère, mes ami.e.s et Suzanne pour leur soutien inconditionnel et leur compréhension pendant cette période exigeante.

TABLE DES MATIÈRES

Table des figures	viii
Table des tableaux	ix
Liste des abréviations	xi
Introduction	1
Chapitre 1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1 Une espèce diversifiée	3
1.1.1 Les génomes cœur et accessoire	3
1.1.2 Les différentes lignées	4
1.1.3 Les mécanismes moléculaires de cette diversité	6
1.2 Un pathogène versatile	8
1.2.1 Mode de vie : Planctonique ou Sessile	9
1.2.2 Pathologies et infections chroniques	11
1.2.3 Résistance aux antimicrobiens	11
Chapitre 2 Le réseau de régulation génétique de <i>P. aeruginosa</i>	15
2.1 Un réseau élaboré	17
2.1.1 Les facteurs de transcription	17
2.1.2 Les principaux autres acteurs	19
2.1.3 Un réseau plastique	21
2.2 Régulation de la virulence	21
2.2.1 Le quorum sensing	21
2.2.2 Les messagers secondaires nucléotidiques	23
2.2.3 Le système Gac/Rsm	24

Chapitre 3 Les systèmes de régulation à deux composants de <i>P. aeruginosa</i>	27
3.1 Bases moléculaires des TCSs	29
3.1.1 Diversité des HKs	29
3.1.2 Diversité des RRs	32
3.1.3 Le transfert de phosphate	34
3.1.4 Evolution des TCSs	37
3.2 Le réseau des TCSs de <i>P. aeruginosa</i>	39
3.2.1 Le réseau Gac/Rsm et HptB	40
3.2.2 Régulation des <i>cup</i>	41
3.2.3 La résistance aux métaux	43
3.2.4 Les nouveaux défis	43
Objectifs de thèse	47
 Résultats	 47
 Chapitre 4 Exploration des données de DAP-seq	 49
4.1 Les résultats de DAP-seq	52
4.1.1 Variabilité de la taille des cistromes entre les RRs	52
4.1.2 Variabilité des cistromes entre les génomes	53
4.2 Analyse globale des résultats de DAP-seq	54
4.2.1 Des gènes potentiellement régulés aux fonctions variées	55
4.2.2 Redondance et co-occurrence des cibles identifiées	56
4.3 Stratégies pour exploiter les résultats de DAP-seq	58
4.3.1 Régulation des gènes impliqués dans la pathogénicité	58
4.3.2 Les cibles des RRs spécifiques de IHMA87	60
 Chapitre 5 AgtR, un RR prometteur impliqué dans la virulence ?	 63
5.1 Analyse des cibles choisies de AgtR	66
5.1.1 Cistromes de AgtR en DAP-seq	66
5.1.2 Activation du système AgtSR par le GABA	66
5.1.3 Régulation de <i>rsmY</i> et <i>rsmZ</i> par AgtR	67
5.1.4 7 UTs potentiellement régulées par AgtR	68

5.2	Caractérisations des phénotypes contrôlés par AgtR	69
5.2.1	Motilités : <i>swimming</i> , <i>twitching</i> et <i>swarming</i>	70
5.2.2	Formation de biofilm à l'interface air-liquide	70
5.3	Localisation et dynamique de AgtS	71
5.4	Discussion	72
5.5	Materiel & Méthodes	73
Chapitre 6	CusR, un RR spécifique de IHMA87 acquis par HGT	75
6.1	Intégration d'un TCS accessoire dans le contrôle de l'homéostasie du cuivre (Article)	76
6.2	Résultats supplémentaires	138
6.2.1	Les ICEs de IHMA87	138
6.2.2	Les ICEs contenant le locus <i>lysR-cusS</i>	139
6.3	Discussion	140
Chapitre 7	PA4080, un RR orphelin intégré au système Roc	143
7.1	Immersion dans le système Roc (Article)	144
7.2	Résultats supplémentaires	190
7.2.1	Etude du rôle de RocA3	190
7.2.2	Régulon des Roc	193
7.3	Discussion et perspectives	195
Discussion générale		199
Appendices		205
A	Article supplémentaire	205
B	Communications	223
Références		225
Résumé		247

TABLE DES FIGURES

1.1	Nombre de publications traitant de <i>P. aeruginosa</i>	2
1.2	Enrichissement des COGs pour les gènes des génomes cœur et accessoire.	3
1.3	Arbre phylogénétique de <i>P. aeruginosa</i>	4
1.4	Comparaison des souches de <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. paraaeruginosa</i>	6
1.5	Le cycle de vie d'une ICE	8
1.6	Les étapes de formation du biofilm	9
1.7	Les fimbriae de type Cup	10
1.8	Mécanismes de résistance intrinsèque, acquise et adaptative aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i>	12
1.9	Acteurs de la réponse du cuivre chez <i>P. aeruginosa</i>	14
2.1	Représentation schématique d'un résea de régulation	16
2.2	Les familles des FTs OCSs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	18
2.3	Les 3 voies du quorum sensing de <i>P. aeruginosa</i>	22
2.4	Activation de l'opéron <i>pel</i> par FleQ en réponse au di-GMPc	24
2.5	Le système Gac/Rsm	26
3.1	Archétype du TCS	28
3.2	Nombre d'acteurs de TCS identifiés dans différents genres bactériens	29
3.3	Les RRs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	32
3.4	Les types d'HKs	35
3.5	Interaction entre le domaine REC et le domaine HisKA/CA	37
3.6	Les modes d'interconnexions entre les TCSs	39
3.7	Interconnexions entre la voie Gac/Rsm et HptB	41
3.8	Régulation des loci <i>cup</i> par les TCSs	42

4.1	Conservation des RRs ayant un DBD dans 3 souches appartenant à des lignées différentes de <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. paraeruginosa</i>	50
4.2	Nombre de cibles identifiées pour chaque RR sur les génomes des souches PAO1, PA14 et IHMA87.	52
4.3	Conservation des cibles identifiées sur les génomes des souches PAO1, PA14 et IHMA87 pour quelques RRs.	53
4.4	Distribution des annotations fonctionnelles des UTs ciblées pour chaque RR dans le génome de PAO1	55
4.5	Co-occurrence des cibles identifiées en DAP-seq sur le génome de PAO1.	56
4.6	Réseau pondéré des chevauchements des cistromes des RRs en DAP-seq dans PAO1.	57
4.7	Fixations observées en DAP-seq sur la région promotrice de <i>cupB1</i> (<i>PA4086</i>).	59
4.8	Réseau des fixations observées en DAP-seq sur 16 cibles du génome de PAO1.	60
4.9	Environnements génétiques des 3 RRs spécifiques de IHMA87 en comparaison avec PAO1.	61
5.1	Modèle de fonctionnement du TCS AgtSR.	64
5.2	Cistrome de AgtR en DAP-seq.	65
5.3	Cibles sélectionnées à partir du cistrome de AgtR établi par DAP-seq.	66
5.4	Activation de AgtSR en réponse au GABA et au GlcNAc.	67
5.5	Rôle de AgtR dans la régulation de <i>rsmY</i> et <i>rsmZ</i>	68
5.6	Activités de 7 promoteurs ciblés en DAP-seq par AgtR.	69
5.7	Effet de la délétion de <i>agtR</i> sur le <i>swarming</i> et la formation de biofilm.	70
5.8	Localisation de AgtS en réponse au GABA.	71
6.1	Représentation circulaire du chromosome de <i>P. paraeruginosa</i> IHMA87 et de son plasmide.	138
6.2	Diversité des ICEs de <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. paraeruginosa</i> portant le locus <i>lysR-cusS</i>	139
7.1	La surproduction de RocS2 stimule la formation de biofilm à l'interface air liquide.	191
7.2	Rôle de CupB dans l'adhésion de <i>P. aeruginosa</i>	191
7.3	Formation de Microcolonies de la souche surproduisant RocA3 en microfluidique.	192
7.4	La surproduction de RocA3 induit un défaut de croissance.	193
7.5	Régulon contrôlé par RocS2 par RNA-seq.	194
7.6	Les interconnexions entre les TCSs Roc et CusRS et CopRS	200

TABLE DES TABLEAUX

1.1	Différences de toxines entre les 5 lignées de <i>P. aeruginosa</i>	5
3.1	Liste des RRs ayant un DBD dans les souches PAO1 et PA14 de <i>P. aeruginosa</i> et dans la souche IHMA87 de <i>P. paraaeruginosa</i>	45
4.1	Les 10 premières lignes des résultats générés par la DAP-seq pour AgtR sur le génome de PAO1.	51
4.2	Liste des gènes d'intérêt utilisés pour explorer les données de DAP-seq	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAI	Identité moyenne des acides aminés
AI	autoinducteur
AMPC	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ANI	Identité moyenne des nucléotides
CF	<i>Cystic fibrosis</i>
COG	<i>Cluster of genes</i>
Cup	<i>Chaperone-usher pathway</i>
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
dDDH	Hybridation digitale de l'ADN
DGC	Diguanylate cyclase
ECF	Fonction extra cytoplasmiques
EPS	Exopolysaccharides
FT	Facteur de transcription
GMPc	guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
HGT	Transfert horizontal de gène
HK	Histidine kinase
HTH	Hélice-coude-hélice
ICE	Élément intégratif et conjugatif
IME	Élément intégratif et mobilisable
MGE	Élément génétique mobile
MPF	Formation de paires d'accouplement
NAP	Protéine associée au nucléoïde
OCS	Système de régulation à un composant
PDE	Phosphodiesterase
QS	Quorum sensing
RBP	Protéine liant l'ARN
RNAP	ARN polymérase
RND	Résistance-Nodulation-Division

RR	Régulateur de réponse
SST3	Système de sécrétion de type 3
SST4	Système de sécrétion de type 4
TCS	Système de régulation à deux composants
TPS	Système de sécrétion à deux partenaires
T4P	Pili de type 4
UT	Unité transcriptionnelle

1 *Pseudomonas aeruginosa*

Sommaire

1.1 Une espèce diversifiée	3
1.1.1 Les génomes cœur et accessoire	3
1.1.2 Les différentes lignées	4
1.1.3 Les mécanismes moléculaires de cette diversité	6
1.2 Un pathogène versatile	8
1.2.1 Mode de vie : Planctonique ou Sessile	9
1.2.2 Pathologies et infections chroniques	11
1.2.3 Résistance aux antimicrobiens	11

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) a été isolée pour la première fois en 1882 par le pharmacien militaire français Carle Gessard qui essayait de déterminer la cause de la coloration bleue parfois observée sur les pansements (GESSARD, 1882). Initialement nommée *Bacillus pyocyaneus* en raison de sa morphologie en bâtonnet et de la pyocyanine, un pigment bleu caractéristique qu'elle secrète, cette bactérie suscite immédiatement l'intérêt des chercheurs. Dès le XIXème siècle, la pathogénicité de *P. aeruginosa* est identifiée (CHARRIN et al., 1890) et son étude révélera progressivement son implication dans de nombreuses infections (BODEY et al., 1983). À l'émergence du séquençage à haut débit, le génome de PAO1, une des souches références de *P. aeruginosa*, fut un des premiers chromosomes bactériens à être séquencé, ouvrant la voie vers une nouvelle ère pour l'étude de ce pathogène (STOVER et al., 2000). Stimulée par l'essor technologique connu par la biologie, la recherche sur *P. aeruginosa* n'a cessé de croître (Fig 1.1). Avec près de 8 000 génomes séquencés, *P. aeruginosa* est actuellement l'une des espèces bactériennes les plus étudiées (WINSOR et al., 2016). Pourtant, ce pathogène opportuniste reste un problème de santé majeur et se trouve fréquemment à l'origine d'infections nosocomiales affichant souvent une forte résistance aux antibiotiques (REYNOLDS et al., 2021, PANG et al., 2019).

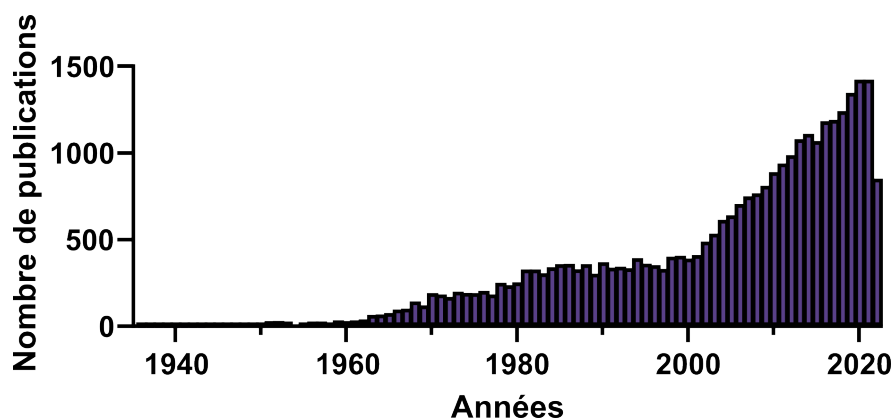


FIGURE 1.1. Nombre de publications traitant de *P. aeruginosa* ajoutées dans la base de données MEDLINE par année. Les articles avec les termes « *Pseudomonas aeruginosa* » dans leur titre ont été recensés dans pubmed (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) en août 2023.

Ce pathogène est réputé pour sa capacité à s'adapter à de nombreuses conditions, notamment dans ses hôtes durant l'infection (MORADALI et al., 2017, E. ROSSI et al., 2021). Sa versatilité repose en partie sur son large génome (5,5-7 Mpb) qui présente une grande diversité génétique et dont les gènes sont orchestrés par un réseau de régulation élaboré (SILBY et al., 2011, WINSOR et al., 2016, GALÁN-VÁSQUEZ et al., 2011). Après plus d'un siècle de travaux, cette bactérie continue d'intriguer la science et s'avère être un modèle d'étude idéal pour l'exploration du réseau de régulation d'un pathogène (DIGGLE et al., 2020).

1.1 Une espèce diversifiée

Le génome des souches de *P. aeruginosa* se caractérise par un taux en GC élevé (66.6%) et une taille relativement importante. Par exemple, la souche de référence PAO1 possède un chromosome de 6.3 Mpb codant pour 5 572 gènes (STOVER et al., 2000). Les différents génomes disponibles de cette espèce attestent une grande variabilité témoignant de la diversité de *P. aeruginosa* et de la plasticité de son chromosome (MATHEE et al., 2008, KUNG et al., 2010).

1.1.1 Les génomes cœur et accessoire

Le pangénome d'une espèce correspond au répertoire complet des gènes présents dans l'ensemble des souches étudiées. Le nombre de gènes du pangénome reflète la richesse génétique d'une espèce et son estimation peut grandement varier en fonction du nombre de génomes disponibles. L'étude du pangénome permet de diviser les gènes en deux catégories : les gènes du « génome cœur » et les gènes du « génome accessoire ». À l'inverse du génome accessoire, le génome cœur regroupe les gènes qui sont conservés dans l'ensemble des souches étudiées et tend donc à se restreindre quand l'espèce s'élargit. Le génome cœur de *P. aeruginosa* n'a donc pas de définition absolue et a fait l'objet de plusieurs études (VALOT et al., 2015, HILKER et al., 2015, MOSQUERA-RENDÓN et al., 2016). Il a récemment été établi à 665 gènes pour un pangénome de plus de 50 000 gènes distribués dans 1 311 génomes (FRESCHI et al., 2019). La majorité de ces gènes cœurs sont impliqués dans les processus fondamentaux de la cellule tels que la structuration de la chromatine, la division cellulaire et la synthèse des acides aminés et des nucléotides (Fig 1.2). À l'inverse, le génome accessoire est notamment enrichi avec des gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies métaboliques auxiliaires, des systèmes de sécrétion et des gènes signatures des éléments génétiques mobiles (MGE).

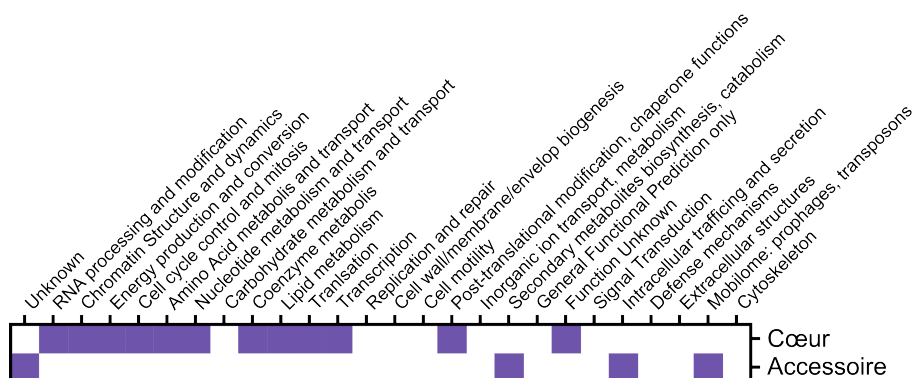


FIGURE 1.2. Enrichissement des COGs pour les gènes des génomes cœur et accessoire. La couleur violette indique un enrichissement significatif pour un "cluster of genes" (COG) (adapté de FRESCHI et al., 2019).

1.1.2 Les différentes lignées

Ces approches génomiques ont permis la délimitation de plusieurs phylogroupes au sein de l'espèce *P. aeruginosa*. Ces groupements de souches, ou lignées, ont d'abord été définis en 3 groupes principaux numérotés de 1 à 3, respectivement représentés par les souches PAO1, PA14 et PA7 (L. STEWART et al., 2014, FRESCHI et al., 2019). L'augmentation du nombre de génomes séquencés a mené à un affinage de la classification en vigueur en proposant deux nouveaux phylogroupes, 4 et 5, anciennement affiliés au groupe 3 (Fig 1.3)(FRESCHI et al., 2019). Le nombre de génomes pour les groupes 3, 4 et 5 est particulièrement faible et il apparaît évident que notre connaissance de l'espèce reste encore parcellaire. L'ajout progressif de souches séquencées continuera d'affiner l'arbre phylogénétique des lignées de *P. aeruginosa*.

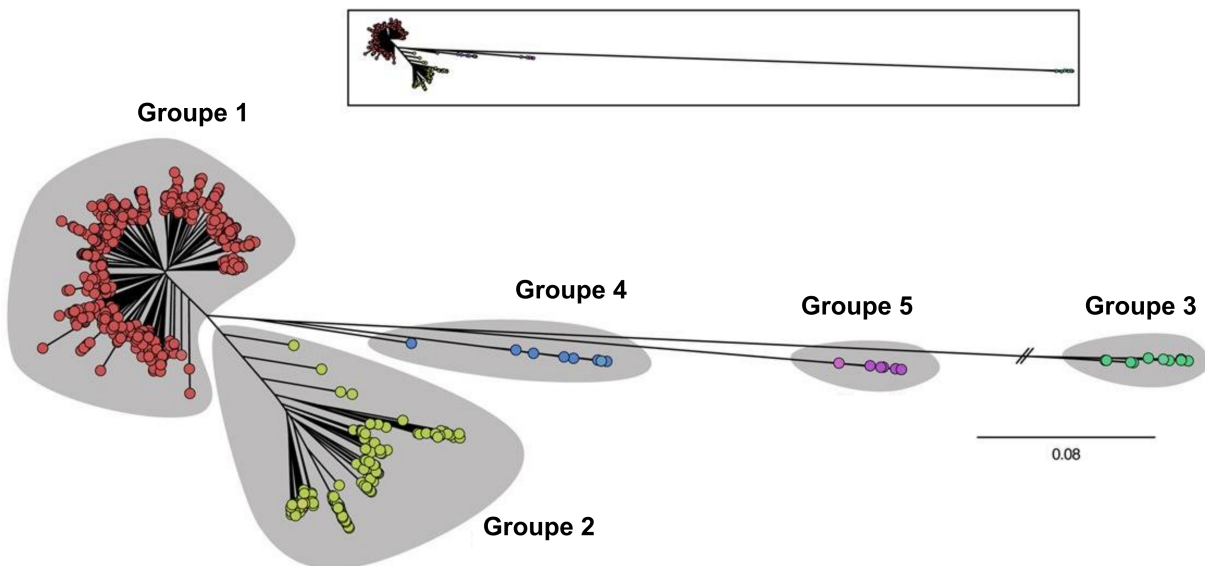


FIGURE 1.3. Arbre phylogénétique de *P. aeruginosa*. Les différentes lignées sont mises en évidence par des zones grises (n=1311). Le petit arbre en haut du panneau montre la distance génétique réelle entre les isolats du groupe 3 et les autres groupes d'isolats (FRESCHI et al., 2019).

Ces groupes phylogénétiquement distincts possèdent des facteurs de virulence différents, ce qui suggère qu'ils emploient des stratégies de pathogénèse spécifique. Le système de sécrétion de type III (SST3) permet l'injection de quatre toxines (ExoS, ExoT, ExoY et ExoU) directement dans le cytoplasme des cellules de l'hôte grâce à un injectisome et joue un rôle clé dans la cytotoxicité de *P. aeruginosa*. La conservation des gènes codant pour ces acteurs est variable au sein de l'espèce selon les lignées. Ainsi, seuls les groupes 1, 2 et 4 possèdent un SST3 avec des combinaisons de toxines différentes (Table 1.1). Les groupes 3 et 5 sont dépourvus de ce

système, et leur pathogénèse repose principalement sur ExlBA, un système de sécrétion à deux partenaires (TPS) (ou système de sécrétion de type V; SST5) spécifique de ces lignées (ELSEN et al., 2014, REBOUD et al., 2017). Suite à l'acquisition de ExlBA, la perte des gènes codant pour le T3SS ainsi que *rhlC* et *phzH* a été sélectionnée, mais les événements de délétions sont différents selon les lignées (QUIROZ-MORALES et al., 2022).

Groupe 1	●	PAO1	SST3+	<i>exoS</i> +	<i>exoY</i> +	<i>exoT</i> +	
Groupe 2	●	PA14	SST3+		<i>exoY</i> +	<i>exoT</i> +	<i>exoU</i> +
Groupe 3	●	PA7	SST3-				
Groupe 4	●		SST3+	<i>exoS</i> +		<i>exoT</i> +	
Groupe 5	●		SST3-				

TABLE 1.1. Différences de toxines entre les 5 lignées de *P. aeruginosa*. Les souches de référence des groupes 1, 2 et 3 sont indiquées. La présence des gènes du SST3 ou des toxines est représentée par un + (adapté de FRESCHI et al., 2019).

Les phylogroupes 1 et 2 constituent la majorité des souches séquencées et présentent de fortes similarités génétiques avec un pourcentage moyen d'identité nucléotidique (ANI) supérieur à 98,5%. L'abondance de ces lignées dans l'espèce s'explique en partie par un biais de surreprésentation dû à leur implication dans de nombreuses infections, telles que les infections chroniques des patients atteints de la mucoviscidose, dont les isolats sont généralement séquencés. Les isolats de ces deux phylogroupes sont de source environnementale ou clinique et peuvent être retrouvés dans le monde entier. Malgré leur ressemblance génétique, ces deux lignées sont génétiquement isolées, attestant notamment un faible niveau de recombinaison entre les groupes, ce qui pourrait témoigner d'un isolement génétique ou écologique par l'occupation de niches distinctes (OZER et al., 2019). En dépit de leurs similitudes génomiques, PAO1 et PA14, les souches références de ces deux groupes, arborent des phénotypes différents provoqués par quelques variations génétiques (GRACE et al., 2022). Les lignées divergent notamment par la présence de *exoS* ou *exoU* (OZER et al., 2019), ce dernier ayant été acquis par transfert horizontal de gène (HGT) via l'intégration de l'îlot de pathogénicité PAPI-2 dans les souches de la lignée 2. Quant au locus de *exoS*, il a été perdu dans ces souches à la suite d'une délétion ciblée (B. R. KULASEKARA et al., 2006).

Le phylogroupe 3, représenté par la souche PA7, est génétiquement très divergent des autres lignées et fut qualifié de groupe « déviant » (ou « *taxonomic outlier* ») (ROY et al., 2010). En plus du TPS ExlBA, la lignée dispose d'un système de sécrétion de type 2 (SST2) spécifique, Txc (CADORET et al., 2014). Ce groupe diffère tant des autres lignées que son appartenance à l'espèce *P. aeruginosa* est sujet à débat et le clade a récemment été proposé comme une espèce distincte sous le nom de *P. paraaeruginosa* (RUDRA et al., 2022). En considérant les pourcentages d'ANI, d'identité moyenne des acides aminés (AAI), et d'hybridation digitale de l'ADN

(dDDH) entre les génomes des groupes 1, 2 et 3, il apparaît que ce dernier est en dehors des seuils communément utilisés pour délimiter une espèce à partir de ces 3 paramètres (Fig 1.4) (KONSTANTINIDIS et al., 2005, MEIER-KOLTHOFF et al., 2022, RICHTER et al., 2009).

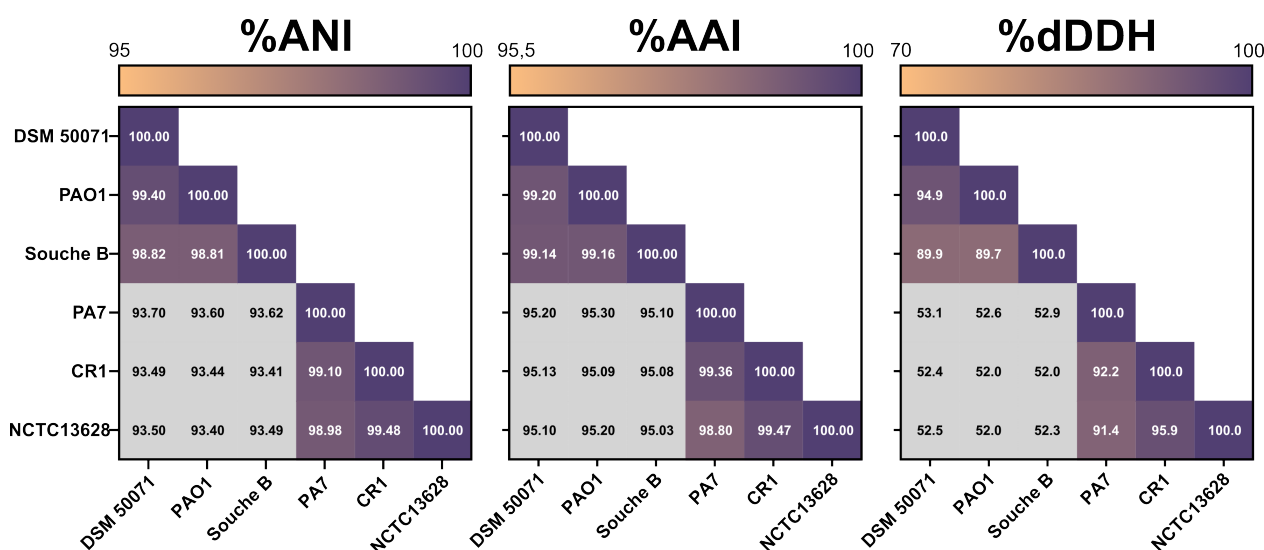


FIGURE 1.4. Comparaison des souches de *P. aeruginosa* et *P. paraeruginosa*. Les souches de *P. aeruginosa* appartiennent au phylogroupe 1 (PAO1 et DSM50071), 2 (Souche B) et les souches de *P. paraeruginosa* appartiennent au phylogroupe 3 (PA7, CR1 et NCTC13628). Les valeurs en dehors des seuils sont en gris. Les valeurs des seuils sont 95% pour le % d'ANI, 95,5% pour le % d'AAI et 70% pour le % de dDDH (adapté de RUDRA et al., 2022).

L'appréciation de la diversité de l'espèce *P. aeruginosa* implique généralement l'étude de souches de référence pour représenter les différentes lignées. Notre appréciation des variabilités entre ces lignées est lacunaire et nos connaissances de cette bactérie sont souvent extrapolées des quelques souches de références. Dans la suite de ce manuscrit, lorsqu'il sera sujet de souches appartenant au phylogroupe 3, ces dernières seront référées sous le nom d'espèce *P. paraeruginosa*. Cependant, par usage, l'appellation *P. aeruginosa* sera utilisée pour faire référence aux 5 phylogroupes.

1.1.3 Les mécanismes moléculaires de cette diversité

Les processus responsables de la plasticité génétique des bactéries sont multiples, le plus simple étant l'apparition de mutations ponctuelles comme dans le cas du gène *mexS* dans la souche PAK appartenant au premier phylogroupe. Une unique mutation provoque le changement d'un acide aminé de MexS par rapport à PAO1, conduisant à l'inactivation de cette protéine impliquée dans la régulation du SST3 (JIN et al., 2011). Les lignées de *P. aeruginosa* sont aussi génétiquement différentes par la présence ou l'absence de certains gènes résultant d'un remodelage du génome

au cours de l'évolution (DOBRINDT, 2001).

Des processus accélèrent grandement la diversification des génomes, notamment dû à la plasticité intrinsèque des chromosomes. De nombreux exemples sont répertoriés démontrant la dynamique du génome de *P. aeruginosa* comme les réarrangements de chromosomes, la duplication de gènes ou le déplacement de MGEs. Ainsi, un réarrangement important est observé entre les souches PA14 et PAO1 dont le génome présente une inversion entre des gènes d'ARNr de 1.7 Mbp (STOVER et al., 2000). Dans les isolats cliniques CLJ1 et CLJ3 prélevés à des temps différents d'une infection chronique, la multiplication de MGEs de type séquence d'insertion a permis la délétion de nombreux gènes favorisant l'adaptation de ce pathogène (SENTAUSA et al., 2020). La duplication de régions impliquées dans le métabolisme peut, par exemple, favoriser l'adaptation en amplifiant certaines voies du catabolisme (TOUSSAINT et al., 2017). Des duplications à plus petite échelle peuvent modifier des protéines comme dans le cas du senseur LadS de PA14 dont le gène présente une duplication de 49 nucléotides conduisant au décalage du cadre de lecture et l'inactivation de la protéine, ce qui améliore la virulence de la souche (MIKKELSEN et al., 2011b).

En plus de la dynamique interne du chromosome, les bactéries peuvent acquérir de l'ADN étranger par des mécanismes de HGT comme la transformation, la transduction et la conjugaison qui constituent une force évolutive importante des génomes bactériens (TREANGEN et al., 2011). Les prophages, les plasmides conjugatifs et les éléments intégratifs et conjugatifs/mobilisables (ICEs/IMEs) sont des MGEs caractéristiques de HGT. Les ICEs sont de grands éléments capables de s'exciser, de se transférer par conjugaison et de s'intégrer dans le génome de l'hôte. Dans le cas des IMEs le transfert de l'élément n'est pas autonome et implique le détournement de la machinerie de conjugaison d'un autre élément conjugatif (GUÉDON et al., 2017). Les ICEs ont des tailles très variables pouvant s'étaler de 13 kpb (ICESa1 chez *Staphylococcus aureus* (SCHIJFFELEN et al., 2010)) à 500 kpb (ICEMISymR71 chez *Mesorhizobium loti* (RAMSAY et al., 2006)). Ces éléments sont modulaires et les gènes encodés peuvent être classés en deux catégories selon leurs fonctions : les gènes cœurs impliqués dans les fonctions de base du cycle de l'ICE comme l'excision, l'intégration et la conjugaison, et les gènes cargo qui sont portés par l'élément et qui apportent généralement un avantage à l'hôte (Fig 1.5) (JOHNSON et al., 2015).

En particulier, la conjugaison des ICEs nécessite un pore de conjugaison ou système de formation de paires d'accouplement (MPF) de la famille des systèmes de sécrétion de type IV (T4SS) permettant la classification de ces éléments par type de MPF (CURY et al., 2017). Les ICEs sont un grand facteur de diversité chez *P. aeruginosa* comme PAPI-1, une ICE de 108 kpb codant pour 115 gènes et qui est intégré dans le chromosome de la souche PA14, participant à la pathogénicité de la souche (HARRISON et al., 2010).

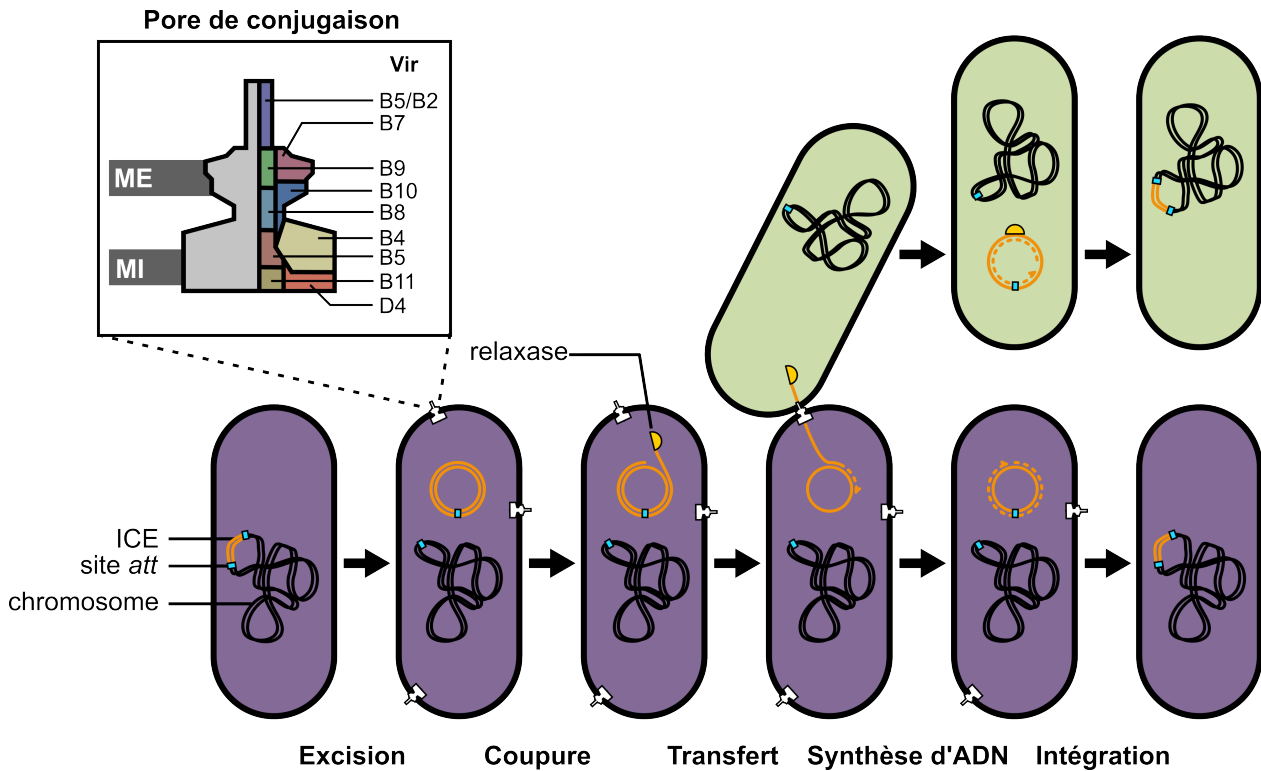


FIGURE 1.5. Le cycle de vie d'une ICE. L'ICE est représenté en orange. De gauche à droite : L'ICE est intégré dans le chromosome de l'hôte. La plupart des gènes de l'ICE ne sont pas exprimés, en raison d'une répression ou en absence d'activation. Lorsque l'expression des gènes de l'ICE est induite, l'ICE s'excise du chromosome hôte et forme un plasmide circulaire d'ADNdb (ADN double brins). Des protéines codées par l'ICE sont produites, dont certaines s'assemblent en pore de conjugaison ou système de formation de paires d'accouplement (MPF). La relaxase codée par l'ICE coupe un brin de l'ADNdb de l'ICE et se fixe de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ADN coupé, formant ainsi l'ADN de transfert (ADN-T). Si un récepteur approprié est disponible, la machinerie de conjugaison transporte l'ADN-T dans la cellule réceptrice représentée en vert. Dans la cellule réceptrice, la relaxase ligature les extrémités 5' et 3' de l'ADN pour former un cercle d'ADNsb (ADN simple brin) fermé de manière covalente. Le brin d'ADN complémentaire est synthétisé pour générer un cercle d'ADNdb qui pourra s'intégrer au niveau d'un site att dans le chromosome de la donneuse et de la receveuse (adapté de JOHNSON et al., 2015). Une représentation schématique du MPF indique les acteurs Vir de ce système. ME : membrane externe. MI : membrane interne.

1.2 Un pathogène versatile

Souvent qualifiée d'ubiquitaire, *P. aeruginosa* est retrouvée dans une grande variété d'environnements terrestres et aquatiques, sur tous les continents, mais principalement impactés par les activités humaines (CRONE et al., 2020). Cette bactérie est capable de croître en aérobie et en anaérobie, ce qui est un avantage pour la colonisation d'hôte dans lequel la disponibilité de

l'oxygène est variable, conduisant à une modulation de la cytotoxicité (K.-M. LEE et al., 2011). Sa température de croissance optimale se situe entre 30 et 37°C, mais elle résiste à des températures allant jusqu'à 42°C. L'adaptation de *P. aeruginosa* aux conditions rencontrées lors d'une infection est nécessaire et participe au succès de ce pathogène (MORADALI et al., 2017).

1.2.1 Mode de vie : Planctonique ou Sessile

Le développement *P. aeruginosa* pourrait être simplifié en deux modes de vie distincts aux physiologies différentes. Dans le mode de vie planctonique, les bactéries mobiles se déplacent grâce à leur unique flagelle et affichent une forte production de facteurs de virulence comme le SST3. Le second mode de vie implique la formation de biofilm qui correspond à une communauté bactérienne dynamique fixée à une surface biotique ou abiotique. La formation du biofilm peut être simplifiée en un enchaînement d'étapes formant un cycle (Fig 1.6) : (i) l'attachement réversible, (ii) l'attachement irréversible, (iii) la formation de microcolonies, (iv) la maturation et (iv) la dispersion (PAMP et al., 2007, K. SAUER et al., 2022).

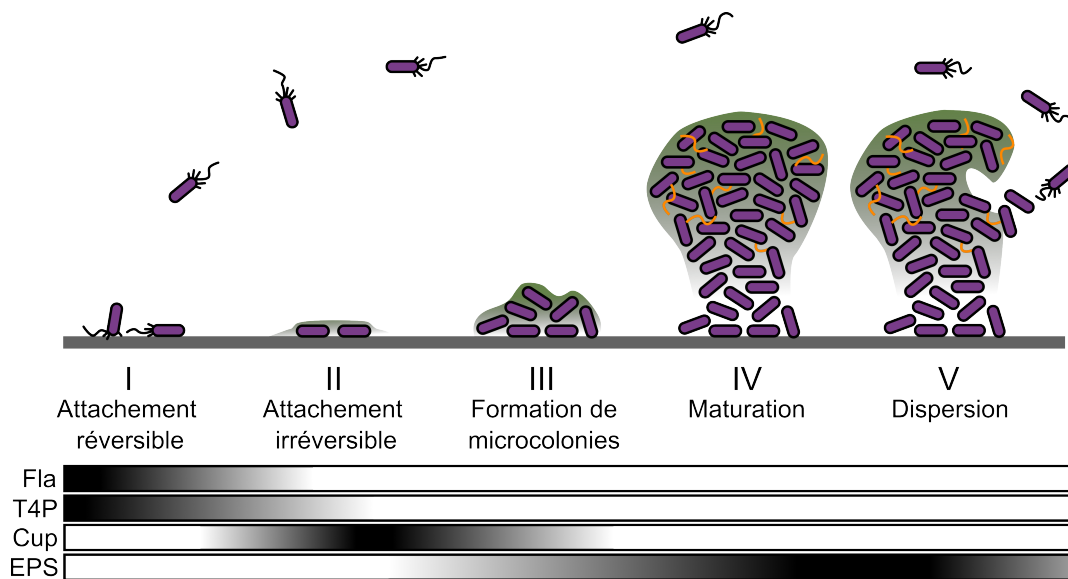


FIGURE 1.6. Les étapes de formation du biofilm. En entrant en contact avec une surface, les bactéries planctoniques peuvent s'y attacher par l'intermédiaire du flagelle (Fla) et des pili de type IV (T4P) d'abord de manière réversible puis irréversible. Des adhésines comme les fimbriae de type Cup participent à l'attachement irréversible et la formation de microcolonies. La maturation du biofilm s'accompagne d'une augmentation de matrice extracellulaire constituée d'EPS (en vert) et d'ADN extracellulaire (orange) et permet la formation de structures tridimensionnelles. La contribution de différents acteurs dans ce cycle est schématisée en dessous.

Aux premières étapes de l'attachement, les bactéries adhèrent à la surface grâce au flagelle et au pili de type IV, typiquement par un pôle avant d'adopter une orientation longitudinale. L'at-

tachement irréversible est caractérisé par la synthèse d'une matrice extracellulaire qui entoure les bactéries. Cette matrice, dont la production augmente pendant la formation de biofilm, est l'association de lipides, de protéines, d'ADN extracellulaire et d'exopolysaccharides (EPS) comme les alginates, Pel et Psl. D'autres acteurs peuvent participer à l'adhésion ou à l'interaction entre les cellules comme les fimbriae de type Cup (*chaperonne usher pathway*) (GIRAUD et al., 2012). Ces fimbriae ont particulièrement été étudiés chez *Escherichia coli* (*E. coli*) sous le nom de fimbriae Fim ou Pap (HUNG et al., 1998 ; F. G. SAUER et al., 2004).

Cinq loci de gènes *cup*, nommés *cupA-E*, ont été identifiés chez *P. aeruginosa* (Fig 1.7A) (FILLOUX et al., 2004). Ces appendices cellulaires sont des adhésines impliquant au moins 3 acteurs encodés en opérons : la sous-unité de la fimbriae (ou piline), la chaperonne périplasmique, et un transporteur dans la membrane externe responsable de la translocation et de l'assemblage des fimbriae. Souvent, les opérons *cup* codent pour des composants supplémentaires, notamment des adhésines qui décorent l'extrémité de l'appendice (Fig 1.7B). L'agrégation des bactéries conduit à la formation de microcolonies qui mûrissent et gagnent en volume. La détérioration de la matrice peut conduire à la dispersion de bactéries qui adoptent de nouveau le mode de vie planctonique. Ce modèle simpliste offre un aperçu de notre compréhension de la formation de biofilm par *P. aeruginosa*. L'alternance de ces modes de vie permet la dissémination et la persistance de ce pathogène dans de nouveaux habitats. De plus, les biofilms sont une barrière physique capable de protéger les bactéries du système immunitaire de l'hôte ou des antibiotiques notamment (DAVEY et al., 2000).

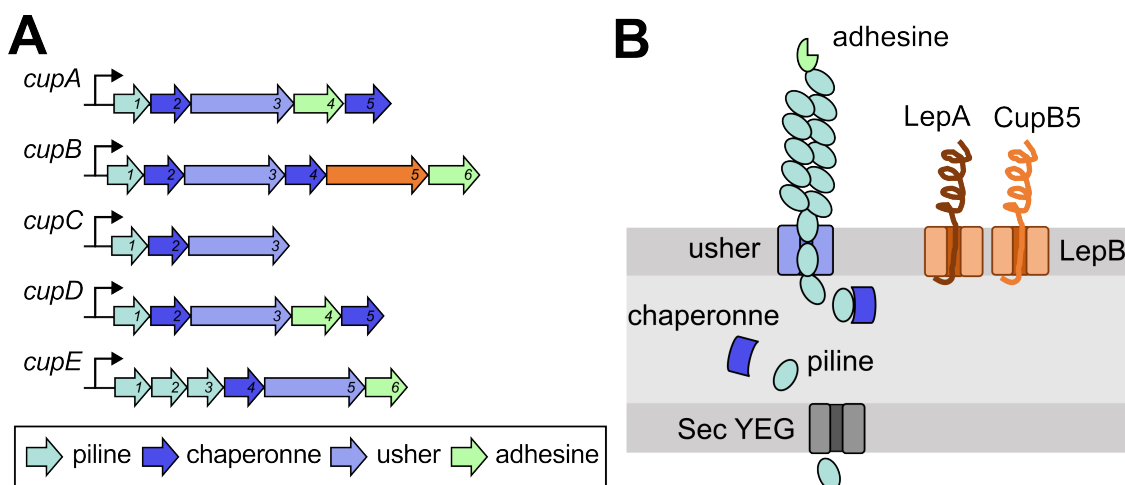


FIGURE 1.7. Les fimbriae de type Cup. A) Organisation des loci *cup* de *P. aeruginosa*. B) Schéma de l'assemblage des fimbriae de type Cup. La piline est transportée dans le périplasm par le système SecYEG. Les chaperonnes périplasmiques redirigent les pilines vers l'usher pour qu'elles soient assemblées en pili à la surface et dont l'extrémité peut harbore une adhésine. La protéine CupB5 diffère des autres protéines Cup et sa sécrétion est médiée par le transporteur LepB du TPS LepA.

1.2.2 Pathologies et infections chroniques

P. aeruginosa est capable, selon son mode de vie, de provoquer des infections aiguës (planc-tonique) ou chronique (biofilm) (REYNOLDS et al., 2021). Ce pathogène opportuniste peut provoquer une grande variété d'infections chez l'humain lorsque les défenses de l'hôte sont altérées, notamment des bactériémies, des pneumonies, des infections urinaires ou cutanées. Cette bactérie peut s'établir durablement dans les poumons des patients atteints de la mucovis-cidose (CF : *cystic fibrosis*) ou de bronchopneumopathie chronique obstructive où elle devient impossible à éradiquer et peut provoquer des infections à répétitions. Le nombre de gènes in-dispensables pour la croissance de *P. aeruginosa* dans les poumons de patients atteints de la CF est estimé à quelques centaines pour PAO1 et PA14. Ces gènes appartiennent principalement au génome cœur, mais certains sont essentiels uniquement pour une souche, comme le cas de la pompe à efflux MexAB-OprM qui est nécessaire dans la souche PA14 mais pas dans la souche PAO1 (TURNER et al., 2015).

Cette colonisation chronique des poumons s'étalant sur plusieurs années permet l'adaptation de *P. aeruginosa* à son hôte, notamment face aux stress et la privation de nutriments. Cette pathoadaptation peut prendre diverses formes dont la formation de biofilm (E. ROSSI et al., 2021). Ce mode de vie participe à la persistance du pathogène chez ces patients, notamment en jouant un rôle protecteur contre le système immunitaire ou l'action d'antimicrobiens (JENSEN et al., 2010, CIOFU et al., 2019).

P. aeruginosa est aussi capable d'évoluer au cours de ces infections chroniques et le génome a tendance à perdre des gènes, en particulier des gènes liés à la virulence. Cette stratégie adap-tative permet de réduire la taille du génome et d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Une cinquantaine de gènes généralement impliqués dans la virulence sont particulièrement vi-sés par ces délétions au cours des infections à longue durée comme le gène de la toxine ExoY (GABRIELAITE et al., 2020). Les mutations du régulateur du quorum sensing LasR est un autre exemple d'évolution dans les poumons de patients atteints de mucovisidose qui conduit à un phénotype mucoïde avec une résistance accrue aux antibiotiques (HOFFMAN et al., 2010).

1.2.3 Résistance aux antimicrobiens

Les antimicrobiens sont des molécules capables de détruire les microorganismes ou d'inhiber leur croissance. Ils peuvent être de natures variées comme les solvants organiques, les métaux lourds ou typiquement les antibiotiques. La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique considérant les difficultés dans l'identification de nouvelles molécules face à la diffusion de souches multirésistantes. *P. aeruginosa* a été classée dans le groupe d'agents pa-

thogènes ESKAPE qui regroupe les espèces les plus problématiques pour l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques. L'Organisation mondiale de la Santé a désigné *P. aeruginosa* comme prioritaire pour le développement de nouvelles thérapies. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* reposent en grande partie sur les pompes d'efflux et peuvent être divisés en 3 catégories : intrinsèque, acquise ou adaptative (Fig 1.8)(MORADALI et al., 2017, LORUSSO et al., 2022).

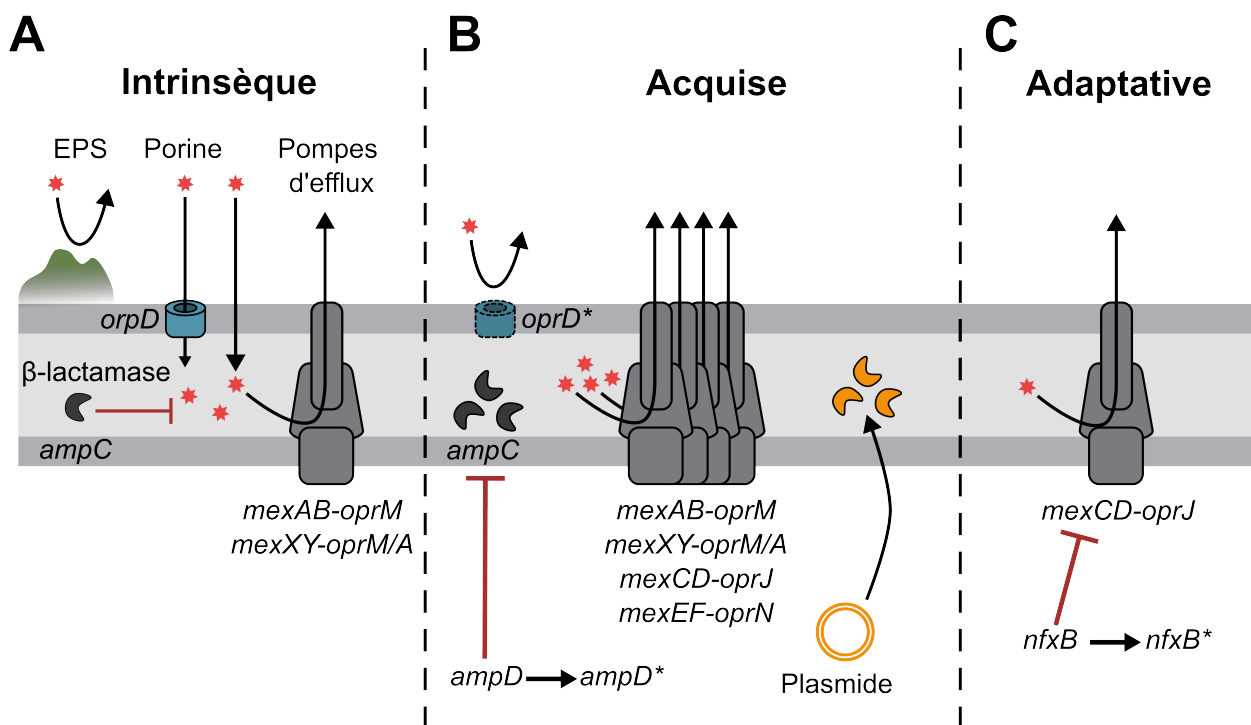


FIGURE 1.8. Mécanismes de résistance intrinsèque, acquise et adaptative aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. Différents exemples de stratégies conférant des résistances aux antibiotiques sont présentés. L'antibiotique est représenté par une étoile rouge. La mutation d'un gène est indiquée par une astérisque (adapté de MORADALI et al., 2017).

En raison de la structure de sa membrane et de l'absence de porines non spécifiques qui pourraient faciliter l'importation d'antibiotiques, *P. aeruginosa* est intrinsèquement protégée de certains antibiotiques (Fig 1.8A)(CHEVALIER et al., 2017). La production d'EPS permet de protéger les bactéries des conditions environnementales, y compris des traitements aux antibiotiques en jouant un rôle de barrière physique (Fig 1.8A)(P. S. STEWART et al., 2001). La β -lactamase AmpC contribue également à la résistance intrinsèque car l'expression basale de son gène suffit à conférer à *P. aeruginosa* une faible résistance aux aminopénicillines et à la majorité des céphalosporines (Fig 1.8A)(OLIVER et al., 2015). Enfin, les gènes de la pompe d'efflux MexAB-OprM présentent aussi une expression basale importante, ce qui permet à *P. aeruginosa* de résister contre une large gamme d'antibiotiques comme les aminoglycosides ou les fluoroquinolones (Fig 1.8A)(X.-Z. LI et al., 2015).

Le génome de *P. aeruginosa* est dynamique, ce qui favorise l'acquisition de résistance aux antibiotiques soit par des mutations ou par HGT. Par exemple, il est courant que les isolats cliniques développent un niveau d'expression d'*ampC* constitutivement élevé, même en l'absence d'inducteurs antibiotiques, à cause d'une mutation inactivant le gène de AmpD qui est un répresseur de *ampC* (Fig 1.8B)(JUAN et al., 2005). L'inactivation du gène de OprD est un mécanisme commun permettant de diminuer la perméabilité de la cellule aux antibiotiques en inactivant la porine. Plusieurs exemples sont caractérisés comme le cas de séquences d'insertion identifiées en amont de la région codante de *oprD* dans des isolats de *P. aeruginosa* résistants à l'imipénème et présentant une diminution de l'expression de *oprD* (Fig 1.8B)(WOLTER et al., 2008) . Des mutations dans les loci régulateurs peuvent conduire à la surproduction d'autres pompes d'efflux multidrogues comme MexXY et MexCD-OprJ en libérant l'expression génique et en augmentant la résistance à plusieurs antibiotiques (Fig 1.8B)(LISTER et al., 2009). Dans certains cas, des souches de *P. aeruginosa* peuvent acquérir des résistances aux antibiotiques grâce à un plasmide conjugatif portant des gènes codant pour des β -lactamases (Fig 1.8B)(POIREL et al., 2002).

La résistance adaptative se produit lorsque les bactéries répondent temporairement à des facteurs environnementaux, notamment en modifiant leurs mécanismes de régulation (KHALEDI et al., 2016). Ce type de résistance transitoire disparaît une fois le stress passé. Contrairement aux deux autres mécanismes, celui-ci est encore mal connu. Il a été identifié que le répresseur transcriptionnel NfxB peut subir des mutations qui entraînent un défaut de fonction, ce qui augmente la production de la pompe à efflux MexCD-OprJ (Fig 1.8C)(STICKLAND et al., 2010).

Dans ce contexte, la résistance aux métaux lourds est un facteur aggravant capable de co-sélectionner et de favoriser la propagation de résistance aux antibiotiques, notamment dans les environnements contaminés par l'activité humaine (L.-G. LI et al., 2017, NGUYEN et al., 2019). Les métaux lourds sont à la fois indispensables et toxiques et leur homéostasie représente un enjeu majeur pour la bactérie. Parmi ces métaux, le cuivre est utilisé par l'homme depuis l'antiquité pour lutter contre le monde microbien dans l'agriculture ou, plus récemment, en milieu hospitalier. Le cuivre est aussi utilisé par le système immunitaire en s'accumulant aux sites d'infections pour lutter contre les microorganismes pathogènes, notamment dans l'urine (FOCARELLI et al., 2022). De plus, les cellules phagocytaires utilisent aussi le cuivre pour détruire les bactéries internalisées. La résistance au cuivre de *P. aeruginosa* est particulièrement documentée et participe donc au succès de ce pathogène. Plusieurs acteurs sont directement régulés par la détection de ce métal et peuvent être classés en trois catégories : les transporteurs, les enzymes et les chaperonnes (Fig 1.9)(QUINTANA et al., 2017). L'import du cuivre repose en partie sur la porine OprC située dans la membrane externe. Le principal moyen de résister à des concentrations létales de cuivre pour *P. aeruginosa* consiste en l'expulsion de ces ions ce

qui peut être médié par la pompe de type Résistance-Nodulation-Division (RND) CusCBA ou le transporteur PcoB. Les transporteurs CopA1 et CopA2 sont des ATPases à cuivre qui participent aussi à la compartimentalisation du cuivre en expulsant les ions du cytoplasme vers le périplasma. Les chaperonnes du cuivre cytoplasmiques CopZ1 et CopZ2 fournissent le métal à CopA1 et CopA2 en interagissant avec ces transporteurs. Des enzymes périplasmiques capable de lier le cuivre peuvent aussi jouer un rôle dans la détoxification du cuivre comme PcoA qui est une multi-cuivre oxydase prédite. La régulation de cette homéostasie sera traitée dans la partie 3.2.3.

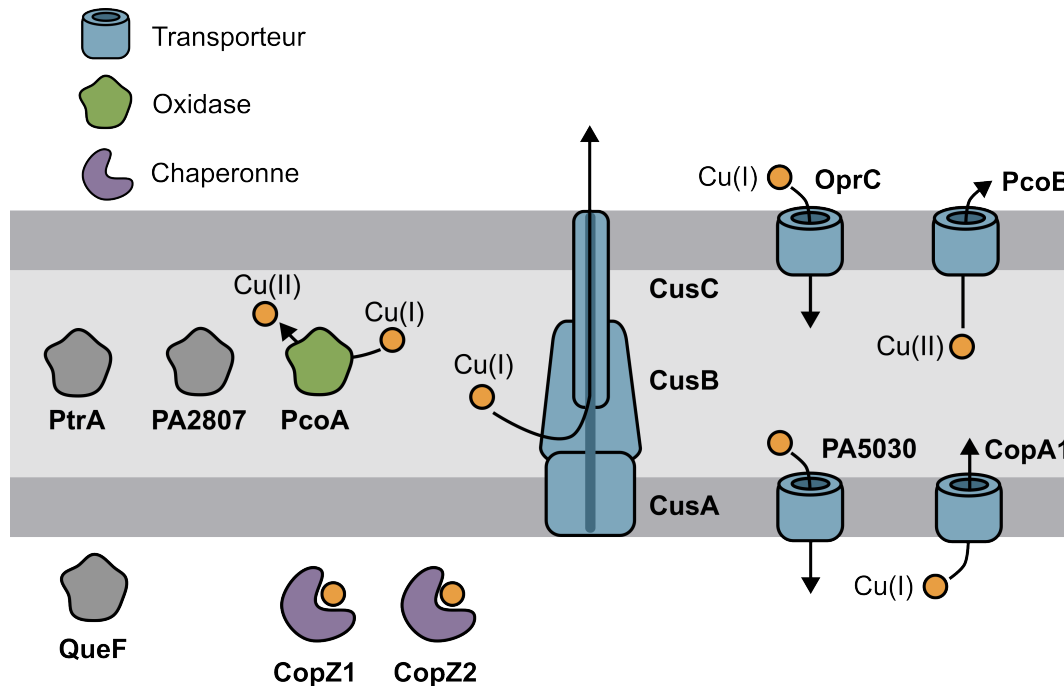


FIGURE 1.9. Acteurs de la réponse du cuivre chez *P. aeruginosa*. Les protéines dont l'expression est modulée par le cuivre sont représentées de manière schématique. En bleu, les transporteurs transmembranaires ; en vert, les multi-cuivre oxydase ; en violet, les chaperons ; en gris, les protéines dont le rôle est inconnu (Adapté de QUINTANA et al., 2017).

2 LE RÉSEAU DE RÉGULATION GÉNÉTIQUE DE *P. aeruginosa*

Sommaire

2.1 Un réseau élaboré	17
2.1.1 Les facteurs de transcription	17
2.1.2 Les principaux autres acteurs	19
Les facteurs sigma	19
Les protéines associées au nucléoïde	19
Les petits ARNs régulateurs	20
2.1.3 Un réseau plastique	21
2.2 Régulation de la virulence	21
2.2.1 Le quorum sensing	21
2.2.2 Les messagers secondaires nucléotidiques	23
2.2.3 Le système Gac/Rsm	24

Les unités transcriptionnelles (UTs) sont les unités fonctionnelles de base du génome et sont constituées d'un ou plusieurs gènes consécutifs portés par le même brin d'ADN et qui sont transcrits en une seule molécule d'ARNm. Plusieurs mécanismes de régulation permettent le contrôle de l'expression de ces UTs et peuvent s'opérer, entre autres, aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Typiquement, la régulation transcriptionnelle orchestre les niveaux d'ARNm transcrits en jouant sur l'activité de l'ARN polymérase (RNAP) tandis que la régulation post-transcriptionnelle module la stabilité ou la disponibilité des ARNm. Ces processus jouent un rôle clé dans la physiologie de la cellule et mettent jeu des régulateurs formant des réseaux sophistiqués orchestrant le contrôle de l'expression des UTs (Fig 2.1). Ces réseaux dynamiques permettent notamment de répondre aux conditions environnementales

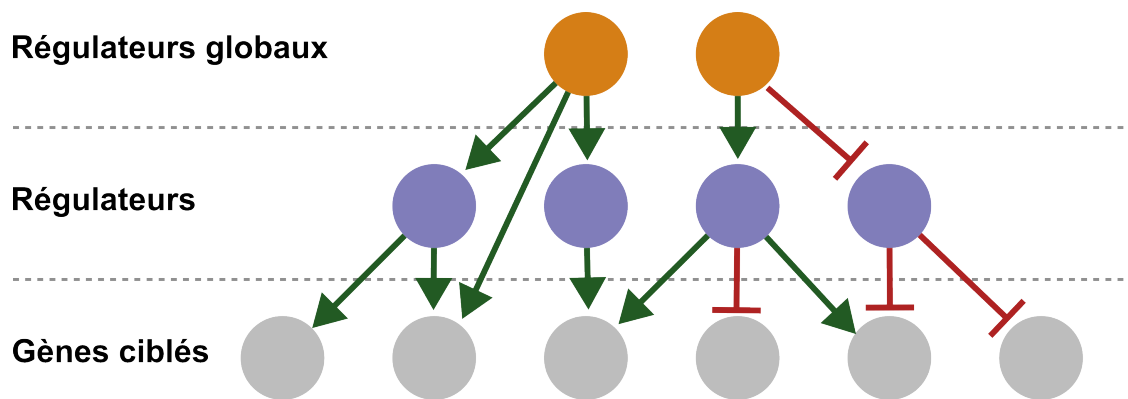


FIGURE 2.1. Représentation schématique d'un réseau de régulation. En gris, les gènes ciblés ; en violet, les régulateurs ; en orange, les régulateurs globaux contrôlant la régulation d'un grand nombre de gènes dont des gènes de régulateurs.

Depuis les premières découvertes de la régulation génétique chez *E. coli* (JACOB et al., 1961), l'étude de ces réseaux a connu un essor majeur avec l'arrivée du séquençage à haut débit et l'avènement de puissantes méthodes génomiques permettant leur analyse à grande échelle telles que la RNA-seq, la ChIP-seq ou la DAP-seq. *P. aeruginosa* n'échappe pas à cette révolution technologique. Aujourd'hui, c'est un défi de taille qui s'impose aux chercheurs quant à l'intégration de ces ressources pour confirmer les liens identifiés (LARA et al., 2023, DUDEK et al., 2022), mais aussi pour l'exploitation et la confrontation de ces nombreux jeux de données. Le réseau de régulation de *P. aeruginosa* est particulièrement élaboré puisque près de 10% des protéines de la souche PAO1 sont des régulateurs (GALÁN-VÁSQUEZ et al., 2011) permettant notamment le contrôle de sa pathogénicité. Le réseau de régulation de cette bactérie recèle encore des mystères et son exploration future s'annonce passionnante.

2.1 Un réseau élaboré

Le réseau de régulation de *P. aeruginosa* est composé de nombreux acteurs incluant les facteurs de transcription, les facteurs sigma, les protéines associées au nucléoïde et les petits ARNs régulateurs. Cette partie n'a pas l'ambition de fournir une description exhaustive de ce réseau, mais plutôt d'en présenter les acteurs principaux et leur diversité.

2.1.1 Les facteurs de transcription

En se liant aux régions promotrices, les facteurs de transcription (FTs) peuvent modifier la fixation de la RNAP, ce qui aura pour effet de réprimer ou d'activer la transcription (BALLEZA et al., 2009, BROWNING et al., 2010). L'emplacement du site de fixation de ces protéines est un paramètre important qui peut renseigner sur leur fonction. Une fixation en aval du promoteur ou au niveau des boîtes -10/-35 résulte typiquement dans la répression du gène en empêchant la fixation de la RNAP ou en bloquant sa progression. À l'inverse, une fixation en amont du promoteur facilite généralement le recrutement de la RNAP. Les FTs peuvent être divisés en deux catégories selon leur mode de détection du signal : les systèmes à un composant (OCSs) ou ceux appartenant aux systèmes à deux composants (TCSs). Le signal est directement perçu par les OCSs grâce à un domaine senseur alors que les TCSs impliquent la coopération d'une protéine qui joue le rôle de senseur et d'un FT dont l'activité est sous le contrôle de ce senseur. Ces derniers sont présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit. Les OCSs représentent la majorité des FTs observés chez les bactéries (ULRICH et al., 2005). Typiquement, les FTs sont des protéines à deux domaines, avec un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine supplémentaire associé à diverses fonctions comme la liaison d'un ligand ou les interactions protéine-protéine. Il existe une grande diversité de DBDs dans les FTs qui impliquent des mécanismes de fixation différents, mais les plus répandus dans les bactéries sont ceux de type hélice-coude-hélice (HTH) (ULRICH et al., 2005). Les domaines HTH forment une grande famille avec une organisation fondamentale en trois hélices avec des variantes comme les domaines tétra-hélicoïdaux, les HTHs ailés et les configurations ruban-hélice-hélice (ARAVIND et al., 2005). Typiquement, l'arrangement conservé des 3 hélices permet l'interaction de la protéine avec les nucléotides du sillon majeur par la deuxième hélice appelée "hélice de reconnaissance" (MATTHEWS et al., 1982)

Les différents DBDs permettent la classification des FTs des bactéries en familles. Chez *P. aeruginosa*, 371 FTs de type OCS sont prédits dans la souche PAO1 distribués dans plus de 20 familles différentes identifiées par le nom d'un FT référence (www.p2tf.org; ORTET et al., 2012) (Fig 2.2A). Les FTs de type LysR ou AraC représentent la moitié des FTs OCS de *P. aeruginosa* et

présentent un domaine senseur de type LysR_subst_bd et AraC_bd respectivement (Fig 2.2B). La famille LysR est la plus répandue dans l'ensemble des procaryotes (MINEZAKI et al., 2006). LysR est un FT de *E. coli* qui régule la biosynthèse de la lysine en présence du précurseur cet acide aminé, l'acide diaminopimélique (Patrick STRAGIER et al., 1983). Grâce à leur domaine de reconnaissance d'un ligand, ces FTs sont impliqués dans la régulation de nombreux processus physiologiques comme MexT qui est impliqué dans l'activation de la pompe MexEF-oprN chez *P. aeruginosa* (MADDOCKS et al., 2008, TIAN et al., 2009). La famille AraC tient son nom du FT de *E. coli* impliqué dans l'activation du promoteur P_{BAD} de l'opéron *araBAD* en réponse à l'arabinose (MIYADA et al., 1984). Le DBD des AraC présente l'association de deux motifs HTH successifs qui est caractéristique de ces FTs. Chez *P. aeruginosa*, ExsA, un FT de cette famille, joue un rôle clé dans la cytotoxicité en activant l'expression des gènes du SST3 dans des conditions pauvres en calcium, sous le contrôle de 3 autres protéines qui modulent la disponibilité de ExsA dans une cascade de couplage sécrétion/synthèse (URBANOWSKI et al., 2005).

La famille Xre a récemment attiré l'attention de notre équipe en raison de ErfA, un de ses représentants impliqué dans la répression de l'opéron *exlBA* (TROUILLON et al., 2020). Le domaine HTH de ErfA est associé à un domaine Cupine impliqué dans la liaison d'un ligand qui reste inconnu à ce jour (DUNWELL et al., 2004). Au total, 7 autres protéines partagent cette organisation dans PAO1 formant la sous-famille des Xre-Cupin comme PsdR et PauR (Fig 2.2B). Ces 8 FTs conservés chez *P. aeruginosa* sont des inhibiteurs transcriptionnels spécifiques de gènes du métabolisme situés typiquement à proximité de leur gène, comme l'a démontré une étude à laquelle j'ai participé (TROUILLON et al., 2021b) (Appendice A).

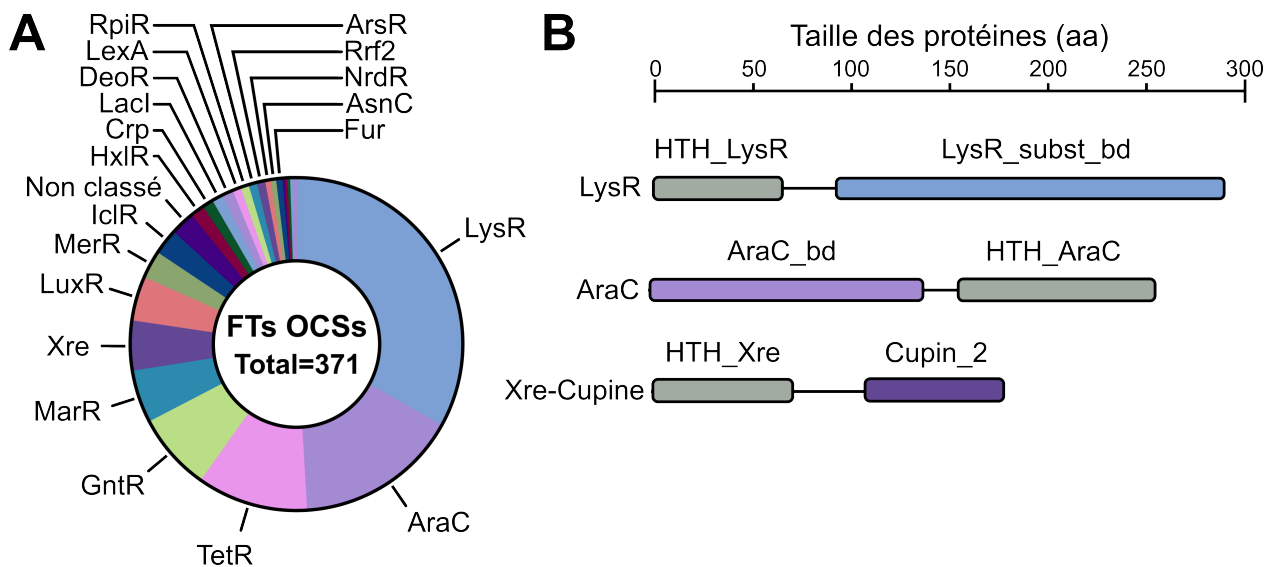


FIGURE 2.2. Les familles des FTs OCSs de *P. aeruginosa* PAO1. A) Distribution des familles des 371 FTs OCSs prédits dans la base de données P2TF (ORTET et al., 2012). B) Représentation schématique des domaines des familles LysR et AraC et de la sous-famille Xre-Cupine.

2.1.2 Les principaux autres acteurs

Les facteurs sigma

Les facteurs sigma (σ) sont des sous-unités de l'ARN polymérase qui permettent sa fixation spécifique sur certains promoteurs et jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la transcription. *P. aeruginosa* code pour de multiples facteurs sigma dont le nombre varie selon les souches. 24 facteurs σ sont identifiés dans la souche PAO1 dont RpoD (σ^{70}) qui est un régulateur global crucial qui permet la transcription de nombreux gènes de ménage impliqués dans les processus fondamentaux de la cellule en reconnaissant la séquence promotrice consensus : TTGACC-N17-TATAAT (POTVIN et al., 2008). À l'inverse, le facteur σ RpoS (σ^{38}) contrôle la transcription de plusieurs gènes conditionnels impliqués dans la réponse à divers stress comme les températures élevées ou le stress oxydatif (SUH et al., 1999). Parmi les facteurs σ prédits de PAO1, 19 sont des facteurs alternatifs appelés σ ECF (ECF ; fonctions extra-cytoplasmiques). Ces facteurs alternatifs régulent l'expression de certains groupes de gènes en réponse à différentes altérations extracellulaires et sont typiquement inhibés par l'interaction avec un facteur anti- σ partenaire. En réponse à un signal extracellulaire, un récepteur associé situé dans la membrane externe provoque la libération du facteur sigma de l'anti- σ , lui permettant ainsi de réguler ses cibles selon les conditions environnementales.

Les protéines associées au nucléoïde

Les protéines associées au nucléoïde (NAPs) sont capables de se lier à l'ADN avec une spécificité relativement faible et participent à la structuration dynamique du chromosome et la régulation globale des gènes. En recouvrant, en pliant ou en formant des ponts entre les brins d'ADN, ces protéines modifient l'activité des promoteurs à l'échelle du génome (BROWNING et al., 2010). En comparaison aux FTs, les NAPs sont supposées plus abondantes et contrôlent généralement un plus grand nombre de gènes. Cependant, cette définition est incomplète et des exemples ambigus en démontrent les limites, suggérant que la frontière entre un FT et une NAP n'est pas toujours évidente (DORMAN et al., 2020).

Chez *P. aeruginosa*, les 4 principales familles de NAPs sont présentes ; Fis, H-NS, HU et IHF (DILLON et al., 2010). Assez peu documenté dans *P. aeruginosa*, le fonctionnement de ces protéines sera principalement déduit de nos connaissances chez *E. coli*. Les familles HU, IHF et Fis organisent le chromosome en induisant des courbures dans l'ADN ; Fis et H-NS peuvent former des ponts ADN-protéine-ADN permettant de former des boucles ; HU et Fis participent à la structuration du chromosome en entourant l'ADN. L'expression de ces NAPs dépend de la phase de croissance comme la NAP Fis de *E. coli* qui est fortement exprimé pendant la croissance ex-

ponentielle (AZAM et al., 1999). Bien que ces NAPs jouent généralement un rôle de régulateur général en jouant sur la structure du chromosome, Fis est capable d'activer la transcription de gènes par l'interaction avec la RNAP comme un FT (MCLEOD et al., 2002). La paire de NAPs de la famille H-NS MvaT-MvaU de *P. aeruginosa* est une des mieux caractérisées chez ce pathogène. Ces protéines fonctionnent de manière coordonnée et interagissent préférentiellement avec les zones riches en AT, suggérant qu'elles permettent la répression d'éléments acquis par HGT puisque le génome de *P. aeruginosa* est riche en GC (CASTANG et al., 2008). Les gènes réprimés par MvaT et MvaU sont nombreux et sont impliqués dans des processus variés comme le catabolisme ou la formation de biofilm, notamment par l'inhibition de l'opéron *cupA* (Isabelle VALLET et al., 2004).

Les petits ARNs régulateurs

Les petits ARNs régulateurs sont des ARNs non codants ayant une taille comprise entre 50 et 400 nucléotides (NITZAN et al., 2017). Ces molécules jouent un rôle de régulateur post-transcriptionnel principalement inhibiteur par l'interaction avec des molécules d'ARNm modulant leur stabilité ou leur traduction (DUTTA et al., 2018). Dans certains cas, cette interaction peut être médiée par une protéine chaperonne comme Hfq ou ProQ chez *P. aeruginosa* (VOGEL et al., 2011; PITA et al., 2018, GEROVAC et al., 2021). Cependant, certains ARNs ne se lient pas aux ARNm, mais interagissent avec des protéines liant l'ARN (RBP) modulant ainsi leur activité typiquement de régulation post-transcriptionnelle. Un exemple de ce mécanisme sera détaillé dans la partie 2.2.3 avec la séquestration de RsmA par RsmY et RsmZ chez *P. aeruginosa* (MORADALI et al., 2017).

Plus de 500 petits ARNs régulateurs ont été identifiés chez *P. aeruginosa* PAO1 (GÓMEZ-LOZANO et al., 2012) mais peu ont été étudiés. En revanche, le rôle de certains de ces ARNs a été identifié, notamment dans la virulence comme SicX, un ARN noncodant de moins de 100 nucléotides régulé par le niveau d'oxygène qui a récemment été identifié comme un acteur de la transition entre l'infection chronique et l'infection aiguë de *P. aeruginosa* (CAO et al., 2023). La comparaison des ARNs identifiés dans les souches PAO1 et PA14 suggère qu'une part importante de ces acteurs sont variables entre les lignées de *P. aeruginosa* (GÓMEZ-LOZANO et al., 2015). Chez *P. aeruginosa*, Hfq apparaît comme un régulateur majeur ayant des centaines de cibles identifiées, variables selon la phase de croissance et le phylogroupe, dont certaines impliquées dans la virulence comme le SST3 (TROUILLON et al., 2022).

2.1.3 Un réseau plastique

La diversité des réseaux de régulation génétique, notamment alimentée par la plasticité du génome, participe à la variabilité phénotypique des bactéries et contribue à l'adaptation de ces organismes (BALLEZA et al., 2009). La transposition de notre compréhension de la régulation génétique d'une souche à une autre doit donc se faire avec parcimonie. En effet, les réseaux de régulation sont rarement abordés à l'échelle d'une espèce, ce qui contraint souvent à l'extrapolation des résultats obtenus dans des souches de référence. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de cette diversité, le plus évident étant le gain ou la perte d'acteurs du réseau de régulation. Les mutations ponctuelles des régulateurs ou des promoteurs peuvent aussi conduire à un réarrangement du réseau en modifiant la reconnaissance de l'ADN par les régulateurs (PEREZ et al., 2009).

Particulièrement chez *P. aeruginosa*, cette plasticité participe au succès de ce pathogène qui voit son réseau de régulation réorganisé au cours des infections chroniques notamment. Le gain ou la perte de gènes impliqués dans la virulence permet à cette bactérie de moduler sa pathogénicité dans les poumons de patients CF (GABRIELAITE et al., 2020). En particulier, les mutations des gènes codant pour des régulateurs sont fréquentes au cours de la colonisation de l'hôte. Une adaptation typique de ce pathogène aux poumons des patients atteints de la CF résulte de la mutation du facteur anti- σ MucA, partenaire du σ ECF AlgU. Ce gène est parmi les plus mutés lors des infections chroniques et résulte en un phénotype mucoïde dû à la surproduction des alginates (BOUCHER et al., 1997, MARVIG et al., 2015).

2.2 Régulation de la virulence

Comme précédemment évoqué, ce réseau joue un rôle clé dans la pathogénicité de cette bactérie et implique la coordination de ce large éventail de régulateur. Certaines voies de régulation bien caractérisées sont cruciales pour la virulence de *P. aeruginosa* comme le quorum sensing, les messagers secondaires nucléotidiques et le système Gac/Rsm.

2.2.1 Le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un système de communication utilisé par la plupart des bactéries pour synchroniser leur comportement en fonction de la densité de leur population (C. M. WATERS et al., 2005). Ce processus repose sur la production et la détection de molécules de signal appelées autoinducteurs (AI) et permet le déclenchement d'une réponse coordonnée en modifiant l'expression de nombreux gènes à l'échelle d'une communauté bactérienne (BARR

et al., 2015). Le système s'auto-induit grâce à des FTs qui stimulent la production d'AI lorsque leur concentration franchit un seuil.

Chez *P. aeruginosa*, trois principales voies de QS ont été décrites et sont responsables de la régulation de 10% des gènes : Las, Rhl et Pqs (Fig 2.3). Le QS est crucial pour la pathogénèse de *P. aeruginosa* et contrôle un large éventail de phénotype comme la formation de biofilm ou la sécrétion de toxines (TURKINA et al., 2019). Les FTs LasR, RhlR, et PqsR contrôlent l'expression des synthases d'AI LasI, RhlI et PqsI respectivement (MORADALI et al., 2017 ; GARCÍA-CONTRERAS, 2016). LasI et RhlI synthétisent des molécules qui appartiennent à la famille des acyl homosérine lactones tandis que le PQS synthétisé par PqsI est une quinolone. Les voies sont interconnectées notamment car leurs régulations sont croisées formant une hiérarchie. En effet, LasR joue un rôle central en activant les systèmes Rhl et Pqs, alors que RhlR inhibe le système Pqs et que PqsR active le système Rhl (J. LEE et al., 2015). Dans le cas de la voie Rhl, le contrôle de RhlI s'effectue aussi au niveau post-transcriptionnel par le biais du petit ARN non codant RhIS (THOMASON et al., 2019). Ces interactions entre voies du QS peuvent s'opérer à d'autres niveaux comme pour PqsE dont le gène est activé par PqsR et qui est capable d'interagir directement et de moduler l'activité de RhlR (BORGERT et al., 2022).

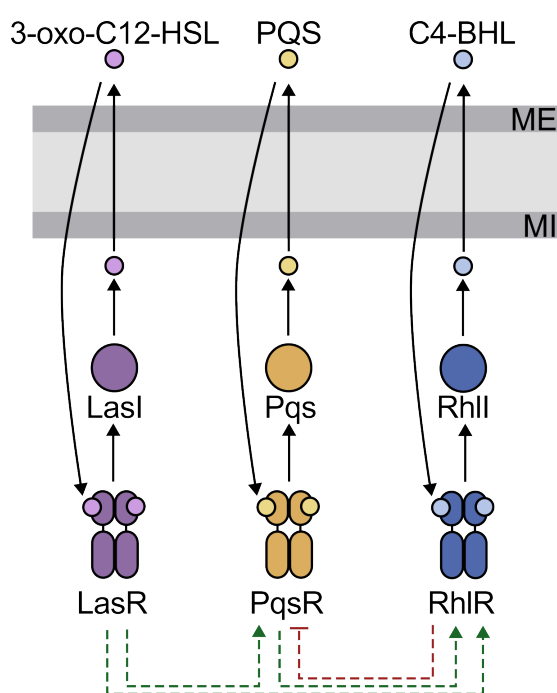


FIGURE 2.3. Les 3 voies du quorum sensing de *P. aeruginosa*. De haut en bas : Les molécules AI déclenchant les différents systèmes, les voies de synthèse des AI (Pqs : PqsABCDE), FTs. Les interactions régulatrices entre les différentes voies sont indiquées par des flèches en pointillés. ME : membrane externe. MI : membrane interne.

Une quatrième voie avait été proposée, sous le nom d'IQS ; cependant, la démonstration que

l'IQS est en réalité un sous-produit de la pyocheline et que sa voie de biosynthèse supposée ne participe pas au QS a remis en cause cette classification (CORNELIS, 2020). Une nouvelle voie a récemment été proposée permettant la synthèse de l'oxylylipine par la synthase DS régulée par le FT OdsR (MARTÍNEZ et al., 2019). Ce système diffère des 3 autres puisque la synthèse de l'AI s'effectue dans le milieu extracellulaire après que la DS a été sécrétée (MARTÍNEZ et al., 2022).

2.2.2 Les messagers secondaires nucléotidiques

Les bactéries utilisent plusieurs nucléotides linéaires et cycliques comme messagers secondaires dont la concentration intracellulaire permet de réguler divers processus cellulaires en réponse à des signaux environnementaux (PESAVENTO et al., 2009). Parmi les plus étudiés, se trouvent l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC) (MCDONOUGH et al., 2012), l'AMPC dimérique (di-AMPC) (CORRIGAN et al., 2013), le guanosine tetra-/penta-phosphate ((p)ppGpp) (HAURYLIUK et al., 2015), le guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMPc) (MARDEN et al., 2011) et le GMPc dimérique (di-GMPc) (RÖMLING et al., 2013).

Le di-GMPc est un des messagers secondaires les plus répandus et les plus étudiés chez les bactéries (JENAL et al., 2017). La concentration intracellulaire de di-GMPc est orchestrée par les diguanylate cyclases (DGC) qui le synthétisent à partir de GTP et les phosphodiesterases (PDE) qui le dégradent. Les DGCs possèdent typiquement un domaine GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe) qui catalyse la réaction de synthèse. Les PDE présentent généralement un domaine EAL (Glu-Ala-Leu) ou HD-GYP (His-Asp-Gly-Tyr-Pro) qui dégradent le messenger secondaire en di-GMP linéaire (pGpG) ou GMP respectivement. Chez *P. aeruginosa*, plus de 40 protéines présentent un de ces domaines et pourraient être impliquées dans le processus d'homéostasie du di-GMPc (VALENTINI et al., 2016a). Certains domaines EAL présentent des variations tout en restant fonctionnels comme le domaine ETL de FcsR (ROSSELLO et al., 2017) ou EVL de RocR (H. D. KULASEKARA et al., 2004). Ce messenger secondaire peut directement impacter la traduction d'ARNm par la liaison à des riboswitchs ou être détecté par des protéines ayant des rôles de régulateur transcriptionnel comme FleQ ou post-traductionnel comme PilZ (TAMAYO et al., 2007). FleQ est un FT qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilm comme l'opéron *pel* (ARORA et al., 1997, HICKMAN et al., 2008, C. BARAQUET et al., 2012, C. BARAQUET et al., 2012). Lorsque la concentration intracellulaire de di-GMPc est faible, FleQ réprime l'opéron *pel* en induisant la torsion de la région promotrice. La liaison du di-GMPc au domaine ATPase AAA+ de FleQ provoque une réorganisation de l'hexamère libérant un des sites de fixation du FT induisant l'activation du promoteur (MATSUYAMA et al., 2016) (Fig 2.4).

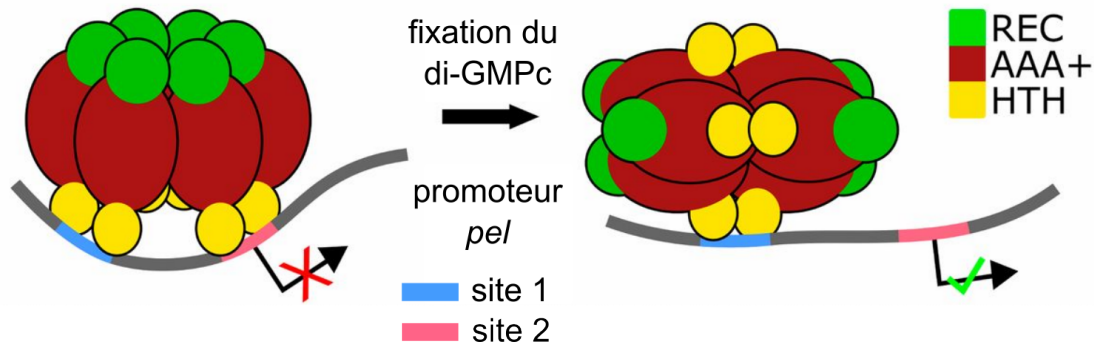


FIGURE 2.4. Activation de l'opéron *pel* par FleQ en réponse au di-GMPc. L'hexamère de FleQ se lie au promoteur *pel* sur 2 sites spécifiques. La fixation de di-GMPc sur FleQ induit un changement conformationnel du FT et rend le promoteur de *pel* accessible pour la transcription des gènes. (MATSUYAMA et al., 2016).

La concentration intracellulaire d'AMPc est modulée par les adénylate cyclases capable de le synthétiser et les phosphodiésterases qui le dégradent en AMP (FUCHS et al., 2010). L'AMPc joue un rôle clé dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* notamment par l'activation de Vfr, connu pour induire l'expression de facteurs de virulence tels que les T4Ps ou, par l'intermédiaire du FT ExsA, le SST3 (MARSDEN et al., 2016, CORRIGAN et al., 2013). Dans *P. paraeruginosa*, Vfr est responsable de l'activation de la synthèse du TPS ExlBA (BERRY et al., 2018). Ces deux messagers sont les marqueurs de la dichotomie entre les deux modes de vie de la bactérie. Une faible concentration de di-GMPc et une forte concentration d'AMPc est caractéristique du mode de vie planctonique associé à l'expression de nombreux facteurs de virulence. Au contraire, un taux élevé de di-GMPc et un niveau d'AMPc faible sont associés au mode de vie en biofilm, avec notamment une production plus importante d'exopolysaccharides (MOSCOSO et al., 2011).

L'adhérence de *P. aeruginosa* à une surface, notamment via ses T4Ps, est l'étape pivot entre ces deux modes de vie qui est un point de bascule entre les niveaux intracellulaires de cAMP et de di-GMPc. Ainsi, la perception de la surface provoque une rapide augmentation des concentrations des deux messagers, stimulant la production de T4Ps. La bactérie se divise ensuite de manière asymétrique, permettant le maintien d'une cellule fille attachée à la surface avec des niveaux de di-GMPc élevés et le détachement d'une cellule fille disposant du flagelle contenant de faibles concentrations de di-GMPc (KUCHMA et al., 2022, LAVENTIE et al., 2019).

2.2.3 Le système Gac/Rsm

La voie Gac/Rsm est l'articulation d'acteurs de diverses natures : le TCS GacS/GacA, les petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ et le régulateur post-transcriptionnel RsmA. GacA active la transcription de RsmY et RsmZ qui possèdent plusieurs sites de liaison à RsmA, ce qui conduit

à sa séquestration. RsmA est une RBP qui module l'initiation de la traduction d'ARNm par la reconnaissance du motif GGA exposé dans une boucle ou une tige-boucle en 5' de ces molécules. En altérant la structure des ARNm cibles, RsmA peut avoir un effet positif ou négatif sur leur traduction, typiquement en modulant l'accessibilité des séquences de Shine-Dalgarno aux ribosomes. Ce régulateur joue un rôle clé dans la transition entre infection aiguë et chronique en inhibant notamment la formation du biofilm et en induisant la production de facteurs de virulence comme le SST3 (Fig 2.5A) (BRENCIC et al., 2009a, IRIE et al., 2020). Dans certains cas, les mécanismes de régulation de RsmA sont bien caractérisés comme pour les ARNm de *psl* et *phz* avec des effets antagonistes. RsmA se fixe aux extrémités 5'-UTR de ces ARNm favorisant ou empêchant la formation de structure en épingle pour *pel* et *phz* respectivement (IRIE et al., 2010, REN et al., 2014). Ces structures entravent la reconnaissance des ARNm par le ribosome, inhibant leur traduction. Récemment, le nombre de transcrits qui interagissent avec RsmA a été évalué à plus de 800 (GEBHARDT et al., 2020, CHIHARA et al., 2021).

Ce système s'est complexifié devenant l'illustration d'une cascade de régulation élaborée articulant de mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (Fig 2.5B). Plusieurs études suggèrent que Hfq pourrait participer à ce réseau notamment car une grande partie de ses ARN cibles sont communes avec ceux de RsmA (GEBHARDT et al., 2020). L'interaction de Hfq avec le petit ARN non codant sRNA 179 participe à l'activation de *rsmY* (JANSSEN et al., 2020). De plus, Hfq est nécessaire à la régulation de *vfr* par RsmA en permettant sa fixation sur ses ARNm cibles (Fig 2.5B) (IRIE et al., 2020). Ce mécanisme pourrait impliquer RhlS qui interagit avec Hfq et active la traduction de Vfr (TROUILLON et al., 2022). En régulant notamment différents FTs comme FleQ, ExsA et RhlR, le régulateur global Vfr orchestre des phénotypes variés comme la pathogénèse et la formation de biofilm. La voie Gac/Rsm s'avère ainsi particulièrement interconnectée avec le QS, intégrant le di-GMPc et l'AMPc mettant en scène des acteurs de natures variées illustrant la richesse des réseaux de régulation bactériens.

La représentation de ce système est simpliste et d'autres protéines identifiées sont impliquées. Ainsi, la transduction du signal par GacS fait appel à de nombreux acteurs interconnectés qui seront présentés dans le chapitre 3. De plus, RsmW et RsmV sont des ARNs similaires à RsmY et RsmZ qui participent à la régulation de RsmA mais qui ne sont pas sous le contrôle de GacA (JANSSEN et al., 2018b, MILLER et al., 2016). Enfin, RsmN est une RBP qui est aussi séquestrée par les 4 ARNs Rsm et dont les ARNm cibles diffèrent de ceux de RsmA (CHIHARA et al., 2021).

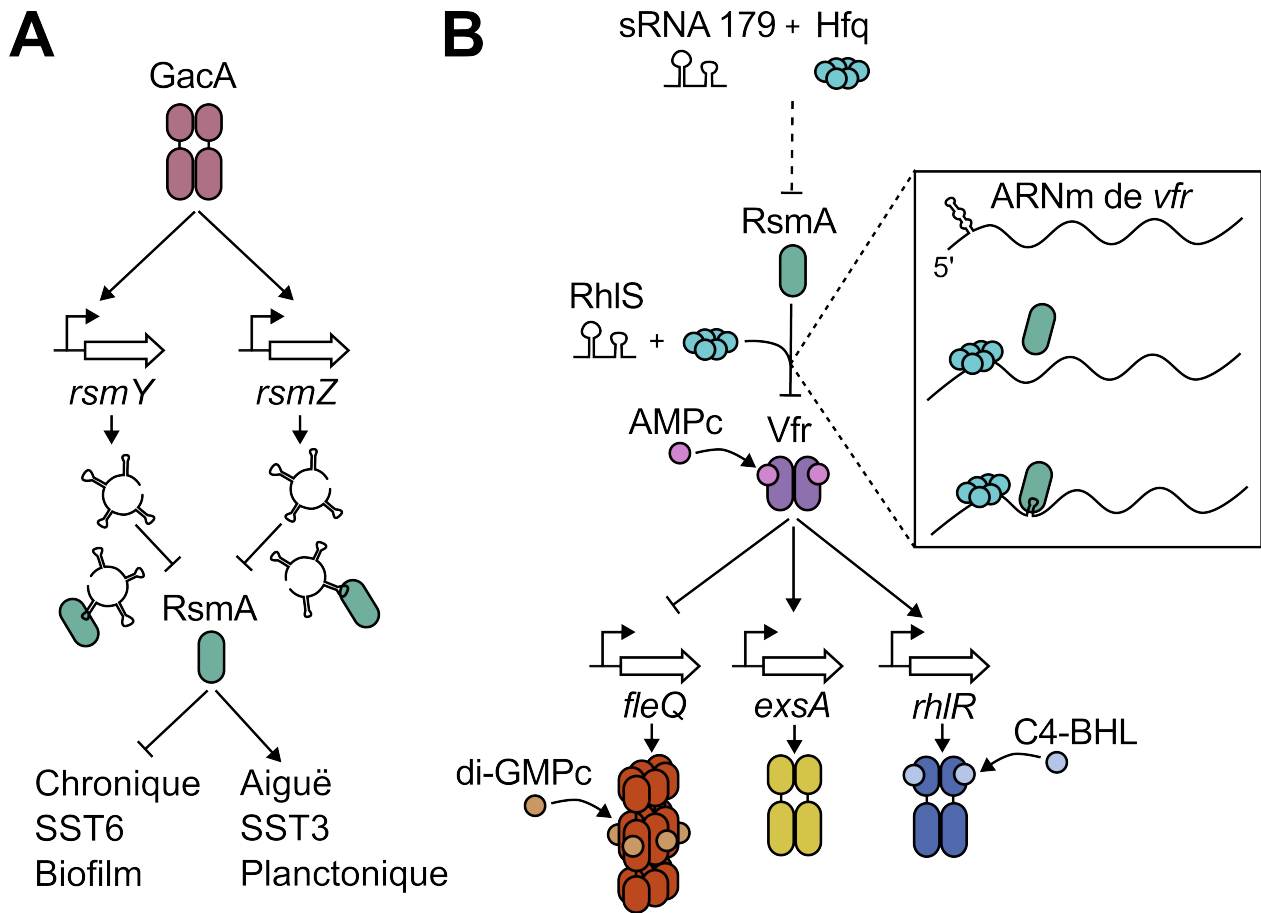


FIGURE 2.5. Le système Gac/Rsm. A) Une fois phosphorylé, le RR GacA active la transcription des gènes des petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ. Ceux-ci présentent des structures « en épingle » et vont séquestrer RsmA l'empêchant de réguler ses ARNm cibles impliqués dans la transition entre mode de vie planctonique et sessile B) Modèle hypothétique d'interconnexions entre Hfq, le QS, l'AMPc, le di-GMPc et RsmA.

3 LES SYSTÈMES DE RÉGULATION À DEUX COMPOSANTS DE *P. aeruginosa*

Sommaire

3.1 Bases moléculaires des TCSs	29
3.1.1 Diversité des HKs	29
Les domaines senseurs cytoplasmiques	30
Les domaines senseurs périplasmiques	30
La transmission du signal	31
3.1.2 Diversité des RRs	32
Le domaine REC	32
Les domaines effecteurs	33
Les mécanismes de régulation	34
3.1.3 Le transfert de phosphate	34
Les phosphorelais	35
Spécificité de l'interaction	36
3.1.4 Evolution des TCSs	37
Plasticité des TCSs	37
Interconnexions des TCSs	38
3.2 Le réseau des TCSs de <i>P. aeruginosa</i>	39
3.2.1 Le réseau Gac/Rsm et HptB	40
3.2.2 Régulation des <i>cup</i>	41
3.2.3 La résistance aux métaux	43
3.2.4 Les nouveaux défis	43

Confrontées à des environnements aux conditions variables, les bactéries sont exposées à une myriade de stimuli de natures variées. La perception de signaux extracellulaires est un défi important pour l'adaptation de ces organismes qui ont recours à de nombreux systèmes de transduction de signaux pour y parvenir comme les sérine-thréonine kinases, les σ ECF, les chimiosenseurs ou les systèmes de régulation à deux composants (TCSs).

Les TCSs forment une des plus grandes familles de systèmes de transduction ; très répandus chez les bactéries, ils sont aussi présents dans certaines plantes et champignons. Le modèle archétypal des TCSs implique deux protéines communiquant par transfert de phosphate : une histidine kinase (HK) et un régulateur de réponse (RR). Typiquement transmembranaire, les dimères de HKs s'autophosphorylent sur un résidu His conservé à partir d'ATP en réponse à un signal. Le groupement phosphate est ensuite transmis au RR sur un résidu Asp conservé conduisant l'activation de cette protéine qui est souvent un FT (Fig 3.1).

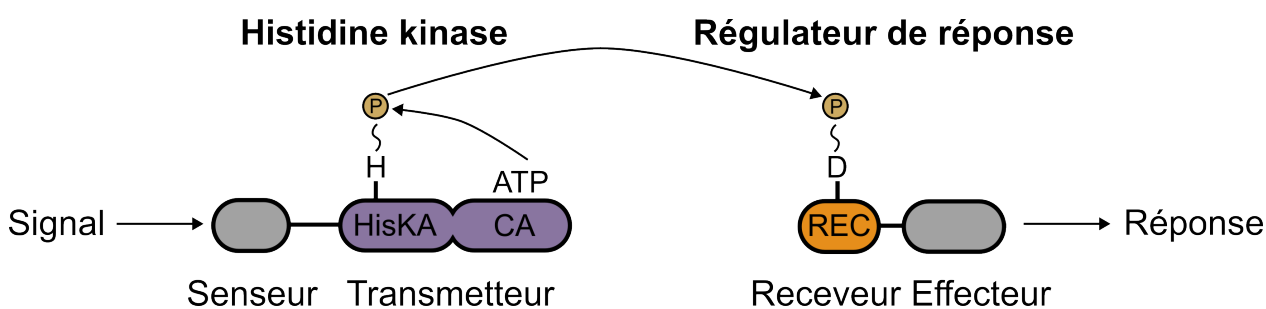


FIGURE 3.1. Archétype du TCS. Domaines transmetteurs en violet. En violet, les domaines transmetteurs ; en orange, le domaine receveur ; en gris, le domaine senseur de l'HK et effecteur du RR

Ces systèmes jouent un rôle clé dans la physiologie des microorganismes en participant notamment à leur adaptabilité. Depuis la première utilisation de l'appellation TCS en 1986, nos connaissances de ces systèmes sont en constante expansion (NIXON et al., 1986). Ils sont présents dans la plupart des genres bactériens et leur nombre est proportionnel à la taille des génomes (Fig 3.2). Abondants chez *P. aeruginosa*, ils jouent un rôle majeur en contrôlant de multiples phénotypes comme la virulence, la formation de biofilm ou la résistance aux antibiotiques (FRANCIS et al., 2018).

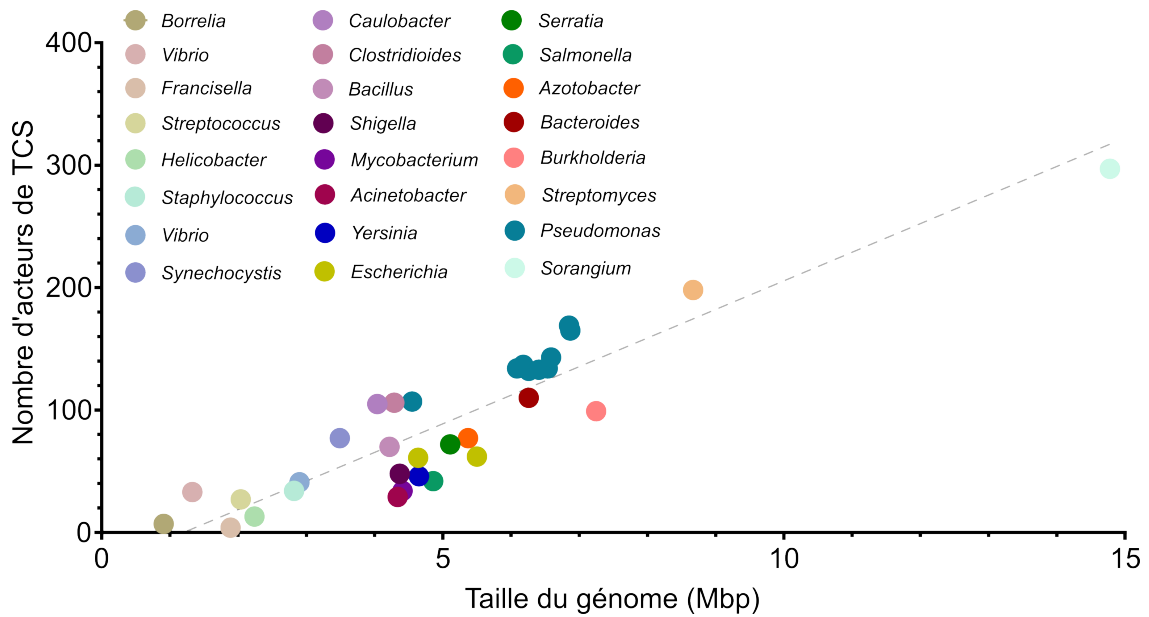


FIGURE 3.2. Nombre d'acteurs de TCS identifiés dans différents genres bactériens. Les acteurs comprennent les HKs, RRs et HPts répertoriés dans MiST. (GUMEROV et al., 2020)

3.1 Bases moléculaires des TCSs

Le nombre d'excellentes revues qui traitent en détail des fonctionnements des TCSs est considérable allant de la perception du signal (MASCHER et al., 2006) à la réponse (GALPERIN, 2010) en passant par la transduction (CASINO et al., 2010), les interférences (ROWLAND et al., 2014) et l'évolution (CAPRA et al., 2012). Dans cette partie, une vision synthétique sera donnée pour comprendre les mécanismes en jeu et la diversité de ces systèmes en exemplifiant ces propos avec *P. aeruginosa* si possible.

3.1.1 Diversité des HKs

L'activité de l'HK repose sur deux domaines essentiels, dits "transmetteurs", qui sont largement conservés et forment le cœur fonctionnel des HKs. Le domaine de dimérisation et de phosphotransfert d'histidine (HisKA ou DHp) qui contient l'His acceptant le phosphate et entre directement en contact avec le RR et le domaine de catalyse du transfert de phosphate de l'ATP (CA). Les domaines cœurs HisKA/CA sont généralement associés à des domaines "senseurs" impliqués dans la détection et/ou la transduction du signal dans la partie N-terminale de la HK. Ces domaines peuvent être situés dans la partie cytoplasmique ou périplasmique de la protéine permettant la détection de signaux dans les différents compartiments cellulaires. Dans la grande majorité des cas, la nature du signal est inconnue et son identification est difficile.

Les domaines senseurs cytoplasmiques

Les domaines Per-ARNT-Sim (PAS) sont les principaux domaines senseurs cytoplasmiques des HKs. Ces domaines sont présents dans de nombreuses familles de protéines de transduction de signaux et fonctionnent comme des modules de détection intracellulaire largement répandus chez les HKs et souvent impliqués dans leur dimérisation (MÖGLICH et al., 2009, STUFFLE et al., 2021). Classiquement, le ligand est une petite molécule reconnue dans une fente d'un homodimère de PAS mais le signal peut aussi être la teneur en oxygène, le potentiel redox ou la lumière (HENRY et al., 2011). Un autre mécanisme a été observé dans certaines HKs impliquant la reconnaissance d'ions métalliques à la surface du domaine PAS comme dans WalK chez *Staphylococcus aureus* (MONK et al., 2019). Dans les HKs, les domaines PAS sont souvent situés en amont des domaines HisKA/CA et sont impliqués dans la transduction du signal comme dans le cas de BvgS chez *Bordetella pertussis* où ils jouent un rôle mécanique dans l'activation du système (DUPRÉ et al., 2015b). Ces domaines peuvent aussi participer à l'inhibition de l'HK en jouant le rôle de verrou en absence de signal comme dans RavS chez *Xanthomonas campestris* (CHENG et al., 2019).

D'autres domaines senseurs peuvent être associés aux HKs comme les domaines GAF (PDE liant le GMPc, Adenylate cyclases d'*Anabaena* et FhlA d'*E. coli*) capables de détecter le di-GMPc (ZORAGHI et al., 2004).

Les domaines senseurs périplasmiques

Les principaux types de domaines périplasmiques des HKs sont les domaines senseurs de type « protéine de liaison périplasmique » (PBP), domaines « Canaux Ca^{2+} , récepteur de chimiotaxie » (CACHE) et les domaines « PhoQ-DcusS-CitA » (PDC).

Les domaines PBP sont présents dans d'autres familles de protéines aux fonctions variées comme les transporteurs à cassettes liant l'ATP (TAM et al., 1993). Typiquement, deux domaines PBP d'une protéine interagissent pour former le site de liaison du ligand à l'interface, adoptant une conformation ouverte ou fermée si la molécule signal est présente. Les protéines ayant un domaine PBP ont une grande variété de ligands identifiés comme des hydrates de carbone, des acides aminés, des anions, des ions métalliques, des dipeptides et des oligopeptides (DWYER et al., 2004). En revanche, les signaux perçus par les domaines PBP des HKs sont rarement connus sauf pour la HK BvgS chez *Bordetella pertussis* qui possède deux domaines PBPs nommés « Venus-Fly trap » capable de détecter la nicotine (DUPRÉ et al., 2015a). Plusieurs sous-familles de domaines appartiennent au groupe des PBPs comme le domaine Sbp_bac_3 qui est présent dans l'HK RocS1 de *P. aeruginosa*.

Les domaines PDC sont parfois classés comme une sous-famille périplasmique de la famille des domaines PAS, en se basant sur les homologies structurales entre les deux domaines, et sont fréquents dans les protéines de transduction de signaux (CHANG et al., 1992). La nomenclature de ces domaines est sujet à débat et il a été proposé que les domaines PAS périplasmiques devraient plutôt être classés comme des domaines CACHE (UPADHYAY et al., 2016). Les signaux identifiés par ces domaines sont variés et sont généralement des petites molécules comme les HKs CitA et DcuS dont les domaines PDC détectent directement le citrate et le C4-dicarboxylate respectivement (KRÄMER et al., 2007). Il est intéressant de noter que cette dernière molécule est aussi reconnue par le domaine CACHE de DctB dans *Rhizobium leguminosarum*, démontrant que des domaines différents sont capables de reconnaître les mêmes signaux (REID et al., 1998). Ces domaines peuvent aussi se lier à des métaux divalents comme le Ca^{2+} et le Mg^{2+} capable de se fixer au domaine PDC de PhoQ chez *Salmonella typhimurium* (VÉSCOVI et al., 1997).

La multiplication de ces domaines de détection, souvent en combinaison, permet l'intégration d'une multitude de signaux. L'intégration de plusieurs signaux peut amplifier l'activation d'une HK comme dans le cas de VirA de *Agrobacterium tumefaciens* capable de détecter les monosaccharides dans le périplasma et dont l'activation est améliorée par la détection de phénol cytoplasmique (CHANG et al., 1992). La détection de ces signaux peut être indépendante comme dans le cas des domaines périplasmiques PBP de BvgS chez *Bordetella bronchiseptica* qui sont capables d'activer l'HK en absence des domaines cytoplasmiques PAS (SOBRAN et al., 2019).

La transmission du signal

Les HKs possèdent généralement un domaine transmembranaire constitué de 2 à 4 hélices alpha. La perception du signal induit un réarrangement conformationnel qui doit traverser la membrane. Quatre mouvements de ces hélices sont proposés pour expliquer ce phénomène : l'association/dissociation, le mouvement piston, le mouvement de ciseaux et la rotation (GUSHCHIN et al., 2018).

Certaines HKs possèdent un domaine HAMP dans la partie cytoplasmique à proximité des hélices transmembranaires (PARKINSON, 2010). Ce domaine joue aussi un rôle dans la transduction du signal en participant aux changements conformationnels de l'HK. Par exemple, le domaine HAMP de l'HK NarQ de *E. coli* permet la conversion du mouvement de piston des hélices transmembranaires en rotation (GUSHCHIN et al., 2017). Les domaines HAMP sont de plus capable de transmettre ces changements de conformation dans les deux sens comme il a été observé pour la protéine LapD de *Pseudomonas fluorescens* (COOLEY et al., 2016).

3.1.2 Diversité des RRs

Les RRs sont composées d'un domaine receveur (REC) N-terminal conservé et d'un domaine effecteur C-terminal dont les fonctions sont diverses. Le plus souvent, le domaine effecteur est un DBD et ces RRs appartiennent donc à la famille des FTs capables de se fixer à l'ADN pour moduler la transcription des gènes. Ces domaines effecteurs peuvent aussi avoir des activités enzymatiques ou être impliqués dans les interactions protéine-protéine. Dans certains cas, le domaine REC n'est associé à aucun autre domaine comme dans le cas de CheY. Ce RR est capable de se lier à la protéine FliM à la base du flagelle induisant la rotation de ce dernier dans le sens horaire (FERRÁNDEZ et al., 2002) (Fig 3.3).

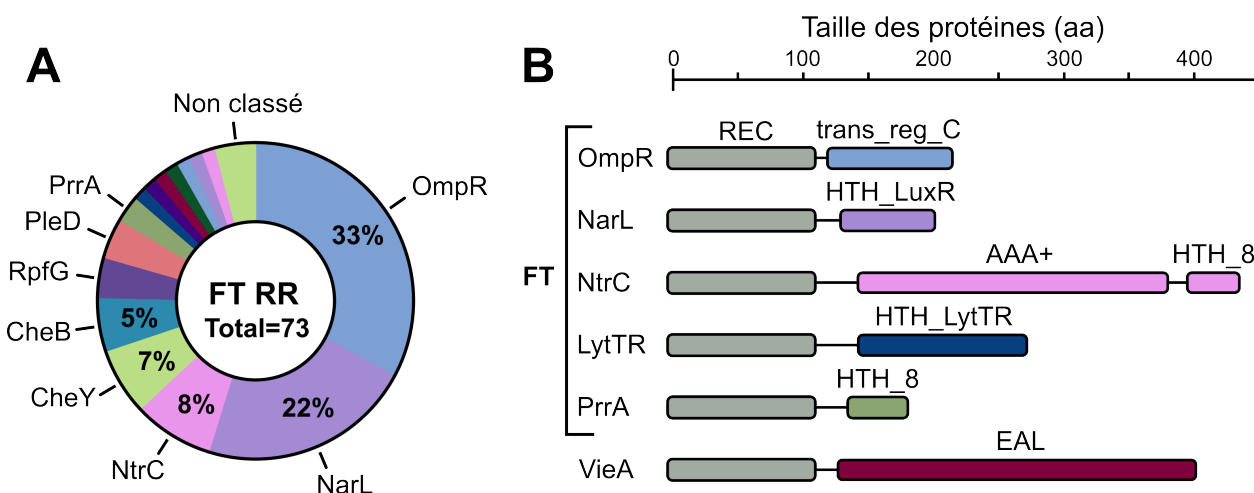


FIGURE 3.3. Les RRs de *P. aeruginosa* PAO1. A) Distribution des familles des 371 RRs prédits dans la base de données P2CS (ORTET et al., 2015). B) Représentation schématique des domaines des familles de RR ayant un DBD (FT) et de la famille VieA possédant un domaine avec une activité PDE.

Le domaine REC

Lorsque le résidu Asp conservé du domaine REC est phosphorylé, cela induit un changement de conformation et module l'activité de la protéine. En plus de l'Asp phosphoaccepteur, les domaines REC possèdent également un groupe de résidus conservés dans le site actif qui sont importants pour la phosphorylation et la propagation du signal (S.-Y. LEE et al., 2001). Le domaine REC est composé de cinq hélices α entourant un feuillet β parallèle central à cinq brins. Les RRs existent ainsi en deux états, inactif et actif, qui résultent typiquement de la phosphorylation et de la dimérisation. La substitution de certains résidus du domaine REC des RRs permet dans certains cas d'inactiver ou d'activer constitutivement la protéine en prolongeant ou en mimant l'état de phosphorylation (SMITH et al., 2003).

Généralement, le statut phosphorylé du RR représente l'état actif, tandis que l'état non phosphorylé est inactif. Cependant, certains RRs sont actifs sous la forme non phosphorylée comme AlgR chez *P. aeruginosa*. Lorsque ce RR est phosphorylé par la HK AlgZ, il active notamment les gènes des T4Ps (WHITCHURCH et al., 2002). En revanche, l'activation transcriptionnelle de l'opéron *alg* par AlgR est indépendante de sa phosphorylation (MA et al., 1998). *In vitro*, les RRs non phosphorylés peuvent se fixer à leurs cibles ADN, mais avec une affinité plus faible qu'à l'état phosphorylé (JONES et al., 2005a).

Les domaines effecteurs

Les RRs présents chez les bactéries sont souvent des FTs (64,5%; GALPERIN, 2010) et peuvent être classés en sous-familles selon leur DBD présentant une grande diversité de fonctionnements. Les sous-familles OmpR, NarL et NtrC sont les plus représentées chez les bactéries et chez *P. aeruginosa* (GALPERIN, 2010). La sous-famille OmpR présente un domaine HTH ailé qui se lie généralement en tandem par une dimérisation en tête à tête des domaines REC (GAO et al., 2010). La sous-famille NarL est caractérisée par le domaine HTH de type LuxR (aussi appelé GerE). Il a été observé dans cette sous-famille que la fixation à l'ADN peut favoriser la dimérisation de certains RRs comme dans le cas de NarL (MARIS et al., 2002). La sous-famille NtrC présente l'association d'un domaine ATPase AAA+ et du DBD Fis (GALPERIN, 2010). Les trois domaines de ces RRs participent à leur oligomérisation et régulent l'activité du domaine ATPase (S.-Y. LEE et al., 2003). Le rôle de ce dernier est de catalyser l'isomérisation du complexe fermé entre le promoteur et σ^{54} -RNAP en complexe ouvert. FleQ est un régulateur qui possède la même architecture que les RRs NtrC mais son domaine REC ne présente pas l'Asp conservé nécessaire à sa phosphorylation qui est remplacée par une Ser. Ce domaine REC est nécessaire aux fonctions de FleQ en participant à l'oligomérisation de ce FT (ARORA et al., 1997, SU et al., 2015). A l'état inactif, plusieurs conformations ont été observées pour les RRs de ces familles impliquant généralement de nombreux contacts entre le domaine HTH et le domaine REC, comme pour NarL, ce qui bloque stériquement la reconnaissance de l'ADN (BAIKALOV et al., 1996).

Les RR possédant des activités enzymatiques représentent 8% des RRs identifiés dans les bactéries (GALPERIN, 2010). La plupart sont des régulateurs du di-GMPc et arborent des domaines GGDEF, EAL ou HD-GYP (RÖMLING et al., 2005). Un deuxième groupe important est celui des protéines de type CheB ayant une activité méthylestérase (DJORDJEVIC et al., 1998). Plus rarement, les RRs peuvent être dotés de domaines de liaison aux protéines ce qui représente 1% des RRs (Galperin 2010). C'est le cas par exemple de CbrB qui interagit avec RmcA, une protéine membranaire avec un domaine GGDEF et un domaine EAL régulant ainsi la formation du biofilm et l'expression du SST3 (KONG et al., 2022). 1% des RRs possède un do-

maine de liaison à l'ARN appartenant à la sous-famille ANTAR des facteurs d'anti-termination tels que AmiR (O'HARA, 1999). Enfin, environ 23% des RRs identifiés chez les bactéries sont uniquement constitués d'un domaine REC (GAO et al., 2019).

Si les RRs présentent souvent une architecture simple de domaines REC-effecteurs, ils peuvent avoir des organisations plus complexes avec des domaines de signalisation supplémentaires, notamment PAS, GAF ou HisKA. La grande variété de RRs identifiés à ce jour souligne la polyvalence du domaine REC et des TCSs.

Les mécanismes de régulation

L'autorégulation transcriptionnelle des TCSs est courante et joue un rôle clé dans l'activation de ces systèmes. Non seulement impliqué dans l'ajustement de la réponse, ce mécanisme d'autorégulation est nécessaire dans certains systèmes comme PhoPQ de *S. enterica serovar Typhimurium*. Dans ce cas, la modification du site de fixation de PhoP sur le promoteur de son propre gène a abrogé l'activation des cibles de PhoPQ (MITROPHANOV et al., 2010). Ces processus d'autorégulation peuvent aussi participer à la limitation de phénomène d'interférence entre les TCSs en renforçant certains RRs par une surproduction (GROISMAN, 2016).

Il a récemment été observé que les HKs phosphorylées peuvent être séquestrées par des RRs non partenaires, comme dans le système MtrAB de *Mycobacterium tuberculosis*. Ainsi, MtrB démontre une meilleure affinité pour certains RRs que pour MtrA (SANKHE et al., 2023). Ce processus pourrait maintenir un système verrouillé en l'absence d'un signal suffisamment fort, évitant une fuite qui pourrait notamment devenir une réponse disproportionnée en cas d'autorégulation.

3.1.3 Le transfert de phosphate

Dans les TCSs, la communication entre l'HK et le RR repose sur un phosphotransfert entre deux résidus His-Asp. Le groupement phosphate se lie de manière covalente et réversible aux senseurs et aux régulateurs modulant l'état d'activation de ces protéines par des réarrangements conformationnels. Sa transmission requiert la coordination de plusieurs domaines entre l'HK et le RR. Typiquement les HKs ont une activité d'autokinase permettant la phosphorylation du RR mais elles peuvent avoir une activité phosphatase conduisant à sa déphosphorylation, ou être bifonctionnelles. Bien que les RRs catalysent généralement leur phosphorylation à partir de l'HK *in vivo*, ils peuvent se phosphoryler *in vitro* par le biais de petits phosphodonneurs comme le phosphate d'acétyle (LUKAT et al., 1992). A l'inverse, le domaine REC est aussi impliqué dans l'autodéphosphorylation du résidu Asp ce qui participe à l'interruption de la signalisation en

absence de stimulus.

Les phosphorelais

Classiquement, le transfert de phosphate s'effectue de l'His du domaine HisKA de l'HK vers l'Asp du domaine REC du RR. Cependant, les HKs sont des protéines modulaires et dans certains cas, la transmission implique plusieurs étapes en raison de protéines d'HKs plus complexes (Fig 3.4).

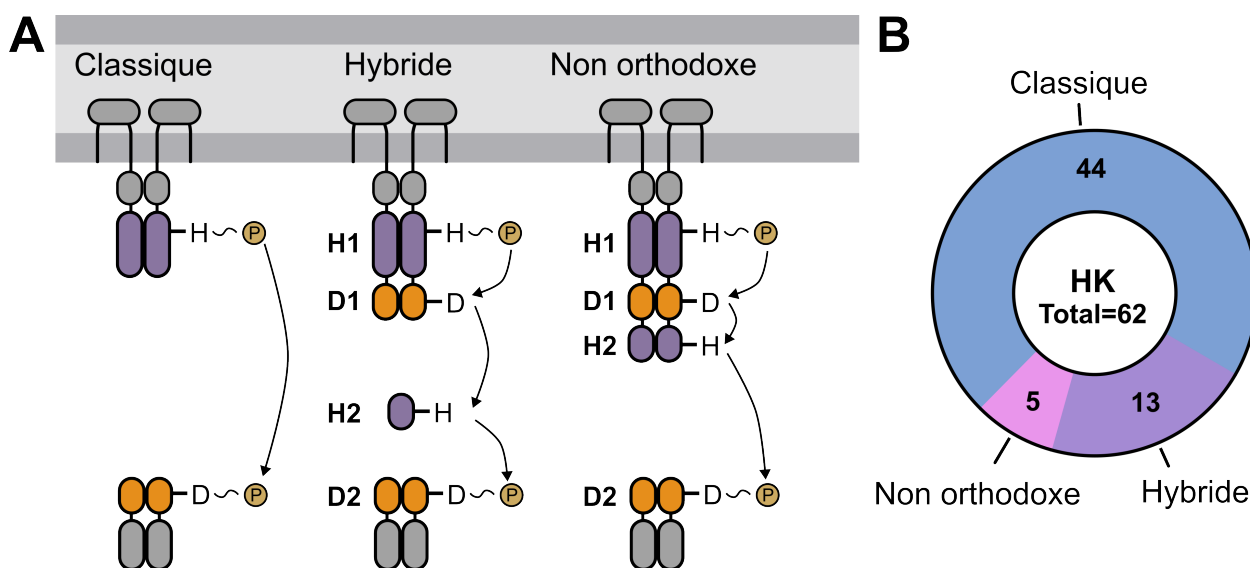


FIGURE 3.4. Les types d'HKs. A) Phosphorelais impliqué dans les différents types d'HKs. Les domaines HisKA/CA, REC, HPT des HKs et des modules HPT sont abrégés en H1, D1 et H2 respectivement. De même, le domaine REC du RR est annoté D2. B) Les différents types d'HKs dans le génome de PAO1 d'après la base de données P2CS (ORTET et al., 2012).

Ainsi, les HKs "hybrides" possèdent un domaine REC à leur extrémité C-terminale qui reçoit le groupement phosphate du domaine HisKA : elles représentent 21% des HKs de PAO1. Dans ce cas, le bon adressage du phosphate au RR nécessite une troisième protéine possédant un domaine de phosphotransfert contenant une histidine (HPT). Ces modules HPT sont monomériques et jouent le rôle d'intermédiaire entre l'HK hybride et le RR. Trois HPT sont prédits dans le génome de PAO1 : HptA, HptB et HptC (RODRIGUE et al., 2000). Ces modules permettent de connecter plusieurs HKs et plusieurs RRs formant des réseaux branchés, cependant seul HptB possède des partenaires identifiés comme il sera présenté dans la partie 3.2.1.

Dans le cas de HK "non-orthodoxes" qui représentent 8% des HKs de PAO1, le senseur comporte successivement les domaines HisKA/CA, REC et HPT impliquant un phosphorelais en trois étapes avant d'atteindre le RR. Certaines organisations non conventionnelles de domaines sont également observées, comme le cas de la protéine RetS de *P. aeruginosa* qui possède deux domaines REC successifs (GOODMAN et al., 2004). La HK ShkA chez *Caulobacter crescentus* possède

également deux domaines REC, dont un fusionné avec le domaine CA et qui est impliqué dans la détection du di-GMPc (DUBEY et al., 2020). Enfin, certaines HKs sont dépourvues de domaines transmembranaires et sont donc solubles dans le cytoplasme. C'est le cas par exemple de CheA qui régule ses RRs partenaires CheY et CheB impliqués dans le contrôle de la chimiotaxie chez les protéobactéries (BILWES et al., 2003). Il est intéressant de noter que la quasi-totalité des HKs hybrides et non orthodoxes semblent s'intégrer dans des réseaux de TCSs de plusieurs HKs à communication croisée, plutôt que dans des réseaux canoniques à une paire, comme il sera détaillé pour GacS, RetS, LadS, PA1611 et SagS dans la partie 3.2.1.

Spécificité de l'interaction

Les HKs présentent généralement une préférence cinétique pour leur régulateur de réponse (Jeffrey M SKERKER et al., 2005). L'interaction spécifique entre l'HK et son RR partenaire repose sur l'appariement approprié des acides aminés de ces protéines. Ainsi, il existe un nombre limité de résidus déterminants pour cette spécificité dans les domaines HisKA/CA et REC au niveau de l'interface d'interaction entre les deux domaines (Fig 3.5) (Jeffrey M. SKERKER et al., 2008 , CASINO et al., 2009). Ces résidus sont typiquement enrichis en petit résidus, hydrophobes et polaires, suggérant que la reconnaissance est médiée principalement par des interactions hydrophobes et de van der Waals qui favorisent la complémentarité stérique (PODGORNAIA et al., 2013). Il a été observé que le domaine HisKA suffit pour la reconnaissance par REC, mais la partie CA pourrait aussi jouer un rôle dans la spécificité (PARK et al., 1998, CASINO et al., 2009).

D'autres mécanismes participent à la spécificité de la signalisation notamment en empêchant les interactions avec d'autres TCSs. Parmi ces processus, l'activité phosphatase de certaines HKs permet de maintenir le RR partenaire dans un état inactif prévenant toutes phosphorylations par d'autres HKs comme dans le cas de CopS de *P. aeruginosa* qui sera présenté dans la partie 3.2.3. Le bon ajustement des concentrations de HKs et de RRs participe aussi à cette préférence cinétique. Les RRs sont typiquement plus abondant que les HKs avec un ratio estimé à 1/35 pour EnvZ et OmpR chez *E. coli* (CAI et al., 2002), ce qui renforce la compétition pour le phosphotransfert. Enfin, des modifications du RR peuvent aussi altérer son affinité pour les HKs comme l'acétylation. Dans le cas de TcrX, l'acétylation de ce RR empêche les interférences avec le TCS MtrAB de *Mycobacterium tuberculosis*. En absence de cette modification post-traductionnelle, TcrX capte le groupement phosphate de MtrB, verrouillant ainsi l'activation de MtrA (K. K. SINGH et al., 2019).

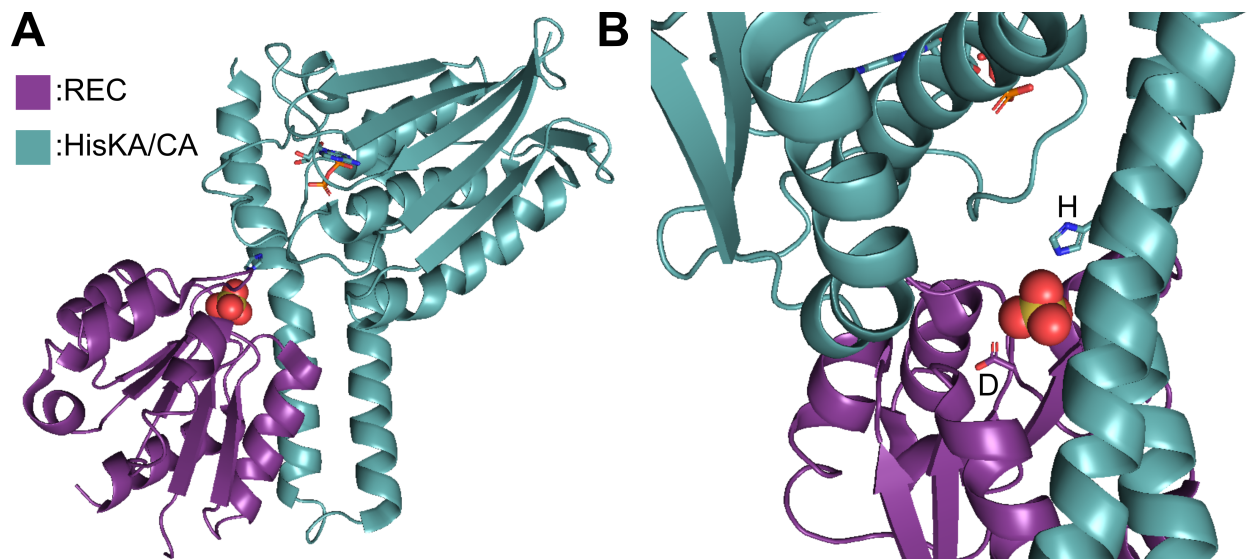


FIGURE 3.5. Interaction entre le domaine REC et le domaine HisKA/CA. Représentation de l'interaction entre le domaine HisKA/CA (vert) de HK853 et le domaine REC de RR468 (violet) de *Thermotoga maritima* par une vue d'ensemble (A) et un focus sur les résidus H260 de l'HK et D53 du RR interagissant avec le groupement phosphate (remplacé par du SO₄) (B) (PDB : 3DGE; CASINO et al., 2009)

3.1.4 Evolution des TCSs

Plasticité des TCSs

Les TCSs sont très répandus chez les bactéries et leur abondance contribue à l'adaptabilité de ces organismes. Le nombre de TCSs est très variable selon les espèces bactériennes; rare dans les bactéries dont le mode de vie est restreint à un hôte comme *Mycoplasma genitalium* dont le génome ne porte aucun TCS prédit, il peut atteindre des centaines dans les bactéries confrontées à des environnements variés comme *Sorangium cellulosum* qui possède un génome codant pour près de 200 acteurs de TCS (MiST, GUMEROV et al., 2020). Ces TCSs peuvent être conservés au sein d'un espèce ou dans un genre bactérien comme le système ColRS des *Pseudomonas*. Ce TCS, capable de détecter les métaux, appartient au génome cœur de *Pseudomonas* mais son RR est capable de contrôler des cibles différentes selon les souches, principalement dû à la conservation ou l'absence des motifs d'ADN qu'il reconnaît ou des gènes qu'il contrôle (WIESMANN et al., 2023). La présence ou l'absence de TCSs entre différentes bactéries peut avoir des répercussions sur le phénotype comme pour les pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus saprophyticus*; Le génome de cette dernière, en comparaison de celui de *S. aureus*, est dépourvu des gènes de 6 TCSs impliqués dans la régulation du métabolisme et de la résistance aux antimicrobiens. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les niches

environnementales de *S. saprophyticus* sont plus restreinte que *S. aureus* (RAPUN-ARAIZ et al., 2020).

L'abondance de ces protéines dans certaines espèces s'explique par deux processus : les évènements de duplication, facilités par la proximité des gènes de HKs et de RRs, et les HGT (LAUB et al., 2007). Les deux mécanismes se produisent dans des proportions différentes selon les espèces. Par exemple, si 20% des HKs de *P. syringiae* sont issues d'HGT, ce n'est le cas pour aucune HK de *Streptomyces coelicolor* qui possède un nombre similaire de HK (ALM et al., 2006).

La duplication de TCSs provoque typiquement l'apparition d'interférences entre les deux systèmes incapables de se discriminer en raison de leurs homologies. Ces interférences peuvent avoir lieu au niveau du transfert de phosphate ou des gènes régulés : elles sont inévitables et ont des répercussions négatives comme la diffusion du signal (ROWLAND et al., 2014). Les TCSs dupliqués sont donc contraint d'évoluer rapidement pour former un TCS isolé ou pour acquérir de nouvelles fonctions sous peine d'être un fardeau métabolique. Plusieurs processus sont impliqués comme la différenciation des domaines senseurs de l'HK, les changements de fonctions du RR ou la modification de la spécificité du transfert de phosphate (LAUB et al., 2007). Cette dernière option implique la coévolution des résidus impliqués dans l'interaction entre les domaines HisKA/CA et REC et pourrait précéder les deux autres processus (ROWLAND et al., 2014). Dans certains cas cependant, les interférences sont maintenues comme les TCS NarXL et NarQP de *E. coli* qui sont partiellement isolés puisque la HK NarX est capable d'activer les deux RRs qui se fixent au même motif (NORIEGA et al., 2010). Dans ce cas, ces interférences maintenues, potentiellement bénéfiques, sont qualifiées d'interconnexions.

Interconnexions des TCSs

Les interconnexions entre TCSs permettent l'intégration de plusieurs signaux et le contrôle de plusieurs RRs aux fonctions potentiellement différentes. Plusieurs types d'interconnexions ont été rapportés et peuvent être divisés en 5 catégories (Fig 3.6) (AGRAWAL et al., 2016). Les deux premiers mécanismes impliquent la formation d'hétérodimères entre les HKs ou les RRs de deux TCSs distincts.

La formation d'hétérodimères d'HKs peut être illustrée par les HKs non orthodoxes RscS et SypF de *Vibrio fischeri*. Dans cet exemple atypique, RscS et SypF forment des hétérodimères grâce au domaine H2 et le domaine H1 de RscS assure l'activation de SypF démontrant comment une HK peut exploiter l'activité d'une autre HK (NORSWORTHY et al., 2015).

Si la plupart des RRs agissent en homodimère, des exemples d'hétérodimérisation permettant des interconnexions entre TCSs ont été observés comme pour RcsB dans *E. coli*. Le RR RcsB fait partie d'un réseau complexe de phosphorelais impliqué notamment dans la formation de

biofilm (MAJDALANI et al., 2005). RcsB non phosphorylé peut former des hétérodimères avec le RR BglJ pour activer l'opéron cryptique *bgl* en levant la répression de H-NS (VENKATESH et al., 2010). L'hétérodimerisation des RRs permet ainsi la reconnaissance d'un motif spécifique étendant les régulateurs des TCSs.

La communication croisée consiste en la phosphorylation d'un RR par une HK différente de sa partenaire. La corégulation implique la compétition ou la coopération de deux RRs pour la régulation d'une cible. Enfin, la régulation croisée est la régulation par un TCS de gènes codant pour un autre TCS. Les résultats présentés dans la suite de ce manuscrit permettront d'illustrer ces 3 mécanismes (Chapitre 6 et 7).

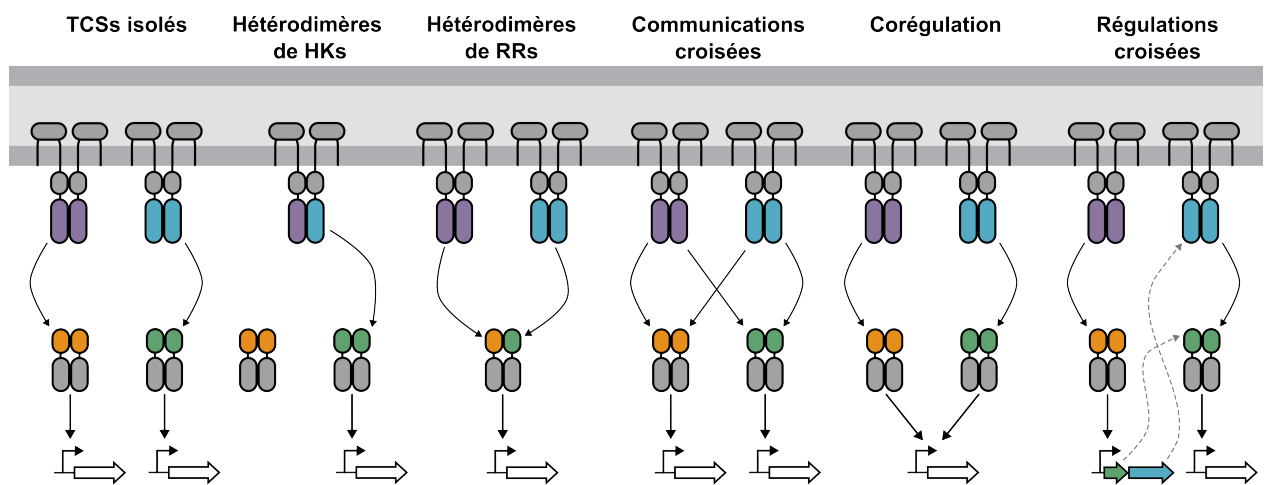


FIGURE 3.6. Interconnexions entre les TCSs. Représentations schématiques des 5 types d'interconnexions possibles entre deux TCSs (adapté de AGRAWAL et al., 2016)

3.2 Le réseau des TCSs de *P. aeruginosa*

Les génomes des souches de *P. aeruginosa* codent pour de nombreux TCSs comme c'est le cas de PAO1 qui possède 63 HKs, 73 RRs et 3 modules HPt (Ortet 2015). En général, les gènes codant pour un RR et son HK partenaire sont organisés en opéron ce qui facilite l'identification des TCSs. Dans PAO1, cette organisation représente 51 paires HK/RR. Cependant dans certains cas, les gènes de ces acteurs sont isolés et sont, en l'absence de partenaire à proximité, qualifiés d'orphelins. Ces acteurs s'intègrent à des TCSs formant des systèmes branchés dans lesquels plusieurs HKs peuvent interagir avec un RR ou inversement. Ces réseaux sont à différencier des interconnexions précédemment décrites puisque, dans ce cas, les acteurs sont dépourvus de partenaire ce qui rend leur interaction avec d'autres membres de TCSs nécessaire. Cependant, l'existence de ces acteurs orphelins et des réseaux de TCSs branchés résulte typiquement de la duplication de systèmes suivie de la perte de certains acteurs. Il est intéressant de

noter que toutes les HKs orphelines de PAO1 ont des architectures hybrides ou non orthodoxes (WINSOR et al., 2016). L'étude des TCSs de *P. aeruginosa* a mis en évidence l'importance de ces acteurs dans la virulence de cette bactérie mais une grande partie des cibles de ces régulateurs restent inconnues (FRANCIS et al., 2017). Les embranchements et les interconnexions entre TCSs donnent naissance à des « sous-réseaux » dans lesquels HKs, RRs, modules Hpt et autres régulateurs collaborent dans l'orchestration de nombreux gènes. Trois exemples de ces sous-réseaux de TCSs seront détaillés dans la suite de cette partie avec le réseau Gas/Rsm/HptB, la régulation des *cup* et la régulation de la résistance aux métaux.

3.2.1 Le réseau Gac/Rsm et HptB

Les modes de vie de *P. aeruginosa* sont orchestrés par de nombreux régulateurs tels que les TCSs qui jouent un rôle crucial dans la transition entre le développement planctonique et la formation de biofilm. La voie Gac/Rsm a été introduite précédemment (Chapitre 2.2.3). Cette voie forme un réseau de régulation sophistiqué intégrant plusieurs TCSs. Les HKs RetS, LadS et PA1611 participent à la modulation de l'activité de GacS par des mécanismes différents (BRENCIC et al., 2009b). RetS inhibe GacS en empêchant son auto-phosphorylation, en détournant ses groupes phosphates ou en déphosphorylant son domaine D1 (FRANCIS et al., 2018). A l'inverse, LadS stimule GacS en phosphorylant son domaine H2 (CHAMBONNIER et al., 2016). En se fixant à RetS et en interférant avec sa capacité à se lier à GacS, PA1611 active indirectement la cascade Gac/Rsm (KONG et al., 2013).

Une voie parallèle s'ajoute à Gac et permet la modulation de l'expression de *rsmY* et *rsmZ*. Les trois HKs PA1611, SagS et ErcS' agissent ensemble en phosphorylant HsbR par le biais du module HptB. Il a été démontré que les HKs PA1611, ErcS', SagS et aussi RetS phosphorylent HptB *in vitro* (HSU et al., 2008). HsbR est un RR à l'architecture non conventionnelle qui contient un domaine REC, un domaine phosphatase (PP2C) et un domaine kinase/facteur anti- σ (K/AS). HsbR interagit avec HsbA, un facteur anti-anti- σ qui contrôle l'état de sa phosphorylation par l'intermédiaire de ses domaines enzymatiques. L'état de phosphorylation de HsbA régule la transition entre la production de biofilm et le mode vie planctonique. En bref, la déphosphorylation de HsbA se produit lors de l'activation du domaine PP2C de HsbR, et permet l'interaction entre HsbA et le facteur anti- σ FlgM. En conséquence, FlgM libère le facteur σ FliA (σ^{28}), qui favorise le mode de vie planctonique et induit l'expression des gènes du flagelle. En revanche, le domaine kinase de HsbR peut phosphoryler la protéine HsbA favorisant ainsi son interaction avec la DGC HsbD conduisant à son activation et sa relocalisation aux pôles cellulaires (VALENTINI et al., 2016a). HsbD active indirectement *rsmY* par la production de di-GMPc mais HptB peut aussi réguler *rsmZ* comme observé dans la souche PA14 (BORDI et al., 2010,

Le TCS BfiS/BfiR est aussi impliqué dans la répression indirecte de *rsmZ* en induisant l'expression de la RNase CafA (PETROVA et al., 2010). Ce TCS est aussi en lien avec la voie Gac puisque SagS est capable de phosphoryler BfiS lorsque *P. aeruginosa* se développe en biofilm, ou de déphosphoryler cette HK lors du mode de vie planctonique (PETROVA et al., 2011). En plus de la voie Gac/Rsm, de nombreux autres TCSs agissent sur une ou plusieurs étapes de la formation de biofilm. Ainsi, les TCSs BfiS/BfiR, BfmS/BfmR et MifS/MfiR et l'HK SagS sont spécifiquement phosphorylés aux premières étapes de la formation de biofilm (PETROVA et al., 2009). De plus, la délétion de ces acteurs a interrompu le développement de biofilm.

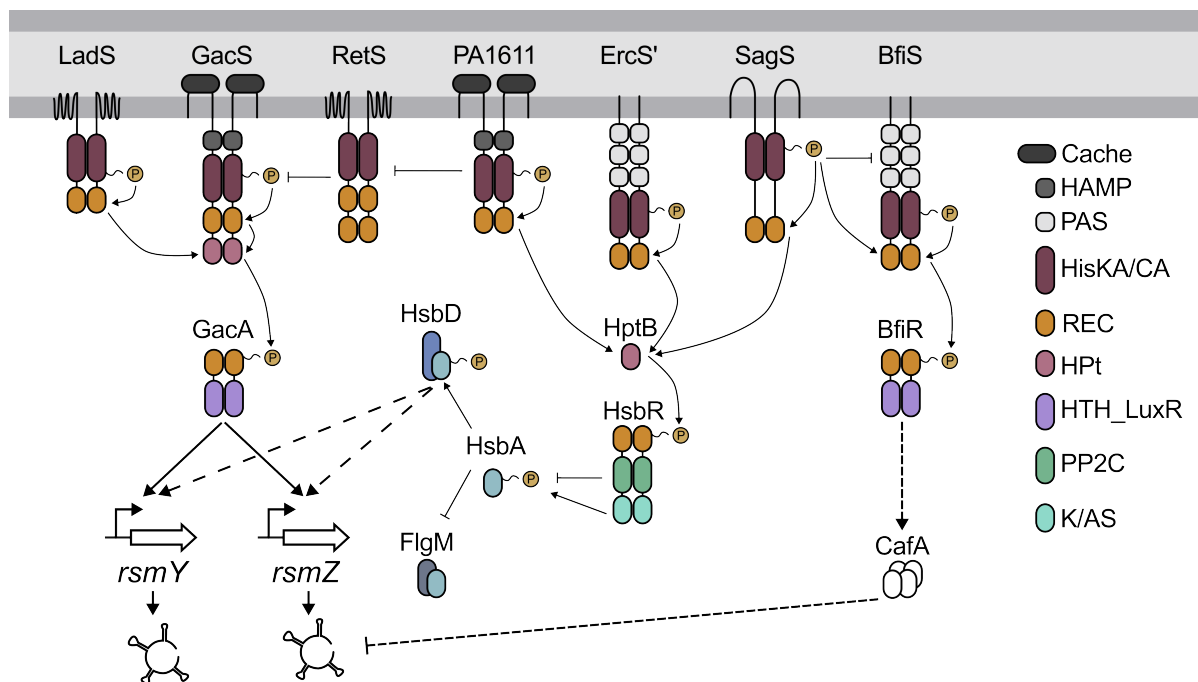


FIGURE 3.7. Interconnexions entre la voie Gac/Rsm et HptB. Le TCS GacS/GacA est au centre d'un réseau branché, impliquant plusieurs HKs (LadS, RetS et PA1611), qui régule l'expression des deux sRNA RsmY et RsmZ. Ce réseau est connecté à la voie HptB, impliquant plusieurs HKs (PA1611, ErcS' et SagS) et l'anti-anti- σ HsbA, qui induit soit l'inhibition de FlgM, soit la synthèse de di-GMPc médiée par HsbD, en fonction du statut de phosphorylation de HsbA.

3.2.2 Régulation des *cup*

Les fimbriae de type Cup sont aussi impliqués dans la formation de biofilm et leur régulation est orchestrée par plusieurs TCSs (Fig 3.8). Le système Roc (Regulation of *cup*) se distingue par les interconnexions de ses acteurs. Il est composé de 3 RRs (RocA1, RocR et RocA2) et de 2 HKs non orthodoxes (RocS1 et RocS2) qui activent les 3 RRs (H. D. KULASEKARA et al., 2004, SIVANESON et al., 2011). Les gènes sont codés dans deux loci distincts, formant le locus Roc1 parfois appelé

système de régulation à trois composants (*rocA1* et, transcrit de façon divergente, l'opéron *rocR-rocS1*) et le système Roc2 (*rocA2-rocS2*). Contrairement aux RRs de type NarL RocA1 et RocA2, RocR n'est pas un FT mais une PDE car son domaine REC est associé à un domaine EVL, ce qui caractérise la sous-famille VieA (RAO et al., 2008). Le système Roc active l'opéron *cupC* via RocA1 et l'opéron *cupB* via un intermédiaire qui n'a pas été indentifié ; cependant le stimulus de ce système est inconnu (H. D. KULASEKARA et al., 2004, SIVANESON et al., 2011). D'autre part, RocR réduit l'expression de ces deux opérons *cup* par un mécanisme actuellement inconnu qui implique probablement la dégradation du di-GMPc (B. R. KULASEKARA et al., 2006).

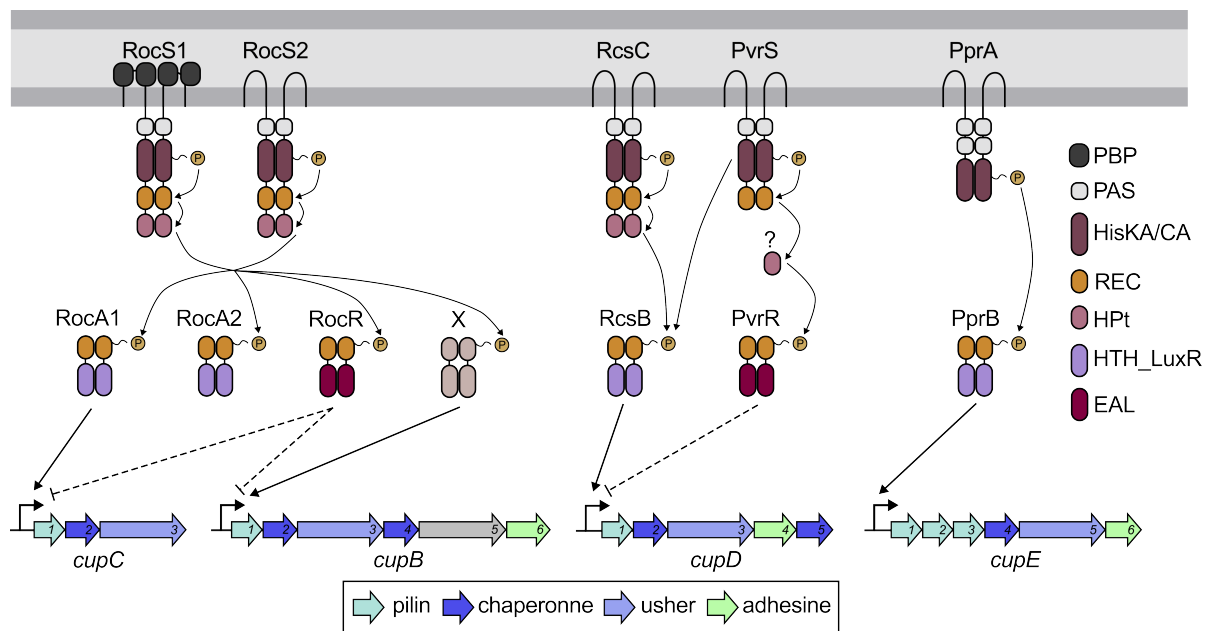


FIGURE 3.8. Régulation des loci *cupB-E* par les TCS. La régulation des loci *cupB-E* est orchestrée par 3 systèmes de TCSs : Roc, Rcs-Pvr et Ppr.

Alors que les opérons *cupB* et *cupC* sont présents dans la plupart des souches de *P. aeruginosa* et *P. paraeruginosa*, l'opéron *cupD* a été identifié dans les souches PA14 et PA7. Les cinq gènes *cupD* sont portés par l'ICE PAPI-1 acquise par HGT (HE et al., 2004). Une HK hybride (PvrS), un HK non orthodoxe (RcsC) et deux RRs (PvrR et RcsB) sont encodés sur cette ICE en aval de l'opéron *cupD*. RcsB est un RR de type NarL responsable de l'activation de *cupD* alors que PvrR possède un domaine EAL et réprime indirectement cet opéron (MIKKELSEN et al., 2009). À l'instar du système Roc, PvrS et RcsC sont capables de moduler la phosphorylation de RcsB (MIKKELSEN et al., 2011a). Il est intéressant de noter que les séquences des HKs PvrS, RcsS, RocS1 et RocS2 sont proches (MIKKELSEN et al., 2013), ce qui suggère un lien phylogénétique. Cette proximité évolutive est retrouvée pour RcsB, RocA1 et RocA2 ainsi que pour PvrR et RocR suggérant que ces TCSs sont issus de duplications. Enfin, l'opéron *cupE* est activé par le TCS PprAB (GIRAUD et al., 2011).

3.2.3 La résistance aux métaux

L'homéostasie des métaux lourds comme le cuivre repose en grande partie sur les TCSs dans *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa*. Ainsi, le système CopRS est activé lors d'une exposition prolongée au cuivre et CopR, un RR de type OmpR, permet l'activation des gènes *pcoAB* et *ptrA* impliqués dans la détoxification périplasmique de ce métal (QUINTANA et al., 2017). CopS est une HK ayant une activité phosphatase inhibant CopR en absence de cuivre (NOVOA-APONTE et al., 2020). Cette répression est levée en réponse au stimulus et permet à CopR d'être phosphorylé par un acteur inconnu.

D'autre part, le TCS CzcRS répond à un excès de zinc (Zn) ou de cadmium (Cd) dans l'environnement extérieur et induit notamment l'expression de la pompe à efflux CzcCBA permettant à la bactérie de survivre à de fortes concentrations de métaux lourds (PERRON et al., 2004). Dans les interactions hôte-pathogène, les métaux lourds comme le zinc et le cuivre jouent un rôle important comme dans les phagolysosomes où ils participent à l'élimination des bactéries (WAGNER et al., 2005). *P. aeruginosa* s'adapte aux deux éléments en partie grâce à son réseau de régulation et aux interconnexions entre les deux TCS CzcRS et CopRS (CAILLE et al., 2007, DUCRET et al., 2021). Par exemple, un excès de CopR peut stimuler l'expression de *czcRS*, qui à son tour augmente la synthèse de CzcCBA. De plus, des concentrations élevées en cuivre renforcent également la résistance au zinc (CAILLE et al., 2007). Le régulateur CzcR contrôle également l'expression de l'opéron *ptrA-czcE-queF* régulé par CopR (DUCRET et al., 2023).

Il a récemment été révélé que la réponse et la résistance au cuivre incluaient le TCS DbsRS en tant qu'acteur supplémentaire (YU et al., 2022). Contrairement à CopS, DbsS répond à l'argent en plus du cuivre et active l'expression de gènes qui sont notamment impliqués dans la création de liaisons disulfures protéiques.

3.2.4 Les nouveaux défis

Notre connaissance actuelle du réseau de régulation des TCSs de *P. aeruginosa* et des sous-réseaux qui le composent comme Gac/Rsm est le fruit d'une multitude d'études ciblées qui ont caractérisé les acteurs de ces systèmes un à un. Les récentes avancées technologiques ont permis une accélération considérable dans l'avancement de notre compréhension de ce réseau, notamment grâce à des techniques puissantes comme la RNA-seq ou la ChIP-seq. L'étude des TCSs s'appréhende de plus en plus à grande échelle, comme l'attestent certaines études récentes qui ont caractérisé l'impact de la mutation de l'ensemble des acteurs des TCSs de *P. aeruginosa* sur différents phénotypes (KOLLARAN et al., 2019, T. WANG et al., 2021, BADAL et al., 2020, JOGE et al., 2018). Certains travaux impressionnants combinent des approches de RNA-seq et

de CHIP-seq pour caractériser des dizaines de FTs (HUANG et al., 2019). L'accumulation de ces informations est un enjeu de taille pour les futures investigations des réseaux de régulation bactériens. La construction de la base de données RegulonDB illustre les difficultés de ce défi, notamment sur l'intégration de résultats d'origines variées (SANTOS-ZAVALA et al., 2019). Cependant, l'étude des réseaux de régulation reste souvent limitée à une souche référence pour une espèce et néglige ainsi la diversité des TCSs entre les différents phylogroupes.

Récemment, notre équipe a utilisé la méthode de DAP-seq pour caractériser les cibles de l'ensemble des RRs qui se fixent à l'ADN dans deux souches de *P. aeruginosa* et une souche de *P. paraaeruginosa* (Table 3.1) (TROUILLON et al., 2021a). Cette première description globale du réseau de TCSs dans ces espèces souligne l'étendue des gènes potentiellement ciblés puisque près de 40% du génome est potentiellement ciblé par un RR. De plus, ce réseau est plastique et les souches possèdent des mécanismes spécifiques. Cette diversité résulte principalement de la conservation des RRs, la variation des séquences promotrices et l'intégration de génome accessoire dans le réseau de régulation.

Name	PAO1 ID	PA14 ID	IHMA87 ID	Family
	PA0034	PA14_00430	IHMA87_00036	NarL-like
CreB	PA0463	PA14_06060	IHMA87_00444	OmpR-like
AgtR	PA0601	PA14_07840	IHMA87_00593	NarL-like
TctD	PA0756	PA14_54510	IHMA87_04501	OmpR-like
PirR	PA0929	PA14_52250	IHMA87_04308	OmpR-like
FleR	PA1099	PA14_50180	IHMA87_04106	NtrC-like
	PA1157	PA14_49440	IHMA87_04060	OmpR-like
PhoP	PA1179	PA14_49180	IHMA87_04038	OmpR-like
AauR	PA1335	PA14_46990	IHMA87_03895	NtrC-like
	PA1397	PA14_46360	IHMA87_03790	NarL-like
	PA1437	PA14_45880	IHMA87_03730	OmpR-like
KdpE	PA1637	PA14_43340	IHMA87_03532	OmpR-like
ParR	PA1799	PA14_41260	IHMA87_03330	OmpR-like
ErbR	PA1978	PA14_38930	IHMA87_03142	NarL-like
EraR	PA1980	PA14_38900	IHMA87_03140	NarL-like
	PA2376	PA14_33920	IHMA87_02778	NarL-like
	PA2479	PA14_32580	IHMA87_02671	OmpR-like
CzcR	PA2523	PA14_31960	IHMA87_02628	OmpR-like
GacA	PA2586	PA14_30650	IHMA87_02519	NarL-like
BqsR	PA2657	PA14_29730	IHMA87_02453	OmpR-like
PfeR	PA2686		IHMA87_03812	OmpR-like
CopR	PA2809	PA14_27810	IHMA87_02262	OmpR-like
AtvR	PA2899	PA14_26570	IHMA87_02066	NarL-like
RocA2	PA3045	PA14_24710	IHMA87_01902	NarL-like
CprR	PA3077	PA14_24350	IHMA87_01871	OmpR-like
GltR	PA3192	PA14_22940	IHMA87_01753	OmpR-like
CpxR	PA3204	PA14_22760	IHMA87_01740	OmpR-like
ErdR	PA3604	PA14_17670	IHMA87_01366	NarL-like
TtsR	PA3714	PA14_16350	IHMA87_01254	NarL-like
NarL	PA3879	PA14_13730	IHMA87_01064	NarL-like
RocA1	PA3948	PA14_12780	IHMA87_00998	NarL-like
	PA4032	PA14_11680	IHMA87_00896	OmpR-like
	PA4080	PA14_11120	IHMA87_00845	NarL-like
BfmR	PA4101		IHMA87_00822	OmpR-like
BfiR	PA4196	PA14_09690	IHMA87_00739	NarL-like
PprB	PA4296	PA14_55810	IHMA87_04597	NarL-like
ColR	PA4381	PA14_56950	IHMA87_04696	OmpR-like
RoxR	PA4493	PA14_58300	IHMA87_04815	ActR-like
PilR	PA4547	PA14_60260	IHMA87_05008	NtrC-like
CbrB	PA4726	PA14_62540	IHMA87_05201	NtrC-like
PmrA	PA4776	PA14_63150	IHMA87_05256	OmpR-like
IrlR	PA4885	PA14_64570	IHMA87_05374	OmpR-like
AruR	PA4983	PA14_65880		OmpR-like
NtrC	PA5125	PA14_67680	IHMA87_05600	NtrC-like
DctD	PA5166	PA14_68250	IHMA87_05647	NtrC-like
AmgR	PA5200	PA14_68700	IHMA87_05683	OmpR-like
AlgR	PA5261	PA14_69470	IHMA87_05746	LytTR-like
PhoB	PA5360	PA14_70750	IHMA87_05886	OmpR-like
	PA5364	PA14_70790	IHMA87_05890	OmpR-like
AlgB	PA5483	PA14_72380	IHMA87_06026	NtrC-like
MifR	PA5511	PA14_72720	IHMA87_06056	NtrC-like
RcsB		PA14_59770	IHMA87_02872	NarL-like
			IHMA87_02165	OmpR-like
			IHMA87_02464	NtrC-like
			IHMA87_06096	NarL-like

TABLE 3.1. Liste des RRs ayant un DBD dans les souches PAO1 et PA14 de *P. aeruginosa* et dans la souche IHMA87 de *P. paraaeruginosa*

OBJECTIFS DE THÈSE

Le projet visant à cartographier l'ensemble des sites de fixation à l'ADN de plus de 50 RRs de *P. aeruginosa* a été initié peu de temps avant mon arrivée en thèse. Ce travail a permis de générer un jeu de données conséquent qui a été analysé principalement dans sa globalité plutôt que dans le détail des interactions identifiées. Ces résultats offraient une donc précieuse opportunité de lever le voile sur les TCSs de *P. aeruginosa* en profitant des cibles identifiées des RRs pour approfondir nos connaissances de ces voies de signalisation cruciales dans l'adaptabilité de ce pathogène.

L'objectif de ma thèse était d'explorer les données générées en DAP-seq afin d'exploiter ces résultats pour pouvoir se concentrer sur l'étude ciblée de quelques RRs choisis.

Grâce à mon analyse des données de DAP-seq, 3 RRs ont été sélectionnés : AgtR, CusR et PA4080. L'étude menée sur AgtR a échoué à identifier de nouvelles cibles pour ce RR, témoignant des limites posées par l'interprétation des données de DAP-seq ; ce projet fut donc interrompu. En revanche, la caractérisation de CusR, un RR accessoire dont le gène est acquis par HGT dans certaines souches, a révélé son implication dans l'homéostasie du cuivre et a permis de révéler l'intégration de ce système et de son régulon dans le réseau de régulation endogène par des mécanismes de régulations et de communications croisées entre plusieurs TCSs. Nos travaux sur PA4080 ont démontré qu'il s'agissait du RR manquant du système Roc, contrôlant l'activation de l'opéron *cupB*. Par des approches de génomique comparative du réseau Roc dans *P. aeruginosa* et *P. paraeruginosa*, nos résultats ont proposé un nouveau modèle pour ces TCSs, illustrant la plasticité de ces systèmes.

4 EXPLORATION DES DONNÉES DE DAP-SEQ

Sommaire

4.1 Les résultats de DAP-seq	52
4.1.1 Variabilité de la taille des cistromes entre les RRs	52
4.1.2 Variabilité des cistromes entre les génomes	53
4.2 Analyse globale des résultats de DAP-seq	54
4.2.1 Des gènes potentiellement régulés aux fonctions variées	55
4.2.2 Redondance et co-occurrence des cibles identifiées	56
4.3 Stratégies pour exploiter les résultats de DAP-seq	58
4.3.1 Régulation des gènes impliqués dans la pathogénicité	58
4.3.2 Les cibles des RRs spécifiques de IHMA87	60

Au commencement de mon doctorat, ma directrice de thèse et un étudiant en thèse menaient un projet, en cours, visant à caractériser les cistromes (e.g l'ensemble des sites de fixation d'une protéine sur l'ADN) de 55 RRs de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa* par la méthode de DAP-seq. Bien que je n'aie pas participé à la réalisation expérimentale de ce travail, mon projet de thèse s'est appuyé directement sur les résultats de cette expérience : il est donc important que je détaille le jeu de données généré, les analyses que j'ai réalisées ainsi que la méthode que j'ai choisie pour exploiter ces résultats.

Tout d'abord, les 55 protéines étudiées correspondent à l'ensemble des RRs prédits avec un domaine de liaison à l'ADN dans deux souches de référence de *P. aeruginosa*, PAO1 et PA14, qui appartiennent aux deux principaux clades, et une souche de *P. paraaeruginosa*, IHMA87 (Table 3.1). Au total, 48 de ces RRs sont conservés dans les 3 souches, 4 sont absents d'un des génomes et 3 sont spécifiques de la souche IHMA87 (Fig 4.1). Pour l'expérience de DAP-seq, les 51 RRs présents dans la souche PAO1 ont été produits en *cell-free* à partir de la séquence de cette souche. Pour les 4 restants, la séquence de IHMA87 a été utilisée pour exprimer les 3 RRs spécifiques de cette souche (IHMA87_02165, IHMA87_02464 et IHMA87_06096) et la séquence de PA14 a été utilisée pour exprimer RcsB qui est absent du génome de PAO1. La méthode de DAP-seq présente deux avantages principaux; l'incubation du RR avec l'ADN se faisant *in vitro*, elle permet d'identifier l'ensemble des sites de fixations de la protéine indépendamment des conditions physiologiques et les protéines peuvent être incubées avec différents génomes.

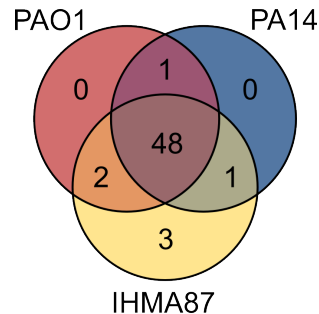


FIGURE 4.1. Conservation des RRs ayant un DBD dans 3 souches appartenant à des lignées différentes de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa* (TROUILLON et al., 2021a)

En testant l'ensemble des 55 protéines purifiées sur les 3 génomes en duplicat, ce sont 330 expériences de DAP-seq qui ont été réalisées, auxquelles s'ajoutent 12 contrôles négatifs réalisés avec la GFP. Cette approche a permis, pour la première fois, une caractérisation globale du paysage des sites de fixation *in vitro* de l'ensemble des RRs de 3 souches de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa*. Ces données ont été analysées par Julian Trouillon afin d'obtenir l'ensemble des gènes ciblés en DAP-seq pour chaque RR sur les 3 génomes. En résumé, les pics de fixation ont été identifiés pour chaque RR en comparant les enrichissements obtenus à ceux obtenus avec la GFP en utilisant MACS2 (Yong ZHANG et al., 2008). Les pics non reproductibles entre

les duplicats ont été éliminés grâce à une approche statistique (*Irreproducible Discovery Rate*). Pour déterminer les gènes ciblés à partir de la position des pics reproductibles en DAP-seq, les régions promotrices ont été définies comme la région allant de -400 pb à +20 pb à partir du début de la traduction du premier gène prédit de chaque UT. Une fixation dans cette région a été interprétée comme une interaction entre le régulateur et sa cible. Ces résultats, présentés sous la forme de tableaux, m'ont été fournis par Julian au fur et à mesure des expériences durant les 3 premiers mois de ma thèse et sont maintenant publiés (TROUILLON et al., 2021a).

L'exemple des résultats obtenus pour AgtR sur le génome de PAO1 permet d'illustrer les informations dont nous disposons (Table 4.1). Chaque pic est identifié par un numéro, l'enrichissement moyen des duplicats par rapport aux contrôles est rapporté et la position est indiquée au niveau de la valeur maximale du pic. À partir de la position du pic, les gènes potentiellement ciblés par le RR sont rapportés en indiquant la distance entre le pic de fixation et l'ATG, le premier gène de l'opéron, le nombre de gènes organisés dans la même UT, le nom du premier gène et sa classification selon les COGs. Cette classification repose sur une banque de données qui permet de classer la fonction de protéines selon 22 catégories.

N°	EM	Position	Dist. ATG	1er gène	UT	Nom	COG
783	21,02	5615462	-190	PA4998	2		Signal transduction mechanisms
100	21,25	586794	-131	PA0527	1	<i>dnr</i>	Signal transduction mechanisms
100	21,25	586794	-73	PA0527.1	1	<i>rsmY</i>	Function unknown
201	16,7	1215253	-31	PA1122	1		Function unknown
201	16,7	1215253	-179	PA1121	3	<i>yfiR</i>	Function unknown
141	12,67	784589	-109	PA0714	1		Function unknown
133	19,48	732814	-145	PA0672	1	<i>hemO</i>	Inorganic ion transport and metabolism
133	19,48	732814	-161	PA0671	3		Function unknown
140	16,93	783870	-303	PA0713	1		Function unknown
140	16,93	783870	-37	PA0712	2		Function unknown

TABLE 4.1. Les 10 premières lignes des résultats générés par la DAP-seq pour AgtR sur le génome de PAO1. Les colonnes indiquent : le numéro du pic (ID), l'enrichissement moyen (EM), la position sur le génome en nucléotide (Position), la distance de la fixation par rapport à l'ATG (Dist. ATG), le premier gène de l'UT (1^{er} gène), la nombre de gènes de l'UT (UT), le nom du premier gène si disponible (Nom) et sa classification selon les COGs.

Cet exemple permet notamment d'illustrer le cas fréquent d'un pic qui régule potentiellement deux UTs, étant localisé dans une région intergénique de deux gènes divergents comme c'est le cas pour la fixation de AgtR entre *rsmY* et *dnr* (le pic n°100). Les valeurs des enrichissements sont très variables entre les expériences. Ainsi, afin de pouvoir comparer les résultats de DAP-seq entre RRs et entre génomes, nous avons défini un enrichissement normalisé, qui correspond à l'enrichissement relatif du pic au sein d'une expérience. Cette valeur est comprise entre 0 et 1, 1 correspondant à l'enrichissement maximal.

4.1 Les résultats de DAP-seq

Face à la mine d'information générée par ce travail, mon premier objectif était d'appréhender au mieux le jeu de données dont nous disposons afin d'en dégager des pistes pour mes futures investigations. Pour cela, j'ai d'abord réalisé une analyse descriptive des résultats de DAP-seq. Bien que redondants avec les travaux qui seront publiés au cours de mon doctorat, j'ai choisi quand même de montrer certains résultats de cette analyse qui permettent de mesurer l'ampleur des données produites par la DAP-seq ainsi que certaines limites de cette méthode.

4.1.1 Variabilité de la taille des cistromes entre les RRs

L'observation du nombre de cibles identifiées pour chaque RR révèle une grande disparité entre les protéines dont les cistromes s'étendent de 0 à 700 cibles (Fig 4.2). Une première explication de cette variabilité repose sur l'activité des protéines et la méthode employée. En effet, les conditions de la DAP-seq sont éloignées des conditions physiologiques de fixation des RRs, principalement car elles mettent en jeu des concentrations de protéines et d'ADN différentes de celles existantes *in vivo*. De plus, l'incubation se faisant *in vitro*, la phosphorylation du RR repose uniquement sur les donneurs de phosphate présents lors de la production des protéines (créatine phosphate) et pendant l'expérience (phosphate d'acétyle) et l'interaction du RR avec l'ADN en DAP-seq est privée de potentiels partenaires ainsi que de la structure du chromosome. Ainsi, la DAP-seq a eu une efficacité différente selon le RR et selon le génome. Aucune cible n'a été identifiée pour NarL et PA5364 ce qui semble résulter d'un défaut total d'activité des protéines dans ces conditions. Cependant, les 53 autres RRs ont reconnu au moins une cible attestant de l'efficacité de la méthode utilisée.

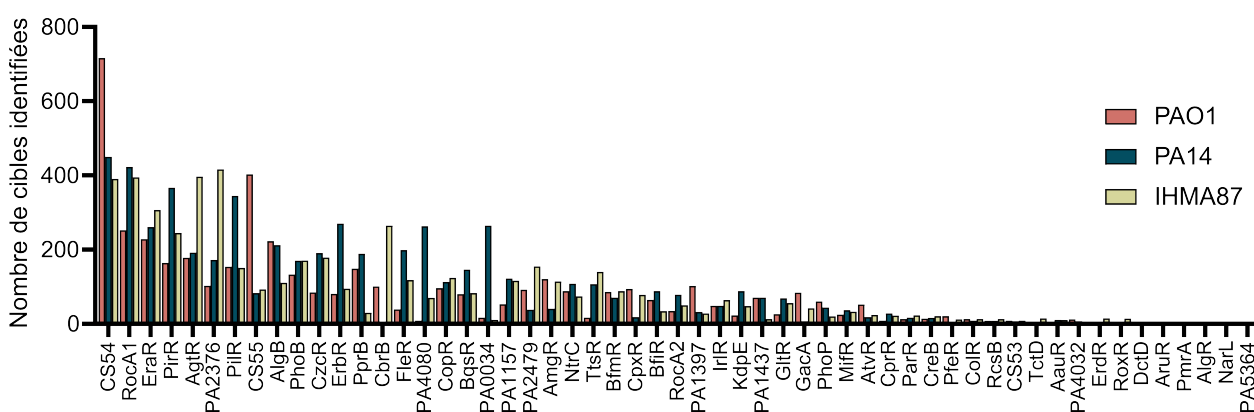


FIGURE 4.2. Nombre de cibles identifiées pour chaque RR sur les génomes des souches PAO1, PA14 et IHMA87. En absence de nomenclature, l'ID de PAO1 a été utilisé sauf pour les 3 RRs spécifiques de IHMA87 abrégés en 02165 (IHMA87_02165), 02464 (IHMA87_02464) et 06096 (IHMA87_06096) (Adapté de TROUILLON et al., 2021a).

Les différences de tailles observées pour les cistromes des RR semblent corréler avec les différentes sous-familles. Les RR des sous-familles NarL et NtrC possèdent en moyenne un plus grand nombre de cibles prédites que les RR de type OmpR. RoxR et AlgR, uniques représentants des familles ActR et LytTR respectivement, ont des cistromes particulièrement réduits. Cela suggère que ces RR sont peu actifs dans les conditions testées, ou que ces familles ont physiologiquement moins de cibles que les autres familles de RR.

4.1.2 Variabilité des cistromes entre les génomes

Nous avons observé qu'il existe une grande variabilité dans le nombre de cibles identifiées pour le même RR entre les 3 génomes utilisés. En fonction du RR, le pourcentage de cibles identifiées communes aux 3 génomes varie de 0 à 100% avec une moyenne de 14%. Six RR n'ont aucune cible en commun dans les 3 génomes (AruR, CbrB, ErdR, PA4032, PA4080 et PfeR)(Fig 4.3) auxquelles s'ajoutent AlgR qui n'a qu'une cible prédite sur le génome de PA14. La variabilité des sites de fixations entre les 3 génomes pour ces 7 RR pourrait être dû à un faible nombre de cibles prédites pour l'un ou deux des génomes utilisés, probablement en conséquence d'une faible efficacité de la DAP-seq dans la condition testée. À l'inverse, certains RR présentent une conservation importante des cibles identifiées dans les 3 souches tels que DctD et CopR avec des pourcentages de cibles communes de 50% et 30% respectivement (Fig 4.3).

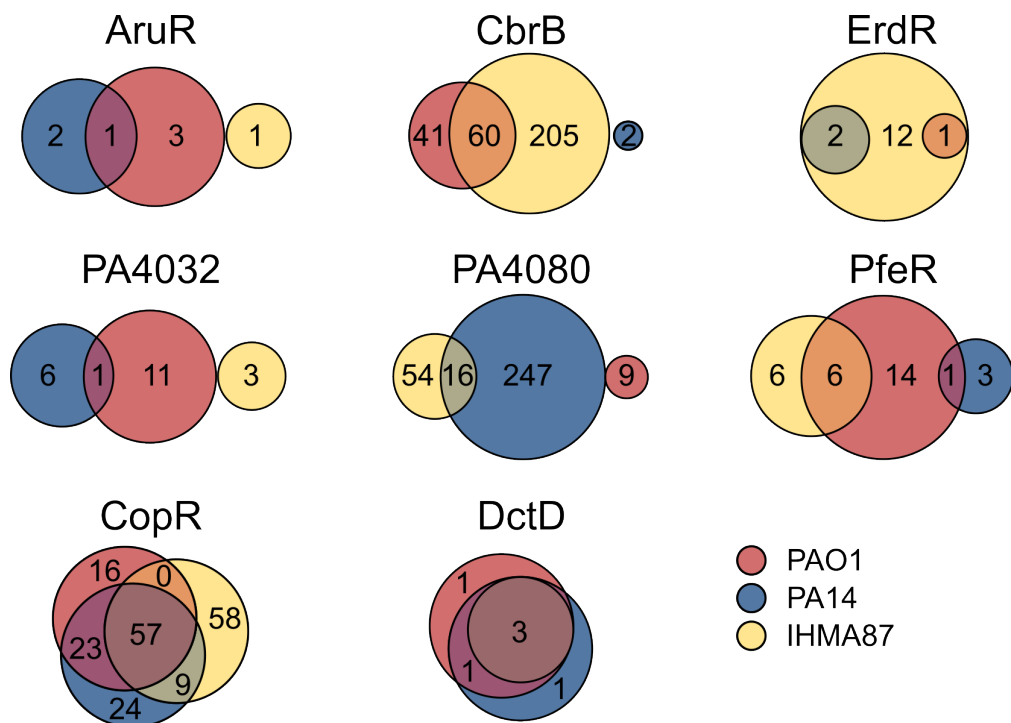


FIGURE 4.3. Conservation des cibles identifiées sur les génomes des souches PAO1, PA14 et IHMA87 des RR choisis.

Une cause évidente pour cette variabilité est la conservation des gènes ciblés entre les 3 souches testées qui présentent des différences génétiques. Au total, les 3 génomes possèdent un pangénome de 7 632 gènes dont 4 718 sont présents dans les 3 souches. Parmi les 2 914 gènes accessoires, 1 538 sont ciblés par au moins un RR, soit plus de 50%. Ainsi, les gènes spécifiques de chaque souche sont largement intégrés dans le réseau de régulation des TCSs expliquant en partie la variation observée pour les cistromes d'un RR entre les 3 génomes. En particulier, la souche IHMA87, étant la plus divergente, est logiquement la plus grande contributrice de cette variabilité puisqu'en moyenne, 29% des cibles d'un RR sont uniquement identifiées dans son génome.

Dans l'ensemble, le nombre de gènes ciblés par au moins un RR en DAP-seq est conséquent (4 159 gènes) et représente plus de 50% du pangénome. Ces résultats suggèrent que le réseau de régulation formé par les TCSs est colossal. Il est évident que l'ensemble des sites de fixation observés ne résulte pas forcément en un lien de régulation. De plus, la liaison des RRs à l'ADN est forcée en DAP-seq ce qui peut donner des fixations non physiologiques et donc des faux positifs. Il n'y a pas de taille "type" attendue pour le cistrome d'un RR, mais le nombre de fixations est souvent de plusieurs centaines comme déterminé pour GacA qui se fixe à environ 300 cibles *in vivo*, identifiées par ChIP-seq (HUANG et al., 2019). L'utilisation de la DAP-seq est plus rare, mais récemment, les cistromes des RRs NarP de *Actinobacillus pleuropneumoniae* et PhoP de *Riemerella anatipestifer* ont été évalués *in vitro* par cette méthode à 75 et 583 cibles respectivement (Q. ZHANG et al., 2020, Yang ZHANG et al., 2022).

En conclusion, ces résultats constituent une source extrêmement riche d'information sur les sites de fixation des RRs étudiés. Les différentes cibles identifiées sont cependant très variables selon le RR et selon le génome et l'origine de cette variabilité n'est pas évidente. Si elle est parfois due à un biais de l'expérience, il est possible que cette variabilité ait une réalité physiologique selon principalement deux mécanismes : l'absence ou la présence de certains gènes potentiellement régulés ou les variations des séquences de fixations. Ces sites de fixations constituent donc une multitude de pistes à étudier qu'il est nécessaire de confirmer par des approches ciblées.

4.2 Analyse globale des résultats de DAP-seq

Les résultats de DAP-seq offrent, pour la première fois, l'opportunité d'appréhender le réseau de régulation des TCSs de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa* dans sa globalité. Deux aspects m'ont particulièrement intéressé : la fonction des cibles de ce réseau et la redondance de certains gènes dans les données de DAP-seq.

4.2.1 Des gènes potentiellement régulés aux fonctions variées

Comme précédemment décrit, le nombre de cibles identifiées est considérable avec une moyenne de 90 gènes prédits par RR et par génome. Une des premières questions que je me suis posée concernait la fonction des gènes ciblés. Existe-t-il des processus particulièrement régulés par les RRs? Est-ce que certains RRs présentent un nombre élevé de cibles impliquées dans des fonctions spécifiques? Afin d'apprécier le rôle des gènes ciblés par les RRs, je me suis intéressé aux classifications en COG des différents gènes ciblés disponibles dans les tableaux de résultats de chaque RR. Cette analyse a donc été réalisée uniquement sur les premiers gènes des UTs. Les COGs prédits pour les UTs potentiellement régulés dans le génome de PAO1 ont été représentés pour les 51 RRs avec des cistromes reproductibles (Fig 4.4).

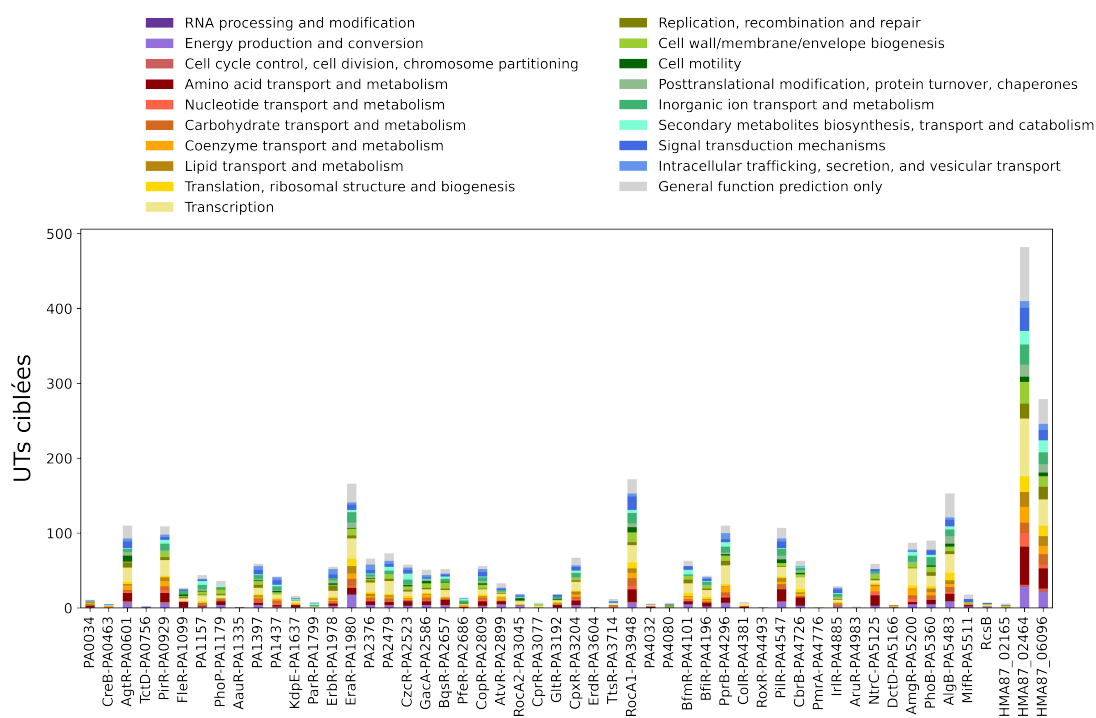


FIGURE 4.4. Distribution des annotations fonctionnelles des UTs ciblées pour chaque RR dans le génome de PAO1. Les gènes sont classés en fonction des catégories de COG.

À l'exception des RRs ayant peu de cibles identifiées comme ErdR, RoxR ou PmrA, la distribution des COGs se rapproche de celle retrouvée pour le génome entier de PAO1 pour les grands cistromes. Les résultats obtenus pour le génome de PA14 et IHMA87 sont similaires. Cette approche n'a donc pas permis de discriminer certains RRs sur la base des fonctions des gènes ciblés et il apparaît que, lorsque les cistromes tendent à s'élargir, les cibles sont uniformément réparties entre les COGs.

4.2.2 Redondance et co-occurrence des cibles identifiées

L'observation des résultats de DAP-seq a révélé que certains gènes sont massivement ciblés par les RRs. Ainsi, 79 gènes sont ciblés par au moins 10 RRs pour au moins un des génomes. La redondance de certaines cibles nous a interpellé et m'a amené à étudier la co-occurrence de certains gènes dans les résultats de DAP-seq. Mon objectif était d'identifier des groupes de gènes co-régulés en identifiant des modules. Est-ce que certains gènes sont systématiquement reconnus ensemble par différents RRs ? Est-ce que ces regroupements nous donnent des pistes sur la fonction de certains gènes inconnus ? Pour cela, le réseau de l'ensemble des gènes ciblés dans le génome de PAO1 a été représenté en créant des liens entre les gènes qui sont reconnus par les mêmes RRs. Le degré de co-occurrence entre deux gènes a été défini comme le nombre de RRs en commun qui reconnaissent ces cibles et a permis d'établir un réseau pondéré permettant de visualiser les groupes de gènes co-régulés en DAP-seq (Fig 4.5A). En appliquant un seuil de 3 pour le degré de co-occurrence, 133 gènes ont été organisés dans un réseau qui s'avère particulièrement dense (Fig 4.5B). En absence de groupes de gènes distincts, cette approche a échoué à identifier des modules de gènes co-régulés et suggère plutôt qu'une partie des gènes ciblés en DAP-seq forme un groupe particulièrement interconnecté.

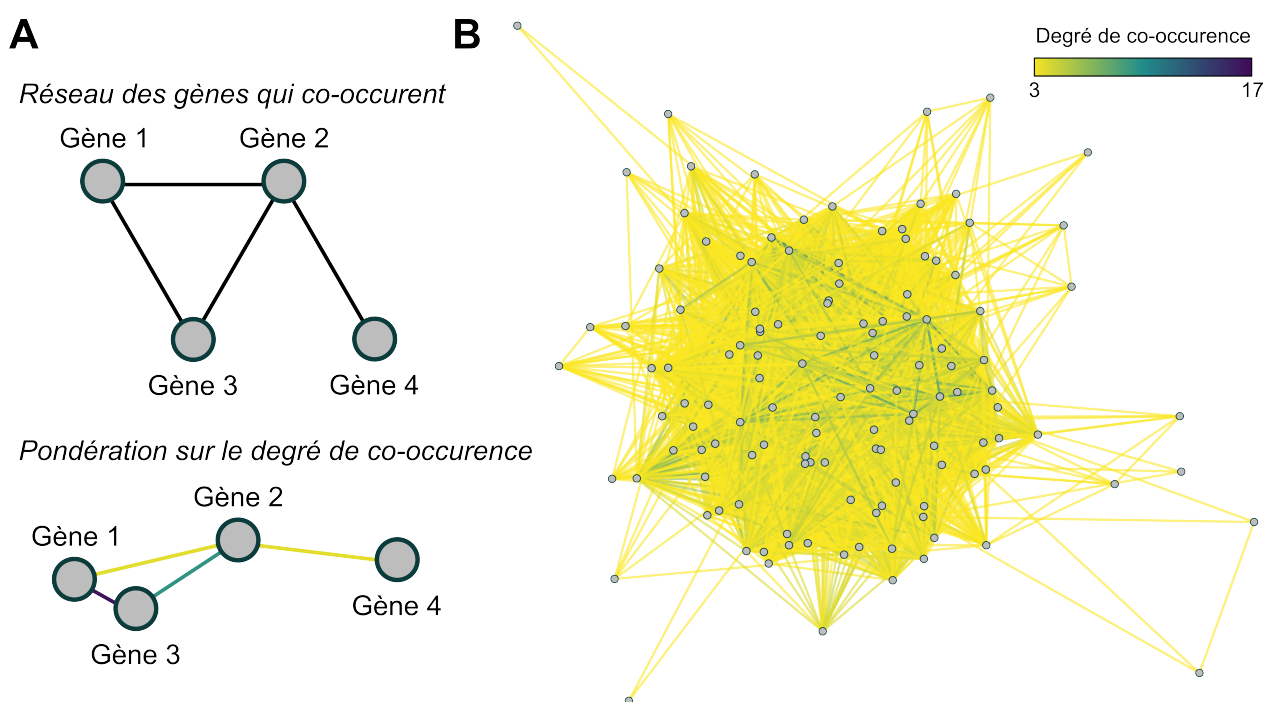


FIGURE 4.5. Co-occurrence des cibles identifiées en DAP-seq sur le génome de PAO1. A) Représentation schématique de la construction du réseau pondéré de co-occurrence. B) Réseau pondéré de co-occurrence de 133 gènes co-régulés en DAP-seq dans PAO1.

Étant donné que l'approche précédente n'a pas permis de délimiter des groupes de gènes

potentiellement co-régulés, je me suis intéressé aux cibles communes entre les RRs pour identifier les similarités de cistromes. Le nombre de cibles en commun de chaque paire de RRs a été évalué dans le génome de PAO1 et a permis de construire un réseau pondéré dans lequel les RRs sont connectés en fonction du chevauchement de leur cistrome (Fig 4.6). Ce réseau révèle d'abord une grande interconnexion qui traduit les similarités entre les cistromes identifiés en DAP-seq. Logiquement, les RRs ayant des cistromes importants comme IHMA87_02464 et RocA1, forment des nœuds centraux. Les RRs de même classe sont regroupés, ce qui confirme que les cistromes des RRs d'une même sous famille sont proches. Il est intéressant de noter par exemple la promiscuité des cistromes des RRs CopR, CzcR, PA1437 (MmnR) et IrlR. Ces RRs ont des rôles avérés ou supposés dans la résistance au cuivre et notamment la régulation d'un opéron spécifique de IHMA87 comme il sera traité en détail dans le chapitre 6.

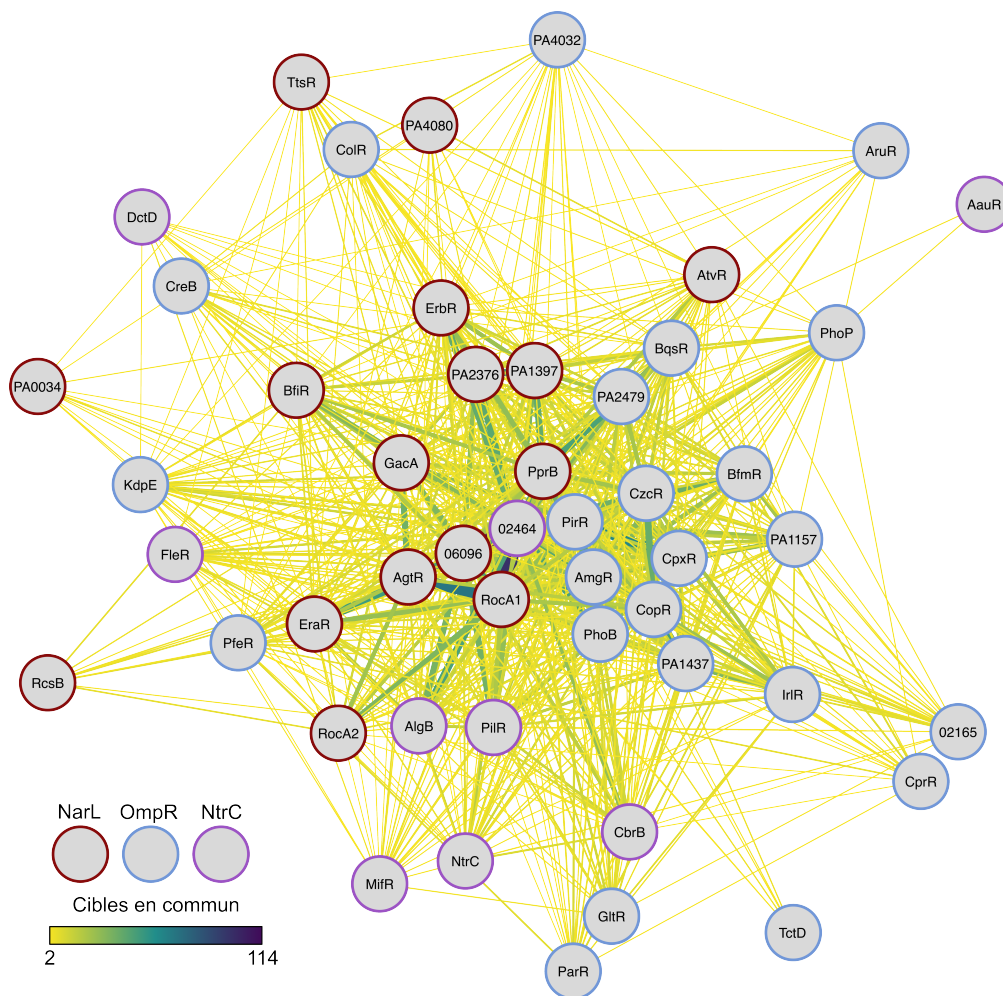


FIGURE 4.6. Réseau pondéré des chevauchements des cistromes des RRs en DAP-seq dans PAO1. Les 3 RRs spécifiques de IHMA87 abrégés en 02165 (IHMA87_02165), 02464 (IHMA87_02464) et 06096 (IHMA87_06096).

Pourquoi les cistromes identifiés en DAP-seq pour ces 53 RRs ont tant de cibles en commun ?

Une piste de réponse se trouve dans les conditions expérimentales de fixation qui favorisent l'apparition de faux positifs car la fixation du RR à l'ADN est forcée. Ces faux positifs peuvent être par exemple des régions génétiques présentant un motif capable d'être reconnu par un RR *in vivo* avec une forte affinité, mais qui, *in vitro*, est reconnu par d'autres représentants de la sous-famille reconnaissant un motif similaire

4.3 Stratégies pour exploiter les résultats de DAP-seq

L'analyse globale des résultats de DAP-seq ne m'a pas permis d'identifier des pistes à étudier, en particulier car je me suis heurté au nombre et à la variabilité des cibles prédites. J'ai ensuite réalisé une analyse plus ciblée, centrée sur les gènes reconnus par des RRs, ce qui a permis de définir les projets sur lesquels j'ai travaillé.

4.3.1 Régulation des gènes impliqués dans la pathogénicité

Je me suis concentré sur certains gènes cruciaux dans 3 processus clés de la pathogénicité de *P. aeruginosa* : la formation de biofilm, la virulence et la résistance aux antibiotiques. Pour cela, j'ai défini un groupement de 16 gènes d'intérêt (Table 4.2).

Afin d'apprécier au mieux les données de DAP-seq, j'ai généré un script en me formant au langage python afin de représenter visuellement les différentes fixations observées sur une région promotrices dans les 3 génomes utilisés (Fig 4.7). Cet outil m'a permis de parcourir les données de DAP-seq en représentant les fixations observées sur le promoteur d'un gène cible donné. Cette approche présente l'avantage de visualiser les RRs impliqués ainsi que la position du pic de fixation, son enrichissement et sa conservation entre les souches.

A l'aide de ce script, j'ai pu construire le réseau des fixations observées en DAP-seq sur les promoteurs des 16 gènes d'intérêt (Fig 4.8). Parmi les liens identifiés, certains confirment ce qui est publié dans la littérature comme la régulation de *rsmY* et *rsmZ* par GacA ou la régulation de l'opéron *cupC* par RocA1. Ces promoteurs sont reconnus par 24 RRs. Certains gènes apparaissent particulièrement ciblés comme l'opéron *alg* ou *rsmY* ciblés par respectivement 9 et 8 RRs.

PAO1_ID	Gène cible	Opéron
PA0992	<i>cupC1</i>	<i>cupC123</i>
PA2128	<i>cupA1</i>	<i>cupA12345</i>
PA2231	<i>pslA</i>	<i>pslABCDEFGHIJKLMNO</i>
PA3064	<i>pelA</i>	<i>pelABCDEFGF</i>
PA3540	<i>algD</i>	<i>algD-8-44-KEGXLIJFA</i>
PA4086	<i>cupB1</i>	<i>cupB123456</i>
PA4648	<i>cupE1</i>	<i>cupE123456</i>
PA0044	<i>exoT</i>	
PA0527.1	<i>rsmY</i>	
PA1697	<i>pscN</i>	<i>pscNOPQRSTU</i>
PA1698	<i>popN</i>	<i>popN-pcr1234-pcrDRGVH-popBD</i>
PA1714	<i>exsD</i>	<i>exsD-pscBCDEFGHIJKL</i>
PA3621.1	<i>rsmZ</i>	
PA3841	<i>exoS</i>	
PA0425	<i>mexA</i>	<i>mexAB-oprM</i>
PA2019	<i>mexX</i>	<i>mexXY</i>
PA2493	<i>mexE</i>	<i>mexEF-oprN</i>
PA4205	<i>mexG</i>	<i>mexGHI-opmD</i>
PA4599	<i>mexC</i>	<i>mexCD-oprJ</i>

TABLE 4.2. Liste des gènes d'intérêt utilisés pour explorer les données de DAP-seq Les gènes sont coloriés en fonction de leur rôle dans : la formation biofilm (bleu), cytotoxicité (vert) ou la résistance aux antibiotiques (violet).

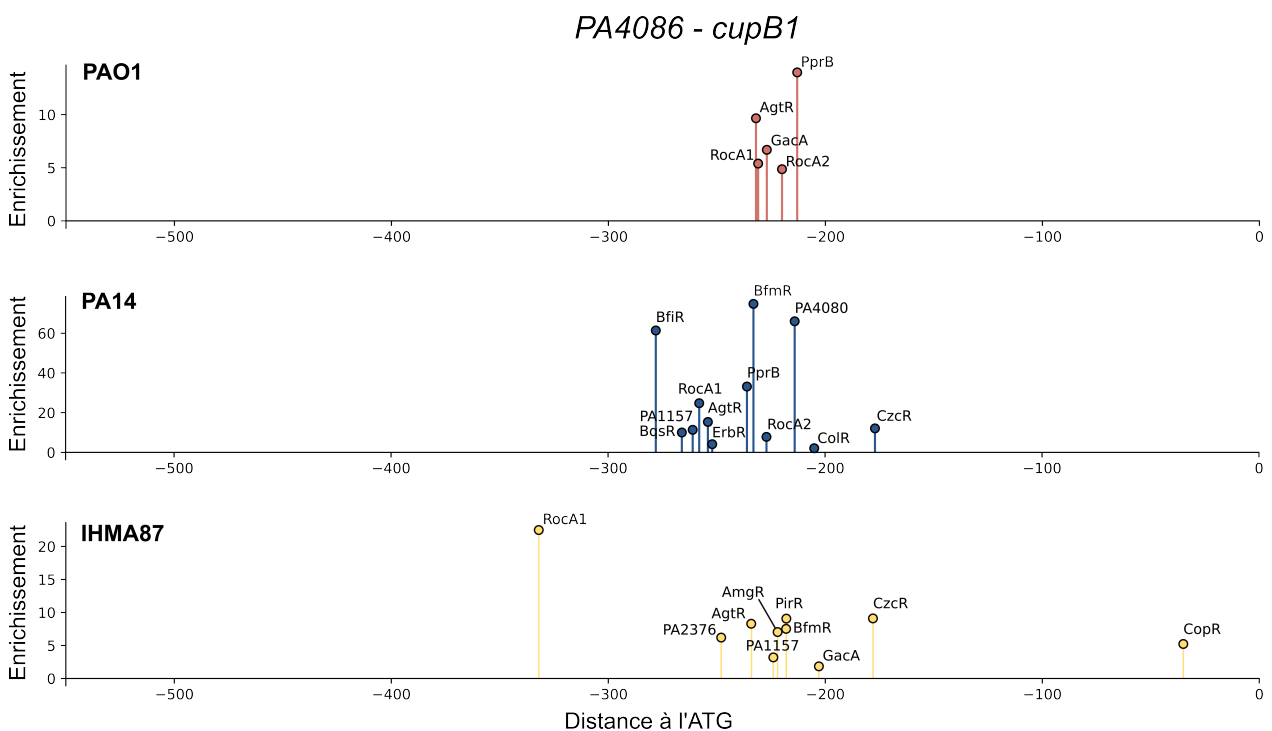


FIGURE 4.7. Fixations observées en DAP-seq sur la région promotrice de *cupB1* (PA4086). Les sites de fixation des RRs sont représentés par la valeur d'enrichissement maximale du pic de fixation et sa position en fonction de la distance à l'ATG en pb. Fixation observée sur les 3 génomes PAO1, PA14 et IHMA87 en rouge, bleu et jaune respectivement.

IHMA87_02165 et son HK prédite IHMA87_02166 forment un TCS qui présente de fortes homologies avec le système CusRS de *E. coli* impliqué dans la régulation de l'homéostasie du cuivre et fut donc rebaptisé de la sorte. De plus, CusR se fixe fortement sur la région localisée entre son propre gène et un groupe de gènes divergents ayant des rôles prédits dans la détoxification du cuivre. C'est donc en vertu de son rôle putatif dans la résistance en métaux que nous avons décidé d'étudier ce système dont les résultats sont présentés dans le chapitre 6.

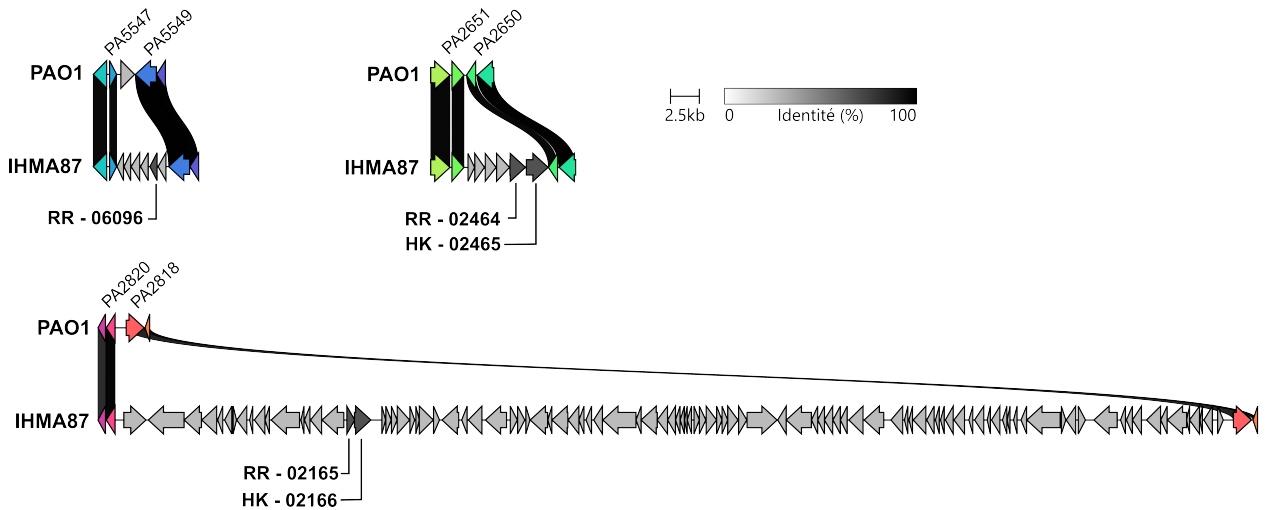


FIGURE 4.9. Environnements génétiques des 3 RRs spécifiques de IHMA87 en comparaison avec PAO1. Les alignements sont visualisés avec clinker. Les noms de locus de IHMA87 sont abrégés tels que *IHMA87_02164* devient *02164*.

5 AGTR, UN RR PROMETTEUR IMPLIQUÉ DANS LA VIRULENCE ?

Sommaire

5.1 Analyse des cibles choisies de AgtR	66
5.1.1 Cistromes de AgtR en DAP-seq	66
5.1.2 Activation du système AgtSR par le GABA	66
5.1.3 Régulation de <i>rsmY</i> et <i>rsmZ</i> par AgtR	67
5.1.4 7 UTs potentiellement régulées par AgtR	68
5.2 Caractérisations des phénotypes contrôlés par AgtR	69
5.2.1 Motilités : <i>swimming</i> , <i>twitching</i> et <i>swarming</i>	70
5.2.2 Formation de biofilm à l'interface air-liquide	70
5.3 Localisation et dynamique de AgtS	71
5.4 Discussion	72
AgtR et la détection du GlcNAc	72
Les cibles de AgtR en DAP-seq	72
Effet de AgtR sur le <i>swarming</i>	72
Modèle d'étude pour la localisation et de la dynamique des HKs	73
5.5 Matériel & Méthodes	73
Milieu et culture	73
Motilité	73
Biofilm	74
Microscopie	74

AgtR est un RR de la famille NarL dont le gène est organisé en opéron avec celui de son HK partenaire AgtS. Ce système est responsable de l'activation d'un opéron de 4 gènes codant pour un transporteur ABC en réponse au δ -aminovalérate (AMV), au γ -aminobutyrate (GABA) et à la β -alanine (CHOU et al., 2014). L'ensemble des gènes *agt* ont un rôle crucial dans l'utilisation de l'AMV et du GABA comme source de carbone et d'azote. Les deux opérons ont ainsi été nommés *agtSR* et *agtABCD* pour « aminovalérate and GABA transport » (Fig 5.1).

Par ailleurs, la délétion de *agtR* empêche la réponse de *P. aeruginosa* au N-acétylglucosamine (GlcNAc), un composant du peptidoglycane qui stimule la virulence de cette bactérie (A. KORGAONKAR et al., 2013). Le peptidoglycane des bactéries à Gram positif étant exposé au milieu extérieur, il peut, lors de sa fragmentation naturelle pendant la croissance ou induite par la lyse, libérer des molécules dans le milieu extracellulaire pouvant servir alors de déterminants pour la détection de ces bactéries par *P. aeruginosa*. Ce résultat suggère que AgtR joue un rôle dans la détection du GlcNAc et les interactions polymicrobiennes.

De plus, deux études sur de multiples mutants de TCSs de *P. aeruginosa* ont révélé un rôle de AgtSR dans la formation de biofilm et la motilité dans la souche PA14 (BADAL et al., 2020, JOGE et al., 2018). En effet, la délétion de *agtR* ou *agtS* conduit à une surproduction de biofilm et diminue les capacités de nage et de *twitching*. Concernant le *swarming*, la délétion de *agtR* a des effets qui dépendent du milieu permettant l'augmentation du périmètre de *swarming* (milieu M8) ou sa diminution (milieux BM2, M9 et PGM)

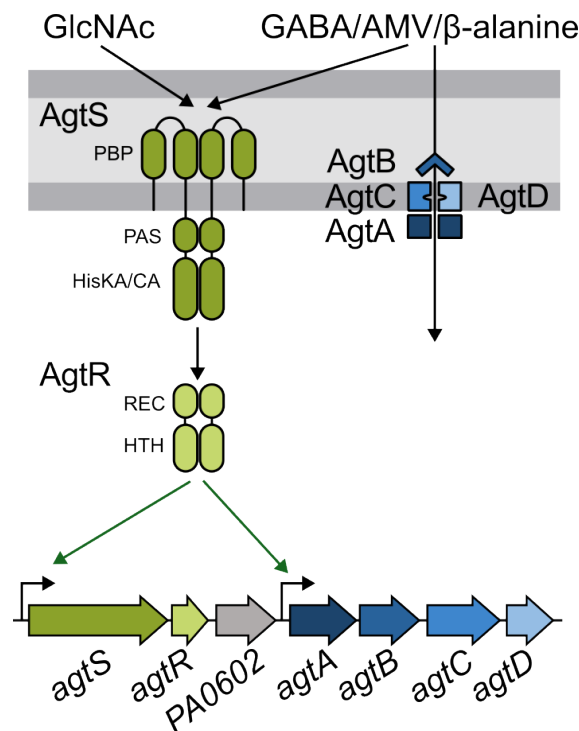


FIGURE 5.1. Modèle de fonctionnement du TCS AgtSR.

De nombreuses cibles ont été identifiées pour AgtR en DAP-seq avec 178,192 et 397 cibles sur les génomes de PAO1, PA14 et IHMA87 respectivement (Fig 5.2A). Parmi ces cibles, 85 sont ciblées dans les 3 souches. Conformément à nos connaissances de ce système, AgtR s'est fixé au promoteur de l'opéron *agtABCD* dans les 3 génomes. Ces données constituent donc une source riche d'informations pour approfondir notre compréhension de ce système.

AgtSR a premièrement retenu notre attention car il cible fortement les promoteurs de *rsmY* et *rsmZ* dans les résultats de DAP-seq dans les 3 génomes (Fig 5.2B). En se fixant en amont de *rsmY*, AgtR régule aussi potentiellement *dnr* codant pour un FT impliqué dans la réponse au nitrite (GIARDINA et al., 2011). Il est intéressant de noter que AgtR se fixe aussi dans la région promotrice de *rpoS*. Les pistes *rpoS* et *dnr* n'ont pas été exploitées. Les deux petits ARNs RsmY et RsmZ et jouent un rôle central dans la virulence de *P. aeruginosa* en contrôlant la transition entre infection chronique et aiguë (section 2.2.3). Leurs gènes sont déjà connus pour être régulés par le RR GacA, dont la fixation a bien été retrouvée en DAP-seq avec des niveaux d'enrichissement comparables à ceux observés avec AgtR. À partir de ces observations, nous avons décidé d'élucider le rôle potentiel de AgtR dans la régulation de la pathogénicité de *P. aeruginosa* suggéré par les résultats de DAP-seq en analysant son rôle dans l'expression de certains gènes sélectionnés et les phénotypes qu'il contrôle.

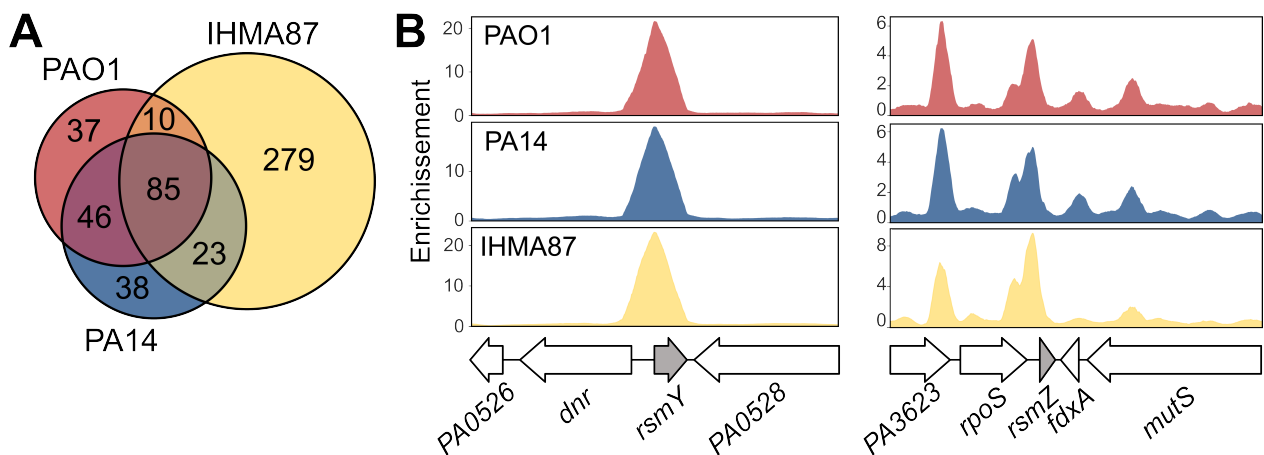


FIGURE 5.2. Cistrome de AgtR en DAP-seq. A) Conservation des cibles identifiées de AgtR sur les génomes des souches PAO1, PA14 et IHMA87. B) Fixation de AgtR en amont de *rsmY* et *rsmZ* sur les génomes de PAO1, PA14 et IHMA87. Les enrichissements ont été obtenus à partir des données brutes de la DAP-seq (TROUILLON et al., 2021a)

5.1 Analyse des cibles choisies de AgtR

5.1.1 Cistromes de AgtR en DAP-seq

En plus de *rsmY* et *rsmZ*, la détermination du cistrome de AgtR à partir des données de DAP-seq nous a permis d'identifier 7 UTs comprenant 22 gènes potentiellement régulés et déduits de 5 sites de fixation. Ces gènes ont retenu notre attention pour leur implication dans la virulence (le SST2 Xcp, la toxine ExoT et RhlA impliqué dans la synthèse de rhamnolipides) ou la formation de biofilm (le TCS RocS1-R-A1 et les fimbriae CupB) (Fig 5.3). À l'exception de *exoT* qui est absent du génome de IHMA87, les 6 autres UTs ont été identifiées sur les 3 génomes avec des enrichissements différents. Par la suite, nous avons cherché à confirmer la régulation de ces gènes par AgtR *in vivo*.

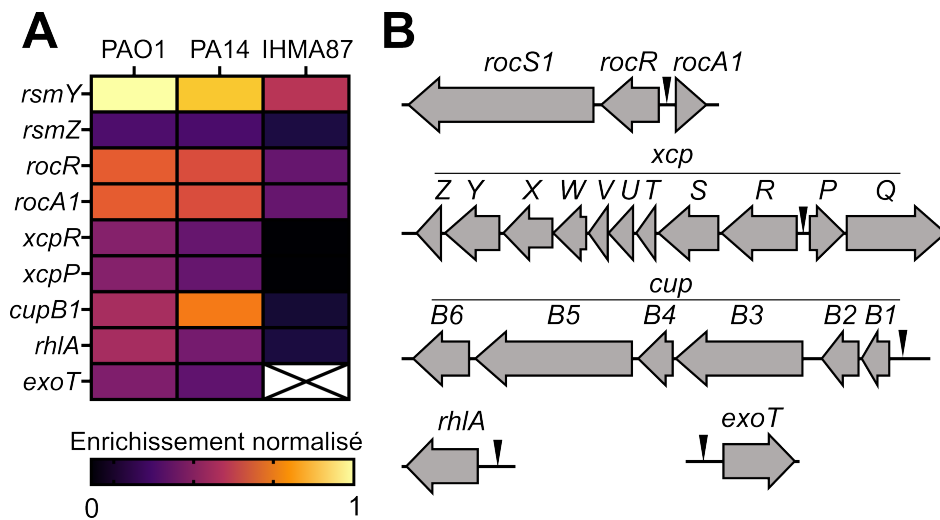


FIGURE 5.3. Cibles sélectionnées à partir du cistrome de AgtR établi par DAP-seq. A) Enrichissements normalisés de la fixation de AgtR sur les régions promotrices de 9 UTs dans 3 souches. B) représentation des opérons potentiellement régulés par AgtR et sa fixation est indiquée par le triangle noir.

5.1.2 Activation du système AgtSR par le GABA

Afin d'analyser le rôle d'AgtR sur des cibles putatives, nous avons tout d'abord mis au point les conditions d'activation du TCS, basé sur les données bibliographiques. Une fusion transcriptionnelle chromosomique du promoteur d'*agtABCD* (*P_{agtA}-lacZ*) a été construite pour rapporter l'activation de AgtSR. Le GABA, l'AMV, et la β -alanine sont connus pour stimuler directement la transcription de *agtABCD* par AgtR tandis que le rôle du GlcNAc sur l'activation de ce TCS n'est pas encore élucidé (A. KORGAONKAR et al., 2013, CHOU et al., 2014). Ainsi, nous avons testé

l'effet du GABA et du GlcNAc sur l'activité de *PagtA-lacZ* en dosant l'activité β -galactosidase des cultures en phase exponentielle ($DO_{600}=1$) en présence ou non de ces molécules (Fig 5.4).

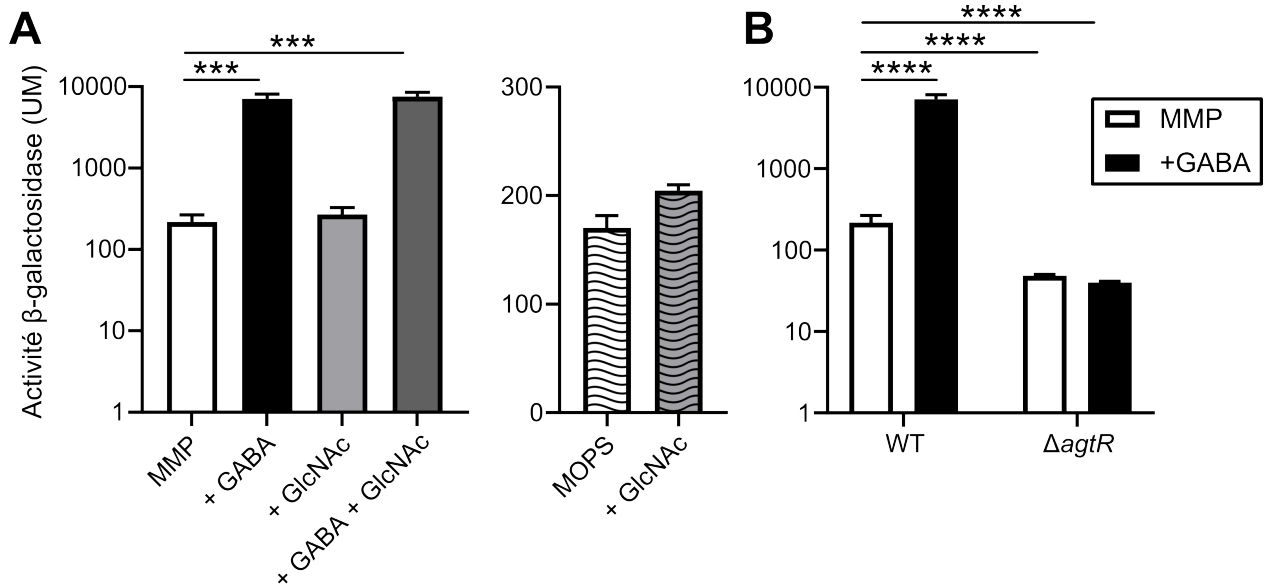


FIGURE 5.4. Activation de AgtSR en réponse au GABA et au GlcNAc. A) Activité β -galactosidase de *PagtA-lacZ* en réponse au GABA (20mM) et/ou au GlcNAc (1mM) en MMP et en MOPS. B) Activité β -galactosidase dans la souche sauvage (WT) et la souche délétée pour *agtR* ($\Delta agtR$) en réponse au GABA en MMP. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d'erreur indiquent l'écart-type à la moyenne. UM : unité de Miller. Les *p*-valeurs ont été déterminées par un test ANOVA et les résultats significatifs sont indiqués (**** : *p*-valeur < 0.0001, *** : *p*-valeur < 0.001).

Nos résultats indiquent que l'ajout de 20mM de GABA induit la transcription de *agtABCD* d'un facteur 20 en MMP (Fig 5.4A). Lorsque AgtR est absent, l'activité du promoteur de cet opéron est significativement plus faible et n'est pas induite par l'ajout de GABA dans le milieu (Fig 5.4B). Cela confirme que AgtRS est activé dans les conditions testées en adéquation avec les travaux de Chou *et al.* (CHOU *et al.*, 2014). En revanche, l'ajout de 1mM de GlcNAc n'a eu aucun impact sur l'activité de *agtABCD* dans les milieux utilisés (MMP et MOPS) en absence ou en présence de GABA (Fig 5.4A). Ainsi, dans les conditions testées, le GlcNAc ne permet pas l'activation de AgtRS. Pour la suite de cette étude, les expériences ont été réalisées en milieu MMP supplémenté avec 20mM de GABA ou non, dans la souche sauvage et $\Delta agtR$.

5.1.3 Régulation de *rsmY* et *rsmZ* par AgtR

Pour évaluer le rôle d'AgtR dans la régulation de *rsmY* et *rsmZ*, nous avons utilisé des fusions *lacZ* rapportrices des deux promoteurs dans le plasmide non intégratif pMP220 qui nous ont été fournies par le Pr Christophe Bordi (BORDI *et al.*, 2010). Les plasmides ont été transformés

dans les souches sauvage et mutante et l'activité des promoteurs a été mesurée par un dosage de l'activité β -galactosidase sur les cultures en MMP supplémenté ou non en GABA à une DO_{600} de 1. Nos résultats démontrent que le GABA a un effet positif et négatif sur la transcription de *rsmY* et *rsmZ* respectivement (Fig 5.5). En revanche, l'absence de AgtR n'a eu aucun impact sur l'expression de ces gènes suggérant que les effets observés sont indépendants de ce RR. Ainsi, dans les conditions testées, AgtR ne régule pas *rsmY* et *rsmZ*.

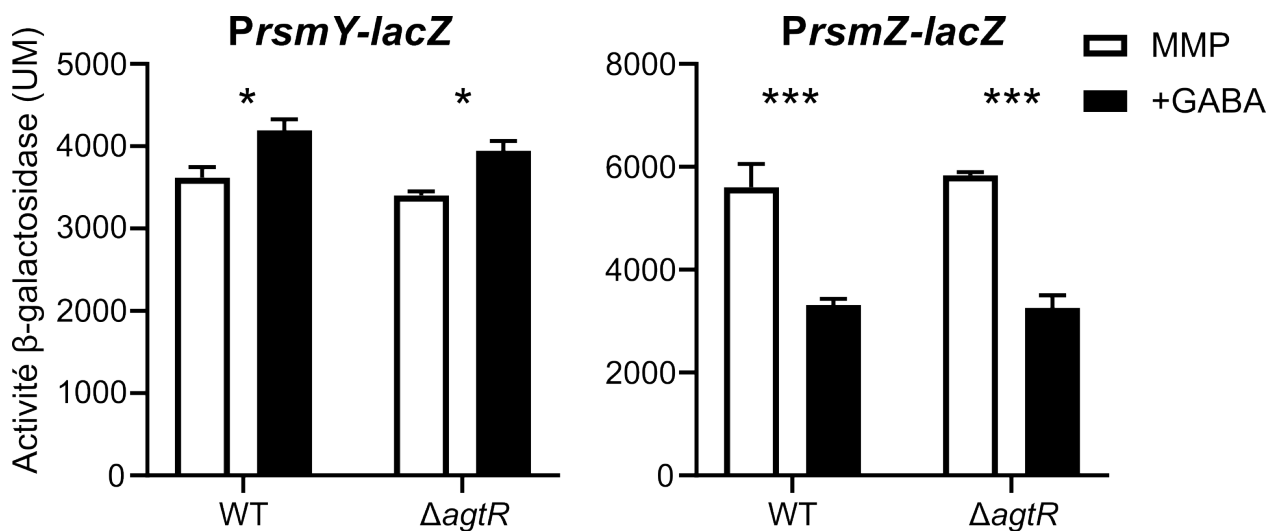


FIGURE 5.5. Rôle de AgtR dans la régulation de *rsmY* et *rsmZ*. L'activité β -galactosidase de *PrsmY-lacZ* et *PrsmZ-lacZ* a été mesurée dans les souches PAO1 sauvage (WT) et délétée pour *agtR* ($\Delta agtR$) en réponse au GABA (20mM). Les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d'erreur indiquent l'écart-type à la moyenne. Les *p*-valeurs ont été déterminées par un test ANOVA et les résultats significatifs sont indiqués (***) : *p*-valeur < 0.001, * : *p*-valeur < 0.05).

5.1.4 7 UTs potentiellement régulées par AgtR

Afin de déterminer l'implication de AgtR dans la régulation des 7 autres cibles sélectionnées, nous avons construit des fusions *lacZ* rapportrices de leur promoteur en utilisant un plasmide intégratif (miniCTX) (Fig 5.6). La délétion de *agtR* a eu un effet positif significatif pour 4 fusions (*rocR*, *rocA1*, *xcpR* et *xcpP*) mais qui est bien inférieur à l'activation de *agtABCD* (x20). L'effet de AgtR sur ces promoteurs nécessiterait d'être confirmé, notamment en identifiant si cette induction d'un facteur de 1,5 a un effet physiologique. Pour les 3 autres fusions, l'absence de AgtR n'a pas impacté significativement l'activité des promoteurs.

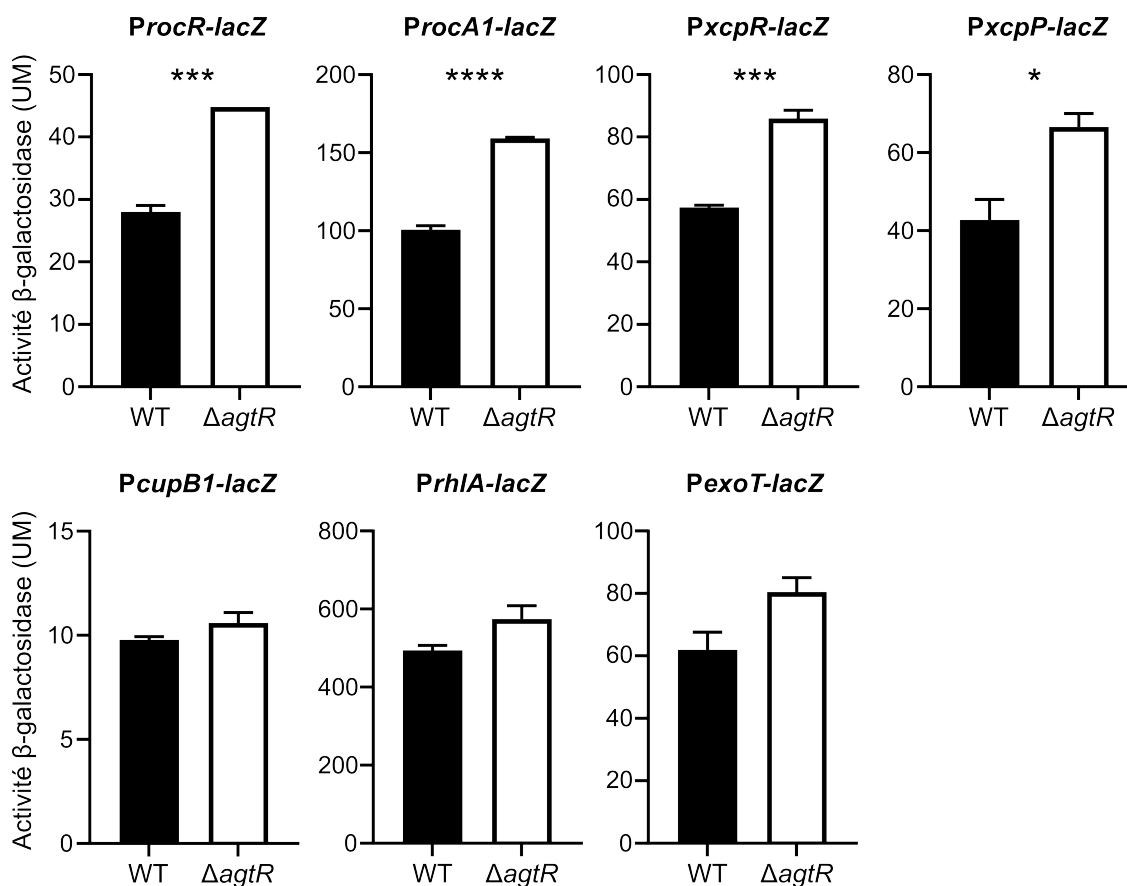


FIGURE 5.6. Activités de 7 promoteurs ciblés en DAP-seq par AgtR. Les activités β -galactosidases des promoteurs indiqués ont été mesurées dans les souches PAO1 sauvage (WT) et délétée pour *agtR* ($\Delta agtR$) en MMP en présence de GABA (20mM). Les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d'erreur indiquent l'écart-type à la moyenne. Les p-valeurs ont été déterminées par un test T et les résultats significatifs sont indiqués (**** : p -valeur < 0.0001, *** : p -valeur < 0.001, * : p -valeur < 0.05).

5.2 Caractérisations des phénotypes contrôlés par AgtR

En parallèle de l'étude des cibles de AgtR, le mutant $\Delta agtR$ a été utilisé pour explorer le rôle de AgtSR dans la motilité et la formation de biofilm. En effet, le fait que AgtR cible *rsmY*, *rsmZ* ou *rhlA* en DAP-seq suggérait que ce système pouvait être impliqué dans le contrôle de ces phénotypes. De plus, plusieurs études ont établi un rôle de AgtR dans la formation de biofilm et les motilités (BADAL et al., 2020, JOGE et al., 2018). Ainsi, j'ai étudié l'impact de la délétion de *agtR* et de l'ajout de GABA sur ces deux processus.

5.2.1 Motilités : *swimming*, *twitching* et *swarming*

Les aptitudes de motilités de la souche mutante ont été comparées à celles de la souche sauvage dans différents milieux spécifiques permettant d'évaluer chaque motilité dans lesquels a été ajouté ou non du GABA à 20mM. Pour la capacité à nager (*swimming*) ou à *twitcher*, ni le GABA, ni la délétion d'*agtR* n'ont eu d'impact dans les conditions testées. En revanche, pour le *swarming*, l'ajout de GABA a largement augmenté le rayon de déplacement de la souche sauvage (Fig 5.7A). La délétion de *agtR* a modifié la capacité de la souche à *swarmer* qui présente un rayon plus diffus en présence de GABA. En conclusion, les phénotypes du mutant *agtR* observés pour les motilités de la souche PA14 ne sont pas reproduits dans nos conditions pour la souche PAO1. Cependant, un effet de la délétion sur la capacité de *P. aeruginosa* à *swarmer* en présence de GABA a été observé. La fixation de AgtR dans la région promotrice de l'opéron *rhlAB* constitue une explication probable de ce phénotype. En effet, RhlA est une enzyme impliquée dans la synthèse de rhamnolipides sous le contrôle de la voie Rhl du QS. Ces rhamnolipides diffusent rapidement dans le milieu et facilitent notamment le *swarming* de *P. aeruginosa* grâce à ses propriétés de tensioactif (CAIAZZA et al., 2005).

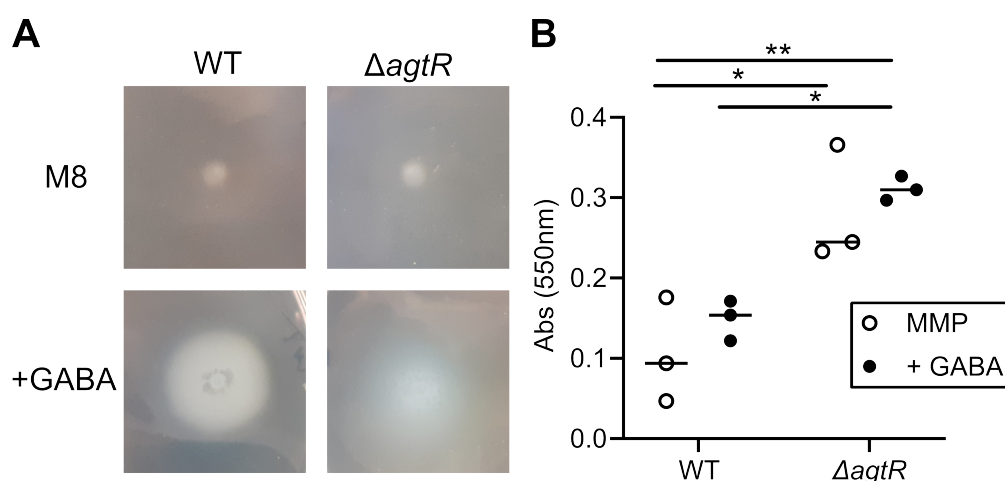


FIGURE 5.7. Effet de la délétion de *agtR* sur le *swarming* et la formation de biofilm. A) Capacité de *swarming* des souches PAO1 sauvage (WT) et délétée pour *agtR* ($\Delta agtR$) en réponse au GABA (20mM). B) Quantification de la formation de biofilm à l'interface air-liquide des souches WT et $\Delta agtR$ par coloration au cristal violet après 24h à 30°C en présence ou non de GABA.

5.2.2 Formation de biofilm à l'interface air-liquide

La capacité de la souche $\Delta agtR$ à former du biofilm en présence de GABA a été évaluée par rapport à la souche sauvage. Ainsi, la quantité de biofilm formée à l'interface air-liquide a été mesurée après 24h de croissance à 30°C sans agitation dans le milieu MMP. Les résultats

montrent que l'ajout de GABA n'affecte pas la formation de biofilm pour les deux souches dans les conditions testées (Fig 5.7B). Cependant, l'absence de AgtR améliore significativement la formation de biofilm indépendamment de la présence de GABA.

5.3 Localisation et dynamique de AgtS

Basé sur les travaux préliminaires du Pr. Christophe Bordi sur la localisation et la dynamique de GacS observant la formation de patchs mobiles d'HK dans la membrane interne, nous avons voulu étudier cet aspect avec AgtS. Nous avons voulu caractériser la localisation et l'organisation de AgtS mais aussi déterminer l'effet du signal sur l'HK car, contrairement à GacS, les signaux de AgtS sont connus.

La surproduction via un plasmide inductible à l'arabinose (pJN105) de AgtS fusionnée avec la superfolder GFP dans sa partie C-terminale (AgtS-sfGFP) a révélé une localisation de la protéine regroupée en patchs (Fig 7.6). Nos résultats montrent que l'ajout de GABA n'a pas modifié la formation et la distribution de ces patchs. Malheureusement, nous avons observé en mesurant l'activité β -galactosidase de la fusion *PagtA-lacZ* que la surproduction de AgtS et de AgtS-sfGFP empêchaient l'activation du système par la GABA dans nos conditions (données non présentées). Dans ces conditions expérimentales, nous ne pouvons conclure sur l'origine artéfactuelle ou non de ces foci car AgtS est surproduite n'est pas fonctionnelle.

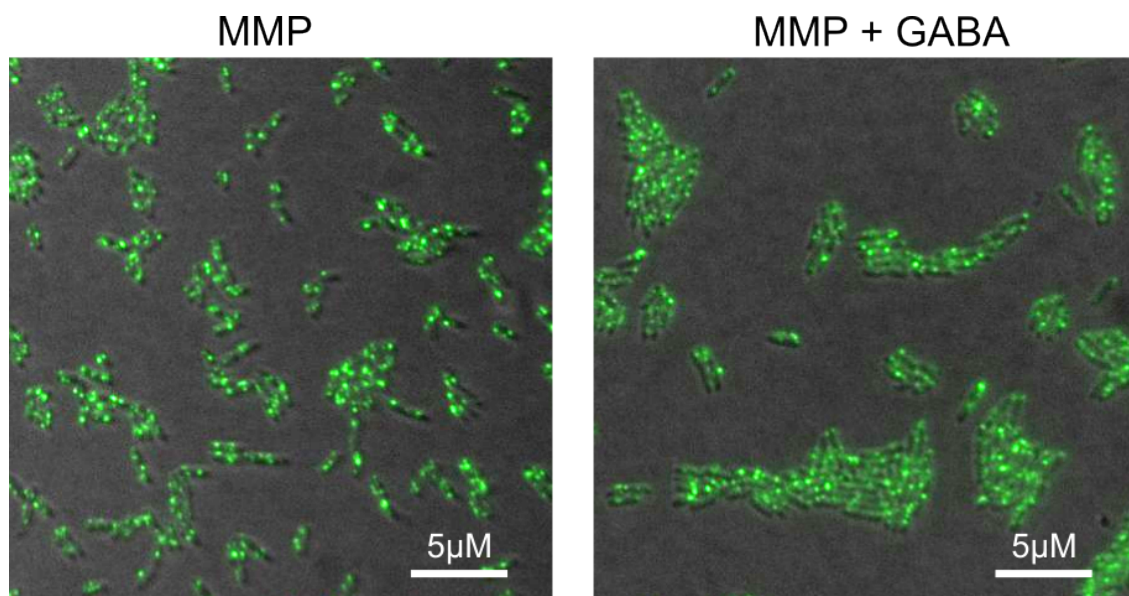


FIGURE 5.8. Localisation de AgtS en réponse au GABA. La souche PAO1 surproduisant AgtS-sfGFP (pJN105) a été cultivée 2 heures en MMP supplémenté en Arabinose (0,5%). Le GABA a été utilisé à 20mM. Images capturées avec un microscope IX71 Olympus avec un objectif au 100X et analysées avec ImageJ.

5.4 Discussion

En conclusion, 7 fixations de AgtR ont été identifiées *in vitro*, régulant potentiellement 9 UTs. Parmi ces cibles, l'expression de 4 UTs a été impactée par la délétion de *agtR* dans nos expériences avec cependant des effets faibles. En l'absence de lien identifié avec les gènes *rsmY* et *rsmZ*, l'étude des cibles de AgtR fut interrompue. Nos résultats suggèrent que AgtR pourrait participer à la formation de biofilm et le *swarming* ; cependant, ce travail a été interrompu puisque je n'ai pas réussi à identifier de nouvelles cibles. Néanmoins, AgtS reste un modèle prometteur pour l'étude de la localisation et la dynamique des HKs dans la membrane et les fusions *lacZ* générées dans ce projet ont été utiles pour la suite de mes travaux de thèse.

AgtR et la détection du GlcNAc

Il a été démontré que AgtR est impliqué dans la réponse de *P. aeruginosa* au GlcNAc en participant à l'augmentation de la production de PQS en réponse à cette molécule (Korgaonkar 2013). Aucune fixation de AgtR n'a été observée sur les promoteurs des gènes du PQS en DAP-seq ce qui suggère que cet effet est indirect. Par ailleurs, le GlcNAc n'a pas altéré la régulation de l'opéron *agtABCD* dans nos conditions, ce qui laisse supposer que le GlcNAc n'est pas capable d'activer AgtRS comme le GABA. Les raisons pour lesquelles AgtR est impliqué dans la réponse au GlcNAc reste inconnues. La DAP-seq pourrait cependant fournir une piste de réponse puisque, dans le génome de IHMA87, AgtR se fixe sur la région promotrice de l'opéron *nag* dont les gènes sont impliqués dans l'import du GlcNAc.

Les cibles de AgtR en DAP-seq

Lorsqu'il s'agit d'étudier les interactions observées en DAP-seq, il est important de noter que toutes les interactions observées *in vitro* ne se produisent pas nécessairement de manière équivalente *in vivo*. Par exemple, si les promoteurs de *rsmY* et *rsmZ* sont certes fortement reconnus par AgtR en DAP-seq, GacA se fixe sur les mêmes sites avec un meilleur enrichissement. Appartenant à la même famille, les deux RR reconnaissent des motifs similaires et possèdent plusieurs cibles en commun en DAP-seq. Il est probable que les conditions de DAP-seq ont favorisé l'interaction de AgtR avec des cibles reconnues *in vivo* par des RR similaires comme GacA.

Effet de AgtR sur le *swarming*

Contrairement à ce qui a été observé dans PA14, la délétion de *agtR* n'a pas diminué la capacité de *swarming* dans la souche PAO1 bien que les conditions expérimentales soient identiques.

Cependant, les capacités de swarming de PAO1 sont bien inférieures à celle de PA14 ce qui pourrait masquer l'effet de AgtR (MORRIS et al., 2011). Dans nos conditions, l'ajout de GABA a un effet positif sur le *swarming* de *P. aeruginosa*, mais cet effet pourrait être indirect puisque le GABA peut être utilisé comme source de carbone et améliore potentiellement la croissance de la souche dans ce milieu (STRANDWITZ, 2018).

Modèle d'étude pour la localisation et de la dynamique des HKs

Finalement, nous avons voulu utiliser AgtS comme un modèle pour l'étude de la localisation et la dynamique des HK dans la membrane interne. La concentration de HK présente un premier défi : trop faible, elle ne permet pas la visualisation de la protéine dans les conditions testées avec ou sans ajout de GABA. Afin de contourner ce problème, nous avons opté pour une surproduction de AgtS qui a posé deux limites : la formation de patches artificiels de protéines et la perturbation de la signalisation au sein du TCS. En effet, la surproduction de AgtS peut altérer sa localisation et générer des foci artéfactuels. De plus, la surproduction d'une HK peut modifier le statut de phosphorylation de son RR partenaire et donc altérer la dynamique d'un système. AgtS présente l'avantage rare de posséder plusieurs signaux identifiés ; poursuivre son étude par une approche d'imagerie par fluorescence nécessiterait des conditions qui permettraient une production suffisante de protéine pour la visualiser tout en conservant un système fonctionnel capable de répondre au GABA. Une première possibilité serait de moduler l'induction à l'arabinose pour limiter la surproduction de l'HK.

5.5 Matériel & Méthodes

Milieu et culture

Le milieu minimum P (MMP) a la composition suivante (g/l) : Na_2HPO_4 , 1.47 ; KH_2PO_4 , 0.648 ; MgSO_4 , 0.2 ; FeSO_4 , 0.001 supplémenté avec 20mM de L-Glutamate, pH 7,4. Les cultures liquides sont inoculées à $\text{DO}_{600}=0,1$ à partir d'une préculture sur la nuit. Le GABA est ajouté au début de la croissance et l'activité β -galactosidase est dosée lorsque les cultures atteignent une DO_{600} de 1.

Motilité

Une culture sur la nuit à 37°C sur gélose LB est utilisé pour ensemercer différentes géloses à l'aide de cure-dents stériles. Pour la nage, l'inoculum est inséré au milieu d'une gélose 0.3%

agar contenant 10 g/L de tryptone, 5 et 5g/L de NaCl, et incubé 24h à 30°C. Pour le twitching, l'inoculum est inséré à l'interface plastique/agar en perforant une gélose 1% agar contenant 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl, et incubé 48h à 37°C. Après retrait de la gélose, la zone de twitching autour du point d'inoculation est colorée avec du Bleu de Coomassie 0,1% pendant 10 min puis rincer à l'eau. Pour le swarming, l'inoculum est prélevé d'une culture sur gélose pour la nage puis est déposé à la surface d'une gélose M8 (8,5 mM NaCl, 42,3 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 0,5% agar, 1 mM MgSO₄, 0,2% glucose, 0,1 mM CaCl₂, 0,5% acides casaminés, 0,5% agar) et incubé 24h à 37°C.

Biofilm

Les bactéries sont inoculées à DO₆₀₀=0,1 dans 1 mL de milieu MMP dans une plaque 24 puits Thermofisher puis incubées à 30°C sans agitation pendant 24h. Le biofilm formé à l'interface air-liquide est coloré avec une goutte de cristal violet 0,1% pendant 10mn. Après deux lavages à l'eau stérile et séchage de la plaque, l'anneau est dissout dans 1mL d'acide acétique 30% et l'absorbance est mesurée à 550nm.

Microscopie

Les observations microscopiques ont été réalisées avec un microscope IX71 Olympus contrôlé par le système CellR Olympus et piloté par le logiciel Xcellence (Olympus). Les images ont été capturées avec une caméra Hammamatsu Orca-ER en utilisant un objectif à huile 100x (N.A. 1,30).

6 CUSR, UN RR SPÉCIFIQUE DE IHMA87 ACQUIS PAR HGT

Sommaire

6.1	Intégration d'un TCS accessoire dans le contrôle de l'homéostasie du cuivre (Article)	76
6.2	Résultats supplémentaires	138
6.2.1	Les ICEs de IHMA87	138
6.2.2	Les ICEs contenant le locus <i>lysR-cusS</i>	139
6.3	Discussion	140
	Résistance au cuivre chez un pathogène	140
	Régulation des ICEs	141

6.1 Intégration d'un TCS accessoire dans le contrôle de l'homéostasie du cuivre

Sylvie Elsen, Victor Simon & Ina Attrée

Manuscrit en voie de soumission

En cherchant à caractériser les RRs spécifiques de IHMA87, nous nous sommes intéressés à un TCS dont les gènes sont portés par une ICE acquise par HGT et qui fut nommé CusRS d'après ses homologues avec le TCS présent chez d'autres bactéries. CusR se lie fortement à la région intergénique en amont de son gène en DAP-seq, régulant potentiellement son propre opéron ainsi que les gènes orientés de manière divergente codant pour des protéines dont les fonctions prédites suggèrent un rôle dans l'homéostasie du cuivre.

Notre objectif était de déterminer le rôle de ce TCS et son intégration dans le système de régulation de l'homéostasie des métaux endogène.

Nos travaux montrent que ce TCS du génome accessoire joue un rôle dans la résistance au cuivre de cet isolat clinique. Nous avons révélé son rôle dans la régulation, en présence de ce métal, des 9 gènes codés en amont qui sont impliqués dans la détoxification du cuivre. Le locus est également régulé par deux TCSs homologues appartenant au génome cœur, CopRS et CzcRS. Ces gènes sont donc intégrés au réseau de régulation endogène, et de manière surprenante, les HKs CusS et CopS sont capables de communiquer avec les RRs partenaires de l'une et l'autre. De plus, les RRs orchestrent la régulation des gènes de CusRS avec des effets opposés. Enfin, l'acquisition horizontale de ces gènes s'avère partagée par de nombreuses souches des espèces *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa* illustrant la manière dont la résistance au cuivre peut se propager chez ces pathogènes. Cette étude démontre comment les gènes acquis par HGT peuvent être incorporés dans des réseaux de régulation endogènes pour procurer un avantage sélectif à l'hôte. Ce travail démontre également l'existence d'interconnexions entre un TCS accessoire et un TCS conservé, avec des modes de fonctionnement différents, élargissant ainsi leurs spectres d'action.

Conception (SE, VS)

Expérimentation (SE, VS)

Rédaction - écriture de la version originale (SE)

Rédaction - révision et édition (SE, VS, IA)

1 **Cross-regulation and cross-talk of conserved and accessory two-component**
2 **regulatory systems orchestrate *Pseudomonas* copper resistance**

3

4

Short title

5

***Pseudomonas* copper-responsive TCSs: cross-regulation and cross-talk**

6

7

Sylvie Elsen^{1*}, Victor Simon¹, Ina Attrée¹

8

¹ University Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Team Bacterial Pathogenesis and

9

Cellular Responses, 38054 Grenoble, France

10

* Corresponding author

11

E-mail: sylvie.elsen@ibs.fr

12

13 **Abstract**

14

Bacteria use diverse strategies and molecular machinery to maintain copper

15

homeostasis and to cope with its toxic effects. Some genetic elements providing copper

16

resistance are acquired by horizontal gene transfer; however, little is known about how they

17

are controlled and integrated into the central regulatory network. Here, we studied two

18

copper-responsive systems in a clinical isolate of *Pseudomonas paraeruginosa* and deciphered

19

the regulatory and cross-regulation mechanisms. To do so, we combined mutagenesis,

20 transcriptional fusion analyses and copper sensitivity phenotypes. Our results showed that the
21 accessory CusRS two-component system (TCS) responds to copper and activates both its own
22 expression and that of the adjacent nine-gene operon to provide resistance to elevated levels
23 of extracellular copper. The same locus was also found to be regulated by two core-genome-
24 encoded TCSs - the copper-responsive CopRS and the zinc-responsive CzcRS. Although the
25 target palindromic sequence – ATTCATnnATGTAAT – is the same for the three response
26 regulators, transcriptional outcomes differ. Thus, depending on the operon/regulator pair,
27 binding can result in different activation levels (from none to high), with the systems
28 demonstrating considerable plasticity. Unexpectedly, although the classical CusRS and the
29 noncanonical CopRS TCSs rely on distinct signaling mechanisms (kinase-based vs.
30 phosphatase-based), we discovered cross-talk in the absence of the cognate sensory kinases.
31 This cross-talk occurred between the proteins of these two otherwise independent systems.
32 The entire locus is part of an Integrative and Conjugative Element, and was found in other
33 *Pseudomonas* strains where its expression could provide copper resistance under appropriate
34 conditions. The results presented here illustrate how acquired genetic elements can become
35 part of endogenous regulatory networks, providing a physiological advantage. They also
36 highlight the potential for broader effects of accessory regulatory proteins through
37 interference with core regulatory proteins.

38 **Author Summary**

39 Two-component regulatory systems play a key role in bacterial life by detecting and
40 integrating a wide range of signals, allowing bacteria to continuously monitor and adapt to a
41 changing environment. They weave a complex network with a few highly interconnected
42 phosphorelays and numerous cross-regulations. Our study reveals connections between zinc

43 and copper homeostasis in a pathogenic bacterium, with cross-regulation observed for three
44 independent, closely related transcriptional regulators, CzcR, CopR and CusR. Zinc and copper
45 play a major role in host-pathogen interactions, and bacteria that synergize their responses to
46 the two elements can harness a growth advantage and enhanced fitness in specific conditions.
47 We also observed unexpected cross-talk between the core genome-encoded CopRS system
48 and the horizontally acquired CusRS system, although the molecular control exerted by a
49 histidine kinase on its cognate regulator differs. This plasticity observed within the two
50 signaling systems ensures a normal regulatory response to the copper signal required to
51 maintain copper homeostasis.

52

53 **Introduction**

54 Copper can be considered to be a heavy metal “Dr. Jekyll and Mr. Hyde”, as it is an
55 essential trace element in biological systems but, in excess, generates free radicals with
56 deleterious consequences [1,2]. As an antimicrobial, copper is extensively used to treat crops,
57 to enhance breeding, and as part of medicine, with the first reports of use dating back to
58 ancient civilizations. Human physiology exploits its properties, notably by accumulating
59 copper in phagocytic cells and at infection sites where it contributes to protection against
60 viruses, fungi and bacteria [3]. However, bacteria also use copper and have developed
61 mechanisms to deal with its excess.

62 To maintain copper homeostasis, Gram-negative bacteria use various molecular
63 mechanisms and machinery [1,2,4,5]. Cuproproteins are essentially extracellular or
64 periplasmic, participating in important biological processes such as respiration, while
65 chaperones and storage proteins capture intracellular copper cations. Copper transits from

66 the extracellular compartment to the cytosol, through porins or other membrane
67 transporters. Enzymes or chemical chelators, such as glutathione, also manipulate the redox
68 state of copper to allow chaperone loading and extrudation in case of excess. Periplasmic
69 chaperones provide copper for cuproprotein biogenesis or deliver it to export systems. These
70 export systems involve P1B-type ATPases or Resistance-Nodulation-Division (RND)-family
71 multidrug efflux pumps. Periplasmic multi-copper oxidases also contribute significantly to
72 periplasmic detoxification, by oxidizing Cu(I) to Cu(II) they reduce the metal's toxicity [2,5].
73 Synthesis of these molecular machines to ensure an equilibrium between cellular uptake and
74 detoxification is mainly orchestrated by the actions of two types of regulators, MerR-like
75 activators such as CueR that respond to cytoplasmic Cu(I), and two-component regulatory
76 systems (TCSs) that sense periplasmic Cu(I), like the CusRS system [1,2,5]. TCSs are widespread
77 in bacteria and play key roles in monitoring and triggering an adaptive response to
78 environmental cues [6–8]. They comprise sensory histidine kinase (HK) proteins and cognate
79 response regulators (RRs) communicating by phosphotransfer. Phosphorylation of RRs often
80 results in modulation of gene expression, as most RRs are transcription factors. The copper
81 resistance of bacterial species is also highly dependent on their genetic diversity. Indeed,
82 additional determinants can be acquired through horizontal gene transfer (HGT), and these
83 acquisitions tend to increase bacterial survival under copper stress [9,10]. For example, the
84 13-gene 37-kb GI-7 islet found in some *Pseudomonas aeruginosa* isolates was found to provide
85 them a copper-resistant phenotype that plays a key role in bacterial colonization and
86 persistence in hospital environments [10,11]. The accessory genes acquired are often
87 associated with metal and/or antibiotic resistance, such as the *pco/sil* genes carried on the
88 widely distributed Tn7-like structures or on the CHASRI (Copper Homeostasis and Silver
89 Resistance Island) [9,10,12–15].

90 The focus of our study, *P. aeruginosa*, is a metabolically versatile Gram-negative
91 bacterium that exhibits high resistance to copper [5]. This opportunistic animal and plant
92 pathogen is ubiquitously present in the environment, in soil and aquatic habitats. It is one of
93 the major causes of nosocomial infections, establishing acute and chronic infections in
94 immunocompromized patients [16,17]. Importantly, the ability of this bacterium to cope with
95 copper stress was shown to be essential for its pathogenicity in a mouse model [18]. Like other
96 bacteria, *P. aeruginosa* uses several strategies and systems to resist copper poisoning and
97 cope with varying concentrations encountered in its environment [5,19]. Expression of the
98 copper-resistance genes is mainly orchestrated by the cytoplasmic CueR regulator and a TCS,
99 CopRS [19,20]. The cytoplasmic Cu(I)-sensing CueR is the “first responder”, triggered after a
100 copper shock, mainly to control genes whose products are involved in cytoplasmic copper
101 tolerance, notably including an RND pump, the cytoplasmic chaperones CopZ1 and CopZ2, and
102 CopA1. When high periplasmic Cu(I)/Cu(II) levels persist, the “second responder” CopR
103 activates genes involved in periplasmic detoxification, such as *pcoAB* and *ptrA* [5]. The
104 physiological importance of CopRS and its targets in terms of bacterial persistence and
105 virulence has been underlined in chronic and acute wound infections [21]. Recently, the TCS
106 DbsRS was shown to be an additional contributor to the copper response and to copper
107 resistance [22]. CopRS responds only to copper, whereas DbsRS also responds to silver,
108 upregulating the expression of genes involved in protein disulfide bond formation, among
109 others. Interestingly, DbsRS requires more than 4-fold higher levels of copper for activation
110 compared to the other two regulatory TCSs [22]. A short pulse of high copper causes a general
111 stress response in addition to specific copper responses [20]. This general response is probably
112 due to the generation of reactive oxygen species. In contrast, when bacteria grow in a high-
113 copper medium, passive transport functions are downregulated to reduce membrane

114 permeability. Nevertheless, both acute and chronic high-copper conditions trigger the
115 synthesis of targets such as the tripartite RND pump CzcCBA, copper-related proteins PcoAB
116 and P-type ATPase CopA1, MexPQ-OpmE, and the three TCSs – CopRS, DbsRS, and CzcRS [20].
117 The urinary isolate IHMA87 [23], related to *Pseudomonas paraeruginosa* PA7 [24,25],
118 expresses additional, ICE-encoded TCS and copper-resistance proteins. This article reports
119 their molecular and phenotypic characterization.

120 Our results indicated that the accessory TCS is integrated into the core regulatory
121 network for copper homeostasis at *i*) the signal level, by detecting and responding to copper,
122 *ii*) the transcriptional level, as expression of its genes is controlled by several core regulators
123 responding to distinct cues, and *iii*) the molecular level, as we found cross-talk to occur with
124 non-cognate partners. Therefore, regulatory genes that accompany physiologically relevant
125 genes on mobile elements appear as an important part of the bacteria's conserved regulatory
126 network.

127

128 **Results**

129 **CusRS is a copper-responsive and strain-specific TCS**

130 The two divergently transcribed operons (*IHMA87_02165-66* and *IHMA87_02164-57*)
131 present in the urinary isolate IHMA87 are reminiscent of the *copSR-copABGOFCDK* locus
132 identified in the soil-based heavy metal-tolerant β -proteobacterium *Achromobacter* sp. AO22
133 [26] (Fig 1A). These predicted operons are absent from reference strains of *P. aeruginosa*
134 (PAO1, PA14) and from taxonomic outlier PA7, the reference strain of a *P. aeruginosa* clade
135 that has recently been proposed as a new species called *P. paraeruginosa* [25]. The locus is

136 present in a genomic island described hereafter. The regulatory genes *IHMA87_02165-66*
137 encode a putative copper-responsive TCS that shares homology with *P. aeruginosa* CopRS. We
138 named this TCS CusRS due to the strong identity of the predicted proteins with the *E. coli* CusR
139 and CusS (70.7% and 41.5% amino acid identity, respectively). For the *IHMA87_02164-57*
140 genes, we used the “*pcoA2B2GOFCDK*” nomenclature, with “*A2 and B2*” as copies of *pcoA* and
141 *pcoB* genes are already present in the core genome of *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa*
142 (www.pseudomonas.com; [27]). The predicted operon codes for several proteins required for
143 metal detoxification, including the multi-copper oxidase PcoA2, a putative P-type ATPase
144 (PcoF) and copper-binding periplasmic proteins likely to play a role as chaperones (PcoC, PcoG
145 and PcoK).

146 Previous DAPseq experiments showed that, *in vitro*, recombinant CusR mainly binds to
147 the 254-bp intergenic sequence of the *cusR* and *pcoA2* genes of the *IHMA87* genome [28]. The
148 summit of the enriched DAPseq peak pointed to a perfect palindromic sequence
149 “ATTCATnnATGTAAT” found upstream of a putative *cusR* promoter identified by BPROM
150 (www.softberry.com) (Fig 1B). This palindromic sequence has similarities to the CopR
151 consensus sequence in *P. aeruginosa* (CTGACAn₅GTAAT) (PRODORIC, www.prodoric.de). CusR
152 binding to the intergenic sequence was confirmed by Electrophoretic Mobility Shift Assays
153 (EMSA), and its specificity was demonstrated by competition with an unlabeled probe (Fig 1C),
154 suggesting that CusR might regulate its own expression as well as that of the genes transcribed
155 in the opposite orientation.

156 To assess the copper-responsiveness of the two operons and the involvement of the
157 CusRS system in this response, we analyzed the expression of transcriptional *lacZ* reporter
158 fusions with 500-bp sequences upstream of the *cusR* and *pcoA2* coding sequences in the wild-

159 type strain and the *cusR*-deleted mutant. For copper stress conditions, we exposed the
160 bacteria to 0.5 mM CuSO₄ for 2.5 h. This concentration and duration do not affect bacterial
161 viability [19]. Exposure of the wild-type strain to copper led to significant stimulation of
162 expression of both *cusR* and *pcoA2* (Fig 1D,E). In contrast, no induction of *pcoA2* was observed
163 following exposure of the *cusR* mutant to copper (Fig 1E), and activation of the *cusR* promoter,
164 while still detected, was reduced about two-fold (Fig 1D). CusR therefore appears to control
165 expression of both operons in a copper-dependent manner, but *cusR* expression must also be
166 controlled by another copper-responsive regulatory factor.

167 To assess the importance of promoter elements, we constructed and analyzed a set of
168 *lacZ* fusions associated with *cusR* upstream sequences of various lengths. Deletions affecting
169 the palindromic sequence identified or the predicted -10/-35 boxes abolished expression,
170 whereas a short fragment containing the palindrome maintained a copper response, but
171 reduced both basal and activated expression levels (Fig 1D). Interestingly, mutation of a 4-bp
172 sequence within the palindrome (ATTACATnnATAGCCT) led to complete loss of the copper-
173 responsiveness of the promoter. When examining the *pcoA2* promoter region (Fig 1E),
174 shortening the sequence reduced the fold-change in expression following exposure to copper,
175 whereas mutations in the palindrome led to the complete loss of copper-mediated *PpcoA2*
176 activation. As expression of the *pcoA2* promoter is CusR-dependent, we concluded that CusR
177 controls *pcoA2* expression by binding to the palindromic sequence identified.

178 To assess the extent of the *pco* operon, the mRNA levels of several genes within the
179 locus (*pcoB2*, *pcoF*, and *pcoK*) and that of a downstream gene encoding a putative LysR-type
180 transcription factor were measured by RTqPCR. Transcription was increased for all targets
181 following copper stimulation, although the level of induction measured decreased with the

182 distance between the gene and the *pcoA2* promoter (S1 Fig). In all cases, interruption of *pcoA2*
183 transcription by introducing an omega interposon abolished the copper-inducing effect down
184 to *lysR*, indicating that the last gene in the locus, *lysR*, is part of the same transcriptional unit.

185 Overall, these data show that the CusRS system in IHMA87 is functional and responds
186 to copper. Following binding to a single site, CusR regulates its own expression and controls
187 the expression of the nine-gene “*pcoA2*” operon, which contains genes that may play a role
188 in copper resistance.

189 **CusR and the *pcoA2* operon contribute to copper resistance**

190 Copper concentrations in urine are known to increase during UTIs, as part of an innate
191 antimicrobial strategy [3,29]. Given the origin of IHMA87, we first questioned whether it had
192 higher copper resistance compared to three reference strains. For these reference strains, we
193 found *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 to be more sensitive to 20 mM CuSO₄ than the *P.*
194 *paraeruginosa* strain PA7 (S2 Fig). In these tests, IHMA87 had the highest resistance capacity,
195 which could be provided by the additional, putative copper-resistance machinery, Pco,
196 acquired through HGT. To verify whether this was a common feature of UTI isolates, we also
197 studied two others – JT87 and TA19, which like IHMA87 are members of the PA7-like group.
198 These other strains showed variable resistance profiles, with TA19 being the most sensitive of
199 all the strains tested. Thus, high copper resistance does not appear to be a common feature
200 of UTI isolates.

201 Therefore, we investigated the role of the CusRS system and the *pcoA2* operon-
202 encoded proteins in the high copper resistance of IHMA87. First, CusR was compared to the
203 two well-described copper regulators, CopR and CueR. To do so, survival of individual, double,
204 and triple mutants was analyzed on minimal medium in the presence of high copper

205 concentrations (5 mM or 20 mM) and compared to that of the wild-type IHMA87 strain. As
206 shown in Fig 2A, mutation of the *cueR* gene did not affect copper resistance whatever the
207 genetic background, whereas the absence of CopR considerably reduced survival of the
208 bacteria, revealing a key role of CopR and its regulon in the response to copper stress. When
209 CopR was absent, the additional loss of CusR made the bacteria highly sensitive to copper
210 toxicity. This sensitivity was observable at 5 mM CuSO₄ and accentuated at the higher
211 concentration (Fig 2A). To determine whether this phenotype was caused by the absence of
212 the CusR regulator *per se*, by the lack of *pcoA2-lysR* expression, or by a combined effect, we
213 introduced in several mutants an omega interposon into the *pcoA2* gene, stopping
214 transcription of the operon from the first gene. This interposon strongly affected the copper
215 resistance of the $\Delta copR$ *pcoA2::Ω* strain compared to that of the $\Delta copR$ mutant, with an effect
216 observable from 5 mM CuSO₄ (Fig 2B). Thus, the proteins encoded by the CusR-regulated
217 *pcoA2* operon are involved in copper detoxification and resistance.

218 We further investigated the contribution to copper resistance of the different copper
219 regulatory systems and the proteins encoded by the *pcoA2* operon. To do so, we followed the
220 growth of appropriate mutant strains in lysogeny broth (LB) and compared it to IHMA87 wild-
221 type growth. Firstly, increasing the copper concentration from 1 to 4 mM led to an extended
222 lag phase for wild-type growth (S3A Fig). Significant cell death has been reported in the
223 bacterial population after exposure to this high copper concentration for 2 h [19]. As the lag
224 phase is a dynamic and adaptive period preparing bacteria for cell division, its extension
225 indicated that more time is required both to repair altered cells and for physiological
226 recuperation by stressed cells before exponential growth can occur [30,31]. Secondly, we
227 observed that *cueR* and *copR* mutant growth was even more dramatically affected than wild-
228 type growth in the presence of 4 mM CuSO₄. For these strains, especially $\Delta copR$, the lag phase

229 was considerably extended (S3A Fig). This increased delay before division indicated that the
230 copper-resistance mechanisms controlled by the two regulators are important for survival in
231 and adaptation to the stress. Interestingly, growth of $\Delta cusR$ and $pcoA2::\Omega$ mutants was
232 unaffected, and was similar to IHMA87 growth, indicating that these mutations had no effect
233 on the copper resistance. In contrast, the lack of both CopR and Pco proteins completely
234 abolished bacterial growth (S2A Fig). This result further underlined the important role in
235 bacterial copper resistance played by the proteins encoded by the *pcoA2* operon. In the
236 conditions used here, this role can be masked by proteins from the CopR regulon. Finally, we
237 introduced an arabinose-inducible promoter (*PBAD*) into the chromosome, upstream of the
238 *pcoA2* operon, and compared bacterial growth of the wild-type and modified strains over a
239 range of copper concentrations. Increased expression of the operon conferred a clear growth
240 advantage relative to wild-type bacteria, allowing faster adaptation to exposure to 5 mM
241 $CuSO_4$, as indicated by the shorter lag phase (S3B Fig).

242 In conclusion, IHMA87 has a high intrinsic capacity to resist copper stress that can be
243 further increased by overexpressing the *pcoA2* operon.

244 **Three TCSs cross-regulate the *cusR-pcoA2* intergenic region**

245 As shown in Fig 1D, copper activates *cusR* expression even in the absence of CusR. As
246 CopR binds *in vitro* to the *cusR-pcoA2* intergenic region [28], we assessed its role as well as
247 that of the copper-responsive regulator CueR in the residual activity of *PcusR* and that of the
248 divergent promoter. To do so, we used transcriptional *lacZ* fusions in several genetic
249 backgrounds lacking one, two, or all three regulators. We found that CueR was dispensable in
250 all the conditions tested (Fig 3A, B). However, induction of *cusRS* expression was reduced in
251 the absence of CopR compared to the wild-type background, and was lost in the $\Delta cusR\Delta copR$

252 mutant. This result confirmed CopR as the additional element responsible for the complete
253 copper induction of *cusRS* in combination with CusR. Activation of the *cusRS* promoter by both
254 CusR and CopR was abrogated by mutating the palindrome (Fig 1D), demonstrating that the
255 same intergenic binding site is required *in vivo* for activation by both regulators.

256 For the expression of the *pcoA2* operon, as mentioned above, no copper induction was
257 observed in the $\Delta cusR$ strain (Fig 1E, 3B). Interestingly, *pcoA2* expression was higher in $\Delta copR$
258 than in the parental strain upon exposure to copper, suggesting a negative regulatory role of
259 CopR. In contrast, expression of *pcoA2* genes was abolished in the $\Delta cusR\Delta copR$ strain,
260 indicating that the increased activation observed in the presence of copper in $\Delta copR$ was the
261 result of CusR activity (Fig 3B). This observation showed that CopR binding does not lead to
262 transcriptional activation of the *pcoA2* promoter and, by competing for binding on the same
263 palindrome, CopR limits access for CusR, therefore reducing *pcoA2* activation.

264 To further explore cross-regulation between the different pathways, we tested
265 whether CusR affects the expression of *copA1* and *pcoA*, which are respectively regulated by
266 CueR and CopR [19]. Expression of the *copA1* promoter was abolished in the absence of CueR,
267 but was unaffected by deletion of either *cusR* or *copR* (Fig 3C) as expected based on *in vitro*
268 binding data [28]. *pcoA* expression had almost the opposite profile, with no effect observed
269 following *cueR* deletion, but a complete lack of copper-induced expression in the *copR* mutant
270 and a slight reduction in the copper-responsiveness in the *cusR* mutant (Fig 3D). This latter
271 result was unexpected as *in vitro* results indicate that CusR does not bind to this promoter
272 [28]. Suspecting an indirect effect, we measured expression of *PpcoA-lacZ* and *PpcoA2-lacZ*
273 fusions in the *pcoA2::Ω* strain. Levels of both transcriptional fusions were decreased in the
274 presence of copper compared to levels in the wild-type strain, whereas the level of CueR-

275 regulated *copA* expression was similar for the two strains (Fig 3E). Based on these
276 observations, the proteins encoded by the *pcoA2* operon may be required for the CopRS and
277 CusRS systems to fully develop their copper-dependent activity. The effect is probably due to
278 altered copper compartmentalization in the bacteria. These data also revealed an additional
279 indirect layer of regulation, since the primary target of CusR, the *pcoA2* operon, seems
280 important for both TCSs to mount a copper response.

281 Mining and reanalyzing the DAPseq data [28] indicated that three other RRs strongly
282 targeted the *pcoA2-cusR* intergenic sequence centered at the same position (S4A Fig). These
283 RRs are the two poorly characterized regulators IrlR and MmnR, and the well-known zinc-
284 responsive protein CzcR that binds to the sequence “GAAACn₆GTAAT” [32]. Additional target
285 genes were found to be shared by CopR, CusR and CzcR (S4B,C Fig), presumably due to the
286 extensive similarity of their consensus sequences, especially the second half-site “GTAAT”.
287 Therefore, we analyzed the roles of these additional RRs on the expression of both the *cusRS*
288 and *pcoA2* operons.

289 The TCS CzcRS is known to respond to several signals, including zinc stress [33]. We
290 therefore assessed its effect on *pcoA2* and *cusRS* expression in the presence of copper and/or
291 zinc. As a control of CzcR activity, we introduced a *PczcC-lacZ* fusion into the wild-type and
292 $\Delta czcR$ strains, as a known CzcR target. Fig 4 shows that, as expected, the *czcC* promoter was
293 upregulated after the addition of zinc, with or without the addition of copper, and that this
294 upregulation was CzcR-dependent. Furthermore, the expression of *pcoA2* was activated by
295 zinc to almost the same level as by copper. Exposure to both stimuli was slightly, but
296 significantly, more efficient. Zinc activation was lost in the absence of CzcR, and the *pcoA2*
297 expression level dropped to that observed in the wild-type in the presence of copper alone

298 (Fig 4). Therefore, both CusR and CzcR control and activate expression of the *pcoA2* operon to
299 similar extents. A distinct expression profile was observed for the *cusR* promoter: while copper
300 strongly activated its expression, the induction following exposure to zinc was lower. In
301 addition, zinc bypassed the copper effect when bacteria were simultaneously exposed to both
302 metals. In the absence of CzcR, this “restraining” effect was lost, and the high-copper-
303 inducible effect was restored, suggesting that CzcR must conceal the CusR binding site.

304 We then assessed a potential regulatory role of MmnR and IrlR and observed no
305 *mmnR* or *irlR* deletion phenotypes in terms of *pcoA2* operon and *cusR* expression, even in the
306 presence of copper (S6 Fig). However, we cannot exclude that this was due to an absence of
307 signal and activation of the sensor in our experimental conditions.

308 Overall, the data indicate that *cusRS* and *pcoA2* operons are controlled *in vivo* by at
309 least three TCSs: CusRS, CopRS, and CzcRS. The three RRs bind to the same palindromic site
310 but modulate expression of the divergent operons differently. Indeed, while CusR and CzcR
311 activate both operons, even if the latter is less effective on the *pcoA2* promoter, CopR only
312 activates *cusRS*, repressing the *pcoA2* operon by hindering the positive action of CusR (S7 Fig).

313 **Molecular cross-talk between the CopRS and CusRS systems**

314 The *P. aeruginosa* CopRS system works in an unusual way [34]. Instead of relying on a
315 conventional “phosphorylation-based mechanism” where the sensor allows the
316 phosphorylation of the response regulator upon detecting a signal, CopS displays phosphatase
317 activity toward CopR. Exposure to copper thus relieves the inhibition by allowing CopR to
318 activate its target genes. The mechanism leading to phosphorylation of CopR remains
319 unidentified. We confirmed the “phosphatase-based mechanism” of the CopRS system in the
320 *P. paraaeruginosa* strain IHMA87, as demonstrated in Fig 5A. Indeed, in a *cusRS* background,

321 the absence of CopS led to a high-copper-blind expression of *pcoA*, whereas constitutive
322 phosphatase activity of the sensor CopS_{His235A} mutation abolished *pcoA* expression. The same
323 pattern was observed for *cusR* expression (Fig 5A). This result also confirmed that CopR can
324 activate expression of this promoter in a $\Delta cusRS$ background, as previously suggested by the
325 data presented in Fig 3A.

326 We then analyzed the functioning of the CusRS system in a genetic background lacking
327 the CopR and CopS proteins to avoid any protein interference. As shown in Fig 5B, neither
328 *pcoA2* nor *cusRS* operons were activated in the strain lacking the sensor protein CusS. This
329 result indicates both that this HK is required for CusR activation by phosphorylation, and that
330 no other protein can phosphorylate CusR. We also confirmed that the phosphorylated form
331 of CusR is the active form, because no gene expression was observed when its conserved
332 phosphorylation site (Asp₅₄) was mutated to an alanine (Fig 5B). In addition, mutation of the
333 autophosphorylation site of CusS (His₂₆₆) abolished the expression of the two operons,
334 indicating that it is required for the system to function properly (autophosphorylation prior to
335 phosphotransfer). Altogether, these data show that the CusRS system is a canonical TCS,
336 functioning like the *E. coli* CusRS system, with the detection of a signal triggering a
337 phosphorylation cascade ultimately leading to target gene activation.

338 The two TCSs were then studied in different combinations of mutants of their HK gene
339 to obtain information on possible cross-talk between non-cognate HKs and RRs. The results
340 are summarized schematically in S7 Fig. Focusing on a CopR-only-activated promoter, we
341 found that deletion of *copS* led to an identical copper response pattern of *PpcoA-lacZ*
342 expression to that observed in the wild-type strain or in a strain lacking the *cusS* gene (Fig 5C).
343 However, deletion of both *copS* and *cusS* led to the strong constitutive activation of *PpcoA*

344 (copper-blind expression) that was observed in the $\Delta copS$ mutant in the absence of CusRS (Fig
345 5A). This result indicates that the HK CusS can compensate for an absence of the HK CopS,
346 controlling CopR activity in the absence of the cognate partner. Thus, like CopS, CusS could act
347 as a CopR phosphatase to prevent gene expression in the absence of copper when its cognate
348 partner is absent. Alternatively, interaction between CusS and CopR in the absence of CopS
349 might prevent phosphorylation of CopR in the absence of signal. We further observed that
350 control of CopR by CusS does not require its cognate HK to be absent. Indeed, normal
351 expression of *PpcoA* was observed when the constitutive phosphatase CopS_{H235A} was
352 produced (Fig 5C), indicating that CusS permits CopR phosphorylation following detection of
353 copper.

354 To determine whether CopS could also interact with CusRS, we used *PcusR-lacZ*
355 (Fig 5D) and *PpcoA2-lacZ* (Fig 5E) transcriptional fusions in several mutant genetic
356 backgrounds. As expected, absence of *copS* had little effect on the two promoters: indeed
357 CusS could control the phosphorylation status of CusR and of CopR, as observed above, and
358 both these proteins activated transcription only in response to the copper signal. However,
359 when *cusS* was deleted, in the absence or presence of copper, a slight increase in *PcusR*
360 expression levels was observed (Fig 5D), and the effect on *PpcoA2* expression was even more
361 pronounced (Fig 5E). Transcriptional activation could be attributed to activity of
362 phosphorylated CusR as the signal was lost when CusR_{D51A} was synthesized in the $\Delta cusS$
363 background mutant. Thus, CopS appears to permit CusR phosphorylation in the presence of
364 copper, but also in its absence, and to control its phosphorylation status, although not as
365 tightly as the cognate HK CusS. *PcusR* activation was not observed in the CopS_{H235A} $\Delta cusS$ strain,
366 supporting the need for CopS for phosphorylation of CusR (Fig 5D). Copper-blind expression
367 of both *PcusR* and *PpcoA2* was then observed in the $\Delta cusS\Delta copS$ mutant. As CusR cannot be

368 phosphorylated in bacteria lacking both sensors (CusS and CopS), the *PcusR* expression
369 pattern observed (Fig 5D) can be attributed mainly to dysregulated CopR activity (Fig 5C).
370 However, high levels of unphosphorylated CusR also contributed to these activities as the
371 copper-blind expression of *PcusR* noticed in $CusR_{D514A}\Delta copS\Delta cusS$ was still observed, albeit to
372 a lesser extent (Fig 5D). This unphosphorylated CusR activity was clearly observed on CusR-
373 only-activated *pcoA2* promoter in $\Delta cusS\Delta copS$ that displayed copper-blind expression (Fig 5E):
374 as expected, similar activity levels were then observed when the CusR phosphorylation site is
375 mutated in the double mutant background ($CusR_{D514A}\Delta copS\Delta cusS$) (Fig 5E). Furthermore,
376 *PpcoA2* expression levels were lower in $\Delta cusS\Delta copS$ compared to in $\Delta cusS$, which underscores
377 the negative effect of phosphorylated CopR binding to the promoter (Fig 5E). In the
378 $CopS_{H235A}\Delta cusS$ background, the *pcoA2* promoter was not expressed, as no CusR is synthesized
379 (Fig 5D).

380 Finally, we wondered whether the CopRS and CusRS systems respond to and modulate
381 their regulon within the same range of copper concentrations. We compared their individual
382 sensitivities to copper and their sensitivity relative to that of the cytoplasmic detector CueR.
383 To do so, we used *lacZ* fusions to monitor the expression of a specific target of each
384 transcriptional regulator over time in response to different copper levels. We found CopRS
385 and CusRS to display a similar sensitivity and response to copper, inducing their target in the
386 presence of 0.5 mM $CuSO_4$. In contrast, CueR activates its target at lower copper
387 concentrations (from 0.01 mM) (S8 Fig).

388 To conclude on cross-talk, not only do the CopRS and CusRS systems share similar DNA-
389 binding sites and a target sequence, their HK can compensate for each other, with higher
390 efficiency observed for CusS.

391 **Horizontal acquisition of the *cusRS* and *pcoA2* operons**

392 As mentioned above, the reference *P. paraeruginosa* strain PA7 lacks the *cusRS* and *pcoA2*
393 operons. Analysis of the genomic environment surrounding this copper-related locus showed
394 that it is present on a genomic island that presents the features of an Integrative and
395 Conjugative Element (ICE) (Fig 6A). ICEs are large mobile genetic elements that are crucial for
396 the genetic plasticity of bacteria [35,36]. Consequently, the copper-related locus was probably
397 acquired by HGT. We named this island ICE1_IHMA, and it is one of three predicted ICEs in the
398 IHMA87 genome. It is 96,269 bp long, inserted at a tRNA-Gly site, and has an average GC
399 content of 64%. Among the 100 predicted coding sequences present on ICE1_IHMA, some
400 correspond to core ICE genes, required for the element's life cycle. These include signature
401 genes coding for an integrase of phage origin (*int*) and a MOB(H)-type relaxase [37]. In
402 addition, the element possesses a set of mating-pore formation (MPF) genes encoding a T4SS
403 (*tfc* genes) including an ATPase (*tfc16/virB4*) and a Type IV coupling protein (*tfc6/t4cp2*).
404 Among the eight types of MPF system – classed based on diverse features – ICE1_IHMA is a
405 type G (MPF_G). These systems are frequently found in Proteobacteria [38]. ICEs also carry
406 specific cargo genes, which usually provide the host with benefits and diverse phenotypic
407 properties [35]. Based on sequence homology and the organization of its core genes,
408 ICE1_IHMA is highly similar to PAGI-2, a prevalent *clc*-like family ICE in *P. aeruginosa* [16] (Fig
409 6A). By comparison with PAGI-2, we defined two specific cargo modules in ICE1_IHMA, named
410 A and B. Module A comprises four genes, of which three (*IHMA87_02154-52*) are predicted to
411 encode a CzcCBA-type heavy metal RND efflux pump. To assess whether this pump could be
412 involved in copper efflux, we deleted *IHMA87_02154-52*. No effect was observed in terms of
413 survival of the mutant obtained upon exposure to a high copper concentration (S2 Fig). In line

414 with this result, the promoter region of *IHMA87_02154-52* was not targeted *in vitro* by CusR
415 or CopR [28]. The other module, Module B is composed of 21 cargo genes, among them the
416 *cusRS* and *pcoA2* operons, but also several genes predicted to be involved in resistance to
417 chromate and arsenic compounds. Copper, arsenic, and chromium resistance genes
418 frequently co-occur in mobile genetic elements, favoring the spread of both metal resistance
419 genes and antibiotic resistance. The spread of such resistance is of concern because co-
420 selection promotes the acquisition of antibiotic resistance [10,39]. Although the gene
421 encoding the LysR-type regulator is present on PAGI-2, it was considered to be part of Module
422 B, since we demonstrated that it was part of the *pcoA2* operon.

423 As ICEs are modular and cargo genes can be exchanged, we assessed how the two cargo
424 modules are distributed in bacterial genomes by performing blast searches against the NCBI
425 database (Fig 6B). Modules A and B from ICE1_IHMA are both present in several bacteria from
426 various genera. The most frequently represented genus was *Pseudomonas*, and the
427 corresponding predominant species are *aeruginosa* and *paraeruginosa*. The two modules
428 were also identified in other genera with distinct distributions, for example in a few
429 *Achromobacter* and *Stenotrophomonas* genomes, whereas only Module A was identified in
430 some *Comamonas* genomes. Interestingly, if the *lysR* gene located at the 3' extremity of the
431 *pcoA2* operon is excluded from the search for Module B, identical results were obtained. This
432 further emphasizes its co-occurrence with the *cusRS* and *pcoA2* operons, and suggests a
433 possible role in their regulation.

434 We next focused our analysis on the distribution of the region from *lysR* to *cusS*, which
435 comprises the entire sequence of the two operons (Fig 6B). Initially, the search provided more
436 hits than obtained for searches with the whole of Module B, suggesting that this region can
437 be acquired or maintained independently of the rest of the module. The genera harboring the

438 locus were similar to those with the module B, but the distribution varied with a higher ratio
439 of *Pseudomonas*. Among species, the region was mostly represented in *P. aeruginosa* and
440 *P. paraeruginosa*, with only two strains of *Pseudomonas* not belonging to these species. We
441 then examined the distribution and conservation of the *lysR-cusS* region over a database of
442 494 complete *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* genomes. The clades were named based on
443 the approach described by Freschi *et al.* [40] from 1 to 5, and, as proposed by Rudra *et al.* [25],
444 outlier group 3 was (re)classified as *P. paraeruginosa* (*P.p*). Bioinformatics analysis revealed
445 the locus to be present in several strains of *P. aeruginosa* clades 1 and 2, and (as expected) in
446 the IHMA87 strain, which is classed in clade 3 (Fig 6C). The locus was not detected in the few
447 clade 4 and 5 strains for which genomes are available (www.pseudomonas.com; [27]). The
448 locus was present as part of a putative ICE in over 80% of genomes. In the remaining 20% of
449 genomes, it was part of regions bearing some similarity to an ICE, as determined based on
450 neighboring genes and their predicted functions. The reason these regions were not
451 immediately predicted to be ICEs can be attributed either to ICE degeneracy, or to a detection
452 failure. In all the loci identified, the motif recognized by CusR in the *pcoA2-cusRS* intergenic
453 sequence was conserved, indicating that the copper-resistance genes can be integrated into
454 the bacterial regulatory network, allowing them to be readily expressed in their host under
455 appropriate conditions.

456 Taken together, these data show that the *lysR-cusS* locus involved in copper resistance
457 is mainly found in the *Pseudomonas* genus where it can be acquired by HGT as part of an ICE.
458 As demonstrated by our research, the integration of this locus into the regulatory network
459 involves cross-regulation and cross-talk with endogenous regulatory actors. These constraints
460 must limit the acquisition of the locus by other genera.

461 Discussion

462 In this study, we examined the integration of an acquired copper-resistance locus into
463 a housekeeping system, both at the level of regulatory pathways and in terms of the
464 protection it affords against toxic copper concentrations. The ICE-encoded copper-responsive
465 TCS CusRS was shown to control expression of its own gene and a divergently transcribed nine-
466 gene operon, *pcoA2B2GOFCDK-lysR*. The copper-related elements described here were
467 initially acquired by HGT, and are not the only example of accessory copper genes found in *P.*
468 *aeruginosa* species [11]. In bacteria, acquired systems can be even more efficient in coping
469 with copper stress than the core mechanisms, as observed for the *copXL* locus in
470 *Staphylococcus aureus* [41]. Although capable of conferring bacterial copper resistance, the
471 results presented here showed that the positive effects of the *P. paraaeruginosa* Pco proteins
472 are masked by those of the core copper homeostasis proteins, controlled by the CopRS system
473 [19]. However, mutation of the *pcoA2* operon reduced the metal response of both the CopRS
474 and the CusRS regulatory systems (Fig 2B): this indicates that Pco proteins also play a role in
475 maintaining copper compartmentalization that affects signal detection by both acquired and
476 conserved sensory HKs. Our results showed that the *pcoA2* operon contributes to overall
477 copper homeostasis as it is under the control of the main core TCS CopRS. The control of
478 accessory genes by housekeeping TCSs has previously been documented for copper
479 homeostasis regulation. For example, in *E. coli*, although chromosome-encoded CusRS and
480 plasmid-borne PcoRS systems are independent TCSs, CusR activates expression of the
481 plasmid-encoded *pcoE* gene [42]. Similarly, in emerging pathogenic *S. aureus* strains, the core-
482 encoded regulator CsoR controls expression of genes present in several mobile elements,
483 conferring a phenotype that is hyper tolerant to copper [41,43]. In the *P. paraaeruginosa* strain

484 studied here, we found CopR to downregulate expression of the *pcoA2* operon, probably by
485 competing with CusR for DNA binding (Fig 3B). This finding was unexpected as the *pcoA2*
486 operon does not appear to be a poisoned gift, given that it can improve the bacteria's
487 resistance to copper stress when artificially overexpressed.

488 Although the homologous CopRS and CusRS systems respond to the same molecule
489 over the same concentration range, their downstream signaling mechanisms differ. The HKs
490 are often bifunctional enzymes with both phosphatase and autokinase activities, differentially
491 triggered depending on the signal detection [44]. We confirmed that the CopRS system relies
492 on a "phosphatase mechanism" in *P. paraeruginosa* like that observed in *P. aeruginosa* [34],
493 where CopS dephosphorylates CopR. The copper signal shuts down the phosphatase activity
494 of CopS and, consequently, CopR becomes active, triggering gene expression. With this *modus*
495 *operandi*, absence of HK leads to a copper-blind activation of the CopR regulon [34]. In the
496 strain studied here, the CusRS system acted like a canonical TCS, functioning more like the
497 recently discovered copper-responsive DbsRS TCS in *P. aeruginosa* [22]. DsbS can
498 dephosphorylate its partner DsbR and, upon direct binding of copper, it can
499 autophosphorylate. The phosphate is subsequently transferred to DsbR, which in turn
500 activates target genes, notably those responsible for copper resistance [22]. Although no CusR
501 dephosphorylation was observed, the data indicated that CusS HK could dephosphorylate the
502 non-cognate CopR in the absence of CopS.

503 The *P. paraeruginosa* IHMA87 proteins CusR and CusS share 70.7% and 41.5%
504 sequence identity, respectively, with their *E. coli* homologs [27]. In addition, both CusR
505 regulators have a perfectly palindromic DNA-binding site and a very restrictive regulon [42].
506 Only one significant target sequence was identified for IHMA87 CusR by DAPseq [28]. This

507 sequence is the palindrome “ATTCATnnATGTAAT”, located in the intergenic sequence *pcoA2-*
508 *cusR*. It is perfectly conserved in the equivalent locus in *Achromobacter* sp. AO22 [26]. *E. coli*
509 CusR preferentially binds to the palindrome “AAAATGACAAnnTTGTCATTTT” [42], located
510 between the two divergent operons *cusRS* and *cusC(F)BA*. Although no other chromosomal
511 binding site could be identified [45], *E. coli* CusR also directly controls expression of the
512 plasmid-borne gene *pcoE*, which has palindromic sequence (TGACAAnnTTGTCAT) in its
513 promoter. Another feature of the *E. coli* CusRS system is its ability to confer resistance to silver
514 toxicity. Thus, the HK CusS was shown to bind to both copper and silver [46,47]. As observed
515 for chromosomally-encoded CusRS and plasmid-encoded PcoRS systems in *E. coli* [42], CopRS
516 and CusRS are independent systems. However, in addition to the known cross-regulation (at
517 the level of both gene target and signal) [44], we demonstrated *in vivo* molecular
518 communication between the unrelated HK-RR pairs. Variable levels of cross-talk within TCS
519 signaling pathways have also been reported in other bacteria, ranging from absent (or not
520 observed) to highly represented as in the case of *Mycobacterium tuberculosis* [48,49]. As TCSs
521 often arose during evolution through gene duplication, the high levels of sequence identity
522 shared by the paralogs may favor interactions. However, distinct mechanisms normally evolve
523 rapidly after duplication to insulate the systems, preventing inappropriate interactions and
524 favoring the specificity of the molecular interactions within each system. Although generally
525 considered to be a disadvantage for the bacteria, as it decreases the specific response and
526 may trigger inappropriate responses, cross-talk can also be beneficial. Indeed, it can provide
527 some evolutionary benefits, such as complex signal-processing mechanisms or priming to
528 respond to future stimuli [44,49,50]. In the IHMA87 strain, our results indicate that CusS could
529 compensate for the absence of CopS by maintaining the relevant CopR phosphorylation status
530 thanks to its copper-responsive function. CusS could also control CopR activity in the presence

531 of the constitutive phosphatase CopS_{H235A} (Fig 5C). The reciprocal reaction was less efficient,
532 as CopS was only partially capable of replacing CusS in its interaction with CusR. Whether the
533 system also controls CusR phosphorylation is less clear, as this reaction requires a
534 phosphotransfer step not reported for the CopS-CopR pair. In addition, results were blurred
535 by cross-regulation exerted by the two TCSs on target genes (Fig 5D,E). We nevertheless
536 produced schematic models that fitted the *in vivo* results indicating the cross-talk between
537 CusRS and CopRS (S7 Fig). These models will need to be consolidated by further experiments,
538 in particular to determine the extent of the protein interactions and the HK activities toward
539 the cognate/non-cognate RRs.

540 The *in vivo* cross-talk detected between the CusRS and CopRS systems in
541 *P. paraeruginosa* was unexpected. First, CopRS is encoded by the core genome of the
542 bacterium whereas CusRS is coded by genes present in the HGT-acquired ICE. Second, while
543 the RRs of the two systems share 69% sequence identity, the HKs CopS and CusS only share
544 36.4% identity. These two HKs also act differently on their cognate RRs. Third, cross-talk
545 usually involves the absence of both the reciprocal RR and the cognate HK of two distinct TCSs,
546 as observed for CpxA–CpxR and EnvZ–OmpR in *E. coli* and mentioned for cross-talk from CusS
547 to OmpR and CpxR [44,50]. The reason is that the RRs usually compete with other RRs for
548 interaction with their cognate partner(s) to prevent misregulation. However, here, in the
549 absence of CopS, CusS controlled the activity of CusR and CopR normally. Moreover, it did so
550 even in the presence of the constitutive phosphatase CopS_{H235A}. Although it originated from a
551 lateral transfer, our bioinformatics analyses revealed that the locus is mainly present in
552 *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* strains, where the genes are probably readily expressed.
553 The expression advantage of copper resistance on bacterial fitness might explain this
554 distribution. In addition, the cross-regulation and cross-talk with endogenous regulatory TCSs

555 may be required for appropriate integration of the locus, making it possible to tightly control
556 expression without creating a burden. This would naturally limit spread of this ICE to other
557 species.

558 Despite having been acquired by HGT, we also observed that the *cusRS-pcoA2* locus
559 was a site of fierce competition for regulation, completely integrated into the conserved TCS
560 regulatory network. Indeed, four core genome-encoded RRs – IrlR, MmnR, CzcR and CopR – in
561 addition to the accessory CusR can bind the *cusRS-pcoA2* intergenic region *in vitro* [28]. All
562 these RRs belong to the OmpR family with winged-HTH effector domains. The corresponding
563 genes are organized in a two-gene operon with downstream, overlapping genes encoding the
564 cognate HK (www.pseudomonas.com; [27]). Phylogenetic analysis clustered them together,
565 inferring that they emerged by RR-HK pair duplication [51]. A genome-wide binding assay
566 revealed these closely related regulators to share similar DNA-binding motifs, and extensively
567 overlapping gene targets (Fig S4) [28]. The physiological relevance of IrlR and MmnR binding
568 could not be assessed here, as the signals detected by their cognate HK are as yet unknown.
569 Although the *mmnRS* locus was reported to be upregulated in response to copper shock [52],
570 we observed no effect of *mmnR* inactivation on the expression of *cusRS* and *pcoA2* in the
571 presence of copper (S5 Fig).

572 Even if the five RRs bind to similar targets *in vitro*, their physiological role is more
573 delimited, as CopR, CusR and CzcR are known to have their own regulon with only a few shared
574 and cross-regulated targets. Similarly, in *Pseudomonas stutzeri*, comparison of the *in vitro*
575 binding sites and regulons of CzcR and the paralogs CopR1/CopR2 revealed limited target
576 sharing and cross-regulation [53]. In addition, their binding was shown to induce either
577 activation or repression with response amplitudes varying depending on the promoter bound

578 [53]. Along the same lines, while CusR, CopR and CzcR could bind to the same DNA region, we
579 observed that their effects on the expression of *cusRS-pcoA2* ranged from activation (to
580 various extents) to no activation at all (illustrated in S6 Fig). The molecular dynamics of the
581 TCSs, signal perception by HKs, and phosphorylated RR levels are among other important *in*
582 *vivo* parameters that will need to be investigated. Nevertheless, based on the results
583 presented here, these variable outcomes may also be due to differences in RR-DNA and/or
584 RR-RNA polymerase interaction, as demonstrated for the *E. coli* paralogs KdpR and OmpR [54].
585 Indeed, a new set of target genes for duplicated RRs can evolve through changes in the DNA-
586 binding sites recognized and their capacity to interact with the RNA polymerase [55].
587 However, sometimes the second mechanism is not without consequences, as shown here,
588 where CopR not only fails to activate *pcoA2* promoter expression, but actually inhibits it by
589 competing with CusR for binding. Furthermore, as proposed for CopRS and CzcRS in *P. stutzeri*
590 [53], we cannot exclude the possibility that cross-talk between these two homologous TCSs
591 exists, adding a level of complexity to the regulatory networks. Overall, our findings
592 emphasized that the effects of a regulator binding to a promoter cannot always be predicted
593 and must be determined on a case-by-case basis.

594 This study also illustrated the connection between zinc and copper homeostasis, with
595 cross-regulation observed with CzcR, CopR and CusR. The two metals play a major role in host-
596 pathogen interactions and, during infection, higher copper and zinc concentrations can be
597 encountered by bacteria under the same physiological conditions. For example, in
598 phagolysosomes [56], these two metal ions contribute to bacterial killing. Synergized
599 responses to the two elements relying on cross-regulation have been described in *P.*
600 *aeruginosa* [57,58]. For instance, high copper concentrations lead to both increased zinc and
601 copper resistance, and overproduced CopR can activate expression of *czcRS*, which in turn

602 activates CzcCAB synthesis [57]. The regulator CzcR also controls the expression of the CopR-
603 regulated *ptrA-czcE-queF* operon [33,58]. In a previous study, we found that PtrA is a
604 periplasmic protein involved in copper tolerance [59]. In addition, CzcE was recently found to
605 be a novel element required for zinc resistance [33]. Therefore, this operon harbors genes
606 involved in tolerance to both metals. The data presented here further demonstrated that CzcR
607 activates expression of the *pcoA2* operon, which is integrated in the RR regulon. As CzcRS is
608 known to respond to cadmium in addition to zinc [33], this broadens the range of signals
609 capable of triggering expression of the *pcoA2* and *cusRS* operons.

610 In conclusion, some *P. aeruginosa* strains harbor ICE carrying genes for copper
611 resistance, as well as cognate regulatory elements that are completely integrated into the
612 bacterial regulatory network. Synthesis of this accessory copper system is tightly controlled in
613 the intergenic regulatory region, which is a hot spot for binding of five RRs. The RRs compete
614 for DNA binding and their docking stimulates or silences gene expression. The reason for the
615 negative effect exerted by the regulator CopR is not known, but expression of the *pcoA2*
616 operon can be modulated by signals other than copper. Therefore, the accessory copper-
617 resistant mechanisms might be physiologically relevant in (as yet unidentified) conditions
618 encountered in the host or in the environment.

619

620 **Material and Methods**

621 **Bacterial strains and growth conditions**

622 The *E. coli*, *P. aeruginosa* and *P. paraaeruginosa* strains used in this study are described
623 in S1 Table. Bacteria were grown aerobically in LB at 37 °C with agitation. To assess the effect

624 of copper on gene expression, overnight cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in LB
625 supplemented with the indicated CuSO₄ concentrations, and growth was continued until the
626 OD₆₀₀ reached around 1.0 (2.5 h). Growth in 96-well plates at 37 °C with agitation was
627 assessed by following the OD₅₉₅ of 200-μL cultures in LB with the CuSO₄ concentrations
628 indicated. Plates were read by a microplate reader at the indicated times. For copper
629 sensitivity plate assays, 15 g/L agar was added to M9 minimal medium (48 mM Na₂HPO₄,
630 22 mM KH₂PO₄, 9 mM NaCl, 19 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.2% Glucose)
631 supplemented with CuSO₄. When LB cultures reached OD₆₀₀ of 1.0, 10 μL of a 10-fold serial
632 dilution of the cultures were spotted on the M9 media and the plates were incubated for 1 to
633 2 days at 37 °C. Antibiotics were added at the following concentrations (in μg/mL): 200
634 spectinomycin (Sm), 100 ampicillin (Ap), 50 gentamicin (Gm), 10 tetracycline (Tc), and 10
635 chloramphenicol (Cm) for *E. coli*; 75 Gm and 75 Tc in presence of 5 irgasan (Irg) in LB for *P.*
636 *aeruginosa*.

637 **Plasmids and genetic manipulation**

638 The plasmids used and the primers for PCR are listed in S1 and S2 Tables, respectively.
639 All constructions were verified by sequencing.

640 To generate *P. paraaeruginosa* deletion mutants, upstream (sF1/sR1) and downstream
641 (sF2/sR2) flanking regions of the different genes were fused and cloned into an *Sma*I-cut
642 pEXG2 plasmid by sequence- and ligation-independent cloning (SLIC) using the appropriate
643 primer pairs [60].

644 For chromosomal insertion of the *PBAD* upstream *pcoA2* operon, a pEXG2 plasmid was
645 created by SLIC with upstream and downstream sequence of the *pcoA2* promoter sequence,
646 creating a *Spe*I site 52 bp upstream of the start codon. Then, the 1580-bp “*araC-PBAD*”

647 fragment was excised from pSW196 using *Xba*I and cloned into the *Spe*I site created, to
648 produce pEXG2-PBAD-*pcoA2*-Sp.

649 For mutagenesis by insertion of the Ω interposon, the MCS-contained *Bam*HI site was
650 first deleted from pEXG2 (pEXG2 Δ B). Then a *de novo Bam*HI site was created while using SLIC
651 to fuse two fragments of *pcoA2* in *Sma*I-cut pEXG2 Δ B. Finally, the Ω interposon from pHP45 Ω
652 was introduced into *Bam*HI-cut pEXG2 Δ B-IHMA_02164.

653 To replace residue His by Ala in CusS and CopS, we used SLIC to generate a fragment
654 with the mutated codon and create a *Sac*II site to allow subsequent restriction analysis
655 screening of PCR-amplified fragments.

656 To create the transcriptional *lacZ* fusions, the miniCTX-*lacZ* plasmid was first modified
657 to prevent transcriptional interference by integrating the strong *rrnB* terminator sequence
658 into its *Xho*I-*Kpn*I sites, as described in Trouillon *et al.* [61], to produce miniCTX-*TrrnB-lacZ*.
659 Then, fragments comprising the ATG and around 500 bp upstream of each target analyzed
660 were amplified using the appropriate pairs (sF/sR) for insertion into *Sma*I-cut miniCTX-*TrrnB-*
661 *lacZ* by SLIC. To create mutations in the regulator binding sites, another pair of overlapping
662 mutated primers (sR1/sF2) were used to create two overlapping fragments (sF/sR1 et sF2/sR),
663 also inserted into *Sma*I-cut miniCTX-*TrrnB-lacZ* by SLIC.

664 The pEXG2- and miniCTX-*TrrnB-lacZ*-derived vectors were transferred into *P.*
665 *paraeruginosa* IHMA87 strains by triparental mating using the helper plasmid pRK600. Allelic
666 exchanges for mutagenesis were selected as previously described [62]. To create the mutant
667 encoding the CusR_{D51A} protein, the mutated sequence was introduced into the Δ *cusR* mutants
668 to replace the deleted gene.

669 For *E. coli* overproduction of CusR protein with an N-terminal 6xHis-Tag, the *cusR* gene
670 was first amplified by PCR using IHMA87 genomic DNA as template, and SLIC was used to
671 insert the fragment into the pET15b plasmid cut with *NdeI* and *BamHI*.

672 **β -galactosidase activity assay**

673 β -galactosidase activity was assessed at least in triplicate as previously described
674 [63,64], after 2.5 h of growth in the indicated media. On the bar graphs, activities were
675 expressed in Miller Units (MU), and error bars correspond to the standard error of the mean
676 (SEM). When relevant, statistical significance was assessed using ANOVA test with Tukey's
677 method.

678 **Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR)**

679 Extraction of total RNA, cDNA synthesis and qPCR were carried out as previously
680 described [61] with the following modifications: the cDNA was synthesized using 3 μ g of RNA
681 and the SuperScript IV first-strand synthesis system (Invitrogen). For each strain and condition,
682 mRNA expression was measured for three biological replicates. Data were analyzed with the
683 CFX Manager software (Bio-Rad), and expression levels were normalized relative to *rpoD*
684 reference Cq values using the Pfaffl method. The sequences of the primers used can be found
685 in S2 Table. Statistical analyses were carried out with *T*-test.

686 **Production and purification of CusR**

687 His₆CusR (H₆CusR) was produced in *E. coli* BL21 Star (DE3) strains harboring pET15b-
688 CusR, grown in LB at 37 °C. Expression was induced by adding 1 mM isopropyl β -D-1-
689 thiogalactopyranoside when cultures had reached an OD₆₀₀ of 0.6. Cells were grown for a
690 further 2 h at 37 °C and 150 rpm, and then harvested by centrifugation. They were

691 resuspended in 20 mL of IMAC buffer (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8) containing 10 mM
692 Imidazole and supplemented with Protease Inhibitor Mixture (Complete, Roche Applied
693 Science) for lysis at 4 °C by sonication. After centrifugation at 200,000 × g for 30 min at 4 °C,
694 the soluble fraction was loaded onto a 1-mL anion exchange column (HiTrap 1 mL HP, GE
695 Healthcare) and purified on an Akta purifier system. The protein was eluted by applying a 30-
696 mL gradient ranging from 10 to 200 mM Imidazole in IMAC buffer at a flow rate of 1 mL/min.
697 Eluted protein was diluted 1:20 in Tris-NaCl buffer (50 mM Tris- HCl, 150 mM NaCl, pH 8) for
698 conservation before use.

699 **Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)**

700 Probes were generated by annealing complementary primer pairs, one of which was
701 Cy5-labeled, to form the fluorescent probe. 0.5 nM of the resulting 60-bp DNA fragments were
702 incubated for 15 min at 25 °C in EMSA Buffer (20 mM HEPES, 80 mM KCl, 20 mM MgCl₂,
703 0.8 mM EDTA, glycerol 7.5%, 0.1 mM dithiothreitol, pH 7.9). For competition assays,
704 unlabeled DNA probes were added to the reaction at either 0.5 nM (equal amount) or 200 nM
705 (400-fold excess). The proteins were then added at the indicated concentrations in a final
706 reaction volume of 20 μL and incubated for a further 20 min at 25 °C. Samples were then
707 loaded onto a native 5% Tris-Borate-EDTA (TBE) polyacrylamide gel and run at 100 V and 4 °C
708 in cold 0.5X TBE Buffer. Fluorescence imaging was performed using an ImageQuant 800
709 imager.

710 **Bioinformatics analyses**

711 ICEs were identified and delineated using the web-based tool ICEfinder [65]. ICEs were
712 typed using ConjScan [66] on the Pasteur Galaxy platform [67]. Sequences were aligned and
713 visualized with clinker [68]. Blast analyses were performed with BLASTn [69]. Complete

714 genome sequences of *P. aeruginosa* (n= 487) and *P. paraeruginosa* (n=7) were downloaded
715 from the Pseudomonas Genome Database [27]. Genomes were annotated with Prokka [70],
716 and core genomes were determined with Roary [71] before alignment with MAFFT using the
717 default parameters [72] on the Galaxy server [73]. The resulting alignment was used to build
718 a maximum-likelihood phylogenetic tree with FASTTREE [74] on the Galaxy server. The
719 phylogenetic tree was finally visualized and annotated using iTOL [75].

720

721 **Acknowledgments**

722 We thank Eric Faudry for valuable advice on protein purification and Emmanuel
723 Thévenon for giving us access to the ImageQuant imager. *P. aeruginosa* IHMA87 was obtained
724 from the International Health Management Association, USA. This work was supported by
725 GRAL, funded through the University Grenoble, Alpes graduate school (Ecoles Universitaires
726 de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003). We further acknowledge support from
727 CNRS, CEA and Grenoble Alpes University. Victor Simon's Ph.D. fellowship was funded by the
728 French Ministry of Education and Research.

729 **References**

- 730 1. Argüello JM, Raimunda D, Padilla-Benavides T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria.
731 Front Cell Infect Microbiol. 2013;3. doi:10.3389/fcimb.2013.00073
- 732 2. Andrei A, Öztürk Y, Khalfaoui-Hassani B, Rauch J, Marckmann D, Trasnea P-I, et al. Cu
733 Homeostasis in Bacteria: The Ins and Outs. Membranes (Basel). 2020;10: 242.
734 doi:10.3390/membranes10090242
- 735 3. Focarelli F, Giachino A, Waldron KJ. Copper microenvironments in the human body define
736 patterns of copper adaptation in pathogenic bacteria. PLoS Pathog. 2022;18: e1010617.
737 doi:10.1371/journal.ppat.1010617
- 738 4. Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing
739 environment. FEMS Microbiol Rev. 2003;27: 197–213. doi:10.1016/S0168-6445(03)00049-4

- 740 5. Hofmann L, Hirsch M, Ruthstein S. Advances in Understanding of the Copper Homeostasis in
741 *Pseudomonas aeruginosa*. *IJMS*. 2021;22: 2050. doi:10.3390/ijms22042050
- 742 6. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev*
743 *Biochem*. 2000;69: 183–215. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.183
- 744 7. Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal
745 Transduction. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428: 3752–3775.
746 doi:10.1016/j.jmb.2016.08.003
- 747 8. Groisman EA. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu Rev Microbiol*.
748 2016;70: 103–124. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095331
- 749 9. Hyre A, Casanova-Hampton K, Subashchandrabose S. Copper Homeostatic Mechanisms and
750 Their Role in the Virulence of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus*. 2021;9:
751 eESP-0014-2020. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0014-2020
- 752 10. Virieux-Petit M, Hammer-Dedet F, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, Romano-Bertrand S. From Copper
753 Tolerance to Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards Patho-Adaptation and Hospital
754 Success. *Genes*. 2022;13: 301. doi:10.3390/genes13020301
- 755 11. Jeanvoine A, Meunier A, Puja H, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Contamination of a hospital
756 plumbing system by persister cells of a copper-tolerant high-risk clone of *Pseudomonas*
757 *aeruginosa*. *Water Research*. 2019;157: 579–586. doi:10.1016/j.watres.2019.04.011
- 758 12. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal
759 resistance. *Trends in Microbiology*. 2006;14: 176–182. doi:10.1016/j.tim.2006.02.006
- 760 13. Staehlin BM, Gibbons JG, Rokas A, O’Halloran TV, Slot JC. Evolution of a heavy metal
761 homeostasis/resistance island reflects increasing copper stress in Enterobacteria. *Genome Biol*
762 *Evol*. 2016; evw031. doi:10.1093/gbe/evw031
- 763 14. Chalmers G, Rozas K, Amachawadi R, Scott H, Norman K, Nagaraja T, et al. Distribution of the
764 *pco* Gene Cluster and Associated Genetic Determinants among Swine *Escherichia coli* from a
765 Controlled Feeding Trial. *Genes*. 2018;9: 504. doi:10.3390/genes9100504
- 766 15. Arai N, Sekizuka T, Tamamura Y, Kusumoto M, Hinenoya A, Yamasaki S, et al. *Salmonella*
767 Genomic Island 3 Is an Integrative and Conjugative Element and Contributes to Copper and
768 Arsenic Tolerance of *Salmonella enterica*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63: e00429-19.
769 doi:10.1128/AAC.00429-19
- 770 16. Klockgether J, Tummler B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a
771 pathogen. *F1000Res*. 2017;6: 1261. doi:10.12688/f1000research.10506.1
- 772 17. Grace A, Sahu R, Owen DR, Dennis VA. *Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and
773 PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review. *Front Microbiol*. 2022;13: 1023523.
774 doi:10.3389/fmicb.2022.1023523
- 775 18. Schwan WR, Warrener P, Keunz E, Kendall Stover C, Folger KR. Mutations in the *cueA* gene
776 encoding a copper homeostasis P-type ATPase reduce the pathogenicity of *Pseudomonas*
777 *aeruginosa* in mice. *International Journal of Medical Microbiology*. 2005;295: 237–242.
778 doi:10.1016/j.ijmm.2005.05.005

- 779 19. Quintana J, Novoa-Aponte L, Argüello JM. Copper homeostasis networks in the bacterium
780 *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292: 15691–15704.
781 doi:10.1074/jbc.M117.804492
- 782 20. Teitzel GM, Geddie A, De Long SK, Kirisits MJ, Whiteley M, Parsek MR. Survival and Growth in
783 the Presence of Elevated Copper: Transcriptional Profiling of Copper-Stressed *Pseudomonas*
784 *aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2006;188: 7242–7256. doi:10.1128/JB.00837-06
- 785 21. Turner KH, Everett J, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M. Requirements for *Pseudomonas*
786 *aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. Garsin DA, editor. *PLoS Genet*.
787 2014;10: e1004518. doi:10.1371/journal.pgen.1004518
- 788 22. Yu L, Cao Q, Chen W, Yang N, Yang C-G, Ji Q, et al. A novel copper-sensing two-component
789 system for inducing Dsb gene expression in bacteria. *Science Bulletin*. 2022;67: 198–212.
790 doi:10.1016/j.scib.2021.03.003
- 791 23. Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, et al. The Resistome of
792 *Pseudomonas aeruginosa* in Relationship to Phenotypic Susceptibility. *Antimicrob Agents*
793 *Chemother*. 2015;59: 427–436. doi:10.1128/AAC.03954-14
- 794 24. Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, et al. Complete Genome Sequence
795 of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. Ahmed N, editor. *PLoS*
796 *ONE*. 2010;5: e8842. doi:10.1371/journal.pone.0008842
- 797 25. Rudra B, Duncan L, Shah AJ, Shah HN, Gupta RS. Phylogenomic and comparative genomic
798 studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains: proposal to
799 transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraaeruginosa* sp.
800 nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2022;72.
801 doi:10.1099/ijsem.0.005542
- 802 26. Ng SP. The Heavy Metal Tolerant Soil Bacterium *Achromobacter* sp. AO22 Contains a Unique
803 Copper Homeostasis Locus and Two mer Operons. *J Microbiol Biotechnol*. 2012;22: 742–753.
804 doi:10.4014/jmb.1111.11042
- 805 27. Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA, Brinkman FSL. Enhanced annotations and
806 features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome
807 database. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D646–D653. doi:10.1093/nar/gkv1227
- 808 28. Trouillon J, Imbert L, Villard A-M, Vernet T, Attrée I, Elsen S. Determination of the two-
809 component systems regulatory network reveals core and accessory regulations across
810 *Pseudomonas aeruginosa* lineages. *Nucleic Acids Research*. 2021;49: 11476–11490.
811 doi:10.1093/nar/gkab928
- 812 29. Hyre AN, Kavanagh K, Kock ND, Donati GL, Subashchandrabose S. Copper Is a Host Effector
813 Mobilized to Urine during Urinary Tract Infection To Impair Bacterial Colonization. Bäumlér AJ,
814 editor. *Infect Immun*. 2017;85: e01041-16. doi:10.1128/IAI.01041-16
- 815 30. Bertrand RL. Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares
816 Bacteria for Cell Division. Margolin W, editor. *J Bacteriol*. 2019;201. doi:10.1128/JB.00697-18
- 817 31. Irawati W, Djojo ES, Kusumawati L, Yuwono T, Pinontoan R. Optimizing Bioremediation:
818 Elucidating Copper Accumulation Mechanisms of *Acinetobacter* sp. IrC2 Isolated From an

- 819 Industrial Waste Treatment Center. *Front Microbiol.* 2021;12: 713812.
820 doi:10.3389/fmicb.2021.713812
- 821 32. Fan K, Cao Q, Lan L. Genome-Wide Mapping Reveals Complex Regulatory Activities of BfmR in
822 *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms.* 2021;9: 485. doi:10.3390/microorganisms9030485
- 823 33. Ducret V, Gonzalez D, Perron K. Zinc homeostasis in *Pseudomonas*. *Biometals.* 2022.
824 doi:10.1007/s10534-022-00475-5
- 825 34. Novoa-Aponte L, Xu C, Soncini FC, Argüello JM. The Two-Component System CopRS Maintains
826 Subfemtomolar Levels of Free Copper in the Periplasm of *Pseudomonas aeruginosa* Using a
827 Phosphatase-Based Mechanism. Ellermeier CD, editor. *mSphere.* 2020;5: e01193-20.
828 doi:10.1128/mSphere.01193-20
- 829 35. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol*
830 *Mol Biol Rev.* 2010;74: 621–641. doi:10.1128/MMBR.00027-10
- 831 36. Johnson CM, Grossman AD. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and
832 How They Work. *Annu Rev Genet.* 2015;49: 577–601. doi:10.1146/annurev-genet-112414-
833 055018
- 834 37. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de La Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its
835 application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33: 657–687.
836 doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x
- 837 38. Guglielmini J, Quintais L, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EPC. The Repertoire of ICE in
838 Prokaryotes Underscores the Unity, Diversity, and Ubiquity of Conjugation. Casadesús J, editor.
839 *PLoS Genet.* 2011;7: e1002222. doi:10.1371/journal.pgen.1002222
- 840 39. Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Co-occurrence of resistance genes to
841 antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC*
842 *Genomics.* 2015;16: 964. doi:10.1186/s12864-015-2153-5
- 843 40. Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault JG, Kukavica-Ibrulj I, Dupont MJ, et al. The
844 *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure,
845 Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol Evol.* 2019;11: 109–120.
846 doi:10.1093/gbe/evy259 5215156 [pii]
- 847 41. Purves J, Thomas J, Riboldi GP, Zapotoczna M, Tarrant E, Andrew PW, et al. A horizontally gene
848 transferred copper resistance locus confers hyper-resistance to antibacterial copper toxicity
849 and enables survival of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
850 USA300 in macrophages: *Staphylococcus aureus* copper resistance and innate immunity.
851 *Environ Microbiol.* 2018;20: 1576–1589. doi:10.1111/1462-2920.14088
- 852 42. Munson GP, Lam DL, Outten FW, O’Halloran TV. Identification of a Copper-Responsive Two-
853 Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 2000;182: 5864–
854 5871. doi:10.1128/JB.182.20.5864-5871.2000
- 855 43. Baker J, Sengupta M, Jayaswal RK, Morrissey JA. The *Staphylococcus aureus* CsoR regulates
856 both chromosomal and plasmid-encoded copper resistance mechanisms: *Staphylococcus*
857 *aureus* copper resistance and regulation. *Environmental Microbiology.* 2011;13: 2495–2507.
858 doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02522.x

- 859 44. Laub MT, Goulian M. Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu Rev*
860 *Genet.* 2007;41: 121–145. doi:10.1146/annurev.genet.41.042007.170548
- 861 45. Yamamoto K, Ishihama A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper:
862 Transcriptional response of *E. coli* to external copper. *Molecular Microbiology.* 2005;56: 215–
863 227. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04532.x
- 864 46. Gudipaty SA, Larsen AS, Rensing C, McEvoy MM. Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in
865 *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;330: 30–37.
866 doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02529.x
- 867 47. Gudipaty SA, McEvoy MM. The histidine kinase CusS senses silver ions through direct binding by
868 its sensor domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2014;1844:
869 1656–1661. doi:10.1016/j.bbapap.2014.06.001
- 870 48. Agrawal R, Pandey A, Rajankar MP, Dixit NM, Saini DK. The two-component signalling networks
871 of *Mycobacterium tuberculosis* display extensive cross-talk *in vitro*. *Biochemical Journal.*
872 2015;469: 121–134. doi:10.1042/BJ20150268
- 873 49. Vemparala B, Valiya Parambathu A, Saini DK, Dixit NM. An Evolutionary Paradigm Favoring
874 Cross Talk between Bacterial Two-Component Signaling Systems. *mSystems.* 2022;7: e0029822.
875 doi:10.1128/msystems.00298-22
- 876 50. Siryaporn A, Goulian M. Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-
877 component systems in *E. coli*. *Molecular Microbiology.* 2008;70: 494–506. doi:10.1111/j.1365-
878 2958.2008.06426.x
- 879 51. Chen Y-T, Chang HY, Lu CL, Peng H-L. Evolutionary Analysis of the Two-Component Systems in
880 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Mol Evol.* 2004;59: 725–737. doi:10.1007/s00239-004-2663-2
- 881 52. Ranjitkar S, Jones AK, Mostafavi M, Zwirko Z, Iartchouk O, Barnes SW, et al. Target (MexB)- and
882 Efflux-Based Mechanisms Decreasing the Effectiveness of the Efflux Pump Inhibitor D13-9001 in
883 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Uncovering a New Role for MexMN-OprM in Efflux of β -
884 Lactams and a Novel Regulatory Circuit (MmnRS) Controlling MexMN Expression. *Antimicrob*
885 *Agents Chemother.* 2019;63: e01718-18. doi:10.1128/AAC.01718-18
- 886 53. Garber ME, Rajeev L, Kazakov AE, Trinh J, Masuno D, Thompson MG, et al. Multiple signaling
887 systems target a core set of transition metal homeostasis genes using similar binding motifs:
888 Multiple signaling systems. *Molecular Microbiology.* 2018;107: 704–717.
889 doi:10.1111/mmi.13909
- 890 54. Ohashi K. Molecular Basis for Promoter Selectivity of the Transcriptional Activator OmpR of
891 *Escherichia coli*: Isolation of Mutants That Can Activate the Non-Cognate kdpABC Promoter.
892 *Journal of Biochemistry.* 2005;137: 51–59. doi:10.1093/jb/mvi006
- 893 55. Capra EJ, Laub MT. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu Rev*
894 *Microbiol.* 2012;66: 325–347. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150039
- 895 56. Wagner D, Maser J, Lai B, Cai Z, Barry CE, Höner zu Bentrup K, et al. Elemental Analysis of
896 *Mycobacterium avium* -, *Mycobacterium tuberculosis* -, and *Mycobacterium smegmatis* -
897 Containing Phagosomes Indicates Pathogen-Induced Microenvironments within the Host Cell's
898 Endosomal System. *The Journal of Immunology.* 2005;174: 1491–1500.
899 doi:10.4049/jimmunol.174.3.1491

- 900 57. Caille O, Rossier C, Perron K. A Copper-Activated Two-Component System Interacts with Zinc
901 and Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2007;189: 4561–4568.
902 doi:10.1128/JB.00095-07
- 903 58. Ducret V, Abdou M, Goncalves Milho C, Leoni S, Martin--Pelaud O, Sandoz A, et al. Global
904 Analysis of the Zinc Homeostasis Network in *Pseudomonas aeruginosa* and Its Gene Expression
905 Dynamics. Front Microbiol. 2021;12: 739988. doi:10.3389/fmicb.2021.739988
- 906 59. Elsen S, Ragno M, Attree I. PtrA Is a Periplasmic Protein Involved in Cu Tolerance in
907 *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2011;193: 3376–3378. doi:10.1128/JB.00159-11
- 908 60. Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA
909 via SLIC. Nat Methods. 2007;4: 251–256. doi:10.1038/nmeth1010
- 910 61. Trouillon J, Sentausa E, Ragno M, Robert-Genthon M, Lory S, Attree I, et al. Species-specific
911 recruitment of transcription factors dictates toxin expression. Nucleic Acids Res. 2020;48:
912 2388–2400. doi:10.1093/nar/gkz1232 5700547 [pii]
- 913 62. Berry A, Han K, Trouillon J, Robert-Genthon M, Ragno M, Lory S, et al. cAMP and Vfr Control
914 Exolysin Expression and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomic Outliers. J
915 Bacteriol. 2018;200. doi:e00135-18 [pii] 10.1128/JB.00135-18 JB.00135-18 [pii]
- 916 63. Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor (N.Y.): Cold Spring Harbor
917 Laboratory; 1977.
- 918 64. Thibault J, Faudry E, Ebel C, Attree I, Elsen S. Anti-activator ExsD Forms a 1:1 Complex with ExsA
919 to Inhibit Transcription of Type III Secretion Operons. Journal of Biological Chemistry. 2009;284:
920 15762–15770. doi:10.1074/jbc.M109.003533
- 921 65. Liu M, Li X, Xie Y, Bi D, Sun J, Li J, et al. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative
922 and conjugative elements. Nucleic Acids Research. 2019;47: D660–D665.
923 doi:10.1093/nar/gky1123
- 924 66. Abby SS, Néron B, Ménager H, Touchon M, Rocha EPC. MacSyFinder: A Program to Mine
925 Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems. Torres NV, editor.
926 PLoS ONE. 2014;9: e110726. doi:10.1371/journal.pone.0110726
- 927 67. Mareuil F, Doppelt-Azeroual O, Ménager H. A public Galaxy platform at Pasteur used as an
928 execution engine for web services. 2017 [cited 26 May 2023].
929 doi:10.7490/F1000RESEARCH.1114334.1
- 930 68. Gilchrist CLM, Chooi Y-H. clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster
931 comparison figures. Robinson P, editor. Bioinformatics. 2021;37: 2473–2475.
932 doi:10.1093/bioinformatics/btab007
- 933 69. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. Journal
934 of Molecular Biology. 1990;215: 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- 935 70. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30: 2068–
936 2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153

- 937 71. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: rapid large-scale
938 prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015;31: 3691–3693.
939 doi:10.1093/bioinformatics/btv421
- 940 72. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements
941 in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30: 772–780.
942 doi:10.1093/molbev/mst010
- 943 73. The Galaxy Community, Afgan E, Nekrutenko A, Grüning BA, Blankenberg D, Goecks J, et al. The
944 Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022
945 update. *Nucleic Acids Research*. 2022;50: W345–W351. doi:10.1093/nar/gkac247
- 946 74. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large
947 Alignments. Poon AFY, editor. *PLoS ONE*. 2010;5: e9490. doi:10.1371/journal.pone.0009490
- 948 75. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display
949 and annotation. *Nucleic Acids Research*. 2021;49: W293–W296. doi:10.1093/nar/gkab301

950

951 **Supporting Information**

952

953 **S1 Fig. Delineation of the *pcoA2* operon.**

954 **S2 Fig. Copper resistance of different UTI isolates.**

955 **S3 Fig. Copper resistance in rich media.**

956 **S4 Fig. CusR, CopR and CzcR targets.**

957 **S5 Fig. Effect of lack of IrlR and MmnR on the copper-related locus.**

958 **S6 Fig. CusR, CopR and CzcR : three regulators, three different outcomes.**

959 **S7 Fig. Models of CopRS and CusRS mechanisms and cross-talk.**

960 **S8 Fig. Similar copper sensitivity of CusRS and CopRS.**

961 **S1 Table. Bacterial strains and plasmids used in this study**

962 **S2 Table. Primers used in this study**

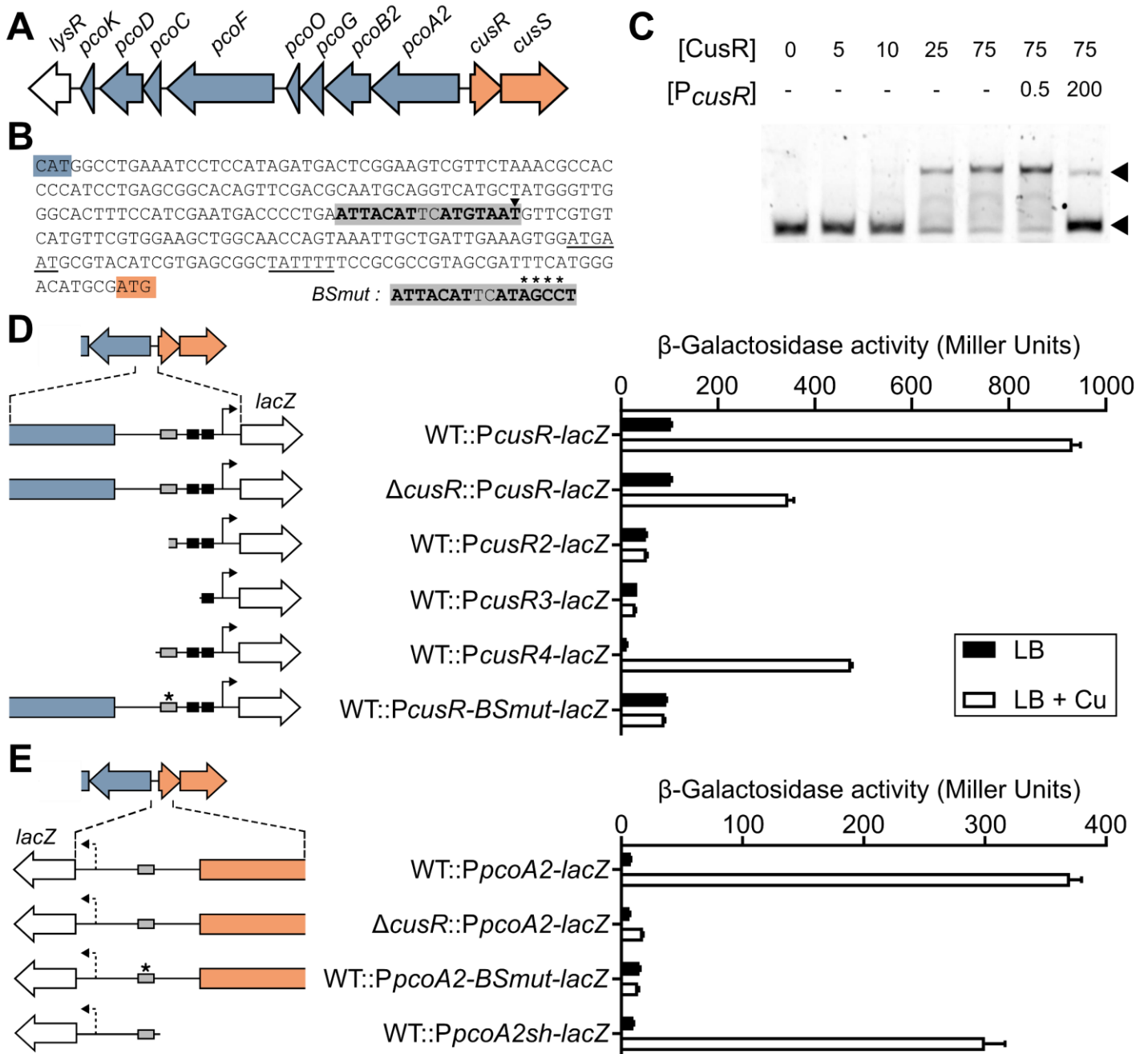


Fig 1. CusRS is a copper responsive and self-regulated TCS. (A) Genetic organization of the copper-related gene locus identified in strain IHMA87. Blue: copper-resistance genes; Orange: regulatory genes. (B) The *pcoA2-cusR* intergenic sequence, framed by the start codon (colored highlights) of each divergent gene. The -10/-35 sequences of the *cusR* promoter (underlined) were predicted using BPROM. The putative CusR

binding site, the palindromic sequence, is in bold and highlighted in gray, with the summit of the peak identified by previous DAPseq [28] identified by an arrowhead. The mutated sequence (*B_Smut*) used in the study is indicated in the inset, with the 4 mutated bases indicated by asterisks. (C) Electrophoretic mobility shift assay of CusR on the *pcoA2-cusR* intergenic region. Up to 75 nM of recombinant His6-CusR protein were incubated with 0.5 nM Cy5-labeled 60-mer probe for 15 min before electrophoresis. For competition assays, excess unlabeled *PcusR* probe (200 nM, 400-fold) was added to the reaction. Arrowheads indicate the positions of unbound free probes (bottom) and CusR/probe complexes (top). (D, E) β -galactosidase activities of the wild-type IHMA87 strain (WT) and the $\Delta cusR$ strain harboring the indicated *PcusR-lacZ* (D) and *PpcoA2-lacZ* (E) transcriptional fusions. The different regions studied are illustrated in the left panels. Black rectangles: putative -10/-35 boxes of *cusR* promoter; Gray rectangle: palindromic sequence, with the *B_Smut* sequence indicated by an asterisk. Arrow: putative transcription start sites, the arrow is dotted for *pcoA2* as it was not predicted by BPRM. Experiments were performed in triplicate and error bars indicate the SEM.

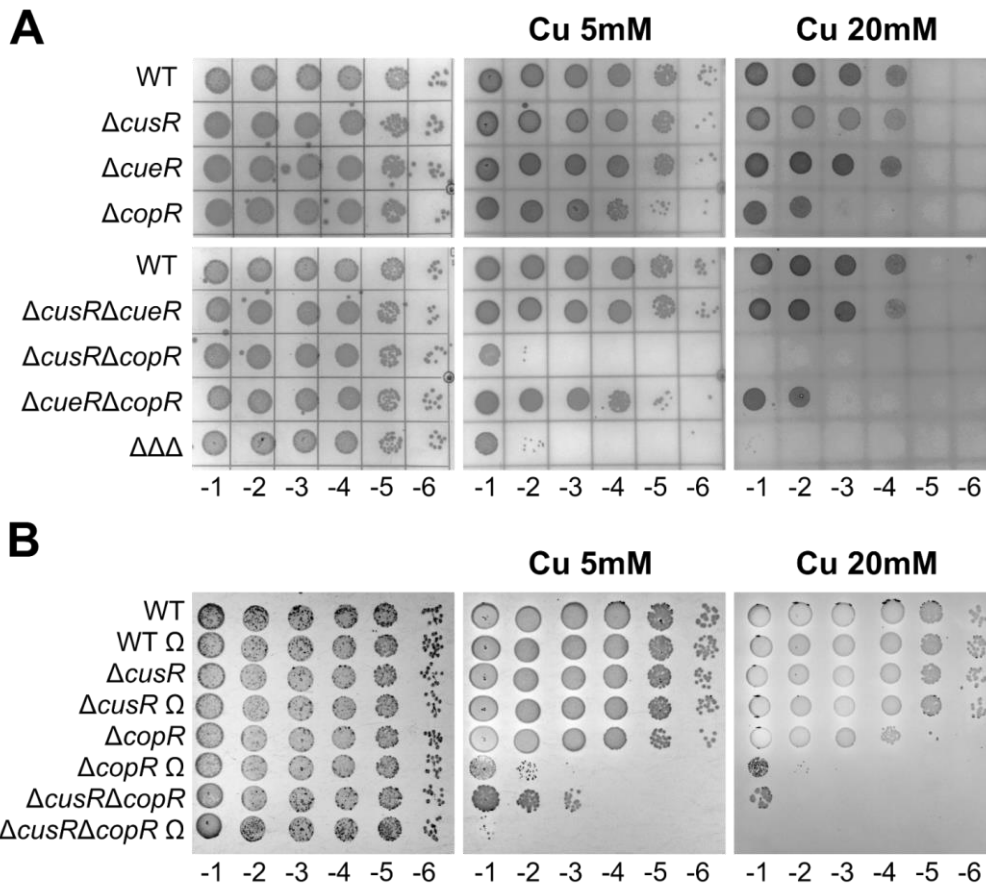


Fig 2. The CusR regulon plays a role in bacterial copper resistance. (A, B) Copper sensitivity plate assays of the different strains used in the study. $\Delta\Delta\Delta$ corresponds to the $\Delta cusR\Delta cueR\Delta copR$ triple mutant and Ω to the *pcoA2:: Ω* background. 10 μ l of 10-fold serial dilutions, as indicated under images (10^{-1} to 10^{-6}), were deposited on M9 plates containing the $CuSO_4$ concentration indicated. Plates were observed after 24 h (M9) or 48 h (Cu) of growth at 37°C.

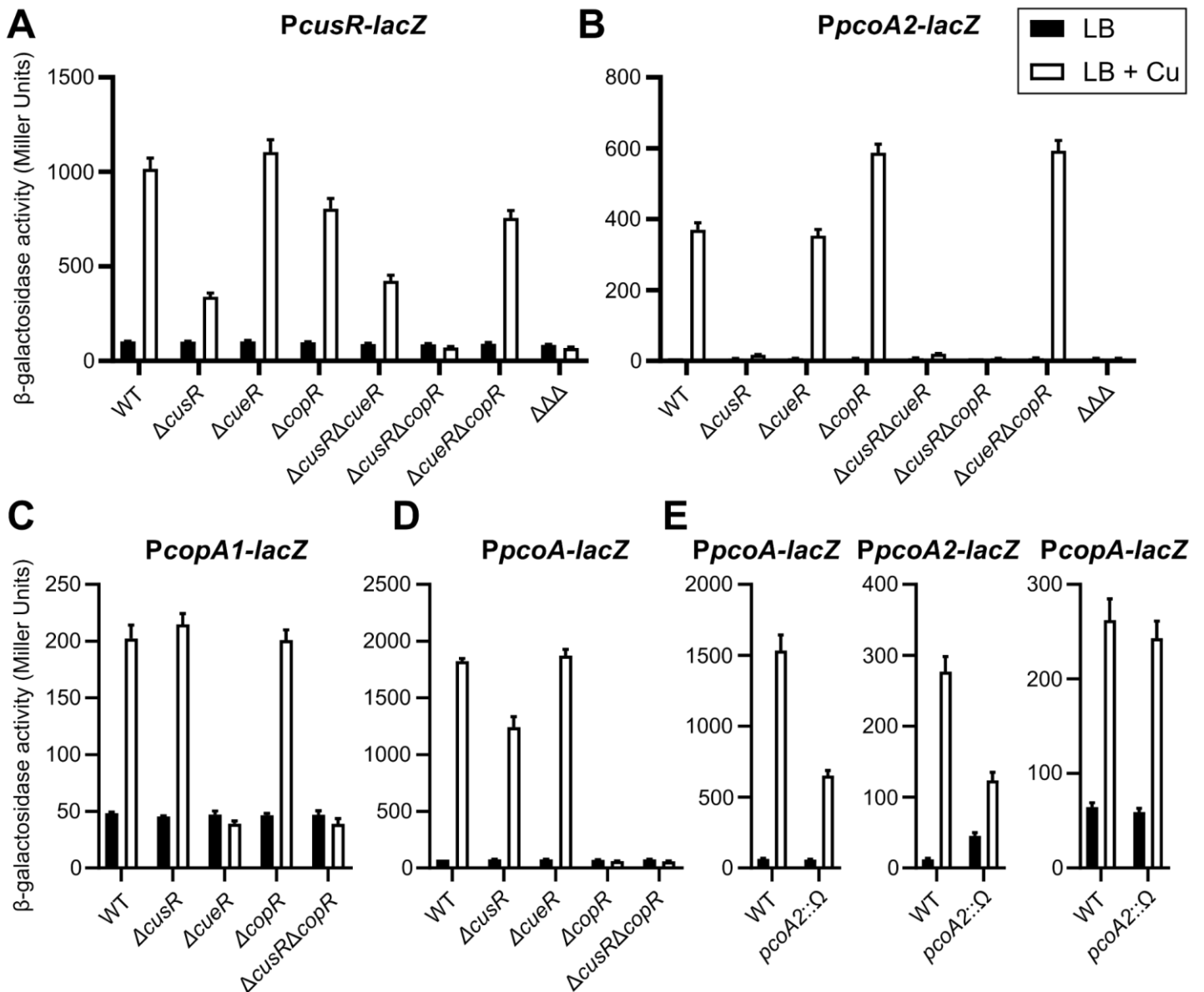


Fig 3. Cross-regulation by CusRS and CopRS. β -galactosidase activities are shown for strains harboring the *PcusR-lacZ* (A), *PpcoA2-lacZ* (B), *PcopA1-lacZ* (C), or *PpcoA-lacZ* (D) transcriptional fusions. $\Delta\Delta\Delta$ corresponds to the $\Delta cusR\Delta cueR\Delta copR$ triple mutant. (E) β -galactosidase activities of the wild-type and *pcoA2:: Ω* strains containing the indicated transcriptional fusions. Experiments were performed in triplicate; error bars correspond to the SEM.

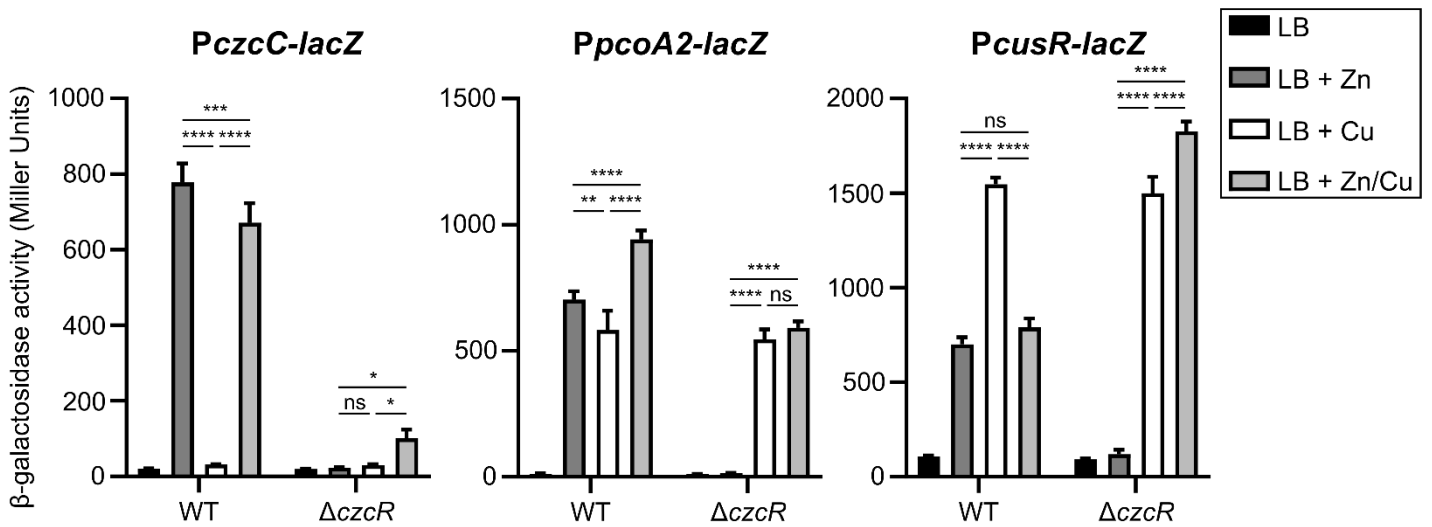


Fig 4. CusRS regulon is also controlled by CzcRS. β -galactosidase activities of the IHMA87 strain (WT) and its isogenic $\Delta czcR$ mutant harboring the three transcriptional fusions indicated. Activities were measured after 2.5 h of growth in LB or LB supplemented with 0.5 mM $ZnCl_2$, 0.5 mM $CuSO_4$, or 0.5 mM $ZnCl_2/0.5$ mM $CuSO_4$. Error bars indicate the SEM. Statistical significance was assessed by ANOVA, applying Tukey's method (p -value, 0.05 [*], 0.01 [**], 0.001 [***], or 0.0001 [****]).

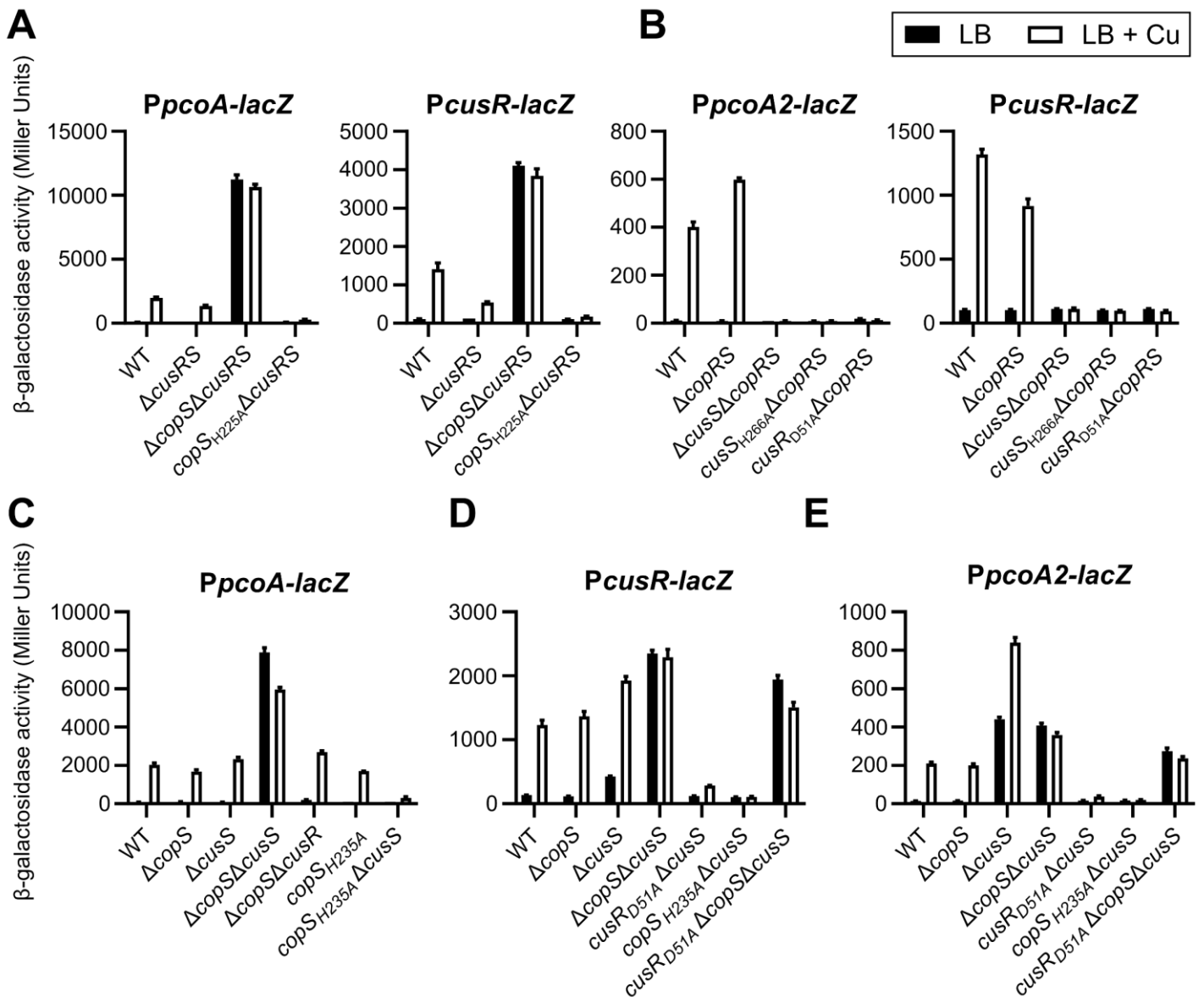


Fig 5. TCS mechanisms and cross-talk. β -galactosidase activities of the strains harboring the transcriptional fusions indicated, after 2.5 h in LB or LB supplemented with 0.5 mM CuSO_4 . Error bars indicate the SEM.

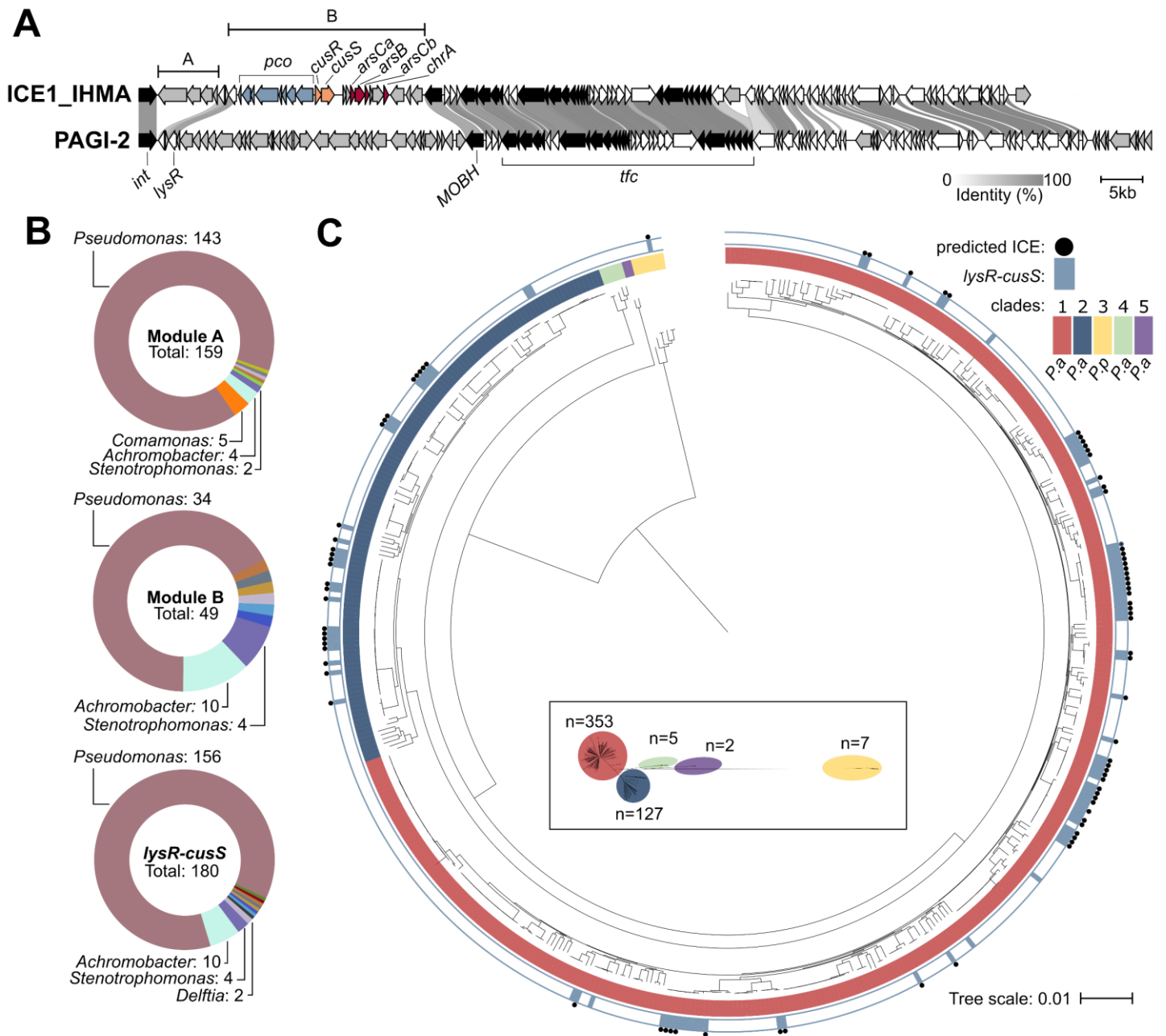
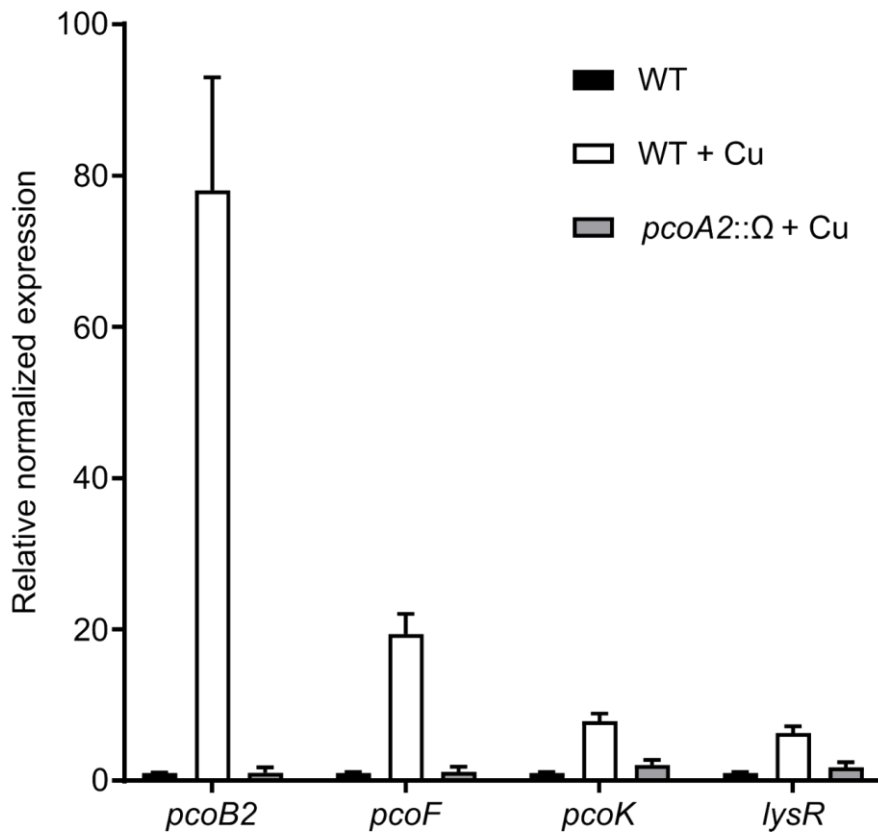
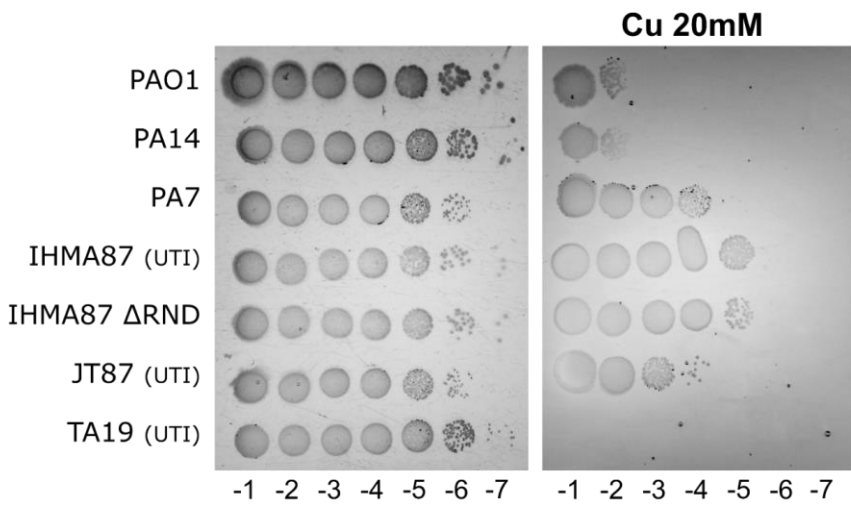


Fig 6. Conservation of *lysR-cusS* locus in *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* species. (A) Comparison of the sequences of ICE1_IHMA and PAGO-2. ORFs are color-coded as follows: *pcoA2B2GOFCDK*, blue; *cusRS*, orange; genes involved in conjugation, transfer and integration of ICE, black; homologous genes, white; genes without any corresponding counterparts in ICE1_IHMA and PAGO-2, gray. Intensity of the link

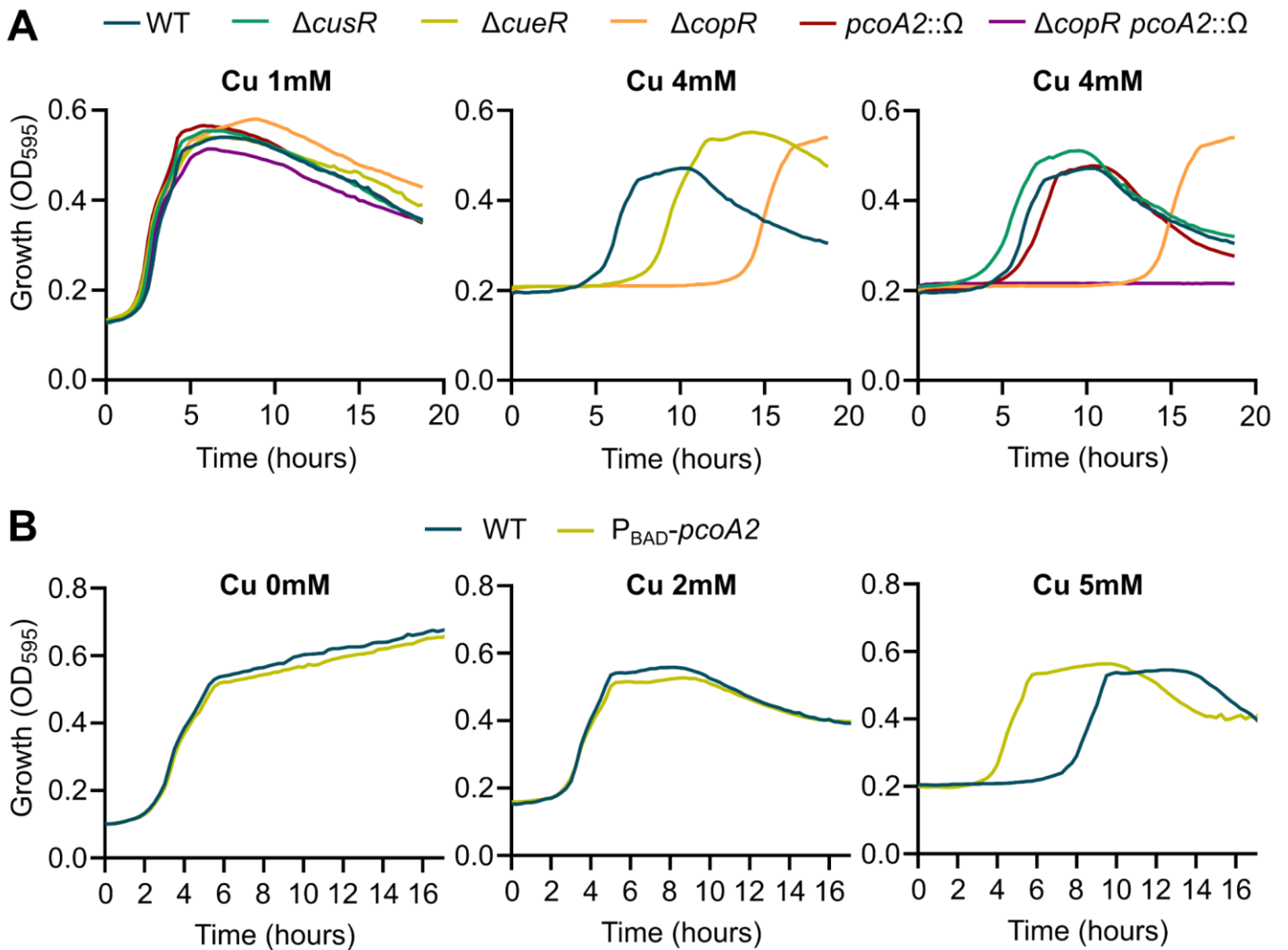
between ORFs was based on % identity between the orthologous proteins. (B) Distribution of genera across genomes harboring modules carried on ICE1_IHMA, as defined in (A). Genera with a single representative are not shown. Module A: *Delftia*, *Diaphorobacter*, *Ralstonia* and *Variovorax*; Module B: *Aerosticca*, *Delftia*, *Tistrella* and *Variovorax*; *lysR-cusS* locus: *Aerosticca*, *Bordetella*, *Delftia*, *Raoultella*, *Ralstonia*, *Tistrella*, *Variovorax* and *Xanthomonas*. (C) Phylogeny of *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* species and distribution of *lysR-cusS*. Inset shows unrooted tree at scale, with the number of genomes for each clade. The presence of the locus is indicated by blue square, a blue dot signals whether the genes are encoded in a predicted ICE.



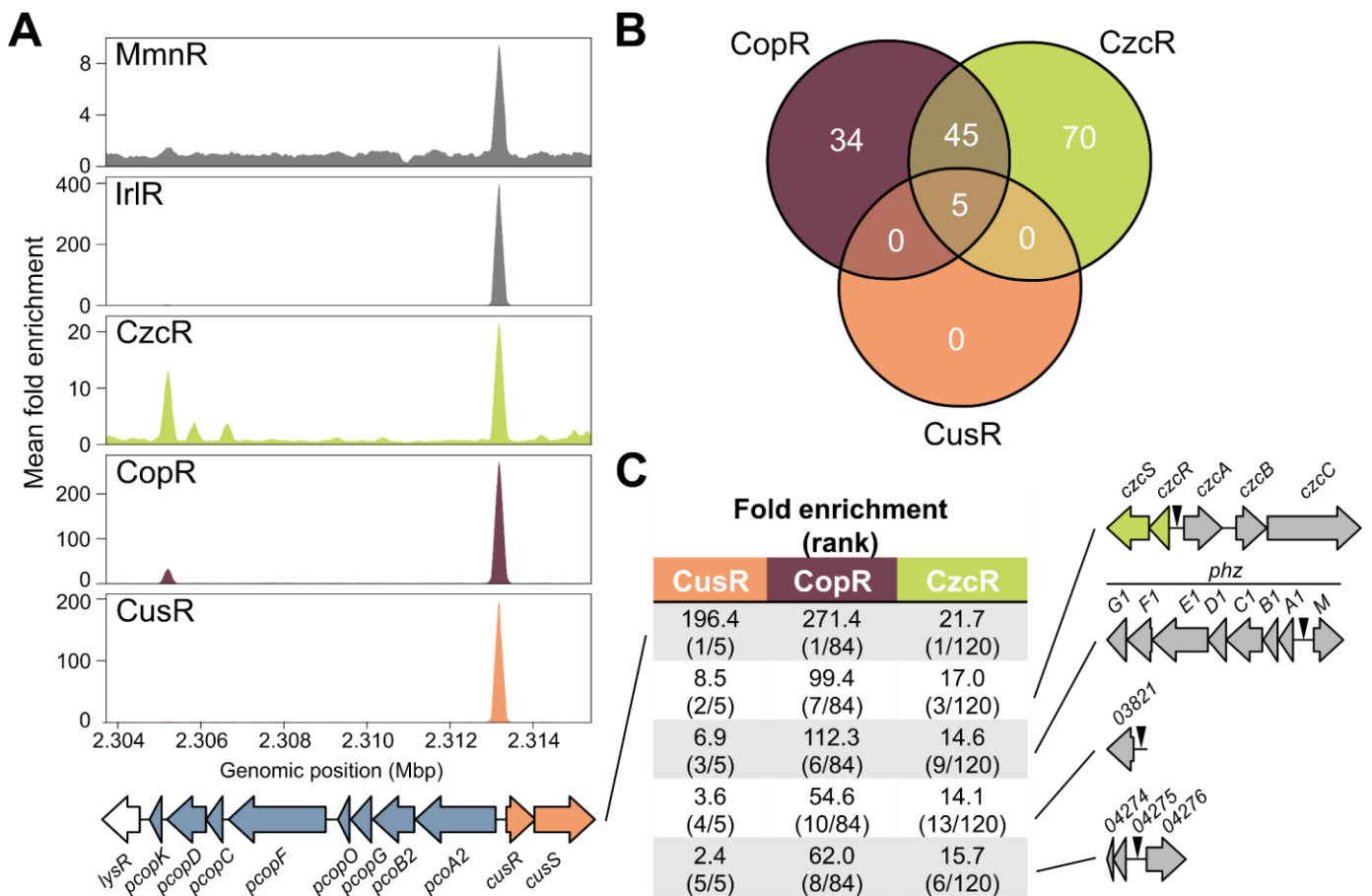
S1 Fig. Delineation of the *pcoA2* operon. RT-qPCR analysis of relative *pcoB2*, *pcoF*, *pcoK*, and *lysR* expression in IHMA87 and IHMA87 *pcoA2::Ω*. Strains were grown for 2.5 h in LB or LB containing 0.5 mM CuSO_4 , as indicated. The *rpoD* gene was used as a reference. Experiments were performed in triplicate, and error bars represent the SEM.



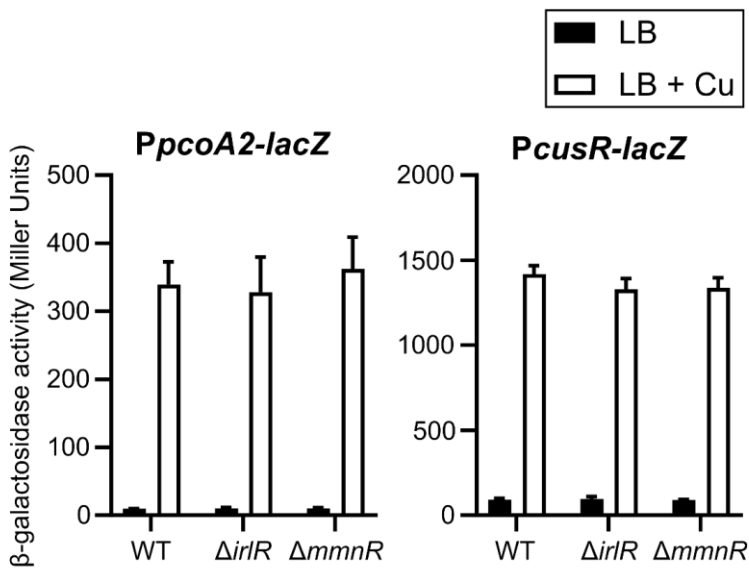
S2 Fig. Copper resistance of different UTI isolates. Copper sensitivity plate assays with the strains indicated. 10 μ l of 10-fold serial dilutions, as indicated under the images (10^{-1} to 10^{-7}), of each strain were deposited on M9 plates and M9 plates supplemented with 20 mM CuSO_4 .



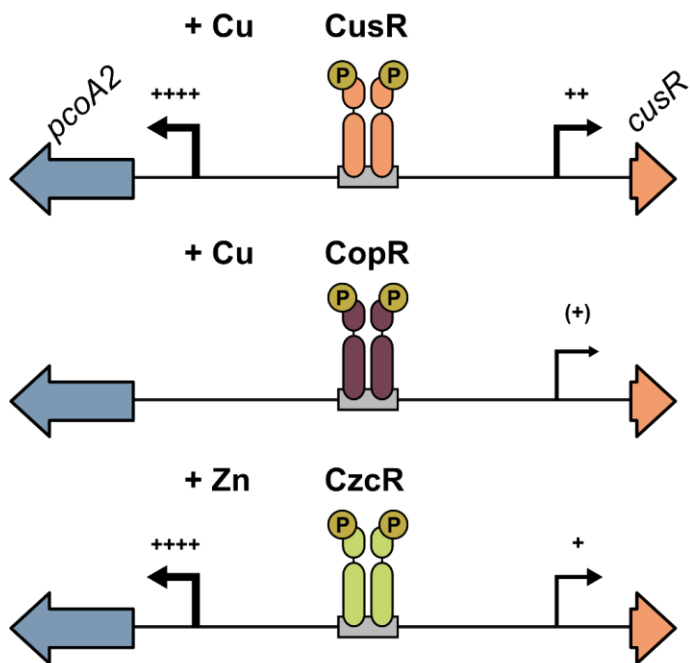
S3 Fig. Copper resistance in rich media. (A) Growth of the different strains was monitored in LB supplemented with various $CuSO_4$ concentrations, as indicated. (B) The *P_{BAD}* promoter was introduced upstream of the *pcoA₂* operon to place it under the control of the inducible promoter. The growth of the resulting strain was compared to that of the wild-type strain in LB supplemented with 2% arabinose (to induce *P_{BAD}*) and 0, 2, or 5 mM $CuSO_4$. (A,B) Growth in 96-well plates was monitored for the times indicated.



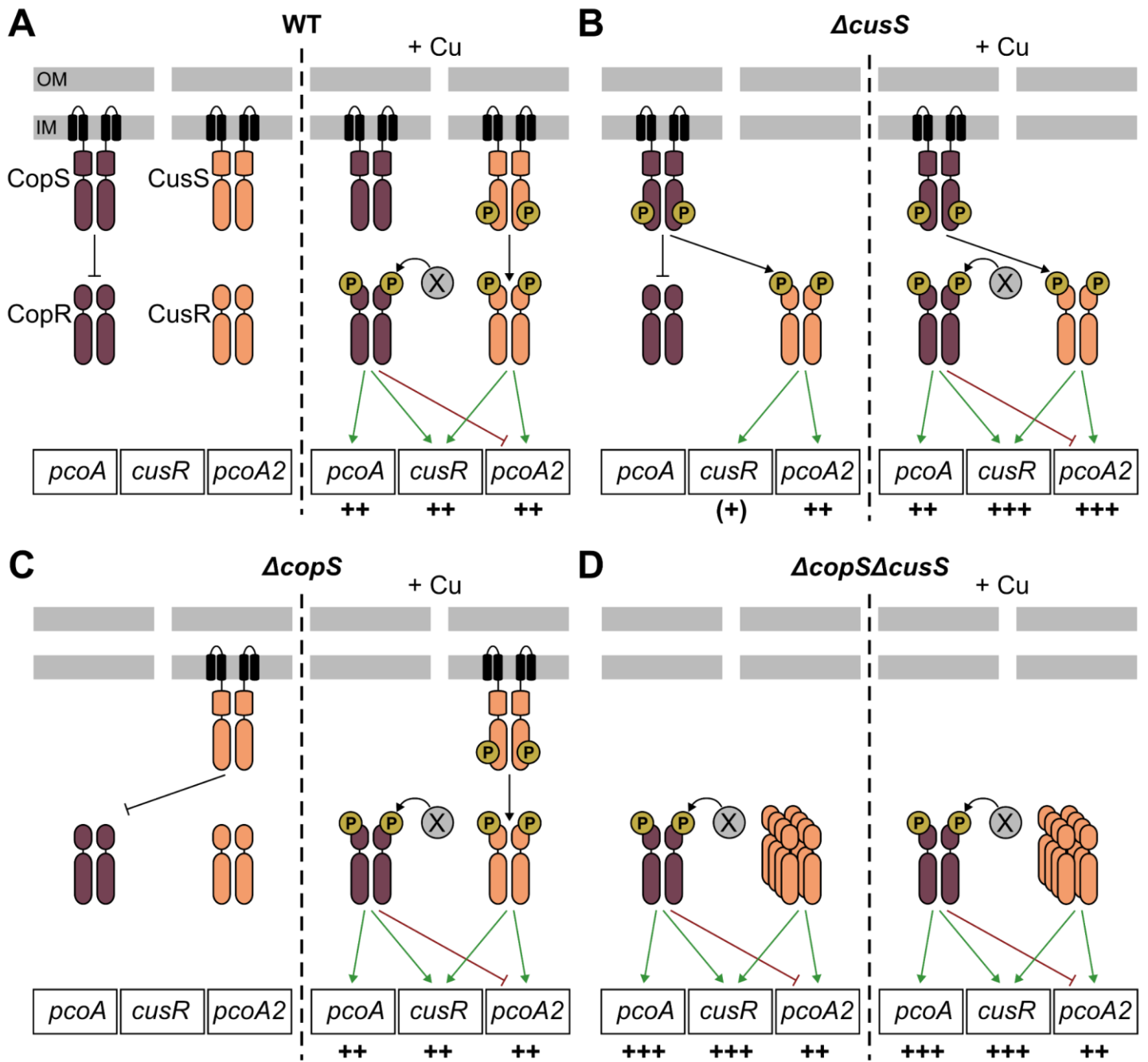
S4 Fig. CusR, CopR and CzcR targets. Reanalysis of previously published DAPseq data obtained for the IHMA87 genome [28]. (A) Enrichment coverage tracks of DAP-seq against negative controls are shown for the five RRs with binding sites on the copper-related locus, as indicated. (B) Venn diagram showing a large range of targets that overlap *in vitro* for the three RRs on the IHMA87 genome. Each target corresponds to the upstream region of one or more transcriptional units. Boundaries set for the upstream region were -400 and +20 bp from the ATG. (C) Targets common to the 3 RRs on the IHMA87 genome with the fold-enrichment of each peak and its rank among other targets of the RR. The targeted intergenic region of the different transcriptional units is indicated by a black triangle. The annotations “03821” and “04274-76” correspond to “IHMA87_03821” and “IHMA87_04274_76” (www.pseudomonas.com; [27]).



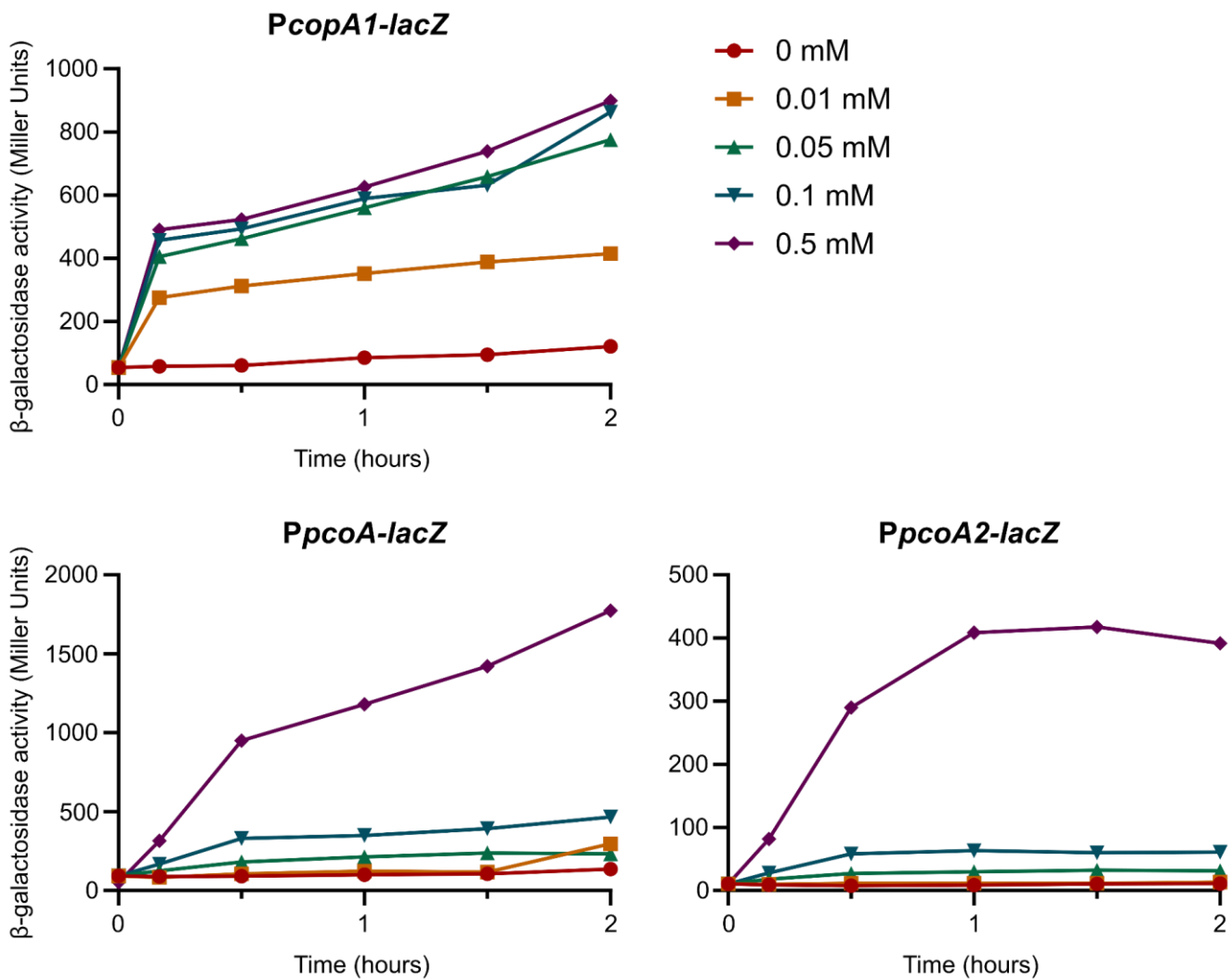
S5 Fig. Effect of lack of IrlR and MmnR on the copper-related locus. β-Galactosidase activities of the indicated strains harboring the *PpcoA2-lacZ* or *PcusR-lacZ* transcriptional fusions, after 2.5 h in LB or LB supplemented with 0.5 mM CuSO₄. Experiments were performed in triplicate; error bars correspond to SEM.



S6 Fig. CusR, CopR and CzcR: three regulators, three distinct outcomes. Model proposed for the action of the three RRs that compete for binding to the same site in the *pcoA2-cusR* intergenic region. The activating molecule (copper or zinc) is indicated for each system. The thickness of the long arrows and the number of "+" signs indicate the strength of transcriptional induction, if any.



S7 Fig. Models of CopRS and CusRS mechanisms and cross-talk. Mechanisms proposed for CusRS and CopRS control of expression of the three target genes, *pcoA1*, *cusR*, and *pcoA2*, in the absence or presence of copper. Wild-type strain (A), $\Delta cusS$ (B), $\Delta copS$ (C), and $\Delta copS\Delta cusS$ (D). The number of “+” signs below the genes reflects the extent of transcriptional activation by the RRs. X represents the unknown entity providing CopR with phosphate. Panel B: although the phosphate status of CopS was unexpected, the data show a CopS-dependent phosphorylation of CusR in the absence of CusS.



S8 Fig. Similar copper sensitivity of CusRS and CopRS. β -galactosidase activities of the wild-type IHMA87 harboring the *PcopA1-lacZ*, *PpcoA-lacZ*, or *PpcoA2-lacZ* transcriptional fusions. Growth in 96-well plates was assessed in LB supplemented with CuSO_4 at the concentrations indicated.

S1 Table. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or relevant properties	Reference/Source
Strains		
<i>P. paraeruginosa</i>		
IHMA879472 (IHMA87)	wild-type strain (urinary infection)	[1]
IHMA87 Δ <i>cusR</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_02165</i> (<i>cusR</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>cusS</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_02166</i> (<i>cusS</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>cusRS</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_02165-02166</i> deletion	This study
IHMA87 Δ <i>copR</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_02262</i> (<i>copR</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>copS</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_02261</i> (<i>copS</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>copRS</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_02262-02261</i> (<i>copRS</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>cueR</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_05258</i> (<i>cueR</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>cusS</i> Δ <i>copS</i>	IHMA87 with <i>cusS</i> and <i>copS</i> deletions	This study
IHMA87 Δ <i>cusS</i> Δ <i>copRS</i>	IHMA87 with <i>cusS</i> and <i>copRS</i> deletions	This study
IHMA87 Δ <i>cusR</i> Δ <i>copR</i>	IHMA87 with <i>cusR</i> and <i>copR</i> deletions	This study
IHMA87 Δ <i>cusR</i> Δ <i>cueR</i>	IHMA87 with <i>cusR</i> and <i>cueR</i> deletions	This study
IHMA87 Δ <i>copR</i> Δ <i>cueR</i>	IHMA87 with <i>copR</i> and <i>cueR</i> deletions	This study
IHMA87 Δ <i>cusR</i> Δ <i>copR</i> Δ <i>cueR</i>	IHMA87 with <i>cusR</i> , <i>copR</i> and <i>cueR</i> deletions	This study
IHMA87 Δ <i>ccuS</i> <i>cusR</i> _{D51A}	IHMA87 Δ <i>cusS</i> bearing gene encoding <i>CusR</i> _{D51A} variant	This study
IHMA87 Δ <i>cusS</i> Δ <i>copS</i> <i>cusR</i> _{D51A}	IHMA87 Δ <i>cusS</i> Δ <i>copS</i> bearing gene encoding <i>CusR</i> _{D51A} variant	This study
IHMA87 Δ <i>copRS</i> <i>cusR</i> _{D51A}	IHMA87 Δ <i>copRS</i> bearing gene encoding <i>CusR</i> _{D51A} variant	This study
IHMA87 Δ <i>copRS</i> <i>cusS</i> _{H266A}	IHMA87 Δ <i>copRS</i> bearing gene encoding <i>CusS</i> _{H266A} variant	This study
IHMA87 Δ <i>copS</i> Δ <i>cusR</i>	IHMA87 with <i>copS</i> and <i>cusR</i> deletions	This study
IHMA87 Δ <i>copS</i> Δ <i>cusRS</i>	IHMA87 with <i>copS</i> and <i>cusRS</i> deletions	This study
IHMA87 Δ <i>cusS</i> <i>copS</i> _{H235A}	IHMA87 Δ <i>cusS</i> bearing gene encoding <i>CopS</i> _{H235A} variant	This study
IHMA8 Δ <i>cusRS</i> <i>copS</i> _{H235A}	IHMA87 Δ <i>cusRS</i> bearing gene encoding <i>CopS</i> _{H235A} variant	This study
IHMA87 ::PBAD- <i>pcoA2</i>	IHMA87 with <i>araC</i> -PBAD inserted upstream <i>pcoA2</i>	This study
IHMA87 <i>pcoA2</i> :: Ω	IHMA87 with Ω interposon inserted in <i>pcoA2</i>	This study
IHMA87 Δ <i>cusR</i> <i>pcoA2</i> :: Ω	IHMA87 Δ <i>cusR</i> with Ω interposon inserted in <i>pcoA2</i>	This study
IHMA87 Δ <i>copR</i> <i>pcoA2</i> :: Ω	IHMA87 Δ <i>copR</i> with Ω interposon inserted in <i>pcoA2</i>	This study
IHMA87 Δ <i>cusR</i> Δ <i>copR</i> <i>pcoA2</i> :: Ω	IHMA87 Δ <i>cusR</i> Δ <i>copR</i> with Ω interposon inserted in <i>pcoA2</i>	This study
IHMA87 Δ <i>czcR</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_02627</i> (<i>czcR</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>irlR</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_05374</i> (<i>irlR</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>mmnR</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_03730</i> (<i>mmnR</i>) deletion	This study
IHMA87 Δ <i>RND</i>	IHMA87 with <i>IHMA87_02154-02152</i> deletion	This study
<i>E. coli</i>		
TOP10	Chemically competent cell	Invitrogen
BL21 Star (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen
Plasmids		
pRK600	Helper plasmid with conjugative properties (Cm ^R)	[2]

pEXG2	Allelic exchange vector (Gm ^R)	[3]
pEXG2-IHMAΔ <i>cusR</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>cusR</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMA <i>cusR</i> D51A	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>cusR</i> mutation (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>cusS bis</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>cusS</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMA <i>cusS</i> _H266A	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>cusS</i> mutation (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>cusRS</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>cusRS</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>copR</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>copR</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>copS bis</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>copS</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMA <i>copS</i> _H235A	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>copS</i> mutation (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>copRS bis</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>copRS</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>cueR</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>cueR</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>czcR</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>czcR</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>irlR</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>irlR</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>mmnR</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>mmnR</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2-IHMAΔ <i>RND</i>	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>IHMA87_02154-02153-02152</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2- <i>PpcoA2</i> -Sp	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>araC</i> -PBAD insertion upstream of the <i>pcoA2</i> operon (Gm ^R)	This study
pEXG2-PBAD- <i>pcoA2</i> -Sp	pEXG2- <i>PpcoA2</i> -Sp with <i>araC</i> -PBAD fragment from pSW196 (Gm ^R)	This study
pSW196	Site-specific integrative plasmid with PBAD30-promoter (<i>attP</i> site, FRT, Tc ^R)	[4]
pEXG2Δ <i>B-pcoA2</i>	<i>Bam</i> HI-deleted pEXG2 carrying 995-bp fragment of <i>pcoA2</i> gene (Gm ^R)	This study
pEXG2Δ <i>B-Ω-pcoA2</i>	pEXG2Δ <i>B-pcoA2</i> with Ω interposon inserted into <i>pcoA2</i> fragment (Gm ^R , Spc ^R , Sm ^R)	This study
pHP45Ω	Derivative of pBR322 plasmid carrying the Ω interposon (Ap ^R , Spc ^R , Sm ^R)	[5]
miniCTX1- <i>lacZ</i>	Site-specific integrative plasmid with promoter-less <i>lacZ</i> (<i>attP</i> site, FRT, Tc ^R)	[6]
miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i>	mini-CTX1- <i>lacZ</i> with strong <i>rrnB</i> terminator (<i>attP</i> , FRT, Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PcusR-lacZ</i>	miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i> harboring the <i>cusR</i> promoter (503 bp) fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> , Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PcusR2-lacZ</i>	miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i> harboring the <i>cusR</i> promoter (126 bp) fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> , Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PcusR3-lacZ</i>	miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i> harboring the <i>cusR</i> promoter (85 bp) fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> , Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PcusR4-lacZ</i>	miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i> harboring the <i>cusR</i> promoter (144 bp) fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> , Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PcusR-DBSmut-lacZ</i>	miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i> harboring the mutated <i>cusR</i> promoter (503 bp) fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> , Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PpcoA2-lacZ</i>	miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i> harboring the <i>pcoA2</i> promoter (501 bp) fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> , Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PpcoA2 sh-lacZ</i>	miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i> harboring the <i>pcoA2</i> promoter (171 bp) fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> , Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PpcoA2 DBSmut-lacZ</i>	miniCTX- <i>TrrnB-lacZ</i> harboring the mutated <i>pcoA2</i> promoter (501 bp) fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> , Tc ^R)	This study

pCTXter- <i>PcopR-lacZ</i>	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>copR</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> ,Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PcopA1-lacZ</i>	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>copA1</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> ,Tc ^R)	This study
pCTXter-IHMA- <i>PpcoA-lacZ</i>	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>pcoA</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> ,Tc ^R)	This study
pCTXter- <i>PrhIA-lacZ</i>	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>rhIA</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> ,Tc ^R)	This study
miniCTX- <i>PczcCBA-lacZ</i>	miniCTX-lacZ harboring the <i>czcA</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> ,Tc ^R)	This study
pET15b	Expression vector (Ap ^R)	Novagen
pET15b-CusR	Expression vector of His6-CusR (Ap ^R)	This study

Supplementary references

1. Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, et al. The Resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in Relationship to Phenotypic Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59: 427–436. doi:10.1128/AAC.03954-14
2. Kessler B, de Lorenzo V, Timmis KN. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Molec Gen Genet.* 1992;233: 293–301. doi:10.1007/BF00587591
3. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102: 8006–8011. doi:10.1073/pnas.0503005102
4. Baynham PJ, Ramsey DM, Gvozdyev BV, Cordonnier EM, Wozniak DJ. The *Pseudomonas aeruginosa* Ribbon-Helix-Helix DNA-Binding Protein AlgZ (AmrZ) Controls Twitching Motility and Biogenesis of Type IV Pili. *J Bacteriol.* 2006;188: 132–140. doi:10.1128/JB.188.1.132-140.2006
5. Prentki P, Krisch HM. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* 1984;29: 303–313. doi:10.1016/0378-1119(84)90059-3
6. Becher A, Schweizer HP. Integration-Proficient *Pseudomonas aeruginosa* Vectors for Isolation of Single-Copy Chromosomal *lacZ* and *lux* Gene Fusions. *BioTechniques.* 2000;29: 948–952. doi:10.2144/00295bm04

S2 Table. Primers used in this study

Name	Sequence (5' -> 3')	Use
pEXG2-mut-cusR-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GTAGCCACGCCTGGCTTG	<i>cusR</i> deletion
pEXG2-mut-cusR-sR1-bis	GAGCGTGTATCCCATTCCACG CAGCAGTTTCATCGCATGTCC	<i>cusR</i> deletion
pEXG2-mut-cusR-sF2	GTGGAATGGGATACACGCTCG	<i>cusR</i> deletion
pEXG2-mut-cusR-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC CGCTGAATCGTCAGCAGGCA	<i>cusR</i> deletion
pEXG2-mut-cusR-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GTAGCCACGCCTGGCTTG	CusR _{D51A} mutation
pEXG2-cusR-D51A-sR1	GG CCAAGACCACCAGATCGTATGT	CusR _{D51A} mutation
pEXG2-cusR-D51A-sF2	TACGATCTGGTGGTCTTGCC GTCATGCTGCCGGATGTCAATG	CusR _{D51A} mutation
pEXG2-mut-cusR-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC CGCTGAATCGTCAGCAGGCA	CusR _{D51A} mutation
pEXG2-mut-cusS-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GCGCTGGCCAACGCATCAAT	<i>cusS</i> deletion
pEXG2-mut-cusS-sR1	TCA GGCCAAGTGTTGCTTCAGTTC	<i>cusS</i> deletion
pEXG2-mut-cusS-sF3	CTGAAGCAACACTTGCCCTGA ATTGCGGAGGCACATGGTGGC	<i>cusS</i> deletion
pEXG2-mut-cusS-sR3	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC AGTACCTTGATCTTGATCAATAAG	<i>cusS</i> deletion
pEXG2-cusS-H266A-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC ATTTGATCGTGTGGCAGGAGGAT	Cus _{H266A} mutation
pEXG2-cusS-H266A-sR1	CGCGGCGATGTCTGCGGAAAAGTGTG	Cus _{H266A} mutation
pEXG2-cusS-H266A-sF2	TTTTCCGCAGACATCGCCGCG GAGTTGCGCACGCCGTCAC	Cus _{H266A} mutation
pEXG2-cusS-H266A-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GTCCTGCGAAAGCAAGACCG	Cus _{H266A} mutation
pEXG2-mut-cusRS-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GTTGGTTACACGGATTGTGACG	<i>cusRS</i> deletion
pEXG2-mut-cusRS-sR1	TCA GTTCTCGTCTTCAACGACCAGC	<i>cusRS</i> deletion
pEXG2-mut-cusRS-sF2	GTCGTTGAAGACGAGAAGTGA CAGGACGAGCAGTGGACAACG	<i>cusRS</i> deletion
pEXG2-mut-cusRS-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GCGCAACGAACCAGCAG	<i>cusRS</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA copR-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC AAACCCGCCGACCGGAAACCA	<i>copR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA copR-sR1	TCATTGTCGCGTTCCTCGAG GATCAGCAGTTTCATGTTTCATCC	<i>copR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA copR-sF2	CTCGAAGAACGCGACGAATGAG	<i>copR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA copR-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC TGATGTCGAGGATCACGGTGAG	<i>copR</i> deletion
pEXG2-mut-copS-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GGTGCTGTTCTCACTGC	<i>copS</i> deletion
pEXG2-mut-copS-sR1	TCA GGATAGCCGGAACCGAGTCC	<i>copS</i> deletion
pEXG2-mut-copS-sF2	CTCGGTTCCCGGCTATCCTGA GAGATCCGCTGCGAGTCCGC	<i>copS</i> deletion

pEXG2-mut-copS-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC AAACTGCAGGTACACCACCTG	<i>copS</i> deletion
pEXG2-copS-H235A-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GCCTGCCGCAGCCTGCGCA	<i>CopS</i> _{H235A} mutation
pEXG2-copS-H235A-sR1	GCG GGCGATGTCGGCGGAGAACG	<i>CopS</i> _{H235A} mutation
pEXG2-copS-H235A-sF2	TTCTCCGCCGACATCGCCGCG GAACTGCGCACGCCACTCAC	<i>CopS</i> _{H235A} mutation
pEXG2-copS-H235A-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GGCGGTCGCCGAGGCGGAT	<i>CopS</i> _{H235A} mutation
pEXG2-mut- copR-bis-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC ATTACATCTTTGTCAGCTTGCC	<i>copRS</i> deletion
pEXG2-mut- IHMA copRS-sR1	TCA GATCAGCAGTTTCATGTTTCATCC	<i>copRS</i> deletion
pEXG2-mut- IHMA copRS-sF4	AACATGAAACTGCTGATCTGA CGCCTGAGCGTGGAGAACCA	<i>copRS</i> deletion
pEXG2-mut-copRS-sR4	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC TGCTGACGCCGCTGACCTAC	<i>copRS</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA cueR-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GATGGTCGGCAACCTGGTGG	<i>cueR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA cueR-sR1	CCTGACTCCAGGTCCCTGAG GATGTTTCATCGGAATCTCCTGG	<i>cueR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA cueR-sF2	CTCAGGGACCTGGAGTCAGG	<i>cueR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA cueR-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GGTGTGGGACCGCCTGCAC	<i>cueR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA czcR-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GATATTCGAAGTTGCACTTCCGG	<i>czcR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA czcR-sR1	GACTTCATCTTCGATAATAAGGATG	<i>czcR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA czcR-sF2	CTTATTATCGAAGATGAAGTC GTCGGCTACGTGCTGGAAGC	<i>czcR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA czcR-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GATGCTCAGCAGGCGCTGGT	<i>czcR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA irIR-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC TCGAGGGCCTTGAGGGTG	<i>irIR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA irIR-sR1	CGCGTCGTCTTCGACCACCA	<i>irIR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA irIR-sF2	TGGTGGTCGAAGACGACGCG GGCTACGTCTGCGAGGAGCG	<i>irIR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA irIR-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GGTGATCTGCAACGGCTCG	<i>irIR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA mmnR-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC AGCGCGAGCAGGGCCTGAG	<i>mmnR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA mmnR-sR1	CGCCTCGTCTCGACTATCAG	<i>mmnR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA mmnR-sF2	TGATAGTCGAGGACGAGGCG CATAACATCCGGGCATGGG	<i>mmnR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA mmnR-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GGTGTCCGCAACTGCAACT	<i>mmnR</i> deletion
pEXG2-mut-IHMA RND-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GTACGGCCGAGGCACAACG	RND genes deletion
pEXG2-mut-IHMA RND-sR1	GATCAGCCTGGATCGCCTTGCAAGT	RND genes deletion
pEXG2-mut-IHMA RND-sF2	GCAAGGCGATCCAGGCTGATC GGTGGCCAATCGCTTCTGGT	RND genes deletion
pEXG2-mut-IHMA RND-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC AAGACCCTGGACGAGTTCC	RND genes deletion

pEXG2-PpcoA2-Sp-sF1	GTCGACTCTAGAGGATCCCC AAGTCCAGCACCAAATCGGCAA	PBAD insertion
pEXG2-PpcoA2-Sp-sR1	ACTAGT CATCCTGAGCGGCACAGTTCG	PBAD insertion
pEXG2-PpcoA2-Sp-sF2	TGCCGCTCAGGATGACTAGT GGGTGGCGTTTAGAACGACTTC	PBAD insertion
pEXG2-PpcoA2-Sp-sR2	CCGAATTCGAGCTCGAGCCC GCAGCACGTGGTCACGGTTCG	PBAD insertion
pEXG2_B-omega2-02164-sF1	GACTCTAGAGGATCGATCCCC GAACATTACATGAATGTAATTCAGG	Insertion interposon Ω in <i>pcoA2</i>
pEXG2-omega2-02164-sF1	TA CCAGTAGGAGCCGCTCTGCT	Insertion interposon Ω in <i>pcoA2</i>
pEXG2-omega2-02164-sF2	AGCAGAGCGGCTCCTACTGGAT CCTACTCGCACTCCGGCTTCC	Insertion interposon Ω in <i>pcoA2</i>
pEXG2-omega2-02164-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GCGTAGCCTGTCCGGTCCA	Insertion interposon Ω in <i>pcoA2</i>
pCTXter-IHMA-cusR-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC GTTGATGGTCGTAGCCACG	<i>PcusR-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-cusR-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC ATCGCATGTCCCATGAAATCG	<i>PcusR-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-cusR2-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC CATGTAATGTTTCGTGTCATGTTT	<i>PcusR-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-PcusR3-lacZ	GATATCGAATTCCTGCAGCCC TAAATTGCTGATTGAAAGTGGATGA	<i>PcusR-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMAcusR4-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC TGACCCCTGAATTACATTCATGTA	<i>PcusR-lacZ</i> fusion
pCTXter-cusR-BS1-lacZ-sR1	GAACATGACACGAACAGGCT ATGAATGTAATTCAGGGGTCATTC	<i>PcusR/pcoA2 DBSmut-lacZ</i> fusion
pCTXter-cusR-BS1-lacZ-sF2	AGCCTGTTTCGTGTCATGTTTCGTGGAA	<i>PcusR/pcoA2 DBSmut-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA_02164-Z-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC ACGCGCCGTCAGAAAGAGC	<i>PpcoA2-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA_02164-Z-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC ATGGCCTGAAATCCTCCATAG	<i>PpcoA2-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA_02164short-Z-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC TTGCCAGCTTCCACGAACATGA	<i>PpcoA2-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-copR-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC TCGGGAGCATTACATCTTTGTC	<i>IHMA87_02262-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-copR-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC ATGTTTCATCCCTCGTTACATTT	<i>IHMA87_02262-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-copA1-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC ATACGCGATCACCTTCTGC	<i>IHMA87_01025-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-copA1-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC ATGGAACCTCCTTGGAATCG	<i>IHMA87_01025-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-pcoA-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC GACCAACTTCGCCGAGAACAT	<i>IHMA87_0306-lacZ</i> fusion
pCTXter-IHMA-pcoA-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC ATCCGCTGGTTTCCACGCA	<i>IHMA87_0306-lacZ</i> fusion
pCTX-czcCBA-igl-sF	GCCCCCCTCGAGGTCGA TTCGCCCTATATAAAGTATGGA	<i>PczcC-lacZ</i> fusion

pCTX-czcCBA-lgl-sR	ATCAAGCTTATCGATACCGTCGA TTCCGCTCCTCGTCTGCTGA	<i>PzcC-lacZ</i> fusion
pCTXter-rhlA-lacZ-sF	GATATCGAATTCTGCAGCCC GAAGGCCATGTGACCCTCGAG	<i>PrhIA-lacZ</i> fusion
pCTXter-rhlA-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC CCGCATTTACACCTCCCAAAAA	<i>PrhIA-lacZ</i> fusion
pET15b-cusR-sF	CTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT ATGAAACTGCTGGTCGTTGAAGA	HMA87 <i>cusR</i> overexpression
pET15b-cusR-sR	GCTTTGTTAGCAGCCGGATCC TTATGGCGCAGGGGCATCATC	HMA87 <i>cusR</i> overexpression
rpoDqPCR F1	GCGCAACAGCAATCTCGTCT	RT-qPCR
rpoDqPCR R1	ATCCGGGGCTGTCTCGAATA	RT-qPCR
02163_qPCR_up	AGCCGTCAATGGTTGGCTTT	RT-qPCR
02163_qPCR_down	CGTCCACCACTTCCCACGTA	RT-qPCR
02160_qPCR_up	TCGCAGATCGTCCAGATGGT	RT-qPCR
02160_qPCR_down	CGACGGCCATCACGAAGTAG	RT-qPCR
02157_qPCR_up	TTCGGTGTGACGAAGGATG	RT-qPCR
02157_qPCR_down	TCCGCCGTGCTCTTTTTGTA	RT-qPCR
02156_qPCR_up	TGCGATGGACCCACGACTAT	RT-qPCR
02156_qPCR_down	TCAGCGGTACCTCGGAGAGA	RT-qPCR

6.2 Résultats supplémentaires

6.2.1 Les ICEs de IHMA87

Afin d'identifier les différentes ICEs du génome de IHMA87, nous avons utilisé l'outil ICEfinder. Ainsi, 4 régions ont été identifiées sur le chromosome, numérotées de 1 à 4 (Fig 6.1). Les 3 premières sont annotées comme des ICEs tandis que la quatrième est prédite comme un IME.

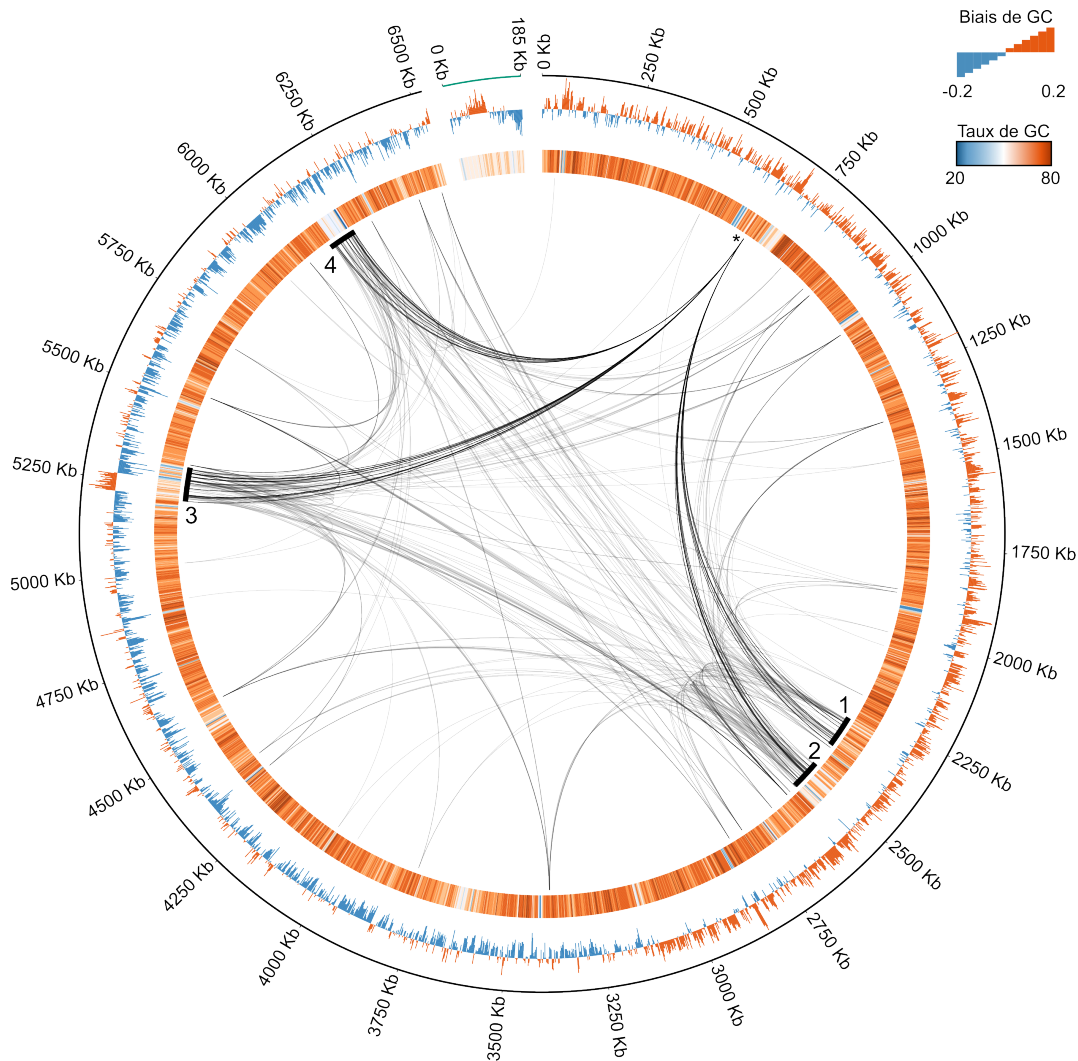


FIGURE 6.1. Représentation circulaire du chromosome de *P. paraeruginosa* IHMA87 et de son plasmide. Les cercles concentriques représentent les éléments suivants (de l'extérieur vers l'intérieur) : La longueur en Kb en noir pour le chromosome et en vert pour le plasmide ; Biais de GC ((G-C)/(G+C) tracé à l'aide d'une fenêtre de 2 kb) ; Contenu en G+C (tracé à l'aide d'une fenêtre de 2 kb) ; Les barres noires indiquent les ICEs (1,2 et 3) et l'IME (4) ; Les liens internes indiquent les fixations observées sur ces régions en DAP-seq en connectant le gène du RR à sa cible.

L'analyse des caractéristiques de l'ADN révèle certains traits associés aux éléments génétiques mobiles comme un taux de GC différents pour l'IME 4 ou un biais en GC asymétrique dans l'élément, révélant une potentielle origine de réplication pour l'ICE 3. Ces régions acquises par transfert horizontal de gène sont largement ciblées par les RRs, comme le montrent les résultats de DAP-seq, mettant en évidence leur intégration au réseau de TCSs endogène (Fig 6.1). Parmi les RRs capables de se fixer sur ces ICEs, AgtR (identifié par une *) cible fortement les 4 régions, suggérant un potentiel rôle de ce système dans la régulation de ces éléments.

6.2.2 Les ICEs contenant le locus *lysR-cusS*

Nos travaux ont permis d'identifier 77 ICEs prédites portant le locus *lysR-cusS* dans différents phylogroupes de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa*. Pour mieux apprécier la diversité de ces ICEs, les éléments ont été regroupés selon un arbre phylogénétique réduit en 20 clusters (Fig 6.2). En ce qui concerne les gènes cœurs, toutes ces ICEs ont été classées dans le groupe G et ont montré une organisation très similaire. Cependant, les gènes cargo présentent quelques variations, notamment pour les 3 gènes codant pour une pompe RND et les gènes impliqués dans la résistance à l'arsénite et au chromate qui ne sont pas toujours conservés. Cela suggère que les opérons *pcoA2* et *cusRS* ne sont pas nécessairement associés à ces gènes et peuvent être acquis avec des modules différents, bien que les prédictions de fonction n'aient pas permis d'identifier le rôle de ces autres gènes cargo. Ces ICEs sont l'illustration de la plasticité de ces éléments capables d'associer différents modules de gènes cargo aux fonctions variées.

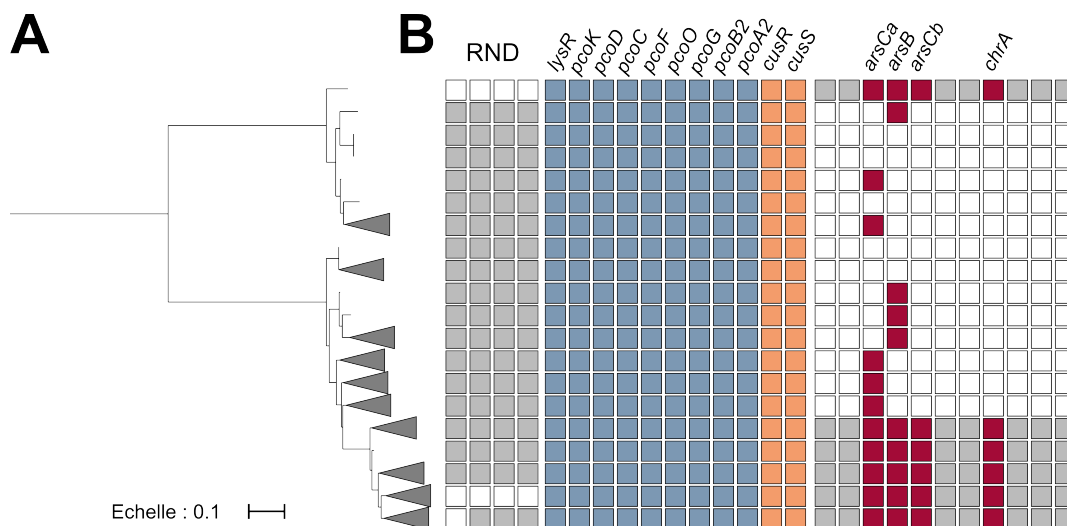


FIGURE 6.2. Diversité des ICEs de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa* portant le locus *lysR-cusS*. A) Arbre phylogénétique des 77 séquences d'ICEs identifiées. Les éléments sont regroupés en cluster selon leur distance phylogénétique avec un seuil de longueur moyenne de branche inférieur à 0,1. B) Conservation des gènes présents dans l'ICE1_IHMA.

6.3 Discussion

Résistance au cuivre chez un pathogène

Nos résultats démontrent que l'absence du système CusRS ou des protéines de l'opéron *pcoA2* diminue fortement la résistance de la souche IHMA87 au cuivre uniquement lorsque le système CopRS est absent. Il apparaît ainsi que, dans nos conditions, l'acquisition de ces éléments ne procure pas d'avantage ou que cet effet est masqué par le système endogène de réponse au cuivre. En postulant l'hypothèse que l'acquisition de cet ICE procure un avantage sélectif à l'hôte, les conditions dans lesquelles ces éléments génétiques sont bénéfiques restent à identifier. Nous avons testé des concentrations allant jusqu'à 20mM de cuivre qui sont ajoutées aux milieux au moment de l'inoculation des bactéries. On peut premièrement supposer que la variation des concentrations de cuivre et des temps d'exposition pourrait impliquer des acteurs différents. Cependant, nos résultats démontrent que le système CusRS répond à des concentrations de cuivre similaires à CopRS.

Différentes conditions ont donc été utilisées pour évaluer la contribution de ces gènes à la résistance au cuivre de cet isolat urinaire lors de la colonisation de l'hôte. Le cuivre est notamment mobilisé dans l'urine par l'hôte dans laquelle il est principalement présent sous sa forme Cu(I) pour altérer le développement des pathogènes (HYRE et al., 2017). Cependant, l'absence de CusRS n'a pas diminué la résistance de la souche à ce métal dans une culture en urine. La phagocytose des macrophages et des neutrophiles peut être stimulées par le cuivre qui améliore leur activité phagocytaire, est qui utilisé comme agent antimicrobien pour améliorer la destruction des bactéries internalisées (DJOKO et al., 2015). Il faudrait donc de caractériser le rôle de CusRS dans la résistance de *P. paraeruginosa* à la phagocytose de ces cellules immunitaires en déterminant la survie dans les cellules phagocytaires pour les différents mutants dont nous disposons.

En particulier dans les habitats pollués par l'activité humaine, la résistance aux métaux lourds est un facteur aggravant capable de co-sélectionner et de favoriser la propagation de la résistance aux antibiotiques, ce qui pose un problème de santé publique majeur (L.-G. LI et al., 2017, NGUYEN et al., 2019). La diffusion de la résistance au cuivre peut contribuer à la persistance des souches responsables d'infections nosocomiales et peut être acquise notamment via des éléments génétiques mobiles (VIRIEUX-PETIT et al., 2022). L'acquisition de groupements de gènes impliqués dans la résistance aux métaux est courante chez les bactéries et influence directement la tolérance des souches (STAEHLIN et al., 2016). Couramment, différentes résistances sont associées au sein d'un même élément comme dans l'ICE de l'ilôt génomique SGI-4 chez *Salmonella* qui confère une résistance à l'arsenic, argent et cuivre (CLARK et al., 2020).

Régulation des ICEs

La régulation des ICEs est particulièrement étudiée concernant les gènes cœurs qui peuvent être réprimés par les régulateurs codés par l'ICE. Le transfert de l'élément nécessite ainsi l'inactivation du régulateur correspondant comme pour ICEBs1 de *Bacillus subtilis* (BOSE et al., 2008). Les gènes de l'ICE peuvent aussi être réprimés par le réseau de régulation de l'hôte, comme cela a été observé chez *P. aeruginosa* avec l'ICE PAPI-1 présente chez PA14, portant notamment les gènes de l'opéron *cupD*. Cette ICE est ciblée par la NAP endogène MvaT qui réprime les gènes de son MPF. Cette répression peut être levée par NdpA2, une NAP codée par cet élément, ce qui permet au FT TrpA (Transfer of PAPI-1 regulator A) d'activer la plupart des gènes impliqués dans le transfert (DANGLA-PÉLISSIER et al., 2021).

Nos travaux illustrent l'acquisition et la régulation de gènes cargos qui sont sous le contrôle d'un TCS porté par l'ICE mais aussi des TCSs endogènes. L'acquisition d'un TCS exogène représente un défi pour le réseau de régulation en place qui s'expose à des interférences qui peuvent perturber les voies de signalisation en place. Dans le cas de ICE1_IHMA, le système CusRS forment un réseau connecté avec CopRS ce qui permet potentiellement à ce TCS accessoire d'étendre son régulon dans l'hôte. Ces gènes cargos sont aussi fortement intégrés dans le réseau endogène. Le motif reconnu par plusieurs RRs comme CusR, CopR et CzcR est un palindrome parfait qui devient le théâtre d'une forte compétition pour la fixation. Ce résultat illustre comment un promoteur acquis par HGT peut recruter des régulateurs endogènes grâce à une séquence qui favorise l'interaction avec de nombreux RRs dans des souches différentes. Souvent associées à la résistance aux antimicrobiens, les ICEs requièrent une régulation adaptée aux conditions environnementales (BOTELHO et al., 2021). Les résultats de DAP-seq suggèrent que les TCSs endogènes reconnaissent massivement ces régions acquises par HGT et pourraient jouer un rôle clé dans leur expression.

7 PA4080, UN RR ORPHELIN INTÉGRÉ AU SYSTÈME ROC

Sommaire

7.1 Immersion dans le système Roc (Article)	144
7.2 Résultats supplémentaires	190
7.2.1 Etude du rôle de RocA3	190
Formation de biofilm à l'interface air-liquide	190
Adhésion	191
Formation de microcolonies	192
7.2.2 Régulon des Roc	193
7.3 Discussion et perspectives	195
Activation du système Roc	195
Interactions des acteurs de Roc	196
Régulation de <i>mexAB-oprM</i>	196
Régulation indirecte de RocR et RocR3	196

7.1 Immersion dans le système Roc

Victor Simon, Julian Trouillon, Ina Attrée & Sylvie Elsen

Manuscrit en cours d'écriture

En explorant les données DAP-seq, un RR orphelin non caractérisé a attiré mon attention. PA4080 (dans la souche PAO1, PA14_11120 dans la souche PA14 et IHMA87_00845 dans la souche IHMA87) est un RR orphelin conservé dans les espèces *P. aeruginosa*. Sur le génome PA14, le gène PA4080 reconnaît fortement le promoteur de l'opéron *cupB* (3ème pic le plus enrichi en DAP-seq), codant pour une fimbriae de la voie chaperone-usher (*cup*) impliquée dans la formation de biofilm. L'expression de cet opéron est sous le contrôle du système Roc (*Regulation of cup*), un réseau TCS interconnecté composé d'au moins 2 HKs (RocS1 et RocS2), 2 RRs liant l'ADN (RocA1 et RocA2) et 1 RR contenant un domaine EAL (RocR). Il a été démontré que la surproduction des deux kinases Roc était responsable d'une activation de la transcription des gènes *cupB*, bien que le RR médiateur de cette activation soit jusqu'à présent inconnu puisqu'il était indépendant de RocA1 et RocA2. Ces observations nous ont permis de formuler l'hypothèse que PA4080 est le chaînon manquant du système Roc.

Notre objectif était premièrement de caractériser ce RR potentiellement impliqué dans le système Roc. En tirant le fil de ce régulateur de réponse supplémentaire, nous avons progressivement plongé dans une étude globale du système Roc par des approches de biologie moléculaire et de bio-informatique.

Nos travaux démontrent que PA4080, renommé RocA3, est l'intermédiaire par lequel RocS1 et RocS2 activent l'opéron *cupB*. En plus des fimbriae Cup et de la résistance aux antibiotiques, Roc contrôle l'expression du système à deux partenaires LepBA impliqué dans la virulence, principalement par l'intermédiaire du régulateur RocA1. L'analyse par génomique comparative de ce système dans les différentes lignées de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa* a mis en évidence la diversité de ce réseau en proposant de nouveaux acteurs dont certains sont spécifiques de certains groupes phylogénétiques.

Conception (VS, SE)

Expérimentation (VS, JT, SE)

Rédaction – écriture de la version originale (VS, SE)

Rédaction – révision et édition (VS, JT, IA, SE)

1 **Identification of new regulatory “Roc” actors in lineages**
2 **of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas paraeruginosa***

3
4
5 **Running title:** RocA3, the missing Roc response regulator

6
7 Victor Simon¹, Julian Trouillon², Ina Attree¹ and Sylvie Elsen^{1#}

8 ¹University Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Team Bacterial Pathogenesis and Cellular
9 Responses, 38054 Grenoble, France

10 ²Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zürich, 8093 Zürich, Switzerland

11 #corresponding author: sylvie.elsen@ibs.fr

12
13 **KEYWORDS:** Roc, two-component system, Cup fimbriae, crosstalk, comparative genomics

14
15 **ABSTRACT**

16 *Pseudomonas aeruginosa* is a versatile Gram-negative pathogen known for its remarkable
17 adaptability. Its ability to thrive in diverse environments and cause opportunistic infections is
18 in part attributed to complex regulatory networks, among which two-component regulatory
19 systems (TCSs) play a central role in sensing and responding to environmental cues. The Roc
20 (Regulation of cup) system is a “one-of-a-kind” network of particularly branched TCSs
21 composed of two histidine kinases (RocS1 and RocS2) interacting with three response
22 regulators (RocA1, RocR and RocA2), and regulating virulence, antibiotic-resistance and biofilm
23 formation. Overproduced RocS1 and RocS2 were known to upregulate two operons coding for
24 cup fimbriae (chaperone-usher pathway) involved in early stages of biofilm growth. We
25 identified the missing response regulator of the Roc system involved in the upregulation of
26 cupB operon, that we named RocA3. It is encoded within a locus that eroded during evolution,

27 letting *rocR3*, a *rocR*-like gene, in a specific clade of *P. aeruginosa* and in the *P. paraeruginosa*
28 species. In addition bacterial two-hybrid assays have highlighted a possible interaction
29 between each of the three Roc regulators (RocA1, RocA2 and RocR3) and the phosphorelay
30 module HptA, whose gene is contiguous to the RocA1-controlled *cupC* operon. HptA was also
31 shown to interact with the unorthodox histidine kinase PA2583, grafting this signalling
32 pathway to the Roc system. Overall, our work has broadened our vision of the Roc system,
33 proposing additional conserved actors that were identified through their genetic links in
34 certain species or clades, as well as a new actor specific to a clade.

35

36 **IMPORTANCE**

37 Two-component regulatory systems (TCSs) of *Pseudomonas aeruginosa* play a crucial role in
38 the regulatory networks orchestrating its (patho)adaptability. They often involve numerous
39 and diverse actors sensing environment, transducing the signal or mediating their
40 physiological responses. Only the knowledge of the incoming signals detected by the sensory
41 proteins would permit to evaluate the extent of crosstalk and cross-regulation occurring
42 physiologically in these dynamic branched pathways. The intricate signaling pathways formed
43 by the pleiad/plethora of TCSs in *P. aeruginosa* reveal a sophisticated regulatory network
44 elaborated through evolution. Elucidating this complexity would enhance our understanding
45 of how bacteria coordinate and fine-tune fundamental processes. Through the exploration of
46 the Roc system, our research contributes to broaden our knowledge on bacterial physiology,
47 biofilm formation, and microbial signaling by illustrating the plasticity of a TCS network in *P.*
48 *aeruginosa* elaborated through evolution.

49

50 **Introduction**

51 Biological processes involved in the life of pathogens are under control of intricate regulatory
52 networks allowing adaptation to fluctuating surroundings. Two-component regulatory systems
53 (TCSs) are widespread molecular machineries allowing bacteria to directly respond to
54 environmental cues, contributing to the organism's ability to adapt to diverse conditions (Stock
55 *et al.*, 2000; Capra and Laub, 2012; Zschiedrich *et al.*, 2016). As their name suggests, classical
56 TCSs are composed of two cognate partners involved in signal transduction through the
57 transfer of phosphate: a sensor histidine kinase (HK), often a membrane protein, and a
58 cytoplasmic response regulator (RR). The HK activity is dependent on the sensing of chemical
59 or physical signal(s), which are still unknown in most cases (Zschiedrich *et al.*, 2016). Upon
60 signal detection through its input domain(s), the HK autophosphorylates on a conserved
61 histidine residue on its transmitter domain (H domains). Then the phosphate is transferred to
62 a conserved aspartate residue on the receiver domain (D domains) of the RR, leading to its
63 activation (Stock *et al.*, 2000). As most RRs are transcription factors, the output response will
64 often be the modification of target genes expression.

65 Besides the canonical TCSs involving a two-step phosphate transfer, numerous four-step
66 phosphorelays also exist (Stock *et al.*, 2000; Zschiedrich *et al.*, 2016). In these cases, the
67 phosphate is transferred sequentially between additional domains on the HKs or on additional
68 protein partners. For instance, an “unorthodox” HK possesses two additional C-terminal
69 domains, a receiver domain and a histidine-containing phospho-transfer (Hpt) domain,
70 harboring a H1-D1-H2 organization. The phosphate is internally transferred along the His-Asp-
71 His modules before reaching the receiver domain of the cognate RR. A “hybrid” HK contains
72 an additional D1 receiver domain and requires an external Hpt protein to phosphorylate the
73 RR. In some cases, a multiplicity of interacting partners are involved, where a RR can be

74 activated by several HKs or where one HK can activate several RRs, further increasing the
75 complexity of these systems (Francis and Porter, 2019). Gene duplication, with subsequent
76 divergence and insulation, and acquisition by horizontal gene transfer (HGT) are the main
77 source of new pathway emergence (Alm *et al.*, 2006; Capra and Laub, 2012). *In silico* modeling
78 suggests that, in these cases, the rapid insulation of TCSs is necessary to limit the interactions
79 between noncognate HK and RR pairs and the fitness costs associated with these potential
80 crosstalks (Capra and Laub, 2012; Rowland and Deeds, 2014).

81 The Roc (regulation of cup) TCS in *Pseudomonas aeruginosa* stands out by its extensive
82 crosstalks and large number of interconnected actors. It is composed of two paralogous
83 unorthodox HKs (RocS1 and RocS2) interacting with three RRs (RocA1, RocA2 and RocR) (**Fig.**
84 **1A**) (Kulasekara *et al.*, 2004; Kuchma *et al.*, 2005; Sivaneson *et al.*, 2011). The proteins are
85 encoded on two different loci, encoding the Roc1 system (*rocA1* and the divergently
86 transcribed *rocR-rocS1* operon) and the Roc2 system (*rocA2-rocS2*). Despite this different
87 genetic organization, phylogenetic studies indicated that the two loci evolved by gene
88 duplication and probable genetic rearrangement (Chen *et al.*, 2004). This origin might explain
89 why both RocS1 and RocS2 are capable to interact with and activate all three Roc RRs
90 (Kulasekara *et al.*, 2004; Sivaneson *et al.*, 2011). Of these three RRs, RocA1 and RocA2 are
91 transcription factors and RocR is a c-di-GMP phosphodiesterase (Rao *et al.*, 2004; Kulasekara
92 *et al.*, 2004; Sivaneson *et al.*, 2011). The main targets of the Roc systems are two operons
93 encoding Cup fimbriae (chaperone-usher pathway), which are surface appendages (Giraud *et*
94 *al.*, 2009) involved in biofilm formation through adhesion to abiotic surface, cell-cell
95 interaction or microcolony formation (Ruer *et al.*, 2008; Giraud *et al.*, 2009; Giraud *et al.*,
96 2011). The *cupC* operon is upregulated by RocA1 while *cupB* was shown to be activated in a
97 RocS1- and RocS2-dependent manner although not by any of the three known Roc RRs,

98 suggesting the existence of a so far unknown additional regulator involved in the Roc system
99 (Kulasekara *et al.*, 2004; Sivaneson *et al.*, 2011).

100 *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen responsible for a wide range of infections in
101 humans, whose variability in virulence and antibiotic resistance capacity mainly rely on the
102 high genomic heterogeneity of its large genome (Klockgether and Tummeler, 2017).
103 Phylogenetic analyses have determined the population structure of the species, identifying 4
104 to 5 different clades (Freschi *et al.*, 2019; Ozer *et al.*, 2019; Quiroz-Morales *et al.*, 2022). The
105 clade 3 group the PA7-like strains known as taxonomic outliers (Roy *et al.*, 2010) which have
106 been recently reclassified as a new species, *Pseudomonas paraaeruginosa* (Rudra *et al.*, 2022).
107 The *P. aeruginosa*'s and *P. paraaeruginosa*'s ability to cause disease and survive in diverse
108 environments is largely due to sophisticated transcriptional regulatory networks, of which TCSs
109 are major actors (Galán-Vázquez *et al.*, 2011; Francis *et al.*, 2017). About 130 genes that code
110 for TCS partners were predicted in the genome of the *P. aeruginosa* strain PAO1 (Rodrigue *et*
111 *al.*, 2000), which emerged through both recruitment and gene duplication events (Chen *et al.*,
112 2004). Many of these TCSs were shown to be involved in key infection-related processes,
113 including motility, biofilm formation, cytotoxicity, virulence and antibiotic resistance (Francis
114 *et al.*, 2017; Sultan *et al.*, 2021).

115 Recently, we delineated the global TCS regulatory network in different strains by
116 characterizing *in vitro* all DNA-binding sites for 55 RRs of *P. aeruginosa* and *P. paraaeruginosa*
117 using DAP-seq (DNA affinity purification and sequencing) (Trouillon *et al.*, 2021). The study was
118 carried out on three reference strains, *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 (Freschi *et al.*, 2019), and
119 *P. paraaeruginosa* IHMA87 (Kos *et al.*, 2015), allowing the intra- and inter-species comparison
120 of regulatory networks through the 48 regulators that are conserved within the three strains

121 (Trouillon *et al.*, 2021). In this study, we found that several RRs were able to bind to the
122 promoter of the *cupB* operon, including the uncharacterized orphan RR PA4080 that exhibited
123 one of the strongest binding on the PA14 genome (Trouillon *et al.*, 2021). The *PA4080* gene is
124 conserved in all *P. aeruginosa* and *P. paraaeruginosa* strains and is encoded downstream of the
125 *cupB* operon and in the same orientation, supporting a functional link, as a genetic association
126 is often found between regulators and their target genes (Lawrence, 2003). This led to the
127 hypothesis that PA4080 could be the as yet unidentified member of the Roc system previously
128 suspected.

129 In the present study, we established that PA4080 is RocA3, the formerly unknown activator
130 of the *cupB* operon which is activated by overproduced RocS1 and RocS2. In addition to Cup
131 fimbriae and antibiotic resistance, Roc controls the expression of the two-partner system
132 LepBA involved in virulence, primarily through the RocA1 regulator. Comparative genomics
133 allowed the identification of several putative new players, either conserved or confined to a
134 few clades of *P. aeruginosa* and *P. paraaeruginosa*. Our work highlights the extraordinary
135 complexity of the interconnected Roc system and its numerous regulatory actors.

136 **Results**

137 **PA4080 is an activator of the *cupB* operon**

138 As mentioned above, we previously showed that PA4080 is able to bind *in vitro* upstream of
139 the *cupB1* gene, the first gene of the *cupB* operon (**Fig. 2A**), with the binding signal centered
140 at 214 bp from the coding sequence (**Fig. 2B**) (Trouillon *et al.*, 2021). This binding was only
141 observed on PA14 genome as DAPseq with PA4080 failed to provide numerous enriched
142 targets on PAO1 and IHMA87 genomes. To first assess the regulatory role of PA4080 on the

143 expression of the *cupB* operon, a transcriptional *lacZ* fusion was constructed with the
144 promoter of *cupB1* (*PcupB1-lacZ*) and integrated into the PAO1 chromosome, while *PA4080*
145 was overexpressed through the arabinose-inducible *PBAD* promoter on the pJN105 replicative
146 plasmid. As previously observed for the different *cup* operons (Kulasekara *et al.*, 2004), the
147 *cupB* operon is poorly expressed in laboratory condition, with a very low level of β -
148 galactosidase activity of the transcriptional fusion (**Fig. 2C**). However, overexpression of
149 *PA4080* strongly induced *cupB1* expression with a 350-fold increase in reporter activity,
150 confirming that *PA4080* is an activator of this operon. As the RR also bound upstream of its
151 own gene *in vitro* (**Fig. 2A**), we used a similar approach and observed that *PA4080*
152 autoregulates itself in PAO1 (**Fig. 2C**). As a control, two targets of the Roc system controlled by
153 either RocA1 or RocA2 were also tested by generating and analyzing *PcupC1-lacZ* (activated by
154 RocA1; Kulasekara *et al.*, 2004) and *PmexA-lacZ* (inhibited by RocA2; Sivaneson *et al.*, 2011).
155 Our data indicated that *PA4080* was not involved in the control of the promoters of *cupC* and
156 *mexAB-oprM* operons (**Fig. 2D**).

157 Taken together, the data indicated that *PA4080* is a direct activator of the *cupB* operon
158 and its own gene. Considering the incomplete regulatory system already known to activate
159 *cupB* expression, we hypothesized that *PA4080* was the suspected additional regulator of the
160 Roc system.

161 **PA4080 belongs to the Roc system**

162 To determine if *PA4080* belongs to the Roc system, we assessed if it could be activated by the
163 two HKs RocS1 and RocS2. To do so, we artificially activated the Roc system by overproducing
164 either RocS1 or RocS2, as previously described (Kulasekara *et al.*, 2004) (Sivaneson *et al.*,
165 2011). Using chromosomal transcriptional *lacZ* fusions as readout, the overexpression of either

166 HK-encoding gene expectedly led to an increased *PcupB1* (**Fig. 3A**) and *PcupC1* (**Fig. 3B**)
167 expression compared to the strains harboring empty vectors in the wild-type strain. The
168 fusions were then introduced in a mutant deleted of the *PA4080* gene, a double mutant
169 $\Delta rocA1\Delta rocA2$ and in a strain lacking the three RRs ($\Delta\Delta\Delta$). Deletion of *PA4080* completely
170 abolished the *cupB* operon induction triggered by either HK overproduction, indicating that
171 *cupB* expression is entirely dependent on PA4080 activity and that this RR is the previously
172 unknown regulator responsible for Roc-dependent of *cupB* regulation (Sivaneson *et al.*, 2011).
173 To confirm that the *cupB1* induction was due to the activation of PA4080 by HK
174 phosphorylation, a mutation was introduced in *PA4080* in order to mutate the conserved
175 aspartate residue into an alanine and thus prevent RR phosphorylation. This mutation
176 drastically reduced the activation of *cupB1* expression by RocS1 and RocS2 (**Fig. 3A**), indicating
177 that this induction requires a phosphorylated PA4080 protein. We also assessed the *cupB1*
178 expression in the $\Delta rocA1\Delta rocA2$ double mutant. Absence of the two RRs had no impact on the
179 activation of *cupB1* when *rocS1* was overexpressed (**Fig. 3A**), in agreement with previous
180 studies (Kulasekara *et al.*, 2004; Sivaneson *et al.*, 2011). However, we observed a small but
181 significant reduction of *cupB1* expression upon RocS2 overproduction (**Fig. 3A**). As *cupB1*
182 expression was reported to be RocA1- and RocA2-independent (Kulasekara *et al.*, 2004;
183 Sivaneson *et al.*, 2011), this might be an indirect effect explained by the RocA1 and RocA2
184 binding observed on the *PA4080* promoter *in vitro* (Trouillon *et al.*, 2021), suggesting that
185 *PA4080* expression is regulated by the two RRs. A similar loss of HK-dependent *cupB* induction
186 was observed in the absence of PA4080 and in that of the three RRs, underscoring its total
187 dependence on PA4080 (**Fig. 3A**). In these different mutant backgrounds, we also assessed the
188 expression of *cupC* operon under conditions of RocS1 or RocS2 overproduction. Consistent
189 with the lack of significant control of PA4080 on this promoter (**Fig. 2C**), inactivation of *PA4080*

190 did not substantially affect activation of *cupC1* expression, that was clearly abolished only in
191 the double $\Delta rocA1\Delta rocA2$ and triple RR mutants (**Fig. 3B**).

192 Overall, our results clearly indicated that PA4080 is part of the Roc system mediating the
193 activation of *cupB* operon by both RocS1 and RocS2 sensory kinases. We thus gave PA4080 the
194 name «RocA3».

195 **RocA1 controls expression of the *lepBA* operon**

196 Besides controlling fimbriae and MexAB-OprM synthesis, the Roc system was shown to
197 modulate synthesis of a two-partner secretion system, the LepBA system, and we suspected
198 that RocA3 could be responsible for the activation of *lepBA* expression observed upon RocS1
199 overproduction (Garnett *et al.*, 2015; Trouillon *et al.*, 2023). LepBA is a multi-effector secretion
200 system, with LepB transporting both the protease LepA and CupB5 across the outer
201 membrane. So a control by RocA3 of the two functionally related *cupB* and *lepBA* operons
202 seemed relevant. Additionally, RocA1, RocA2 and RocA3 were all found able to bind *in vitro* on
203 a same site located upstream of the *lepB* gene (**Fig. 4A**) (Trouillon *et al.*, 2021). We therefore
204 studied their potential contributions using a *PlepB-lacZ* chromosomal transcriptional fusion
205 during activation of the Roc system through *rocS2* overexpression. We observed a strong
206 activation of *lepB* expression in the wild-type genetic background (**Fig. 4B**). The deletion of
207 *rocA1* almost completely abrogated this upregulation suggesting that RocA1 is the main Roc
208 activator of the *lepBA* operon: this is in agreement with the strong DNA binding observed for
209 this RR to the promoter *in vitro* (**Fig. 4A**). Although the effects were minor, deletion of *rocA2*
210 and *rocA3* also had a negative impact on the activation of *lepBA* by RocS2 overexpression,
211 which could be explained by their lower binding intensities observed *in vitro* (Fig 4A), or minor
212 indirect effects on RocA1 synthesis or activation.

213 Consequently, the data indicated that LepBA and CupB5 synthesis depends on different
214 RRs of the Roc system, RocA1 and RocA3, respectively. However, all three RocA regulators
215 appear to potentially affect their expression under these particular conditions of HK
216 overproduction. Although the relevance may depend on the physiological dynamics of the
217 TCSs, this illustrates how an interconnected TCS network can use multiple regulators to
218 orchestrate regulation of a set of genes whose products are functionally linked.

219 **Features of the three RocA regulators**

220 The data obtained on *lepBA* prompted us to compare RocA3 with the two other RocA proteins
221 in term of predicted regulon and homology, to better apprehend their physiological roles. After
222 reanalyzes of the DAPseq data (Trouillon *et al.*, 2021), we could predict the DNA-binding sites
223 for the three RRs that presented strong similarities (**Fig. S1A**). However, only a fraction of
224 targets was shared *in vitro* by the RRs (**Fig. S1B**), among which were the *roc1* locus, the *cupB*
225 and *cupC* operons, the *lepBA* operon and *rocA3* (**Fig. S1C**).

226 RocA1 was the RR with the highest number of *in vitro* putative targets (almost 300 targets)
227 and the strongest binding to the common targets: certain RocA1's targets were confirmed *in*
228 *vivo* by others, as *roc1* locus and *cupC1* (Kulasekara *et al.*, 2004). RocA2 had only a small
229 number of targets, mostly shared with the other RocA1 and RocA3 regulators: an unexpected
230 binding to *cupC* was observed *in vitro* that was not validated by the *in vivo* studies (Sivaneson
231 *et al.*, 2011). In addition, no binding was observed on the promoter of *mexAB-oprM*, the Roc
232 target known to be downregulated by RocA2, suggesting a post-transcriptional regulation.
233 RocA3 shared almost half of its putative targets with RocA1, but its main, confirmed target is
234 *cupB1* promoter. On this promoter and that of *rocA3*, the summit of published DAPseq peaks
235 obtained with RocA3 pointed accordingly to the inferred DNA binding motif (**Fig. 2B**). Certain

236 predicted cross-regulations for common targets are surely overestimated, as in the case of
237 *cupB* and *cupC* which are known to be specifically controlled by only one of the RRs *in vivo*, at
238 least under the conditions tested (Kulasekara *et al.*, 2004; Sivaneson *et al.*, 2011).

239 We then compared the sequence and phylogeny of the three NarL-type RocA proteins.
240 RocA3 shares only 26%/48% and 27%/44 % amino acid identity/similarity with RocA1 and
241 RocA2, respectively, much less than the two paralogues with each other (60% identity/ 74%
242 similarity). To determine their evolutionary promiscuity, we constructed a phylogenetic tree
243 on all RR proteins of PAO1 (**Fig. 5A**), which largely agreed with the previous analysis that
244 omitted RocA3 and additional RRs (Chen *et al.*, 2004). RocA1 and RocA2 appeared closer to
245 PA0034 than to RocA3, in agreement with the low shared sequence identities. RocA3 is
246 grouped with the other NarL-like RRs of PAO1, suggesting that its gene might originate from
247 an early duplication occurring before that of *roc1/roc2* during species evolution. We further
248 explored the phylogeny of RR proteins in *P. paraeruginosa* IHMA87 (**Fig. 5B**) and observed that
249 the distribution of major groups was resembling, mainly with regards to RRs which probably
250 emerged through duplication (NarL-like, OmpR-like, NtrC-like). This similitude between PAO1
251 and IHMA87 phylogenetic tree underlines the proximity and common evolutionary history
252 within the two species. However, differences in the distribution exist for a few RRs as RoxR or
253 PprB, pointing to probable adaptation through evolution. In addition, RocA3 is closer to
254 IHMA87-specific RcsB than to TtsR, RcsB being encoded in the PAPI-1 pathogenicity island also
255 found in PA14 (Winsor *et al.*, 2016).

256 In conclusion, despite their phylogenic proximity and their similar binding sites, the three
257 RocA proteins control *in vivo* different sets of genes. The dynamics of the system will thus be
258 crucial for balancing expression of the Roc targets.

259 **Organization and diversity of the new *roc3* locus**

260 The *rocA3* gene is located close to the *cupB6* gene in a distinct region from the *roc1* and *roc2*
261 loci, which we called the *roc3* locus (**Fig. 6A**). In PAO1 and PA14, *cupB6* and *rocA3* are located
262 next to each other while two additional genes are predicted between them in the *P.*
263 *paraeruginosa* strain IHMA87 (Winsor *et al.*, 2016) (**Fig. 6A**). One encodes a RR similar to PAO1
264 RocR (97% sequence identity), with a C-terminal EAL domain predicted to have cyclic
265 diguanylate phosphodiesterase activity (*IHMA87_00844*): we named it RocR3. The second
266 hypothetical CDS (*IHMA87_RS04355*) codes for a putative protein with a predicted Hpt
267 domain, suggesting a potential role in a TCS phosphorelay. As indicated by the phylogenetic
268 tree (**Fig. 5D**), RocR3 is strongly related to RocR and, in a smaller extent, to PvrR, forming a
269 group of RRs with a predicted cyclic diguanylate phosphodiesterase activity that we classified
270 as VieA-like family (Ortet *et al.*, 2012). As mentioned above, RocA3 shares its most recent
271 common ancestor with RcsB whose gene is located in vicinity to *pvrR*, indicating that the *roc3*
272 locus is phylogenetically related to the *pvrSR-rscCB* locus found in PAPI-1 (Mikkelsen *et al.*,
273 2009).

274 The *P. aeruginosa* RocR protein was reported to be a negative regulator of the Roc1
275 and Roc2 systems, inhibiting expression of both *cupB* and *cupC* operons probably indirectly,
276 through degradation of c-di-GMP second messenger (Kulasekara *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2008;
277 Sivaneson *et al.*, 2011). Therefore, to determine if RocR3 is functional and possesses a RocR-
278 like cyclic diguanylate phosphodiesterase activity impacting the Roc network, we compared
279 the effect of their overproduction in PAO1 strains harboring the *PcupB* and *PcupC*
280 transcriptional *lacZ* fusions activated by pMMB-RocS2. As expected, overproduction of RocR
281 limited expression of the two operons, although slightly, the effect being more visible on the

282 *cupB* operon (**Fig. 6B**). Similarly, expression of the two operons was reduced when RocR3 was
283 overproduced, suggesting that the protein has also a phosphodiesterase activity that is able to
284 partially antagonize the activation of the RocA1-controlled *cupC* and RocA3-controlled *cupB*
285 operons.

286 The IHMA87's *roc3* locus is reminiscent of the *roc1* locus by its organization with two
287 divergent genes encoding two RRs, the transcription factor RocA3 and the cyclic diguanylate
288 phosphodiesterase RocR3, except that *rocS1* is absent (**Fig. 6A**). We looked at the conservation
289 of the *roc3* region across 494 complete genomes of *P. aeruginosa* (n=487) and *P. paraeruginosa*
290 (n=7) available in the *Pseudomonas* genome database (Winsor *et al.*, 2016). Each genome was
291 grouped to a clade based on phylogeny, using previously established nomenclature (Freschi *et*
292 *al.*, 2019), with the outlier clade 3 corresponding now to *P. paraeruginosa* (Rudra *et al.*, 2022)
293 (**Fig. S2**). We first found that *rocR3* was conserved in all *P. paraeruginosa* and all *P. aeruginosa*
294 strains of clade 4. (**Fig. 6C**). No genes were predicted between *cupB6* and *rocA3* in the two
295 main phylogenetic clades (1 and 2) and in clade 5 of *P. aeruginosa*, with the exception of two
296 strains of clade 1 carrying a gene encoding a transposase. Additionally, although the adjacent
297 Hpt-encoding gene mentioned above was specific to the IHMA87 strain, strains from clade 4
298 carry a predicted gene next to *rocR3* (**Fig. 6C**). It encodes a HisKA domain which is normally
299 found on HK, suggesting that a gene encoding an unorthodox HK (as RocS1) was present and
300 was lost during evolution by erosion.

301 In conclusion, an additional actor of the Roc system was identified in the *P. paraeruginosa*
302 IHMA87 strain, RocR3, present in the newly named *roc3* locus which harbors the core *rocA3*
303 gene. The *roc3* locus presents clade-specific gene organization suggesting gene erosion during
304 species evolution and divergence.

305 **Synteny of the Roc system suggested additional actors**

306 In PAO1 and PA14 strains lies upstream of the Roc-regulated *cupC* operon a gene encoding
307 HptA (**Fig. 7A**), one of the three Hpt proteins encoded in their genome (Winsor *et al.*, 2016).
308 As mentioned above, these Hpt proteins are intermediates for the phosphotransfer between
309 hybrid HKs and their cognate RRs. However, neither one of these protein partners is encoded
310 in the vicinity of the *hptA* gene. In order to assess if a potential partner of HptA is present in
311 other strains, we used comparative genomics to analyze the genetic environment around this
312 gene in the different *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* species. In *P. paraeruginosa* IHMA87
313 strain, we found that a gene (*IHMA87_RS21720*) encoding an orphan hybrid HK is located
314 upstream of the *hptA* gene. The orthologous gene in the genomes of PAO1 and PA14 is located
315 elsewhere between two tRNA genes, suggesting a horizontal acquisition (**Fig. 7A**). Like RocS1,
316 PA2583 possesses two predicted Sbp3 periplasmic domains, potentially involved in ligand
317 binding, and one cytoplasmic PAS domain (Kulasekara *et al.*, 2004). Although PA2583 is a
318 hybrid HK and therefore differs from RocS1 in the absence of an additional H2 domain, they
319 both share high sequence identities within their H1 and D1 domains (**Fig. 7B**). In addition, their
320 phylogenetic proximity was previously revealed by Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2004), PA2583
321 being the closest HK to RocS1 and RocS2. As the *hptA* gene is contiguous to the gene encoding
322 the predicted hybrid HK PA2583 in IHMA87, we hypothesized that they could be part of a
323 phosphorelay whose last partner, the final RR, could be a RocA RR. This was supported by the
324 observation that H2 domain of HptA is very similar to those of RocS1 and RocS2, sharing more
325 than 50% sequence identity with them. By comparison, the sequence identity of HptB and
326 HptC with these same domains drop to around 28%. Therefore sequence similarities and

327 localization close to the *cupC* operon suggested that PA2583 and HptA might be additional
328 Roc4 actors of the complex Roc system.

329 To test this hypothesis, we overproduced the cytosolic part of PA2583 HK in a strain
330 carrying a transcriptional fusion of *cupC* promoter with *lacZ*, in combination or not with the
331 overexpression of *hptA*. However no stimulating effect was observed on *cupC* expression, even
332 when the expression of the entire chromosomal *PA2583* gene was directly driven by a *PBAD*
333 promoter (data not shown). However, since there is no control target identified and no correct
334 read-out, we cannot say that it is because the proposed phosphorelay does not exist or that
335 the overproduced proteins are not active. Therefore, we probed the possible interaction of
336 PA2583 and HptA with different Roc proteins using the bacterial two-hybrid system (Karimova
337 *et al.*, 1998) used previously to study interactions in the Roc1 and Roc2 systems (Kulasekara *et*
338 *al.*, 2004; Sivaneson *et al.*, 2011). While HptB interacted with its known partner SagS as
339 expected (Hsu *et al.*, 2008), we observed that HptA was able to interact with PA2583 and the
340 D2 domains of three RRs, RocA1, RocA2 and RocR3 (**Fig. 7C,D**), revealing the first identified
341 partners for the HptA protein of *P. aeruginosa*. Therefore, based on sequence homology and
342 interaction analyses, PA2583 was proposed hereafter to be named “RocS4”.

343 Considering the different genetic environments of *hptA* in PAO1, PA14 and IHMA87 strains,
344 we further investigated it in the different *P. aeruginosa* and *P. paraaeruginosa* species (**Fig. 7E**).
345 Analysing the database previously used, *hptA* was predicted in 475/494 genomes and was used
346 as an anchor to extract the 3 genes upstream in order to assess conservation of the region. For
347 the 12 strains belonging to clades 3 and 4, *PA2583* located in vicinity to *hptA* (**Fig. 7E**).
348 Annotations of genes comprised in this region for the other clades show that the locus is
349 conserved encoding a MutT family protein, an unknown protein and a thioesterase (**Fig. S3A**).

350 Similarly, since they are conserved, *PA2581* and *PA2584* were used as boundaries to delimit
351 the locus comprising *PA2583* framed by two tRNA genes in PAO1. Both boundaries were
352 predicted in 491/494 genomes. This region appeared to be highly variable in its size ranging
353 from 3,911 to 604,833bp (**Fig. S3B**). Sequence of *PA2583* was retrieved in 472 of these regions,
354 only distributed in clades 1, 2 and 5. Overall this approach allowed us to highlight the clade-
355 specific organization of the *roc4* system as illustrated on **Fig. 8A**.

356 To conclude, genetic proximity and comparative genomics pointed to a potential
357 involvement of a hybrid kinase and the HptA protein in the regulation of *cupC* expression.
358 Interaction between the HK RocS4 and HptA as well as between this Hpt module and three
359 RRs were observed *in vivo* suggesting the existence of a phosphorelay that involves several RRs
360 of the Roc systems.

361 **Diversity and conservation of *roc* loci**

362 Organization of the 4 *roc* loci found in *the P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* species was
363 summarized in the **Fig. 8A**, with *roc1* and *roc2* loci conserved within the two species while *roc3*
364 and *roc4* loci presented clade-specific arrangements. To finalize our comparative genomics
365 analyses, conservation of the different identified Roc actors was assessed and revealed that
366 most of their encoding genes are conserved in *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* genomes
367 (**Fig 8B**). In more than 95% of the tested genomes, Roc1 (*rocS1*, *rocR*, *rocA1*), Roc2 (*rocA2*,
368 *rocS2*) and Roc3 (*rocA3*) genes were present. Retrieved in 95% and 90% of the tested genomes,
369 *hptA* and *PA2583*, respectively, were mostly conserved. Interestingly, absence of *hptA* and
370 *PA2583* rarely correlated except for 5 close clinical isolates from the clade 1 (strains ST167).
371 Being restricted to clades 3 and 4, *rocR3* is the most specific actor of the system.

372 Taken together, our data show that the one-of-a-kind interconnected Roc system is
373 mostly conserved in *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* but that the synteny of the loci
374 encoding the actors is clade-specific. More precisely, the clades 3 and 4 exhibit a specific
375 pattern with RocR3, an additional actor and PA2583 encoded in vicinity of *cupC* operon. The
376 reason behind those distinct organisations remains elusive and one can only speculate on the
377 functioning of the system in those clades based on our observation for PAO1.

378

379 **DISCUSSION**

380 This work broadened our comprehension of the Roc system in *P. aeruginosa* and *P.*
381 *paraeruginosa* species (**Fig. 1B**). Based on our previous published DAPseq data (Trouillon *et al.*,
382 2021), we identified the orphan PA4080 as the missing regulator of the Roc system controlling
383 expression of *cupB* operon. RocA3 is the fourth RR able to be activated by the unorthodox HKs
384 RocS1 and RocS2 when overproduced in the bacteria. This was probably overlooked so far as
385 molecular interaction between RocA3 and the two HKs are not observed in bacterial two-
386 hybrid assays (data not shown). In addition, we identified RocA1 as the main regulator
387 controlling expression of the *lepBA* operon, encoding a two-partner secretion system. This was
388 unexpected as LepB allows the secretion of CupB5, whose gene is RocA3-controlled.
389 Comparative genomics allowed us to identify in *P. paraeruginosa* and a specific clade (clade 4)
390 of *P. aeruginosa* a different genetic organization of the *roc3* locus around *rocA3* gene where a
391 RocR homolog was encoded, we called RocR3. The RocR and RocR3 regulators are cyclic di-
392 GMP-specific phosphodiesterases, both capable of reducing expression of *cupC* and *cupB*
393 operons when overproduced in conjunction with RocS2: this regulatory control is probably
394 indirect, resulting from the reduction of intracellular c-di-GMP levels. In addition two RocA
395 regulators, RocA1 and RocA2, were found to interact with HptA whose gene lies close to the

396 Roc-controlled *cupC* operon. In *P. paraeruginosa* and a specific clade (clade 5) of *P. aeruginosa*
397 is found contiguously to *hptA* the *PA2583* gene encoding an unorthodox HK, whose protein is
398 able to interact with HptA. This was the first report in the literature of partners for HptA, which
399 is capable of linking different RRs of the Roc system to the unorthodox HK PA2583, that we
400 called RocS4 for its implication in the Roc system. The HptA protein was also able to interact
401 with RocR3, underscoring the putative role in the Roc system of this clade-specific putative
402 actor. Overall these data modified the view we have of the Roc system, summarized **Fig 1B**,
403 with conserved actors that have been identified thanks to their genetic links in some species
404 or clade, and clade specific actors.

405 Comparative genomics indicated that downstream of the *rocR3* gene could be found
406 sequences possibly encoding different predicted fragments of an unorthodox HK, either a Hpt
407 domain (in *P. paraeruginosa*) or a HisKA domain (in *P. aeruginosa*'s clade 4) that is part of the
408 HK-specific transmitter domain (**Fig. 6C**). This had led to the "naïve" assumption that these
409 domains are the remnants of an ancestral unorthodox HK. Therefore, a putative *roc3* locus
410 with the arrangement "*rocS3R3-rocA3*" could have existed in the common ancestor of the
411 species, either duplicated from locus *roc1* that shares a similar *rocS1R-rocA1* organization, or
412 acquired by HGT; then the *rocS3* and *rocR3* genes were completely eroded in most strains,
413 leaving only *rocA3*. In *P. paraeruginosa* and *P. aeruginosa*'s clade 4, the *rocR3* gene is still
414 present with "*rocS3*" stigmas that are different in the two phylogroups. Therefore, the
415 duplicated locus whose actors were probably maintained in the Roc system was differentially
416 shaped by erosion maintaining *rocA3* and *rocR3* in certain clades and species. As already
417 mentioned, RocA3 shares fewer sequence identities and similarities with RocA1 and RocA2,
418 than these two paralogues with each other.

419 Differences in gene arrangement also pointed to the *PA2583* gene which was found
420 genetically linked to the *cupC* operon and *hptA* gene specifically in *P. paraeruginosa* and *P.*
421 *aeruginosa*'s clade 5. As genes of TCSs are often adjacent to the genes they regulate, this
422 suggested that the hybrid HK and the Hpt module could be part of a phosphorelay involved in
423 the regulation of RocA1-controlled *cupC* operon. Our bacterial two-hybrid approach suggested
424 indicated that a phosphorelay involving PA2583 and HptA proteins may exist and be part of
425 the Roc pathway, as HptA can interact with both PA2583 and different RR actors of the Roc
426 system. PA2583 was therefore renamed RocS4 to indicate that it probably belongs to the Roc
427 system. Unfortunately, the overproduction of the PA2583 HK did not activate the expression
428 of different *cup* operons (not shown). Therefore, in absence of identified targets as readout
429 for HK activity, we could not confirm the existence of the phosphorelay in bacteria. A previous
430 study indicated that, although capable to autophosphorylate *in vitro*, recombinant RocS4 was
431 unable to transfer its phosphate to any of the three Hpt proteins present in the PAO1 strain
432 (Hsu *et al.*, 2008). In addition, HptA was not phosphorylated by any of the recombinant orphan
433 hybrid HKs either (Hsu *et al.*, 2008); therefore our study is the first report of putative
434 interactants for this signaling pathway intermediate that is poorly known. HptA is very similar
435 to the H2 domain of RocS1 and RocS2, sharing about 50 % sequence identity, so consistent
436 with its interaction with RocA1 and RocA2. Further studies on the molecular interconnections
437 within the Roc system would highly beneficiate from the identification of activation
438 conditions.

439 In Roc signaling pathways, the HKs RocS1 and RocS2 are able to interact and activate
440 multiple RRs, whose genes are located in different loci, when detecting unidentified signals.
441 These HKs possess different sensory domains, potentially offering the integration of various
442 incoming signals. Indeed, like predicted in the hybrid HK PA2583, RocS1 possesses two

443 consecutive solute binding proteins (SBP) domains belonging to the SBP_bac_3 (PF00497)
444 family, which are often known to detect amino acids (Matilla *et al.*, 2021). Additionally, the
445 three HKs possess a cytoplasmic PAS (Per-Arnt-Sim) domain that might be involved in protein
446 dimerization, bind a ligand or sense oxygen/redox sensing (Henry and Crosson, 2011). As Roc
447 system is able to downregulate the antibiotic resistance capability of the bacteria while
448 activating its biofilm formation, it was suggested that it might be important for the adaptation
449 to the lung of cystic fibrosis (CF) patients, detecting this particular environment (Sivaneson *et*
450 *al.*, 2011). Signals perceived by HKs are rarely known and study of TCSs often involves their
451 artificial activation, which can be achieved by overexpressing the RR or HK genes, as we did in
452 the study. However, this is not always efficient, as observed for PA2583, and predicting the
453 outcome of such overexpression is tricky. Indeed competitions between different TCS players
454 involve finely tuned concentrations of HKs and RRs for a proper signal transduction. For
455 instance, HKs are usually less numerous than RRs to favor out-competition within RRs and
456 reduce cross-talks with noncognate RRs (Laub and Goulian, 2007; Siryaporn and Goulian,
457 2008). Many examples of cross-talks due to HK overproduction are documented in literature
458 as that of the constitutively active NtrB of *E. coli* crossregulating with CheY in a *cheA* mutant
459 (Ninfa *et al.*, 1988). In addition, phosphotransfer efficiency can be different between HK and
460 its multiple partners as shown for the asymmetric crosstalk between NarXL and NarQP, with
461 NarX interacting preferentially with NarL (Noriega *et al.*, 2010). Last, but not least, HKs can be
462 bifunctional, controlling both phosphorylation and dephosphorylation of the cognate RR(s).
463 Therefore, artificially activating a system might result in hazardous outcome that should be
464 distinguished from a natural *in vivo* activation. In our case, we do not know if RocS1 and RocS2
465 are bifunctional HKs and their overproduction activates the signaling pathways only in M63
466 medium, not LB suggesting a potential lock, lifted in favorable medium. Considering the

467 complexity of the physiological functioning of TCS signaling, the observed cross-talks with the
468 Roc actors by *in vivo* overexpression should not be considered as an irrefutable
469 demonstration, but more like a tendency or a possibility of the system to interact. Only the
470 activation of the HKs by their physiological signals could allow normal functioning of the
471 systems, integrating all the dynamics of the different partners, and would allow us to
472 determine the exact extent of cross-talk and cross regulation.

473 Why have the bacteria maintained all the interconnected TCSs of the Roc system? When
474 TCSs are duplicated, the proteins normally need to gain rapidly new functions rapidly in order
475 to be maintained through different mechanisms are involved as changes in HK sensory
476 domains and pathway inputs or changes in RRs and pathway outputs (Capra and Laub, 2012).
477 Although the complex evolutionary history of the Roc partners has not been elucidated yet
478 and would benefit of a better knowledge of that of the *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa*
479 species, several of these mechanisms mentioned occurred to allow the maintenance of
480 regulatory genes of the duplicated *roc1* and *roc2* loci. Indeed RocS1 has specific periplasmic
481 sensory domains that its closest paralog RocS2 does not possess, indicating they have
482 undergone rearrangement of their sensory domains. In addition, even if the identified binding
483 sites are very similar, the RocA1 and RocA2 regulators were shown *in vivo* to control different
484 targets, indicating that their transcriptional activity has differed (binding capability or
485 interaction with RNA polymerase). As mentioned above, the interference observed between
486 these multiple players needs to be confirmed, in particular by identifying the stimuli for these
487 systems. It is possible that the interactions observed between the partners are more specific
488 in conditions of physiological activation based on modification of specificity-determining
489 residues.

490 To conclude, TCS conservation within species is variable and, as we showed in *P. aeruginosa*
491 and *P. paraaeruginosa*, the distribution of those regulatory proteins is one of the major actor of
492 strain-dependent diversity of the regulatory network ((Trouillon *et al.*, 2021); Elsen *et al.* 2023).
493 Our work illustrated how a one-of-a kind TCS network, mostly conserved in *P. aeruginosa* and
494 *P. paraaeruginosa* species, was differentially shaped in these species through loss and
495 recruitment of different actors.

496

497 **MATERIALS AND METHODS**

498 **Bacterial Strains and Growth Conditions.** The *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* strains used
499 in this study are described in Table S1. Bacteria were grown aerobically in lysogeny broth (LB)
500 or in M63 minimal medium (100 mM KH₂PO₄, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 1.7 μM FeSO₄, 1 mM MgSO₄,
501 0.2% glucose, 0.5% casamino acids, pH7) at 37°C. *P. aeruginosa* was also cultured on
502 Pseudomonas Isolation Agar plates (PIA Difco). To assess β-galactosidase activities of strains
503 carrying chromosome-integrated *lacZ* fusions, LB-grown cells were diluted at OD₆₀₀ of 0.1 in
504 M63 medium with the appropriate antibiotics and inducers (0.5% arabinose for pJN105-
505 derived plasmids; 10 μM IPTG for pMMB-rocS1 and 1 mM IPTG for pMMB-rocS2) when
506 required and incubated with shaking for 6 hours before assays were carried out. Antibiotics
507 were added at the following concentrations (in μg/ml):100 ampicillin (Ap), 10 chloramphenicol
508 (Cm), 50 gentamicin (Gm), 10 tetracycline (Tc) for *E. coli*; 300 carbenicillin (Cb), 200 Gm, 200
509 Tc on PIA plates, 200 Cb and 120 Gm in LB liquid culture for *P. aeruginosa*.

510 **Plasmids and genetic manipulation.** The plasmids utilized in this study and the primers used
511 for PCR are listed in Tables S1 and S2, respectively. All the constructions were verified by
512 sequencing.

513 To generate *P. aeruginosa* deletion mutants, upstream (sF1/sR1) and downstream
514 (sF2/sR2) flanking regions of the different genes were fused and cloned into *Sma*I-cut pEXG2
515 plasmid by sequence- and ligation-independent cloning (SLIC) using the appropriate primer
516 pairs (Li and Elledge, 2007). The same strategy was used to create the point mutation within
517 the *rocA3* sequence, the overlapping primers generating the mutation. To create the
518 transcriptional *lacZ* fusions, fragments comprising the ATG and around 500 pb upstream of
519 each analysed target were amplified using the appropriate pairs (sF/sR) and inserted into *Sma*I-

520 cut miniCTX-TrnB-lacZ by SLIC. To express genes under the *PBAD* promoter, sequences
521 containing the entire coding sequences with 50 bp upstream were amplified using the
522 appropriate pairs (sF/sR) and inserted into *SmaI*-cut pJN105 by SLIC. For the plasmids used in
523 the bacterial two-hybrid systems, the sequences were amplified using the appropriate pairs
524 (sF/sR) and inserted into *Bam*HI-cut pKT25 or pUT18c by SLIC: this created hybrid proteins with
525 heterologous proteins fused to the C-terminal of T25 and T18 fragment of the *Bordetella*
526 *pertussis* adenylate cyclase, respectively.

527 The pJN105- and pMMB-derived plasmids were introduced in *P. aeruginosa* by
528 transformation while the pEXG2- and miniCTX-TrnB-lacZ-derived vectors were transferred
529 into *P. aeruginosa* strains by triparental mating using the helper plasmid pRK600. Allelic
530 exchanges for mutagenesis were selected as previously described (Berry *et al.*, 2018). To excise
531 the miniCTX backbone of strains carrying the *lacZ* fusions, the pFLP2 plasmid was first
532 introduced in the cells and, in a second step, the bacteria were streaked on medium containing
533 5% sucrose to select for the loss of pFLP2. To create the mutant encoding the RocA3_{D58A}
534 protein, the mutated sequence was introduced in the Δ *rocA3* mutants to replace the deleted
535 gene.

536 **β -galactosidase activity assay.** β -galactosidase activity was assessed as previously described
537 (Miller, 1977; Thibault *et al.*, 2009), at least in triplicate. Activities were expressed in Miller
538 Unit (MU) and the error bars on the graphs indicate the standard error of the mean (SEM).
539 When relevant, statistical significance was assessed using ANOVA test with Tukey's method.

540 **The bacterial two-hybrid assay.** It was conducted as previously described (Kulasekara *et al.*,
541 2004). The nomenclature used to define the proteins was as followed: the transmitter domain
542 of HK carrying the conserved histidine residue is called H1. Unorthodox HKs possess additional

543 domains called D1 and H2. The receiver domain of the RR carrying the conserved aspartate
544 residue is the domain D2. The positive controls used were the plasmids pKT25-HptB and
545 pUT18c-SagS-D1. The pKT25- and pUT18c-derived plasmids were co-transformed in the DHM1
546 strain using heat shock and single colonies were patched on LB containing 5-bromo-4-chloro-
547 3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) at 40 µg/ml and 1 mM IPTG. Positive interactions
548 were identified as blue colonies on X-gal after 24 h incubation at 30°C. Colonies were
549 resuspended in water for β-galactosidase assays.

550 **DAP-seq analysis.** Published DAP-seq data were collected with GEO Series accession number
551 GSE179001 (Trouillon *et al.*, 2021). DNA-binding motif discoveries were performed with
552 MEME-ChIP (Machanick and Bailey, 2011). Relative fold-enrichments were calculated for each
553 RR on each genome. The PA14 dataset was used based on quality thresholds because the
554 PA4080 experiment with PAO1 genome didn't yield sufficient DNA enrichment.

555 **Phylogenetic analyses.** Phylogenetic analyses of *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* were
556 performed as previously described (Elsen *et al.*, to be published). For phylogenetic analyses of
557 RRs, 73 RRs of PAO1 were identified in P2CS, and 74 RRs of IHMA87 were identified from
558 collected proteins with “phosphorelay response regulator activity” or “phosphorelay signal
559 transduction system” gene ontology term search on Pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2016).
560 Proteins were aligned with MAFFT (Kato and Standley, 2013) and Maximum-likelihood tree
561 was build using FASTTREE (Price *et al.*, 2009) with default parameters. Trees were visualized
562 and annotated using iTOL (Letunic and Bork, 2021).

563 **Bioinformatics analyses.** To assess conservation of genes at the species level, homolog
564 determination was performed by Reciprocal Best Hit (RBH) analysis (Cock *et al.*, 2015) with
565 minimum percentage alignment coverages of 90 and sequence identities of 50 on the

566 European Galaxy server (The Galaxy Community *et al.*, 2022). Sequences alignment and
567 visualization were done with clinker (Gilchrist and Chooi, 2021). Domain predictions were
568 performed on InterPro (Paysan-Lafosse *et al.*, 2023) and sequence homologies were evaluated
569 with Clustal Omega (Madeira *et al.*, 2022).

570

571 **BIBLIOGRAPHY**

572 Alm, E., Huang, K., and Arkin, A. (2006) The Evolution of Two-Component Systems in Bacteria Reveals
573 Different Strategies for Niche Adaptation. *PLoS Comput Biol* **2**: e143.

574 Berry, A., Han, K., Trouillon, J., Robert-Genthon, M., Ragno, M., Lory, S., *et al.* (2018) cAMP and Vfr
575 Control Exolysin Expression and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomic Outliers. *J*
576 *Bacteriol* **200**.

577 Capra, E.J., and Laub, M.T. (2012) Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu*
578 *Rev Microbiol* **66**: 325–347.

579 Chen, Y.-T., Chang, H.Y., Lu, C.L., and Peng, H.-L. (2004) Evolutionary Analysis of the Two-Component
580 Systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Mol Evol* **59**: 725–737.

581 Cock, P.J.A., Chilton, J.M., Grüning, B., Johnson, J.E., and Soranzo, N. (2015) NCBI BLAST+ integrated
582 into Galaxy. *GigaSci* **4**: 39.

583 Francis, V.I., and Porter, S.L. (2019) Multikinase Networks: Two-Component Signaling Networks
584 Integrating Multiple Stimuli. *Annu Rev Microbiol* **73**: 199–223.

585 Francis, V.I., Stevenson, E.C., and Porter, S.L. (2017) Two-component systems required for virulence in
586 *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **364**.

587 Freschi, L., Vincent, A.T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J.G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.J., *et al.*
588 (2019) The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure,
589 Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol Evol* **11**: 109–120.

590 Galán-Vásquez, E., Luna, B., and Martínez-Antonio, A. (2011) The Regulatory Network of
591 *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Inform Exp* **1**: 3.

592 Garnett, J.A., Muhl, D., Douse, C.H., Hui, K., Busch, A., Omisore, A., *et al.* (2015) Structure-function
593 analysis reveals that the *Pseudomonas aeruginosa* Tps4 two-partner secretion system is involved in
594 CupB5 translocation. *Protein Sci* **24**: 670–87.

595 Gilchrist, C.L.M., and Chooi, Y.-H. (2021) clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster
596 comparison figures. *Bioinformatics* **37**: 2473–2475.

597 Giraud, C., Bernard, C., Ruer, S., and De Bentzmann, S. (2009) Biological ‘glue’ and ‘Velcro’: molecular
598 tools for adhesion and biofilm formation in the hairy and gluey bug *Pseudomonas aeruginosa*: *P.*
599 *aeruginosa* toolkit for community lifestyle. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 343–358.

600 Giraud, C., Bernard, C.S., Calderon, V., Yang, L., Filloux, A., Molin, S., *et al.* (2011) The PprA-PprB two-
601 component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-
602 usher pathway system assembling fimbriae: *P. aeruginosa* CupE fimbriae. *Environmental Microbiology*
603 **13**: 666–683.

604 Henry, J.T., and Crosson, S. (2011) Ligand-Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural
605 Context. *Annu Rev Microbiol* **65**: 261–286.

606 Hsu, J.-L., Chen, H.-C., Peng, H.-L., and Chang, H.-Y. (2008) Characterization of the Histidine-containing
607 Phosphotransfer Protein B-mediated Multistep Phosphorelay System in *Pseudomonas aeruginosa*
608 PAO1. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 9933–9944.

609 Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a
610 reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5752–5756.

611 Katoh, K., and Standley, D.M. (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7:
612 Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 772–780.

613 Klockgether, J., and Tummeler, B. (2017) Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa*
614 as a pathogen. *F1000Res* **6**: 1261.

615 Kos, V.N., Déraspe, M., McLaughlin, R.E., Whiteaker, J.D., Roy, P.H., Alm, R.A., *et al.* (2015) The
616 Resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in Relationship to Phenotypic Susceptibility. *Antimicrob*
617 *Agents Chemother* **59**: 427–436.

618 Kuchma, S.L., Connolly, J.P., and O’Toole, G.A. (2005) A Three-Component Regulatory System
619 Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**:
620 1441–1454.

621 Kulasekara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A., and Lory, S. (2004) A novel two-
622 component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes:
623 Regulation of *P. aeruginosa* Cup fimbriae by Roc 1. *Molecular Microbiology* **55**: 368–380.

624 Laub, M.T., and Goulian, M. (2007) Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu*
625 *Rev Genet* **41**: 121–145.

626 Lawrence, J.G. (2003) Gene Organization: Selection, Selfishness, and Serendipity. *Annu Rev Microbiol*
627 **57**: 419–440.

628 Letunic, I., and Bork, P. (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree
629 display and annotation. *Nucleic Acids Research* **49**: W293–W296.

630 Li, M.Z., and Elledge, S.J. (2007) Harnessing homologous recombination in vitro to generate
631 recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* **4**: 251–256.

632 Machanick, P., and Bailey, T.L. (2011) MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics*
633 **27**: 1696–1697.

- 634 Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A.R.N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., *et al.* (2022) Search and
635 sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research* **50**: W276–W279.
- 636 Matilla, M.A., Ortega, Á., and Krell, T. (2021) The role of solute binding proteins in signal transduction.
637 *Computational and Structural Biotechnology Journal* **19**: 1786–1805.
- 638 Mikkelsen, H., Ball, G., Giraud, C., and Filloux, A. (2009) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD
639 Fimbrial Genes Is Antagonistically Controlled by RcsB and the EAL-Containing PvrR Response
640 Regulators. *PLoS ONE* **4**: e6018.
- 641 Miller, J.H. (1977) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
642 Harbor (N.Y.).
- 643 Ninfa, A.J., Ninfa, E.G., Lupas, A.N., Stock, A., Magasanik, B., and Stock, J. (1988) Crosstalk between
644 bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon:
645 evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer
646 mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5492–5496.
- 647 Noriega, C.E., Lin, H.-Y., Chen, L.-L., Williams, S.B., and Stewart, V. (2010) Asymmetric cross-regulation
648 between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from
649 *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology* **75**: 394–412.
- 650 Ortet, P., De Luca, G., Whitworth, D.E., and Barakat, M. (2012) P2TF: a comprehensive resource for
651 analysis of prokaryotic transcription factors. *BMC Genomics* **13**: 628.
- 652 Ozer, E.A., Nnah, E., Didelot, X., Whitaker, R.J., and Hauser, A.R. (2019) The Population Structure of
653 *Pseudomonas aeruginosa* Is Characterized by Genetic Isolation of exoU+ and exoS+ Lineages. *Genome*
654 *Biology and Evolution* **11**: 1780–1796.
- 655 Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B.L., Salazar, G.A., *et al.* (2023) InterPro
656 in 2022. *Nucleic Acids Research* **51**: D418–D427.
- 657 Quiroz-Morales, S.E., García-Reyes, S., Ponce-Soto, G.Y., Servín-González, L., and Soberón-Chávez, G.
658 (2022) Tracking the Origins of *Pseudomonas aeruginosa* Phylogroups by Diversity and Evolutionary
659 Analysis of Important Pathogenic Marker Genes. *Diversity* **14**: 345.
- 660 Rao, F., Yang, Y., Qi, Y., and Liang, Z.-X. (2008) Catalytic Mechanism of Cyclic Di-GMP-Specific
661 Phosphodiesterase: a Study of the EAL Domain-Containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J*
662 *Bacteriol* **190**: 3622–3631.
- 663 Rao, P.S., Yamada, Y., Tan, Y.P., and Leung, K.Y. (2004) Use of proteomics to identify novel virulence
664 determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol* **53**: 573–86.
- 665 Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., and Foglino, M. (2000) Cell signalling by
666 oligosaccharides. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in*
667 *Microbiology* **8**: 498–504.
- 668 Rowland, M.A., and Deeds, E.J. (2014) Crosstalk and the evolution of specificity in two-component
669 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 5550–5555.
- 670 Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., *et al.* (2010) Complete Genome
671 Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE* **5**: e8842.

672 Rudra, B., Duncan, L., Shah, A.J., Shah, H.N., and Gupta, R.S. (2022) Phylogenomic and comparative
673 genomic studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains: proposal
674 to transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraaeruginosa* sp. nov.
675 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **72**
676 <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.005542>. Accessed
677 March 15, 2023.

678 Ruer, S., Ball, G., Filloux, A., and Bentzmann, S. de (2008) The “P-usher”, a novel protein transporter
679 involved in fimbrial assembly and TpsA secretion. *EMBO J* **27**: 2669–80.

680 Siryaporn, A., and Goulian, M. (2008) Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR
681 two-component systems in *E. coli*. *Molecular Microbiology* **70**: 494–506.

682 Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., and Filloux, A. (2011) Two-component regulatory
683 systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene
684 expression. *Mol Microbiol* **79**: 1353–66.

685 Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev*
686 *Biochem* **69**: 183–215.

687 Sultan, M., Arya, R., and Kim, K.K. (2021) Roles of Two-Component Systems in *Pseudomonas*
688 *aeruginosa* Virulence. *IJMS* **22**: 12152.

689 The Galaxy Community, Afgan, E., Nekrutenko, A., Grüning, B.A., Blankenberg, D., Goecks, J., *et al.*
690 (2022) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022
691 update. *Nucleic Acids Research* **50**: W345–W351.

692 Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I., and Elsen, S. (2009) Anti-activator ExsD Forms a 1:1 Complex
693 with ExsA to Inhibit Transcription of Type III Secretion Operons. *Journal of Biological Chemistry* **284**:
694 15762–15770.

695 Trouillon, J., Attrée, I., and Elsen, S. (2023) The regulation of bacterial two-partner secretion systems.
696 *Mol Microbiol* **120**: 159–177.

697 Trouillon, J., Imbert, L., Villard, A.-M., Vernet, T., Attrée, I., and Elsen, S. (2021) Determination of the
698 two-component systems regulatory network reveals core and accessory regulations across
699 *Pseudomonas aeruginosa* lineages. *Nucleic Acids Res* **49**: 11476–11490.

700 Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., and Brinkman, F.S.L. (2016) Enhanced
701 annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas*
702 genome database. *Nucleic Acids Res* **44**: D646–D653.

703 Zschiedrich, C.P., Keidel, V., and Szurmant, H. (2016) Molecular Mechanisms of Two-Component
704 Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology* **428**: 3752–3775.

705

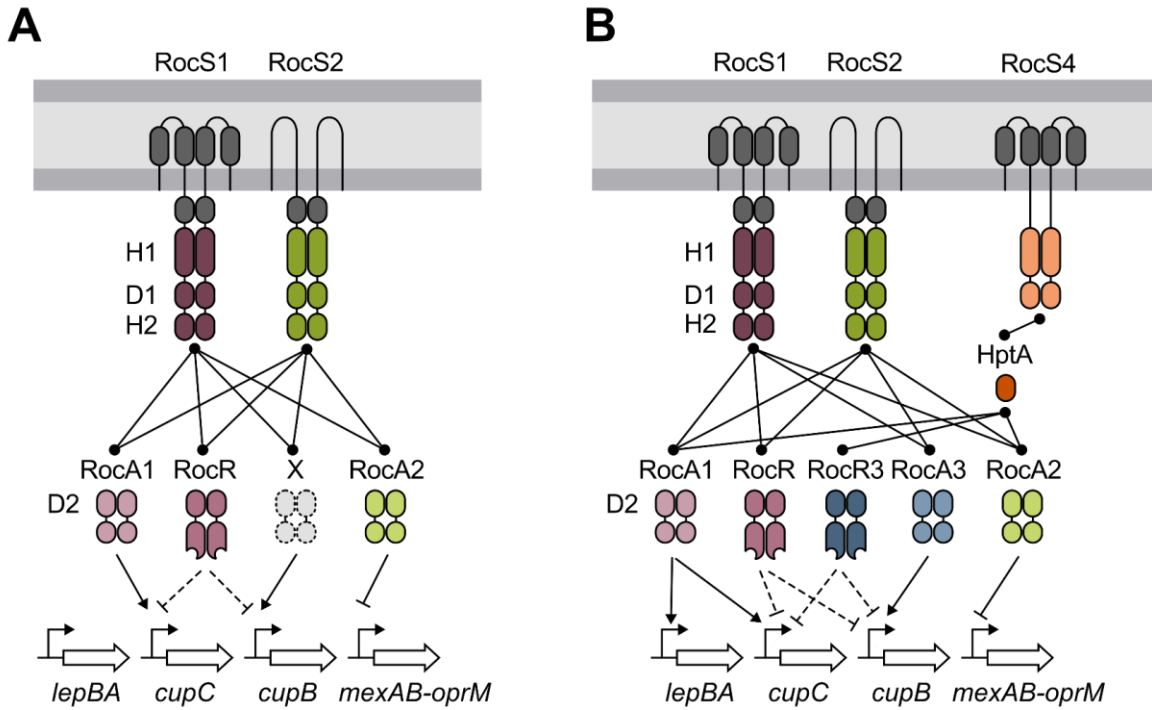


FIG 1. Schematic model of the Roc signalling pathways (A) The Roc system at the beginning of the study. RocR inhibits *cupC* and *cupB* through c-di-GMP degradation. (B) The full picture of the Roc system, with RocA3 (PA4080) which was the former X regulator, and the *lepBA* operon which is now known to be regulated mainly by RocA1. The system was extended with both potential new players as the phosphorelay comprising HptA and the hybrid HK PA2583, named RocS4, and the cyclic diguanylate phosphodiesterase RocR3 found in a few *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* strains. Represented domains are according to PFAM nomenclature; SBP_bac_3 (periplasmic grey domain), PAS_4 (cytosolic grey domain), HisKA and HATPase_c (H1), Response_reg (D1 and D2), Hpt (H2) and either GerE or EAL (concave) for output domain of RRs.

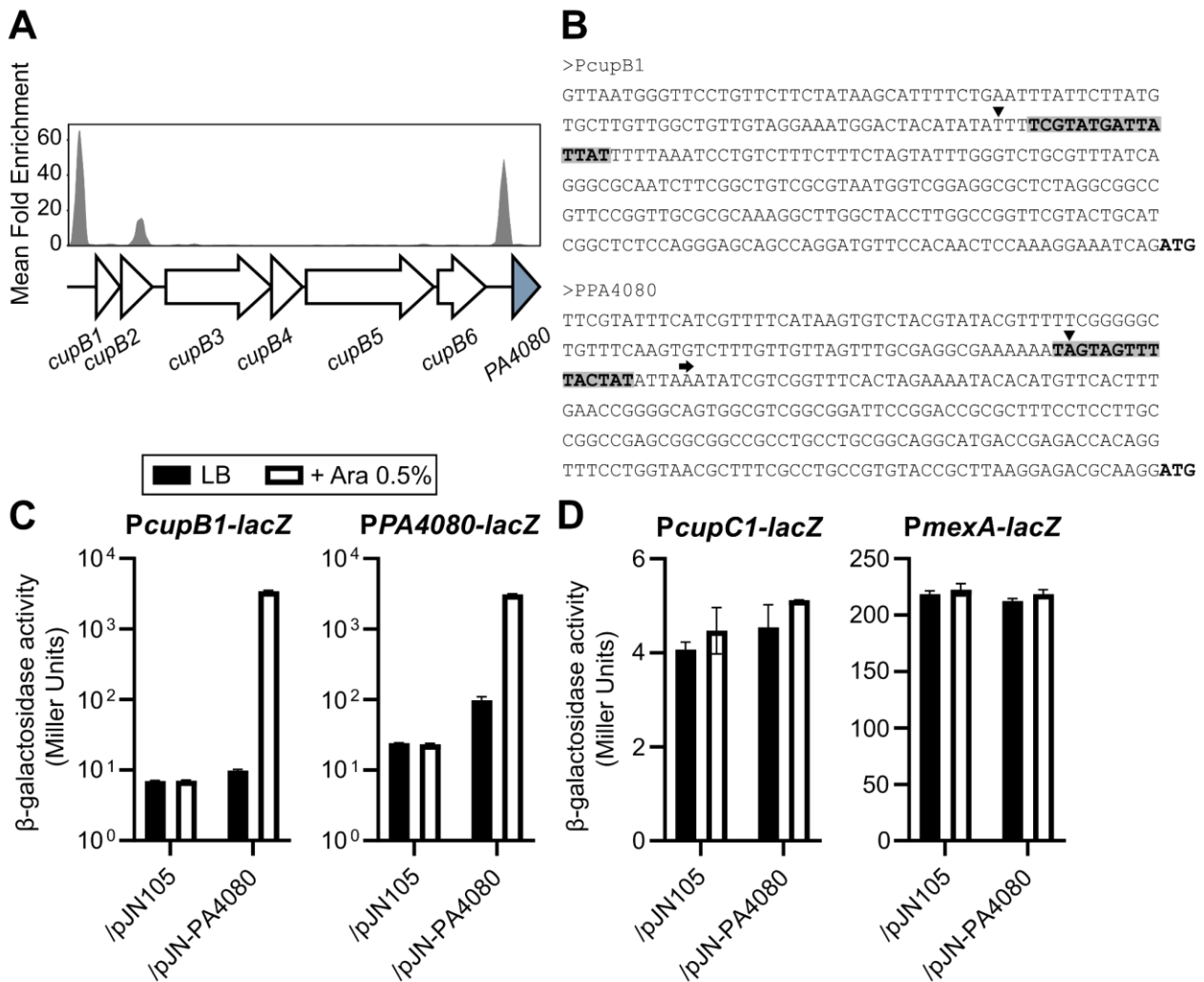
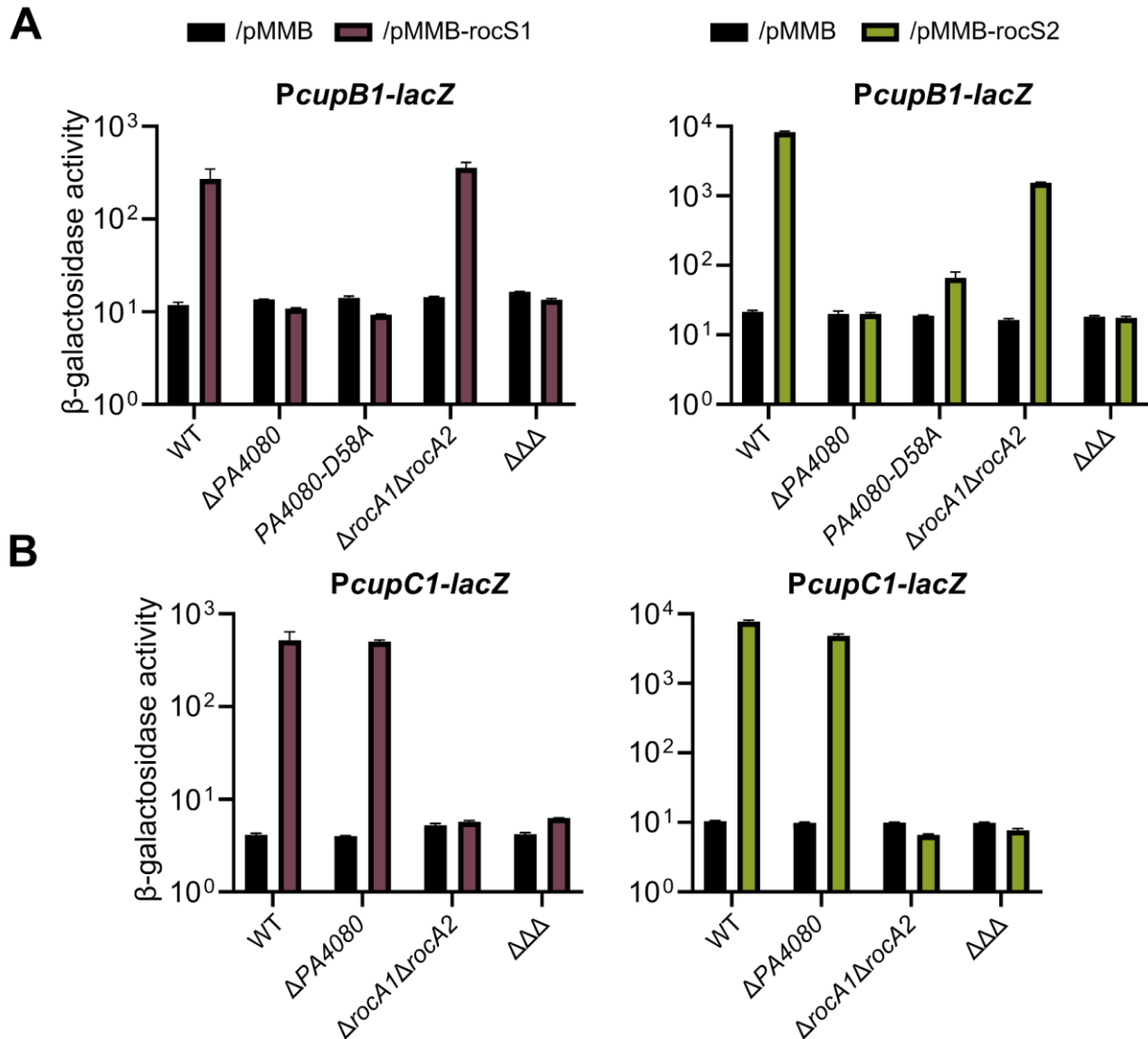


FIG 2. PA4080 regulates *cupB* operon and its own expression (A) Reanalyses of previously published data on PA14 genome (Trouillon et al., 2021) showing enrichment coverage track of DAP-seq against negative control for the RR PA4080 on the indicated locus. (B) Upstream sequences of the *cupB1* and *PA4080* genes. The ATG of each coding sequence is indicated as well as the location of the transcriptional start site of *PA4080* (star). The MEME-ChIP predicted binding site for PA4080 on each sequence is in bold and colored in grey, with the top of the peak of the DAPseq (Trouillon et al., 2021) pointed with triangle. (C,D) β -galactosidase activities of the indicated strains harboring the *PcupB1-lacZ*, *PPA4080-lacZ* (C), *PcupC1-lacZ* or *PmexA-lacZ* (D) transcriptional fusions. Strains also carried either the empty pJN105 or the pJN-PA4080 plasmid, and expression of *PA4080* was induced with 0.5% arabinose for 2.5 hours in LB medium. Experiments were performed in triplicate and the error bars depict the SEM.



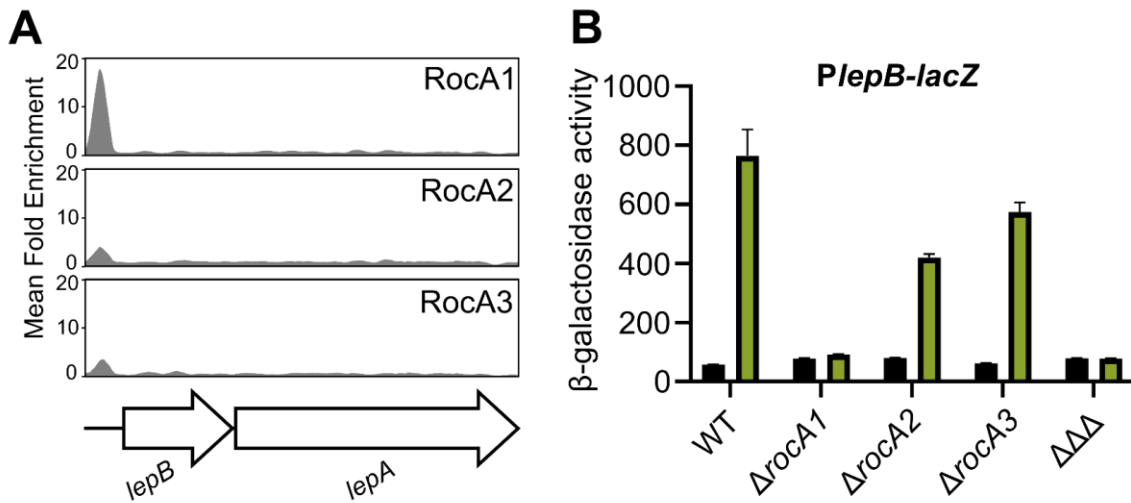


FIG 4. RocA1 controls the synthesis of LepBA system (A) Reanalyses of previously published data on PA14 genome (Trouillon et al., 2021) showing enrichment coverage track of DAP-seq against negative control for the three RocA regulators on the *lepBA* upstream region. (B) β -galactosidase activities of the strains and mutants harboring the *PlepB-lacZ* fusion integrated into the chromosome. Strains also carried either the empty pMMB (black bars) or pMMB-rocS2 (green bars) plasmid and expression of the HK was induced with IPTG for 6 hours in M63 medium. $\Delta\Delta\Delta$ corresponds to the triple mutant $\Delta rocA1\Delta rocA2\Delta rocA3$. Experiments were performed in triplicate and the error bars represent the SEM.

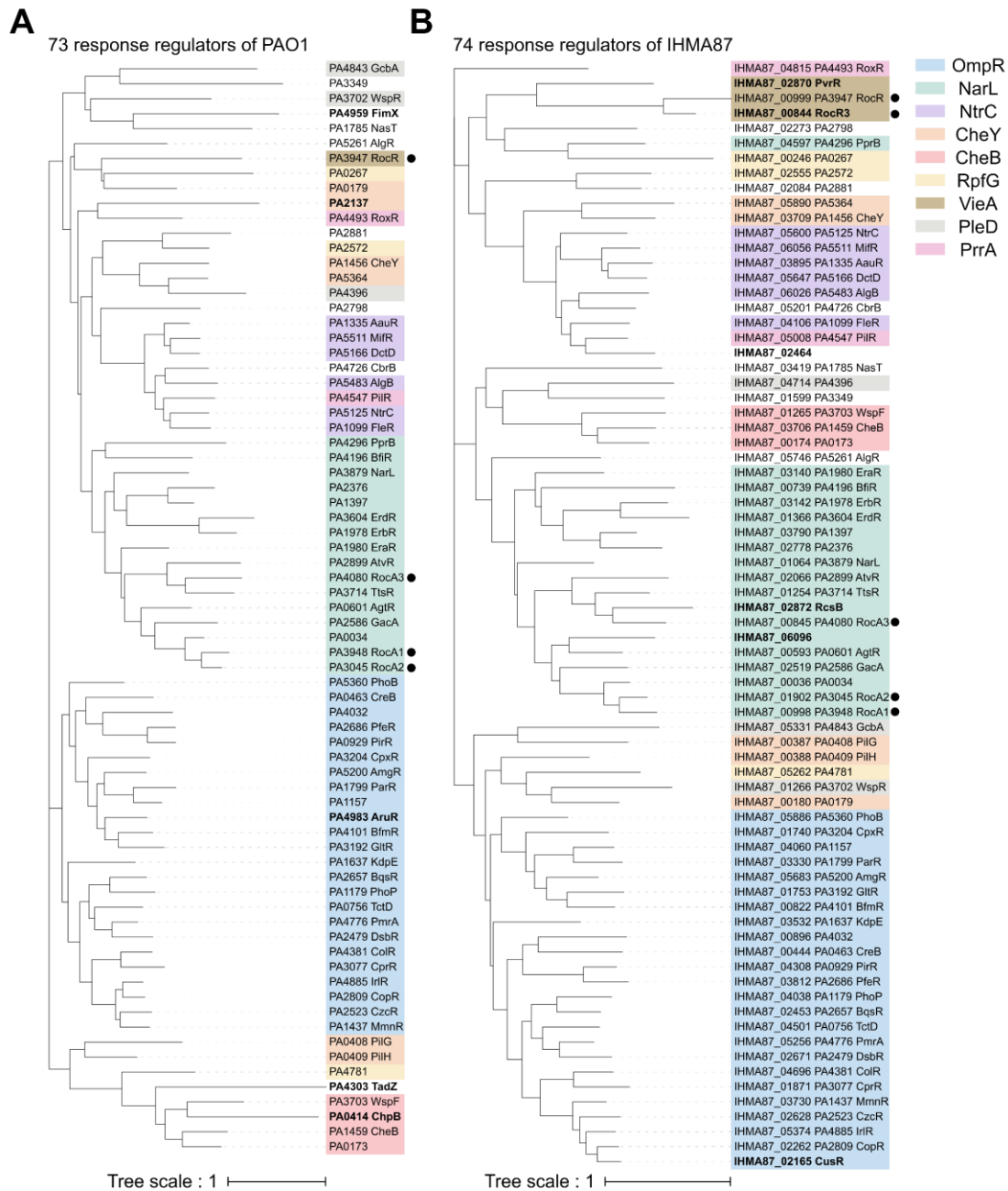


FIG 5. Phylogenetic tree of response regulators proteins in PAO1 (A) and IHMA87 (B). Bold labels indicate strain-specific proteins. RRs of the Roc system are highlighted by black dot. Colored according to family predicted in P2CS.

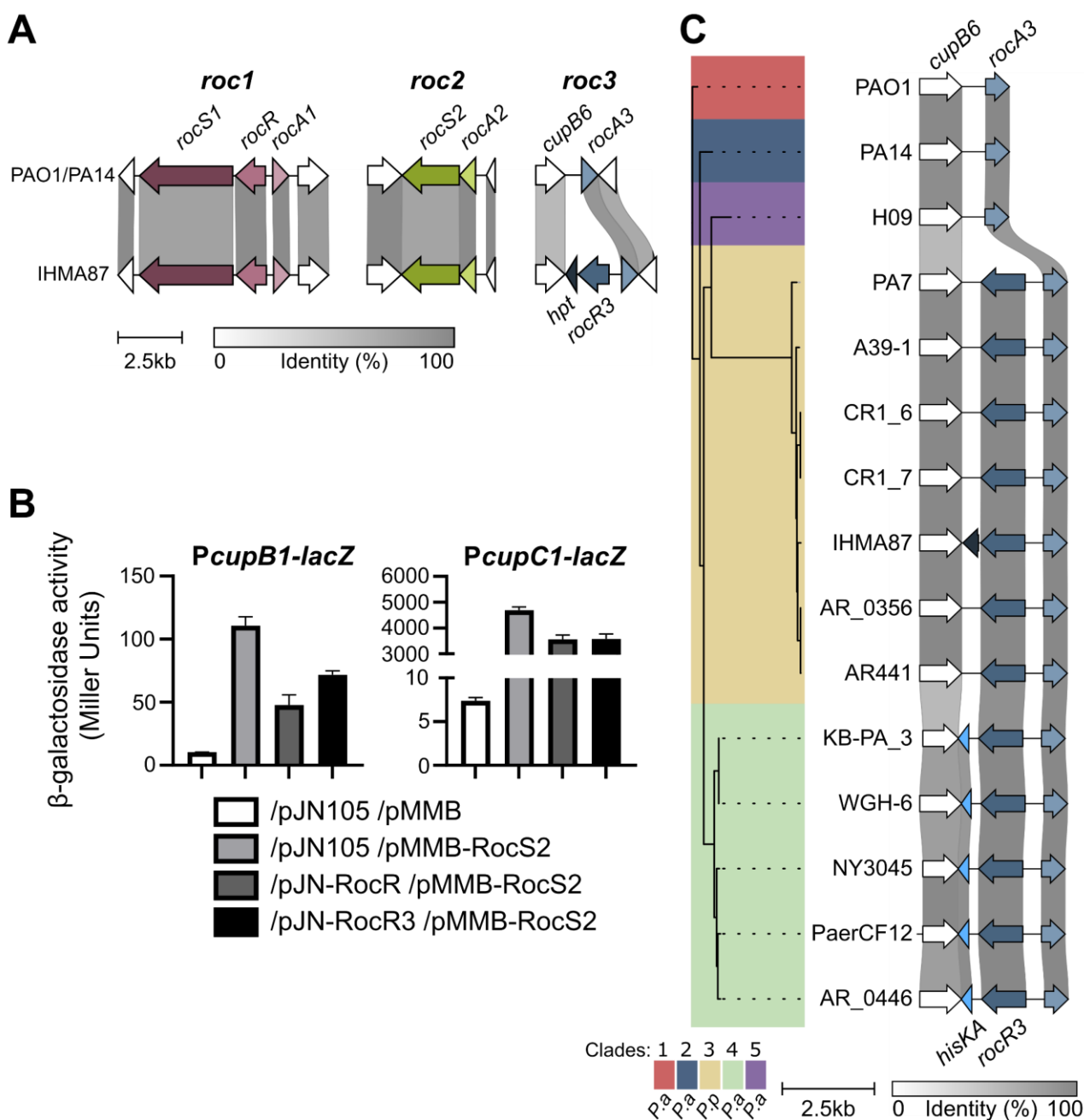


FIG 6. The *roc3* locus in *P. (par)aeruginosa* species (A) Loci encoding the three Roc systems are represented in the *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 strains and *P. paraeruginosa* IHMA87, with the % of sequence identity indicated by the grey scale. The genes located on either side of the *roc* genes are also indicated to show the conservation of their location. In IHMA87 Roc3 system, *rocR3* is homologous to *rocR* while the pseudogene lying downstream potentially encodes part of a H2 domain, which is an Hpt-like module. (B) β -galactosidase activities of the PAO1 strain containing the *PcupB1-lacZ* or *PcupC1-lacZ* transcriptional fusion. Strains carried two replicative plasmids which are indicated below. Induction of the genes was performed with 1 mM IPTG and 0.5% arabinose for 6 hours in M63 medium. Experiments were performed in triplicate and the error bars represent the SEM. (C) Genetic comparison of *Roc3* loci in *rocR3*⁺ strains with the % of sequence identity indicated by the grey scale. PAO1, PA14 and H09 were used as reference for clades 1, 2 and 5 respectively. Gene located downstream *rocR3* codes for protein harboring either Hpt (dark blue) or HisKA (light blue) domain. Sequences were ordered based on genomic phylogeny shown on left part.

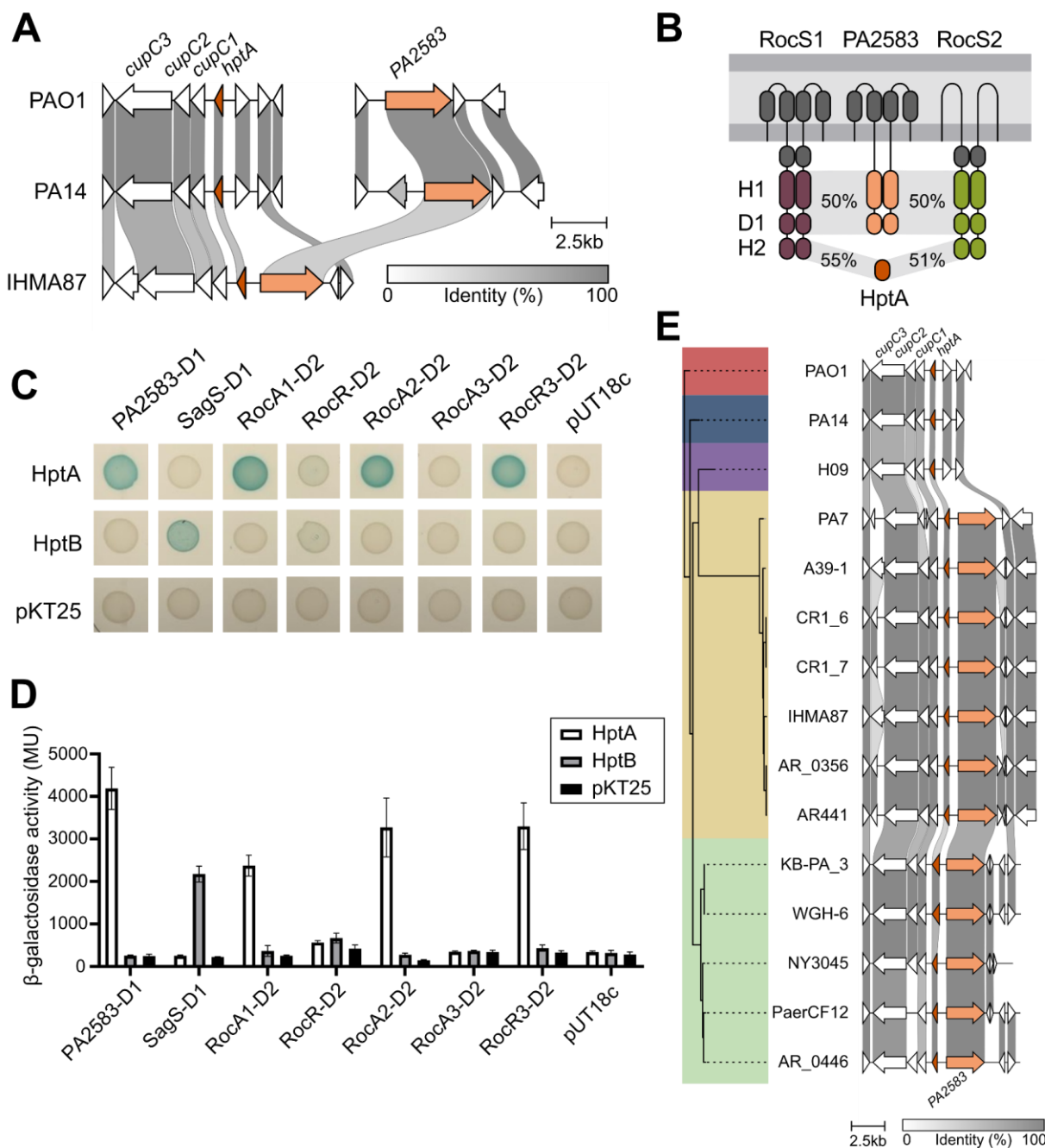


FIG 7. Additional putative players in the Roc system (A) Gene organisation of loci containing *cupC* operon and the *PA2583* gene in the *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 strains and *P. paraeruginosa* IHMA87, with the % of sequence identity indicated by the grey scale. (B) Depicting of RocS1 and RocS2 unorthodox HKs, PA2583 hybrid HK and HptA proteins. H1, D1 and H2 correspond to transmitter (HisKA/HATPase_C), receiver and Hpt domains, respectively. The putative sensory domains are represented by periplasmic black dots for the Sbp3 domains and a cytoplasmic black box for the PAS domain. The percentage of amino acid identity within their different domains are indicated. (C) Bacterial two-hybrid analysis of various combinations of recombinant pKT25 and pUT18c plasmids encoding full or partial proteins of interest in *E. coli* DHM1 spotted on LB agar containing X-Gal and IPTG. Blue coloration indicates interaction of studied proteins. (D) β -galactosidase activities of the resuspended spots from plates of Bacterial two-hybrid analysis. Experiments were performed in triplicate and the error bars depict the SEM. (E) Genetic comparison of *hptA* locus in strains harbouring PA2583 in vicinity with the % of sequence identity indicated by the grey scale. PAO1, PA14 and H09 were used as reference for clades 1, 2 and 5 respectively. Sequences were ordered based on genomic phylogeny shown on left part.

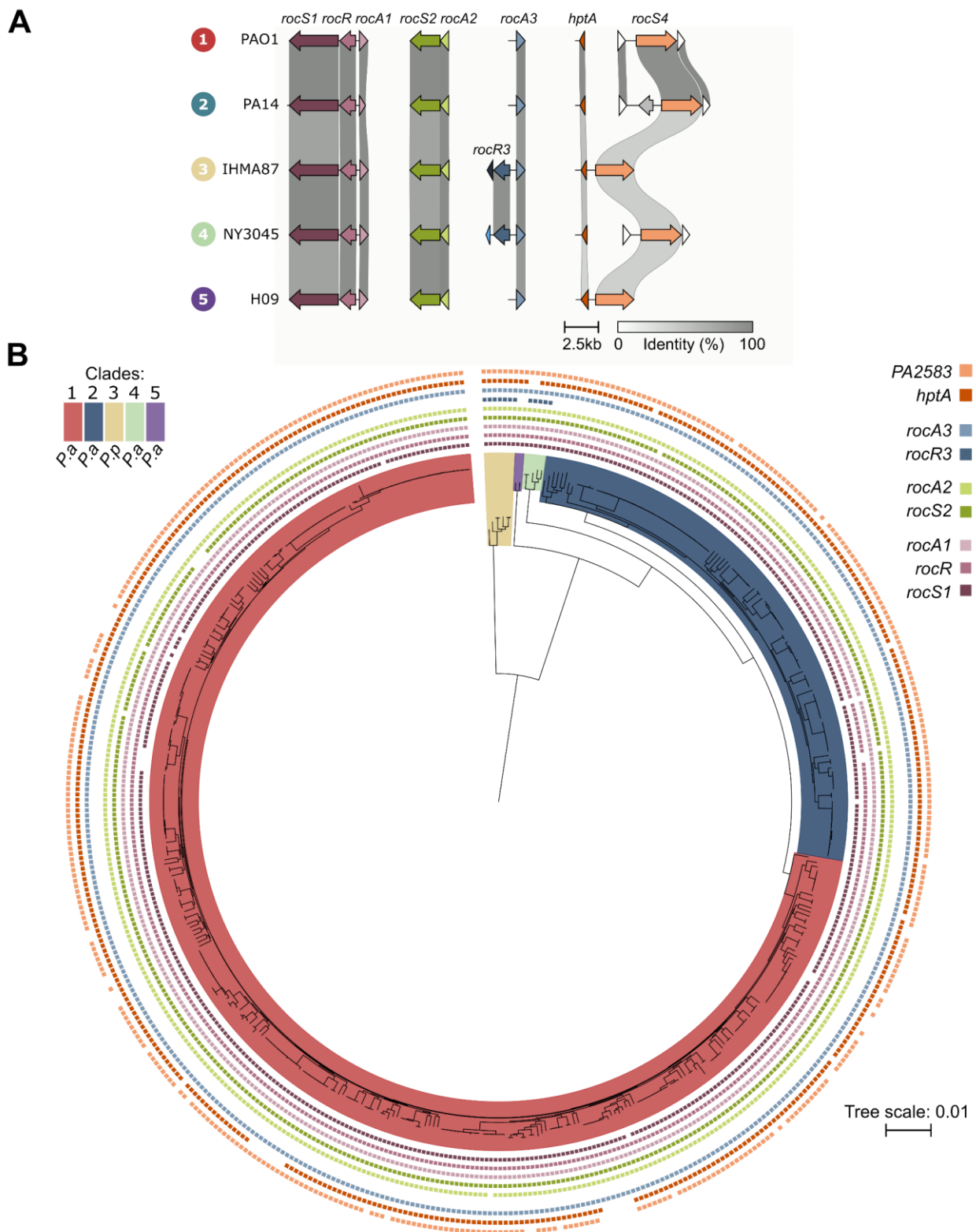


FIG 8. Clade-dependent diversity of Roc system in *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* (A) Genetic comparison of the typical organization of the different proposed Roc loci in 5 strains representative of the different clades of *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* species with the % of sequence identity indicated by the grey scale. Gene located downstream *rocR3* codes for protein harbouring either Hpt (dark blue) or HisKA (light blue) domain. RocS4 is represented between its surrounding genes (white; PA2582 and PA2584) in clades 1, 2 and 4. Additional gene of clade 2 coding for a fimbrial protein (PA14_30690) is depicted in grey. (B) Phylogeny of *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* species and conservation of Roc actors.

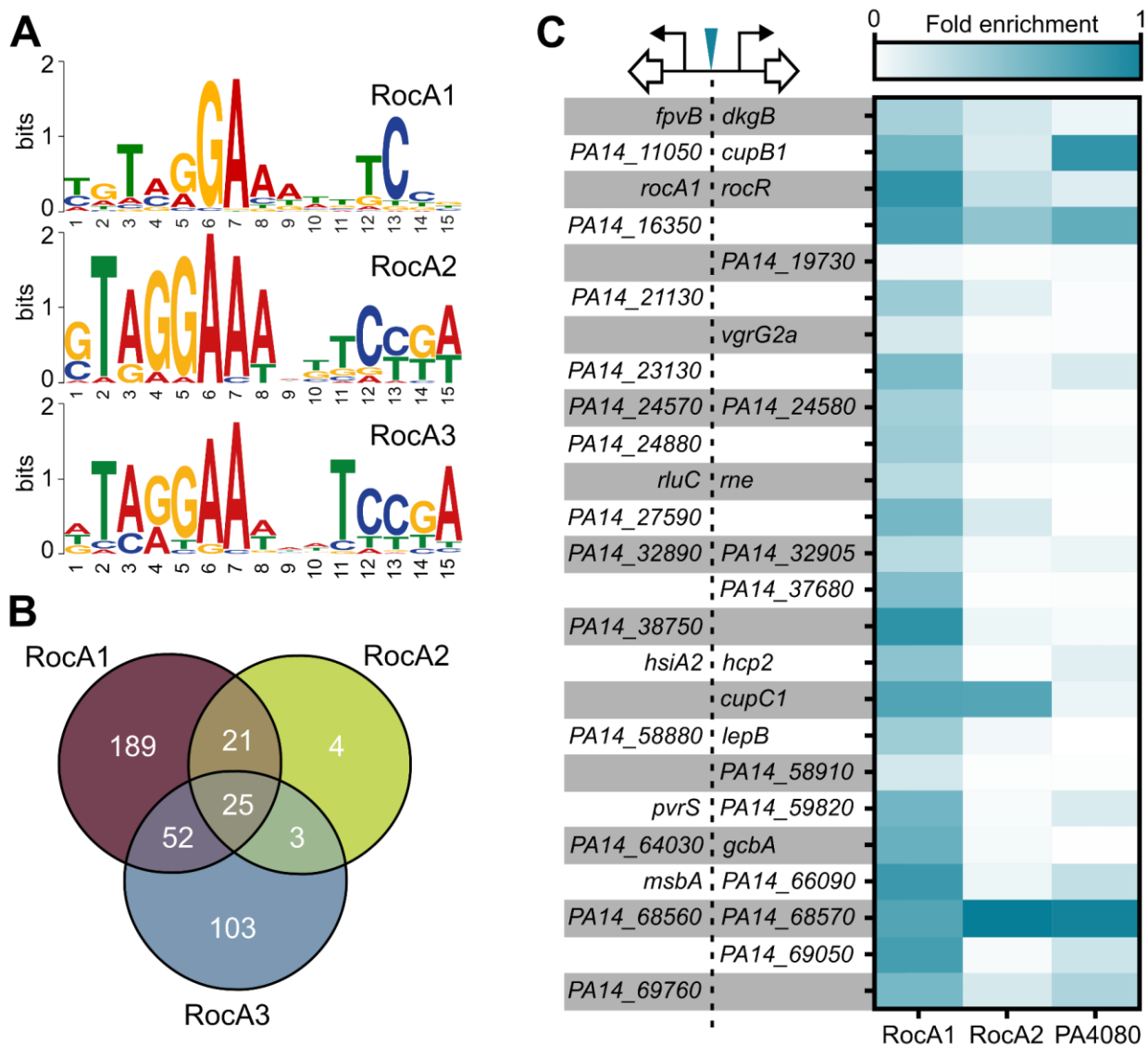


Fig S1. RocA1, RocA2 and RocA3 targets. Reanalysis of the best Dataset of DAP-seq results from published data (Trouillon et al., 2021) (A) DNA-binding motifs of RocA1, RocA2 and RocA3 identified by MEME-ChIP. At each position are shown the nucleotide symbols. The sequence conservation at each position is indicated by the overall height of the stack. The relative frequency of each nucleotide is indicated by the height of symbols within the stack. (B) Overlap of inferred targets of RocA1, RocA2 and RocA3. (C) Relative fold-enrichment of 25 common targets of RocA1, RocA2 and RocA3. Surrounding divergent genes from the targeted regions are represented on the left with the orientation when appropriate.

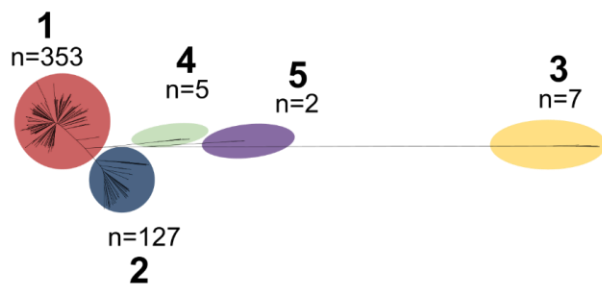


Fig S2. Unrooted tree of *P. aeruginosa* and *P. paraeruginosa* species at scale with number of genomes for each clade. The clade 3 corresponds to *P. paraeruginosa*.

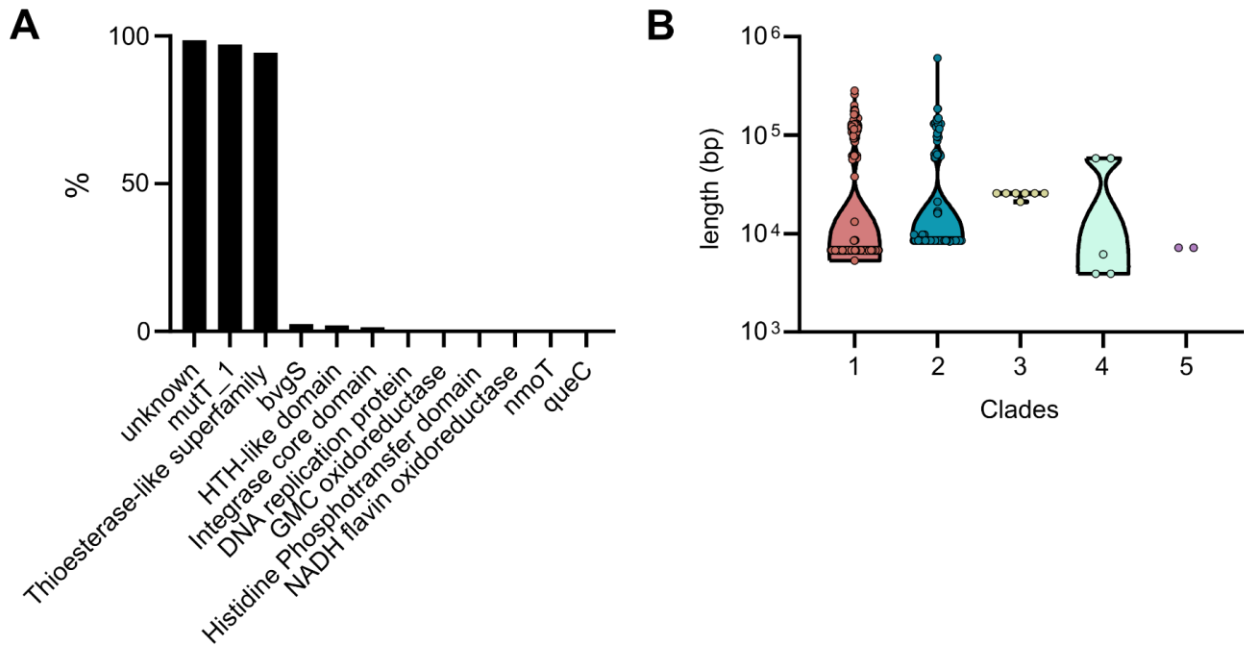


Fig S3. Localisation of PA2583 in clades of *P. aeruginosa* and *P. paraaeruginosa* species (A) Relative distribution of gene annotations by EggNOG of genes upstream of *hptA*. (B) Distribution of length of the *PA2581-PA2584* region.

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Genotype or relevant properties	Reference/Source
Strains		
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wound isolate, sequenced laboratory strain	J. Mougous
PAO1 Δ PA4080	PAO1 with PA4080 (<i>rocA3</i>) deletion	This study
PAO1 Δ rocA1	PAO1 with PA3948 (<i>rocA1</i>) deletion	This study
PAO1 Δ rocA2	PAO1 with PA3045 (<i>rocA2</i>) deletion	This study
PAO1 Δ rocA1 Δ rocA2	PAO1 with <i>rocA1</i> and <i>rocA2</i> deletion	This study
PAO1 Δ rocA1 Δ rocA2 Δ rocA3	PAO1 with <i>rocA1</i> , <i>rocA2</i> and <i>rocA3</i> deletion	This study
PAO1-PA4080 D58A	PAO1 with <i>rocA3</i> mutated gene encoding RocA3 _{D58A}	This study
<i>P. paraaeruginosa</i>		
IHMA87	wild-type strain (urinary infection)	(Kos <i>et al.</i> , 2015)
<i>E. coli</i>		
TOP10	Chemically competent cell	Invitrogen
DHM1	F ⁻ <i>cya-854 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi1 hsdR17 spoT1 rfbD1 glnV44(AS)</i>	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
Plasmids		
pRK600	Helper plasmid with conjugative properties (Cm ^R)	(Kessler <i>et al.</i> , 1992)
pFLP2	Plasmid expressing the Flp recombinase (Ap ^R /Cb ^R)	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pMMB67EH-Gm	Broad-host-range bacterial cloning vector, <i>tac</i> promoter (Gm ^R)	This study
pMMB67-RocS1	pMMB67EH-GW harbouring the <i>rocS1</i> gene from Gateway library (Gm ^R)	Kulasekara <i>et al.</i> , 2005)
pMMB67EH	Broad host range bacterial cloning vector, <i>tac</i> promoter (Ap ^R /Cb ^R)	(Sivaneson <i>et al.</i> , 2011)
pMMB67-RocS2	pMMB67EH harbouring the <i>rocS2</i> gene from Gateway library (Ap ^R /Cb ^R)	(Sivaneson <i>et al.</i> , 2011)
pEXG2	Allelic exchange vector (Gm ^R)	(Rietsch <i>et al.</i> , 2005)
pEXG2 Δ PA4080	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>rocA3</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2 PAO1 Δ rocA1	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>rocA1</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2 PAO1 Δ rocA2	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>rocA2</i> deletion (Gm ^R)	This study
pEXG2 PA4080-D58A	pEXG2 carrying SLIC fragment for <i>rocA3</i> mutation (Gm ^R)	This study
pJN105	<i>ParaBAD</i> (pBAD) transcriptional fusion vector (Gm ^R)	(Newman and Fuqua, 1999)
pJN105-PA4080	pJN105 carrying <i>PBAD-rocA3</i> transcriptional fusion (Gm ^R)	This study
pJN105-rocR	pJN105 carrying <i>PBAD-rocR</i> transcriptional fusion (Gm ^R)	This study
pJN105-rocR3	pJN105 carrying <i>PBAD-(IHMA87) rocR3</i> transcriptional fusion (Gm ^R)	This study
miniCTX-TrrnB-lacZ	Site-specific integrative plasmid with promoter less- <i>lacZ</i> and strong <i>rrnB</i> terminator (<i>attP</i> site, FRT, Tc ^R)	Elsen <i>et al.</i> (2023)

pCTXter-PcupB1-lacZ	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>cupB1</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> site, FRT, Tc ^R)	This study
pCTXter-PcupC1-lacZ	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>cupC1</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> site, FRT, Tc ^R)	This study
pCTXter-PPA4080-lacZ	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>rocA3</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> site, FRT, Tc ^R)	This study
pCTXter-PmexA-lacZ	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>mexA</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> site, FRT, Tc ^R)	This study
pCTXter-PlepB-lacZ	miniCTX-TrrnB-lacZ harboring the <i>lepB</i> promoter fused to <i>lacZ</i> (<i>attP</i> site, FRT, Tc ^R)	This study
pKT15	Cloning and expression vector, encodes the T25 fragment (amino acids 1–224 of <i>CyaA</i>) (Km ^R)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pKT25-HptA	Fusion of <i>hptA</i> to <i>cya</i> gene T25 fragment in pKT25 (Km ^R)	This study
pKT25-HptB	Fusion of <i>hptB</i> to <i>cya</i> gene T25 fragment in pKT25 (Km ^R)	This study
pUT18c	Cloning and expression vector, encodes the T18 fragment (amino acids 225–399 of <i>CyaA</i>) (Ap ^R)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18c-2583-D1	Fusion of sequence encoding D1 domain (834-992 aa) of PA2583 to <i>cya</i> gene T18 fragment in pUT18C (Ap ^R)	This study
pUT18c-SagS-D1	Fusion of sequence encoding D1 domain (663-786 aa) of SagS to <i>cya</i> gene T18 fragment in pUT18C (Ap ^R)	This study
pUT18c-RocA1-D2	Fusion of sequence encoding D2 domain of RocA1 to <i>cya</i> gene T18 fragment in pUT18C (Ap ^R)	(Kulasekara <i>et al.</i> , 2004)
pUT18c-RocA2-D2	Fusion of sequence encoding D2 domain of RocA2 to <i>cya</i> gene T18 fragment in pUT18C (Ap ^R)	(Sivaneson <i>et al.</i> , 2011)
pUT18c-RocA3-D2	Fusion of sequence encoding D2 domain (1-134 aa) of RocA3 to <i>cya</i> gene T18 fragment in pUT18C (Ap ^R)	This study
pUT18c-RocR-D2	Fusion of sequence encoding D2 domain of RocR to <i>cya</i> gene T18 fragment in pUT18C (Ap ^R)	(Kulasekara <i>et al.</i> , 2004)
pUT18c-RocR3-D2	Fusion of sequence encoding D2 domain (1-136 aa) of RocR3 to <i>cya</i> gene T18 fragment in pUT18C (Ap ^R)	This study

Supplementary references

Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77–86.

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5752–5756.

Kessler, B., Lorenzo, V. de, and Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Molec Gen Genet* **233**: 293–301.

Kos, V.N., Déraspe, M., McLaughlin, R.E., Whiteaker, J.D., Roy, P.H., Alm, R.A., *et al.* (2015) The Resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in Relationship to Phenotypic Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 427–436.

Kulasekara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A., and Lory, S. (2004) A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes: Regulation of *P. aeruginosa* Cup fimbriae by Roc1. *Molecular Microbiology* **55**: 368–380.

Newman, J.R., and Fuqua, C. (1999) Broad-host-range expression vectors that carry the l-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. *Gene* **227**: 197–203.

Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005) ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8006–8011.

Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., and Filloux, A. (2011) Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Mol Microbiol* **79**: 1353–66.

Table S2. Primers used in this work

Name	Sequence (5' => 3')	Use
pEXG2-mut-PA4080-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC TCTGAGGGATATGCAAGTTTCCT	<i>rocA3</i> deletion
pEXG2-mut-PA4080-sR1	GCGATGTAGGGACATCCTTGC	<i>rocA3</i> deletion
pEXG2-mut-PA4080-sF2	GCAAGGATGTCCCTACATCGC TGCCGGATGCCCTGACGGAT	<i>rocA3</i> deletion
pEXG2-mut-PA4080-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GATGTGGCGGAAATCGACGCC	<i>rocA3</i> deletion
pEXG2-mut-rocA1-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GATGTGCGACGTGTCCGCAGG	<i>rocA1</i> deletion
pEXG2-mut-rocA1-sR1	CAGGACGGTATGCATAAATTCGA	<i>rocA1</i> deletion
pEXG2-mut-rocA1-sF2	GAATTTATGCATACCGTCCTG TCGCTGATCCACTGACCTGGC	<i>rocA1</i> deletion
pEXG2-mut-rocA1-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GAATTTCCGGCCGACCGAGG	<i>rocA1</i> deletion
pEXG2-mut-rocA2-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC GAAGCTCTAAGCGATAGCGCC	<i>rocA2</i> deletion
pEXG2-mut-rocA2-sR1	TATCAGGATACGGCTCATTGTCT	<i>rocA2</i> deletion
pEXG2-mut-rocA2-sF2	ACAATGAGCCGTATCCTGATA GAGTTCGCCAAACGCAATACGC	<i>rocA2</i> deletion
pEXG2-mut-rocA2-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GTTGCAGGCCAGCAGGCGAC	<i>rocA2</i> deletion
pEXG2-mut-PA4080-sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCC TCTGAGGGATATGCAAGTTTCCT	<i>rocA3-D58A</i> mutation
pEXG2-PA4080-D58A-sR1	GGCATCGTATAGGCGACGATAAC	<i>rocA3-D58A</i> mutation
pEXG2-PA4080-D58A-sF2	GTTATCGTCGCCTATACGATGCC	<i>rocA3-D58A</i> mutation
pEXG2-mut-PA4080-sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCC GATGTGGCGGAAATCGACGCC	<i>rocA3-D58A</i> mutation

pCTXter-cupB1-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC TCCATCCGGAATGCGAGTGGG	<i>PcupB1-lacZ</i> fusion
pCTXter-cupB1-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC CATCTGATTCCTTTGGAGTTGTG	<i>PcupB1-lacZ</i> fusion
pCTXter-cupC1-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC AGGCAAACCTAAGTGCCTTCGAAA	<i>PcupC1-lacZ</i> fusion
pCTXter-cupC1-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC CATGATTGAGCTTCCTTTTGACAG	<i>PcupC1-lacZ</i> fusion
pCTXter-PA4080-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC GCTCGTCTGGGTCTCGTG	<i>ProcA3-lacZ</i> fusion
pCTXter-PA4080-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC ATCCTTGCGTCTCCTTAAGC	<i>ProcA3-lacZ</i> fusion
pCTXter-mexA-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC AGCTCGCGGATCTTCCG	<i>PmexA-lacZ</i> fusion
pCTXter-mexA-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC ATAGCGTTGCTCATGAGC	<i>PmexA-lacZ</i> fusion
pCTXter-lepB-lacZ-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCC TCTAGCGCTGCGTCTGCC	<i>PlepB-lacZ</i> fusion
pCTXter-lepB-lacZ-sR	GCTAGTTAGTTAGGATCCCC ATGAGGCCCGTACGGAGC	<i>PlepB-lacZ</i> fusion
pJN105-PA4080-sF	CTAGCGAATTCCTGCAGCCC TTTCTGGTAACGCTTTCGCTT	<i>rocA3</i> expression
pJN105-PA4080-sR	CTAGAACTAGTGGATCCCC TCAGGGCATCCGGAATAGCC	<i>rocA3</i> expression
pJN105-rocR-sF	CTAGCGAATTCCTGCAGCCC AACACAGCAGTATATCGCCGGT	<i>rocR</i> expression
pJN105-rocR-sR	CTAGAACTAGTGGATCCCC TAGAGGCAGCCGAGGCCAG	<i>rocR</i> expression
pJN105-rocR3-sF	CTAGCGAATTCCTGCAGCCC ACAATCGCTCCACCATAAAGATTA	IHMA87 <i>rocR3</i> expression
pJN105-rocR3-sR	CTAGAACTAGTGGATCCCC GTTGATATCGCAACGACCGCC	IHMA87 <i>rocR3</i> expression
pKT25-hptA-sR	TACTTAGGTACCCGGGGATC TCTAGAGCTTTGCCAATTCGGTT	pKT25 cloning for BTH
pKT25-hptA-sF	CTGCAGGGTCGACTCTAGAG ATGAAAGAGCTTGGTTCGGAATC	pKT25 cloning for BTH
pKT25-hptB-sR	TACTTAGGTACCCGGGGATC TCAGCGATAGCGCTGACGTTT	pKT25 cloning for BTH
pKT25-hptB-sF	CTGCAGGGTCGACTCTAGAG ATGTCCGCGCCGCATCTCGA	pKT25 cloning for BTH
pUT18c-PA2583 D1-sR	GAGCTCGGTACCCGGGGATC TCATTGCGAATCGACGCTCGT	pUT18c cloning for BTH
pUT18c-PA2583 D1-sF	ACTGCAGGTTCGACTCTAGAG ACCGAGCCTCCGCCAGC	pUT18c cloning for BTH
pUT18c-sagSD1-sF	ACTGCAGGTTCGACTCTAGAG ACCCGGGTCTGCTGGTGGA	pUT18c cloning for BTH
pUT18c-sagSD1-sR	GAGCTCGGTACCCGGGGATC CTAGTCGCTCGCGGTGAGCG	pUT18c cloning for BTH
pUT18c-rocA2D2-sF	ACTGCAGGTTCGACTCTAGAG ATGAGCCGTATCCTGATAGTCG	pUT18c cloning for BTH

pUT18c-rocA2D2-sR	GAGCTCGGTACCCGGGGATC CTACGAGCTGGGAAAGTAACTGTAT	pUT18c cloning for BTH
pUT18c-PA4080D2-sF	ACTGCAGGTGCGACTCTAGAG ATGTCCCTACATCGCATTTCGC	pUT18c cloning for BTH
pUT18c-PA4080D2-sR	GAGCTCGGTACCCGGGGATC TTACGGCGAGAAATACTGGTTTCG	pUT18c cloning for BTH
pUT18c-rocR3D2-sF	ACTGCAGGTGCGACTCTAGAG ATGCGGCAGATCAGCGTCCT	pUT18c cloning for BTH
pUT18c-rocR3D2-sR	GAGCTCGGTACCCGGGGATC CTAAAGAGCGGGCGGAAGCAGC	pUT18c cloning for BTH

7.2 Résultats supplémentaires

7.2.1 Etude du rôle de RocA3

Nos travaux ont permis d'identifier le RR médiant l'activation de l'opéron *cupB* par les HKs RocS1 et RocS2. À ce jour, les conditions physiologiques permettant l'activation des gènes *cupB* sont inconnues et cet opéron est particulièrement peu exprimé dans les conditions de laboratoires, tout comme l'opéron *cupC* qui est aussi activé par les HKs du système Roc. Cependant, le rôle de ces fimbriae dans la formation de biofilm est établi et a été caractérisé uniquement en comparant des souches surproduisant RocS1, conduisant à l'activation de *cupB* et *cupC* à des souches ne surproduisant pas cette HK.

J'ai donc voulu étudier le rôle de RocA3 dans la formation de biofilm par diverses approches permettant d'évaluer sa contribution dans la formation d'une pellicule à l'interface air-liquide, dans l'adhésion à une surface abiotique et dans la formation de microcolonies.

Formation de biofilm à l'interface air-liquide

J'ai tout d'abord analysé l'effet de la surproduction de RocS2 sur la formation de biofilm à l'interface air-liquide à 30°C et 37°C en M63 comme il a été fait pour RocS1. Nous avons observé que la surproduction de RocS2 augmente de manière significative la formation de biofilm dans nos conditions, aux 2 températures testées après 4h de croissance (Fig 7.1). Cependant, aucun effet significatif n'a été observé à 8 et 24h. Afin d'évaluer la contribution de RocA3 dans ce phénotype, l'effet de cette surproduction a aussi été déterminé dans les souches $\Delta rocA3$ et $\Delta rocA1\Delta rocA2$. Cependant, les résultats obtenus avec ces souches sont très variables malgré les répétitions, ce qui m'empêche de conclure sur l'effet des délétions testées.

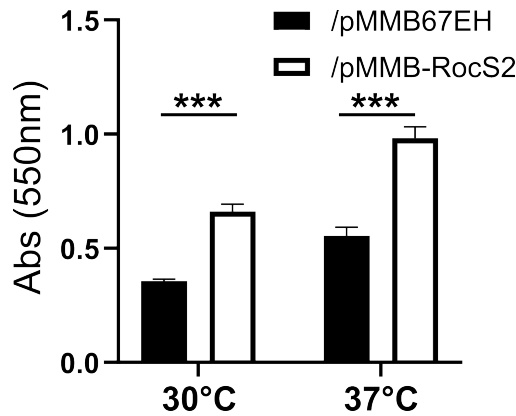


FIGURE 7.1. La surproduction de RocS2 stimule la formation de biofilm à l'interface air liquide. L'absorbance à 550 nm de la pellicule de biofilm est mesurée après 4h de croissance statique aux températures indiquées. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne (n=5). Les *p*-valeurs ont été déterminées par un test T (***) : *p*-valeur < 0.001)

Adhésion

Comme indiqué dans l'article en préparation, la surproduction de RocA3 grâce à un plasmide inductible à l'arabinose (pJN105) provoque l'activation de l'opéron *cupB*. Afin de déterminer le rôle des fimbriae CupB dans l'adhésion de *P. aeruginosa*, ce plasmide a été transformé dans une souche de PAO1 exprimant constitutivement la GFP. Brièvement, les cultures bactériennes ont été placées dans des puits au fond desquelles des lamelles ont été disposées. À différents temps, les cultures ont été enlevées, et après lavages, les cellules adhérentes ont été fixées pour observation au microscope. L'analyse des images a été réalisée par Stéphanie Bouillot avec ImageJ (Fig 7.2).

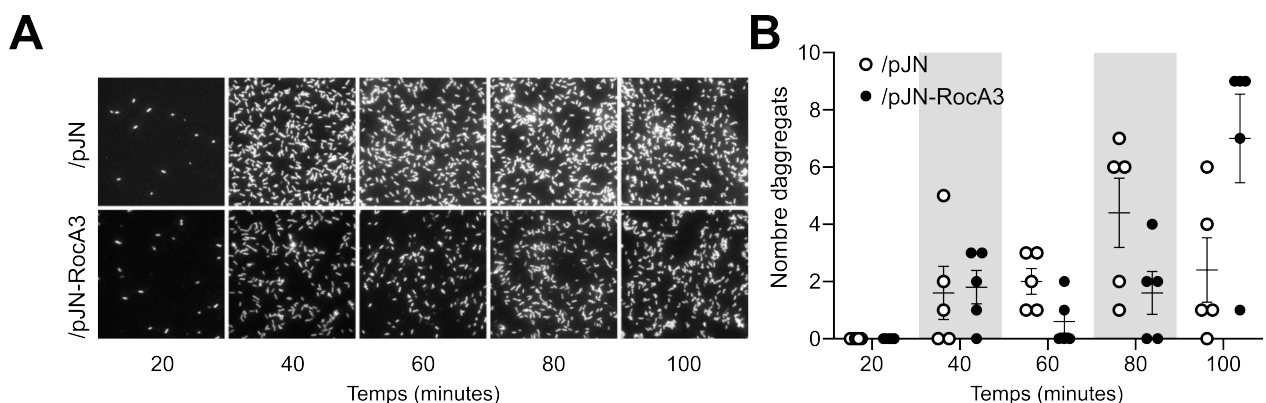


FIGURE 7.2. Rôle de CupB dans l'adhésion de *P. aeruginosa*. Comparaison des souches surproduisant RocA3 (pJN-RocA3) ou possédant le plasmide vide (pJN). Les souches de PAO1 ont été marquées à la GFP par un plasmide intégré (pIApX2-GFP) A) Bactéries adhérentes à la surface de la lamelle à différents temps. B) Analyse du nombre d'agrégats formés sur la lamelle (n=5).

L'observation des images révèle que le nombre de bactéries adhérentes est plus faible pour la souche surproduisant RocA3 qui tend à occuper une surface plus faible (Fig 7.2A). La quantification des agrégats ne montre pas de différences significatives entre les deux souches dans les conditions testées (Fig 7.2B). Dans ces conditions, la surproduction de RocA3 n'a pas d'effet majeur sur l'adhésion de *P. aeruginosa* à une surface, mais semblerait conduire à la formation d'agrégats de plus petite taille.

Formation de microcolonies

Afin d'évaluer l'effet de RocA3 et des fimbriae CupB dans les premières étapes de la formation de biofilm, nous avons utilisé un dispositif de microfluidique permettant la culture de bactérie dans une chambre traversée par un flux. Cette approche permet d'appréhender la dynamique et la structure tridimensionnelle des communautés bactériennes. Les dispositifs dont nous disposions nous permettait la visualisation d'une seule chambre. Nous avons donc étudié les souches contenant le plasmide surproduisant RocA3 ou le vecteur vide en coculture, exprimant constitutivement, la GFP (verte) et la mCherry (rouge) respectivement pour pouvoir les comparer. Nos résultats démontrent que bien que la souche surproduisant RocA3 est capable de former rapidement des agrégats volumineux dans la chambre, sa croissance n'est pas comparable à la souche contrôle, suggérant un défaut de croissance.

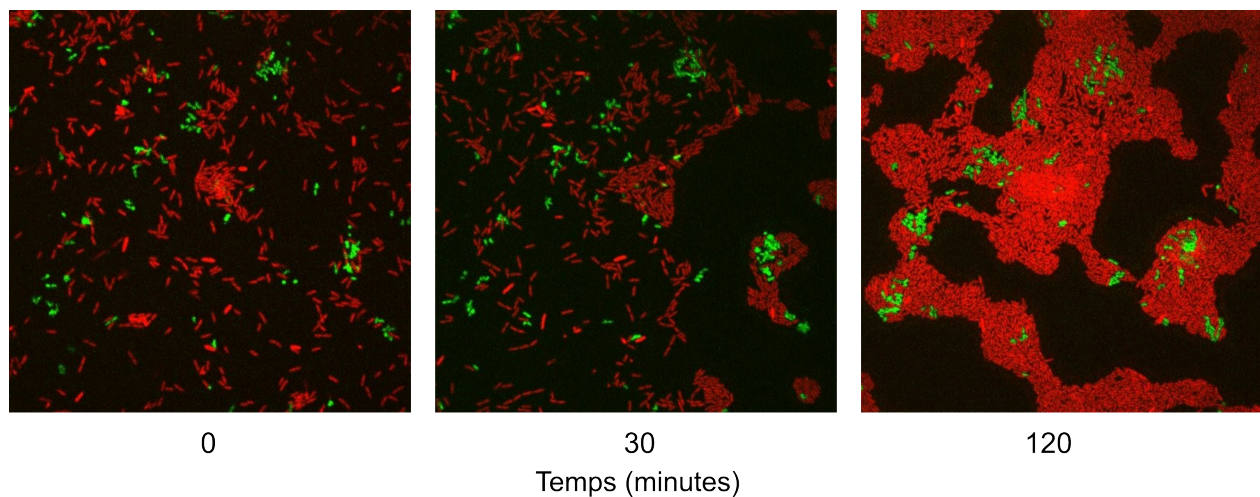


FIGURE 7.3. Formation de microcolonies de la souche surproduisant RocA3 en microfluidique. Les souches possédant le plasmide surproduisant RocA3 (pJN-RocA3) ont été marquées à la GFP par un plasmide intégré (pIApX2-GFP). Les souches possédant le plasmide vide (pJN) ont été marquées à la mCherry par un plasmide intégré (pIApX2-mCherry). Brièvement, les précultures sont diluées à une DO_{600} de 0.05 en milieu LB dans le même tube, puis injectées dans la chambre qui est laissée 1 h 30 à 37°C afin de permettre aux bactéries d'adhérer à la surface. Les bactéries non adhérentes sont éliminées par un lavage de 10 minutes à un flux de à 1,5 μ L/min avant d'appliquer un flux à 0,5 μ L/min pendant la durée de l'acquisition.

Ce défaut de croissance de la souche surproduisant RocA3 a été confirmé et dépend du niveau d'induction à l'arabinose (Fig 7.4). Ce défaut de croissance est un frein majeur dans l'observation des phénotypes régulés par RocA3 et il découle potentiellement directement de la surproduction de ce FT qui pourrait perturber la physiologie de la cellule ou indirectement de l'activation de l'opéron *cupB*.

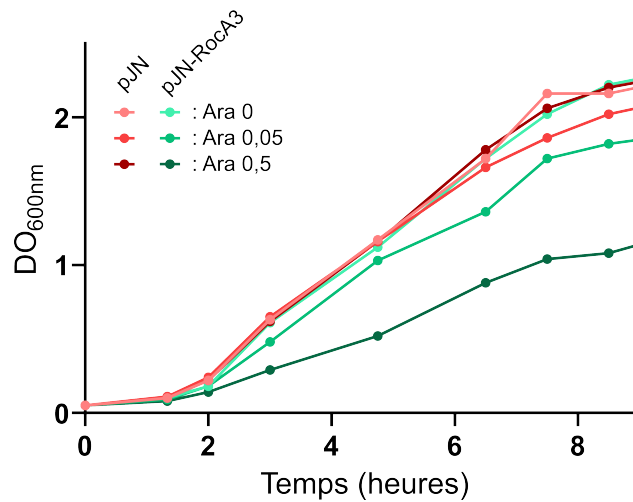


FIGURE 7.4. La surproduction de RocA3 induit un défaut de croissance. Les souches PAO1 : :pIApX2-mCherry /pJN105 et PAO1 : :pIApX2-GFP /pJN-PA4080. sont cultivées en tubes en milieu LB supplémenté avec 200µg/mL de gentamycine et de l'arabinose aux pourcentages indiqués

7.2.2 Régulon des Roc

Nos travaux ont permis de démontrer que RocA3 régule l'opéron *cupB* ainsi que son propre gène. Pour déterminer le régulon de ce RR et le confronter aux résultats de DAP-seq, j'ai utilisé la RNA-seq. L'analyse des transcriptomes des souches sauvages et $\Delta rocA3$ transformées avec un plasmide surproduisant RocS2 a été réalisée dans des conditions similaires à celles précédemment utilisées pour l'analyse du régulon de RocA2 (SIVANESON et al., 2011). Les cultures bactériennes ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,1 et cultivé à 37°C sous agitation pendant 5h en M63 en triplicat. L'extraction des ARN totaux a été réalisée par extraction au phénol chaud. Un traitement à la Turbo DNase supplémentaire a permis d'enlever les contaminations d'ADN génomique. Les ARN ribosomiques ont été déplétés à l'aide du kit RiboMinus selon les instructions du fabricant. Les banques d'ADNc pour séquençage ont été construites avec le kit Colibri. Le suivi de la quantité et la qualité des ARNs et des banques a été réalisé à l'aide d'un bioanalyseur Agilent. Le séquençage haut débit a été réalisé par la plateforme MGX-NGS de l'Institut de Génomique Fonctionnelle. Les séquences d'adaptateurs et les reads d'une longueur inférieure à 20pb ont été retirés avec Trimmomatic. L'alignement a été réalisé avec Bowtie2 (LANGMEAD

et al., 2012) et le comptage des reads alignés avec Ht-seq (ANDERS et al., 2015). Enfin, l'expression différentielle des gènes entre les deux conditions a été déterminée avec DESeq2 (LOVE et al., 2014).

Au total, 164 gènes sont impactés par l'absence de RocA3 dans les conditions testées ($\log_2(\text{FC}) > 2$ et $p\text{-value} < 0.001$). Parmi ces gènes, sont retrouvés l'opéron *cupB* mais aussi l'ensemble des acteurs du système Roc à l'exception de *rocA1* et PA2583 (Fig 7.5). Ce résultat inattendu suggère que l'induction du système par la surproduction de RocS2 a échoué dans le mutant *rocA3*. En effet, nous observons que les transcrits de *rocS2* sont très significativement enrichis dans la souche sauvage, ce qui indique que le gène n'est pas exprimé de la même manière dans les deux souches. Ainsi, une erreur technique est suspectée pour cette expérience qui semble plutôt comparer une souche sauvage surproduisant RocS2 au mutant *rocA3* ne surproduisant pas RocS2. Même si cette expérience ne nous permet pas de différencier les régulons des RRs du système Roc, elle offre néanmoins une vue d'ensemble sur le régulon global des acteurs de Roc et pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles.

Parmi les cibles significativement induites par la surproduction de RocS2, il est intéressant de noter que le RR orphelin PA0034 compte parmi les plus faibles p -valeurs. Comme RocA1, RocA2 et RocA3, ce RR appartient à la sous-famille NarL et a été identifié comme évolutivement proche de RocA1 et RocA2 (partie 7.1). De plus, le gène de PA0034 forme un opéron avec le gène de HptC. L'hypothèse que PA0034 et possiblement HptC participe au système Roc est une piste intéressante à étudier.

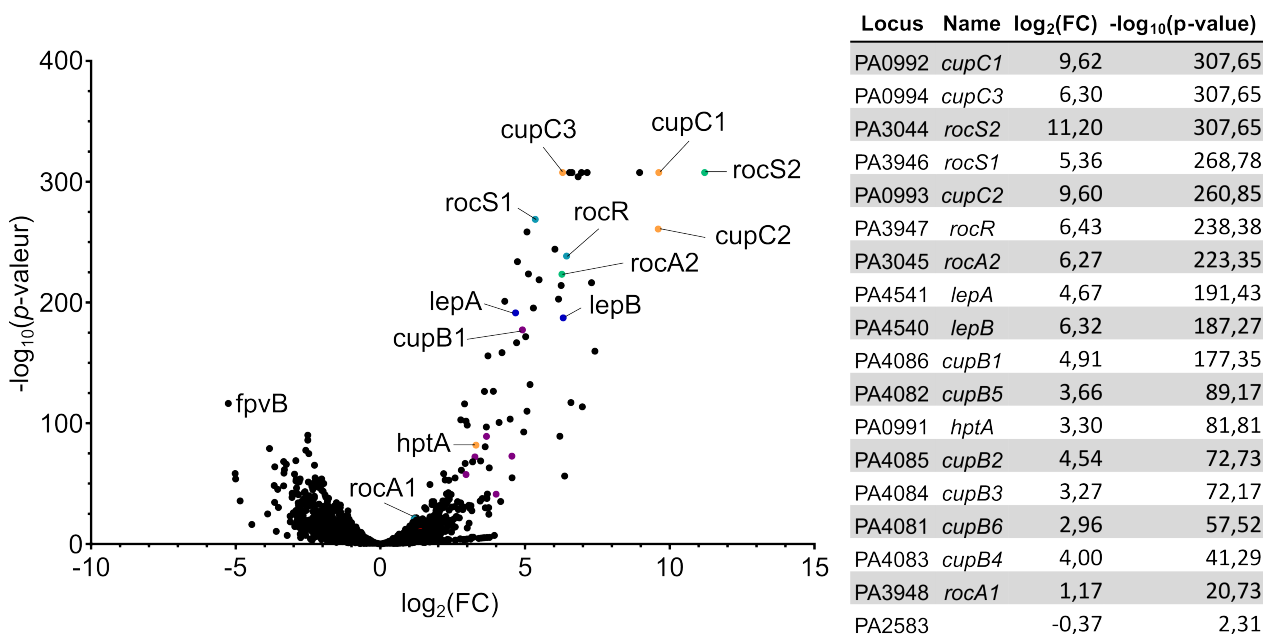


FIGURE 7.5. Régulon contrôlé par RocS2 par RNA-seq. A) Représentation des gènes différentiellement exprimés. B) Résultats obtenus pour les acteurs Roc. FC : Fold change

7.3 Discussion et perspectives

L'exploration du rôle phénotypique de RocA3 et de son régulon s'est heurté à des problèmes d'activation provoqués par la surproduction de RocA3 dont les effets sont délétères et la surproduction de RocS2 qui a échoué pour le RNA-seq. Le recours obligatoire à des surproductions pour activer le système a de lourdes répercussions sur la cellule. Les approches développées dans ces résultats supplémentaires constituent néanmoins des pistes intéressantes à approfondir. Cependant, il serait nécessaire de déterminer des conditions permettant l'activation de ce système sans impacter la croissance des différentes souches. Le plasmide pJN-RocA3 utilisé dans cette étude offre la possibilité de moduler l'induction de RocA3 en ajustant les concentrations d'arabinose qui active son expression de manière dose-dépendante. En diminuant cette induction, l'activation de l'opéron *cupB* est réduite, mais pourrait permettre d'observer le rôle de cet acteur dans les différentes méthodes développées ici.

De plus, il a été observé que la surproduction de RocS1 augmente la formation de biofilm dans une souche dépourvue de pili de type 4 et de flagelle ($\Delta pilA$ et $\Delta fliC$) (RUER et al., 2007). La délétion des gènes de ces acteurs pouvant masquer l'effet des Cup est potentiellement nécessaire pour observer le rôle phénotypique de RocA3.

Plus généralement, l'étude du système Roc développée dans l'article soulèvent de nombreuses questions dont certaines seront discutées ci-dessous.

Activation du système Roc

Afin d'activer le système Roc, nous avons utilisé des plasmides surproduisant RocS1 et RocS2 fournis par Thomas Clamens et Alain Filloux. Cependant, avant d'obtenir pMMB-RocS1 et pMMB-RocS2, nous avons construit plusieurs plasmides pour surproduire ces HKs sans jamais arriver à activer la transcription des gènes ciblés par Roc (*cupC*, *cupB*, *mexA*). Ainsi, nous avons utilisé le pJN105 possède un promoteur inductible à l'arabinose (P_{BAD}), le pMMB64EH possédant un promoteur inductible à l'IPTG (P_{TAC}) et le pBBR1MCS-4 qui porte un promoteur constitutivement actif (P_{LAC}). Ce dernier a aussi été utilisé pour surproduire uniquement la partie cytoplasmique, sans résultat. Ainsi, les propriétés du vecteur et la nature de la construction surproduite sont critiques pour parvenir à l'activation de ce système. Dans notre situation, seules les constructions précédemment publiées ont été efficaces et tous nos essais ont échoué à activer le système Roc. Les études futures de ce système bénéficieraient grandement de l'identification du signal perçu par RocS1 et RocS2 ce qui permettrait de s'affranchir des surproductions d'HKs dont les répercussions peuvent-être hasardeuses et d'aborder l'aspect dynamique de ce système.

Interactions des acteurs de Roc

L'interaction de RocA3 avec les HKs RocS1 et RocS2 a été évalué *in vitro* par la méthode de double hybride bactérien comme pour RocA1 et RocA2 (SIVANESON et al., 2011). Cependant, ni le domaine D2, ni la protéine entière de RocA3 n'ont été capables d'interagir avec les domaines H2 ou H1-D1-H2 de RocS1 et RocS2 dans nos conditions. La méthode de double hybride bactérien présente quelques limites comme l'absence de partenaire médiant l'interaction ou une faible sensibilité pouvant empêcher la détection d'interactions faibles ou transitoires. Pour ces raisons, l'étude de l'interaction entre RocA3 et les HKs RocS1 et RocS2 nécessiterait l'utilisation d'une méthode différente. Une possibilité serait d'évaluer le transfert de phosphate entre les HKs et les RRs purifiés *in vitro*. Dans le cas de RocA1, RocA2 et RocA3 dont les fixations à l'ADN n'ont jamais été identifiées par des méthodes de détection directe comme le retard sur gel, les affinités de ces différents RRs pour leurs cibles pourrait être évaluées en présence de potentielles partenaires ou en compétition par EMSA. Cette approche pourrait compléter notre compréhension du système Roc et de sa dynamique.

Régulation de *mexAB-oprM*

RocA2 inhibe la transcription de l'opéron *mexAB-oprM* qui code pour une pompe d'efflux qui joue un rôle clé dans la résistance aux antibiotiques. En proposant RocA3 comme un acteur supplémentaire de ce système, nous avons voulu déterminer son impact sur les autres cibles identifiées du système (partie 7.1). Cependant, les surproductions de RocS1 et RocS2 n'ont pas eu d'effet sur l'activité du promoteur de *mexA* dans nos conditions testées. De plus, la DAP-seq n'a pas identifié de fixation de RocA2 sur ce promoteur, ce qui suggère que l'inhibition est indirecte. Afin d'évaluer une possible inhibition post-transcriptionnelle, une fusion traductionnelle du promoteur a été construite, mais s'est révélée non affectée par l'activation de Roc. Ainsi, la répression de *mexAB-oprM* par RocA2 ne semble pas dépendre de l'initiation de la transcription ou de la traduction et pourrait s'opérer au niveau des ARNm.

Régulation indirecte de RocR et RocR3

Nos travaux ont identifié un RR ayant une activité PDE prédite, phylogénétiquement proche de RocR, encodé à proximité de RocA3. Ce gène, uniquement présent dans *P. paraeruginosa* et dans un groupe de *P. aeruginosa*, a été renommé *rocR3*. Nous avons démontré que la surproduction de cette protéine avait un effet similaire à la surproduction de RocR en inhibant l'activation des opérons *cupB* et *cupC* par le système Roc. En modulant la concentration cellulaire de di-GMPc, le rôle joué par ces protéines sur la transcription des cibles du système est indirect. Une hypothèse

est que la répression opérée par RocR et RocR3 requiert un intermédiaire, typiquement un facteur de transcription capable de détecter le di-GMPc. FleQ était un candidat prometteur car ce répresseur inhibe la production d'exopolysaccharides lorsqu'il n'est pas lié au di-GMPc. De plus, le promoteur de son gène dans la souche IHMA87 est fortement reconnu par RocA1 et RocA2 dans les résultats de DAP-seq ce qui suggère qu'il pourrait être intégré dans le régulon du système Roc. L'absence de fixation de RocA1 et RocA2 sur le promoteur de *fleQ* dans les génomes de PAO1 et PA14 s'explique par la variabilité de la séquence promotrice, le motif reconnu par ces RRs en amont de *fleQ* étant absente dans ces deux génomes (TROUILLON et al., 2021a). Afin d'évaluer l'implication de FleQ, l'effet de sa délétion a été testé sur l'activité du promoteur de *cupB* mesuré dans des souches surproduisant certains acteurs Roc (données non présentées). Nos résultats montrent que la délétion de *fleQ* limite l'activation de *cupB* par RocS2. En revanche, l'absence de FleQ n'impacte pas la répression de cet opéron induite par la surproduction de RocR et RocR3 ce qui suggère que cette inhibition n'est pas médiée par ce répresseur. En revanche, plusieurs autres FTs capables de détecter le di-GMPc pourraient être à l'origine de la répression observée et pourraient être testés d'une façon similaire comme BrLR (F. WANG et al., 2018).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Différents TCSs de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa* ont été étudiés au cours de ce travail de thèse. À l'origine de ce projet, il y a un jeu de données généré par DAP-seq pour l'ensemble des RRs se liant à l'ADN chez ces pathogènes. L'analyse de ces résultats de cistromique a permis de sélectionner 3 RRs à étudier en se basant sur les cibles déduites des sites de fixation (Chapitre 4) : AgtR, CusR et RocA3.

J'ai choisi ces RRs parce que les résultats de DAP-seq suggéraient qu'ils pouvaient être impliqués dans la régulation de la pathogénicité (AgtR), de la formation du biofilm (RocA3) et de la résistance au cuivre (CusR), et que ces processus participent à la virulence de *P. aeruginosa*. Les 3 RRs présentent des profils différents. AgtR appartient au TCS AgtRS qui est relativement caractérisé et dont certains signaux qu'il détecte et quelques gènes dont il contrôle l'expression sont déjà identifiés. À l'inverse, RocA3 (PA4080) est un RR orphelin dont on ne connaissait ni cibles ni signaux et CusR (IHMA87_02165) forme le TCS CusRS, appartenant au génome accessoire et qui n'a jamais été étudié.

L'exploitation des données générées par des approches à grande échelle n'est pas toujours évidente. L'interprétation et la confirmation des résultats présentent parfois un défi, comme cela a été le cas pour AgtR (Chapitre 5). Ce RR avait retenu mon attention notamment car il se fixe fortement dans les régions promotrices de *rsmY* et *rsmZ*, codant pour deux petits ARNs régulateurs cruciaux dans la régulation de la virulence de *P. aeruginosa*. Cependant, mes travaux n'ont pas permis d'identifier de nouvelles cibles pour ce RR. Ainsi, bien qu'un effet de la délétion de *agtR* ait été observé sur la motilité, je n'ai pas poursuivi l'étude de ce RR. Pourquoi certaines cibles identifiées en DAP-seq de AgtR n'ont pas été confirmées dans nos expériences? Comme il a été discuté, l'explication de ces résultats reste incertaine et peut résulter de conditions expérimentales inappropriées ou de faux positifs (Chapitre 5). Cependant, les fixations d'un FT à l'ADN avec une faible affinité ne sont pas forcément dénuées d'importance et peuvent indirectement participer à l'activité de ces protéines. Il est établi, chez les eucaryotes, que les sites de fixations de FTs avec une faible affinité sont notamment impliqués dans le fonctionnement de ces protéines en modulant la concentration de FTs libres ou en augmentant la concentration locale (KRIBELBAUER et al., 2019). D'une manière générale, les travaux menés dans cette thèse

se sont concentrés sur les fixations fortes de RR dans les régions promotrices des gènes. Or une grande partie des sites de fixations des FTs sont situés dans des régions codantes comme il a été identifié par CHIP-seq dans six espèces bactériennes dont *P. aeruginosa* (HUA et al., 2022). Ces liaisons peuvent aussi avoir un rôle de régulation typiquement en modulant la transcription du gène sur lequel se fixe le FT ou des gènes environnants, généralement en inhibant la progression de la RNAP. Ces fixations peuvent aussi participer à la régulation de promoteurs cryptiques d'ARNs.

Par la caractérisation de certains TCSs de *P. aeruginosa* et *P. paraeruginosa* comme CusRS (Chapitre 6) ou le système Roc (Chapitre 7), ce travail illustre deux concepts fondamentaux des TCSs : les interconnexions entre les systèmes et la plasticité de ce réseau dans ces espèces.

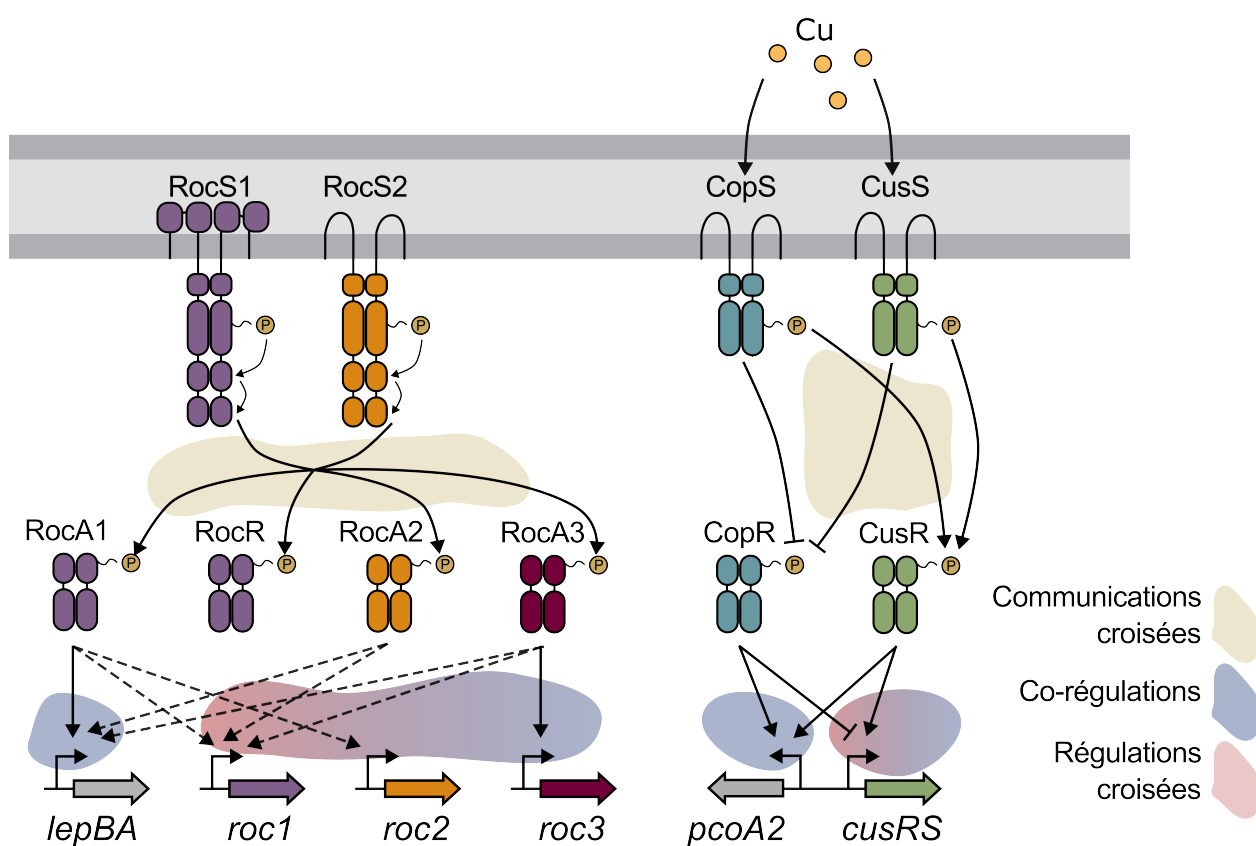


FIGURE 7.6. Les interconnexions entre les TCSs Roc et CusRS et CopRS. Les flèches en pointillés indiquent une fixation seulement observée *in vitro*

Interconnexions des TCSs

Généralement, les TCSs sont l'association d'une HK et d'un RR formant un système isolé. Cependant, à mesure que notre compréhension des TCSs grandit, de plus en plus d'exemples de systèmes plus complexes et d'interactions entre TCSs sont recensés, venant bousculer notre

perception de ces acteurs clés de la régulation bactérienne. Les interconnexions possibles entre TCSs sont de natures variées et peuvent mettre en jeu des : i) hétérodimères d'HKs, ii) hétérodimères de RRs, iii) communications croisées, iv) co-régulations, v) régulations croisées (Chapitre 3)(AGRAWAL et al., 2016). Nos résultats sur les RRs CusR et RocA3 documentent des exemples de communications croisées, de co-régulations et de régulations croisées. L'existence d'hétérodimères dans ces systèmes n'a pas fait l'objet d'étude dans ce travail.

Communication croisée

La communication croisée entre deux TCSs se définit comme la phosphorylation ou la déphosphorylation d'un RR par une HK différente de son partenaire identifié. Ce phénomène a souvent été observé *in vitro* comme chez *E. coli* où il a été démontré que 9/27 des HKs étudiées étaient capables de phosphorylations croisées (YAMAMOTO et al., 2005). Cependant, de nombreux cas de phosphorylations croisées *in vivo* sont aussi référencés. Ils peuvent être provoqués par la surproduction de HK, comme le cas de l'HK NtrB dont la surproduction complémente la délétion du gène de l'HK CheA chez *E. coli* (NINFA et al., 1988). Le système Roc est aussi un exemple de communication croisée identifiée lorsque les HKs RocS1 et RocS2 sont surproduites (H. D. KULASEKARA et al., 2004, SIVANESON et al., 2011). L'augmentation de la concentration de HKs favorise les interactions non-spécifiques et ces phosphorylations entre TCSs non partenaires nécessitent d'être confirmées notamment dans des conditions d'activation physiologiques du système. D'autres cas rapportent ces phénomènes de communications croisées *in vivo* lorsqu'un des partenaires est absent. C'est le cas par exemple du RR QseB de *E. coli* qui est activé par PmrB lorsque QseC est absente, de manière constitutive car l'activité phosphatase de QseC n'est pas entièrement complémentée (GUCKES et al., 2013). Dans notre étude du système CusRS, les interconnexions avec le système CopRS ont été observés lorsque les HKs étaient absentes, CusS étant capable de maintenir CopR relativement déphosphorylé en absence de cuivre lorsque *copS* est délété (Chapitre 6). Les croisements de phosphorylation peuvent mettre en jeu des affinités différentes entre HKs et RRs comme il a été démontré pour les TCS NarXL et NarQP de *E. coli*. En réponse au nitrate et au nitrite, la HK NarQ phosphoryle à la fois les RRs NarP et NarL alors que NarX phosphoryle préférentiellement NarL en réponse au nitrate (NORIEGA et al., 2010).

L'apparition de ces croisements entre TCSs résulte typiquement de la duplication d'un système provoquant des interférences qui peuvent être désavantageuses en participant par exemple à la diffusion du signal ou au déclenchement d'une réponse inadaptée à un stimulus (CAPRA et al., 2012). Ainsi, le maintien de ces communications croisées nécessite l'acquisition rapide de nouvelles fonctionnalités avantageuses par les acteurs.

Dans le cas du système Roc les 3 HKs présentent de fortes homologues mais RocS1 et RocS4 possèdent des domaines senseurs périsplasmiques de type PBP dont RocS2 est dépourvu. À l'in-

verse, RocS1 et RocS2 possèdent des domaines senseurs cytoplasmiques de type PAS qui sont absents dans RocS4. Il apparaît que les 3 HKs ont rapidement subi des réarrangements de leurs domaines senseurs modifiant probablement la dynamique de réponse aux stimuli ou permettant l'intégration de signaux différents. Les 3 RRs de Roc ayant des domaines de liaison à l'ADN présentent de fortes homologies dans leurs séquences et dans le motif ADN reconnu mais sont néanmoins capables de réguler des cibles spécifiques distinctes *in vivo* ce qui suggère que leur activité transcriptionnelle a évolué. Les FTs paralogues représentent une part importante du répertoire des FTs bactériens et ont généralement des fonctions différentes rapidement acquises au cours de l'évolution (MADAN BABU, 2003a, GELFAND, 2006). En conclusion, si les communications au sein du réseau formé par les acteurs Roc s'avèrent être croisées, il semble que les domaines de détection de signaux des HKs et les domaines effecteurs des RRs sont bien spécifiques de chaque composant permettant ainsi le contrôle de plusieurs gènes en réponse à divers potentiels signaux.

Le système CusRS est acquis dans certaines souches de *P. aeruginosa* par HGT d'une ICE et n'est donc pas le résultat d'une duplication. Ce TCS présente néanmoins de fortes homologies avec CopRS ce qui peut expliquer les communications croisées que nous avons observées entre ces deux systèmes. Il est intéressant de noter que, dans ce cas, nos résultats suggèrent que CopS qui possède une activité phosphatase envers CopR est capable de phosphoryler CusR en absence de CusS. À l'inverse, CusS déphosphoryle CopR en absence de CopS et du signal. Les RRs catalysent leur propre phosphorylation/déphosphorylation (BOURRET, 2010) et nos résultats suggèrent que, en l'absence de CusS, CusR est capable de « pirater » CopS en l'utilisant comme une source de phosphate. Porté par une ICE, le TCS CusRS est amené à s'intégrer à des réseaux de régulation variés mais c'est principalement chez *P. aeruginosa* qu'il a été identifié. Ces résultats suggèrent que CusRS est généralement associé au TCS du génome cœur CopRS avec lequel il peut communiquer. Le rôle de ces communications croisées entre CusS et CopS reste à déterminer. Cependant, la réponse de ces HKs au cuivre sont similaires ce qui suggère que ces interconnexions ne permettent pas l'intégration d'un signal différent.

Co-régulation

La co-régulation est une autre forme d'interconnexions entre TCSs qui implique la régulation commune de gènes par plusieurs RRs. Par exemple, les RRs NarL et NarP reconnaissent les mêmes sites de fixation avec des affinités différentes et régulent ainsi plusieurs gènes en commun (DARWIN et al., 1997). Les sites reconnus par les RRs peuvent aussi être différents comme pour PmrA et RcsB qui sont capables de se lier à deux positions différentes dans la région promotrice de *ugd* et d'activer sa transcription chez *Salmonella* (MOUSLIM et al., 2003). Nos travaux sur le système Roc ont permis d'identifier que RocA1 est le principal activateur de

l'opéron *lepBA*. Cependant, une fixation de RocA2 et RocA3 a été observée sur le même site *in vitro* et leur délétion a sensiblement diminué l'activation de *lepBA* ce qui suggère que les 3 RRs pourraient co-réguler ces gènes.

Notre étude de CusRS a identifié un cas notable de co-régulation dans la région intergénique entre les gènes divergents *pcoA2* et *cusR*. Nos résultats démontrent qu'au moins trois TCS régulent les opérons *cusRS* et *pcoA2-lysR in vivo* : CusRS, CopRS et CzcRS. Bien qu'ils se lient à la même région palindromique, les trois RRs de ces systèmes influencent différemment l'expression des opérons. CusR et CzcR sont des activateurs pour les deux opérons, même si ce dernier a un effet faible sur le promoteur de *pcoA2*. CopR est un activateur de *cusRS* mais réprime l'opéron *pcoA2* en entravant l'action positive de CusR. Considérant que ce locus est acquis par HGT, la présence de ce palindrome « consensus » capable de recruter fortement les RRs endogène pourrait être un moyen pour ces gènes accessoires de s'intégrer au réseau de régulation existant.

Régulation croisée

Dans certains cas, des TCSs sont capables de réguler les gènes d'autres TCSs contrôlant ainsi indirectement l'activité de ces systèmes, ce qui est défini comme de la régulation croisée. Comme précédemment vu pour l'autorégulation des TCSs (Chapitre 3), la régulation croisée participe à l'activation en modulant directement les concentrations des acteurs. L'expérience de DAP-seq a révélé de nombreuses fixations de RRs sur les régions promotrices de la plupart des gènes codant pour des acteurs de TCS dans *P. aeruginosa* suggérant que les régulations croisées entre TCSs est un processus majeur dans ces réseaux de régulations (TROUILLON et al., 2021a). Par exemple, la région intergénique entre *czcC* et *czcR* est ciblée par une vingtaine de RRs, le TCS CzcRS est donc potentiellement massivement régulé par d'autres TCSs.

Nos travaux sur CusR ont ainsi démontré que CopR, en induisant l'expression de *cusR*, est capable d'augmenter la production de ce RR favorisant la fixation de CusR à ces cibles même en absence de phosphorylation et en absence de CusS et CopS.

Plasticité

Les réseaux de régulation sont variables au sein même d'une espèce et cette hétérogénéité participe à l'adaptabilité des différentes souches. Par exemple, chez *Streptococcus pneumoniae*, les gènes régulés par le RR 09 sont très variables entre deux souches et moins de 10% des cibles sont régulés en commun (HENDRIKSEN et al., 2007). Trois principaux moteurs de cette diversité ont été proposés par Trouillon *et al.* (TROUILLON et al., 2021a) : la conservation des RRs, des

gènes ciblés et des régions promotrices. RocR3 et CusR sont deux exemples de RRs spécifiques de certaines souches de *P. paraaeruginosa* et *P. aeruginosa*. RocR3 est un RR orphelin, possédant une activité PDE, qui est probablement issu d'une duplication d'un locus Roc ancestral puis fut perdu dans la plupart des lignées de *P. aeruginosa* à l'exception du groupe 4 et du groupe 3 de *P. paraaeruginosa*. Le gène de CusR est porté par un MGE présent dans plusieurs souches distribuées dans les principaux groupes de *P. aeruginosa* et *P. paraaeruginosa*. L'opéron *pcoA2-lysR* est aussi l'illustration d'une cible spécifique de IHMA87 dont la régulation est orchestrée par des RRs des génomes cœur et accessoire.

Nos travaux apportent aussi un résultat surprenant puisque RocS4 est conservé dans les souches de *P. aeruginosa* ; cependant, la localisation de son gène dépend de la lignée. Situé à proximité de *hptA* codant pour un de ses partenaires dans les groupes 3 et 4, *rocS4* se trouve à un autre emplacement dans les autres groupes, suggérant une potentielle acquisition par HGT. Lors de l'étude du locus de *rocA3*, en plus de *rocR3*, nous avons identifié des gènes prédits codant pour des domaines d'HK et qui suggèrent qu'une HK ancestrale (« RocS3 ») a été complètement ou partiellement perdue selon les lignées. Les portions de gènes restantes codent potentiellement pour des acteurs qui sont uniquement présents dans certains groupes, illustrant ainsi comment l'érosion des gènes des acteurs de TCSs peuvent donner naissance à des protéines spécifiques d'une lignée.

A ARTICLE SUPPLÉMENTAIRE

Cet article mentionné dans l'introduction est le fruit d'un travail auquel j'ai participé en stage de Master 2 sous la supervision de Sylvie Elsen. J'ai pris part à ce projet en réalisant des expériences de RT-qPCR. Il s'agit pour du premier article dans lequel je suis impliqué, qui sera publié au cours de ma première année de thèse.



Transcription Inhibitors with XRE DNA-Binding and Cupin Signal-Sensing Domains Drive Metabolic Diversification in *Pseudomonas*

 Julian Trouillon,^a Michel Ragno,^a Victor Simon,^a  Ina Attrée,^a  Sylvie Elsen^a

^aUniversité Grenoble Alpes, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses team, CNRS ERL5261, CEA IRIG-BCI, INSERM UMR1036, Grenoble, France

ABSTRACT Transcription factors (TFs) are instrumental in the bacterial response to new environmental conditions. They can act as direct signal sensors and subsequently induce changes in gene expression leading to physiological adaptation. Here, by combining transcriptome sequencing (RNA-seq) and cistrome determination (DAP-seq), we studied a family of eight TFs in *Pseudomonas aeruginosa*. This family, encompassing TFs with XRE-like DNA-binding and cupin signal-sensing domains, includes the metabolic regulators ErfA, PsdR, and PauR and five so-far-unstudied TFs. The genome-wide delineation of their regulons identified 39 regulatory interactions with genes mostly involved in metabolism. We found that the XRE-cupin TFs are inhibitors of their neighboring genes, forming local, functional units encoding proteins with functions in condition-specific metabolic pathways. Growth phenotypes of isogenic mutants highlighted new roles for PauR and PA0535 in polyamines and arginine metabolism. The phylogenetic analysis of this family of regulators across the bacterial kingdom revealed a wide diversity of such metabolic regulatory modules and identified species with potentially higher metabolic versatility. Numerous genes encoding uncharacterized XRE-cupin TFs were found near metabolism-related genes, illustrating the need of further systematic characterization of transcriptional regulatory networks in order to better understand the mechanisms of bacterial adaptation to new environments.

IMPORTANCE Bacteria of the *Pseudomonas* genus, including the major human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, are known for their complex regulatory networks and high number of transcription factors, which contribute to their impressive adaptive ability. However, even in the most studied species, most of the regulators are still uncharacterized. With the recent advances in high-throughput sequencing methods, it is now possible to fill this knowledge gap and help the understanding of how bacteria adapt and thrive in new environments. By leveraging these methods, we provide an example of a comprehensive analysis of an entire family of transcription factors and bring new insights into metabolic and regulatory adaptation in the *Pseudomonas* genus.

KEYWORDS *Pseudomonas aeruginosa*, transcription factors, XRE-cupin, RNA-seq, DAP-seq, global regulatory networks


The regulation of gene transcription is a key mechanism in the evolution and adaptation of bacteria to a wide array of environments. Transcriptional regulation involves the interaction between *trans*-acting regulatory proteins called transcription factors (TFs) and *cis*-regulatory elements found on the promoters of regulated genes. Many external and internal signals, such as metabolite concentrations, oxygen, temperature, pH levels, or surface contact, are integrated into regulatory networks through different sensing mechanisms in order to provide an appropriate transcriptional response allowing the bacterium to adapt effectively to the new environment. TFs are classified in several families

Citation Trouillon J, Ragno M, Simon V, Attrée I, Elsen S. 2021. Transcription inhibitors with XRE DNA-binding and cupin signal-sensing domains drive metabolic diversification in *Pseudomonas*. *mSystems* 6:e00753-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00753-20>.

Editor Gilles P. van Wezel, Leiden University

Copyright © 2021 Trouillon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Julian Trouillon, julian.trouillon@gmail.com, or Sylvie Elsen, sylvie.elsen@cea.fr.

 The XRE-cupin family of transcription factors drives metabolic diversification. These inhibitors form local, functional units with their neighbor target genes that are widespread and diverse across the #Pseudomonas genus and most bacterial phyla.

Received 3 August 2020

Accepted 17 November 2020

Published 12 January 2021

depending on the structural similarities in their DNA-binding domains (DBDs), which can either stand alone or be present in multidomain proteins containing variable arrangements with sensing or oligomerization domains (1). This allows the integration of countless different input and output signals into regulatory networks. Although TFs are classified in defined families (2), they each control specific sets of genes to coordinate bacterial responses, and the targets and functions of each newly identified TF cannot be inferred but need to be experimentally established. One-component systems (OCSs) are the most diverse TFs that can directly sense intracellular or imported extracellular signals through their signal-sensing domain and transmit the signal, probably through a conformational change, to their DBD (1). Here, we explored one family of OCSs in *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative opportunistic human pathogen.

P. aeruginosa possesses a considerable metabolic versatility and one of the most complex regulatory networks found in the bacterial kingdom, with roughly 10% of all genes dedicated to transcription regulation (3–5). This regulatory network contains about 500 predicted TFs. While some regulatory pathways have been thoroughly studied, the vast majority of *P. aeruginosa* TFs are still uncharacterized. With the development of next-generation sequencing (NGS)-based methods dedicated to the genome-wide characterization of TFs, the view of complex interplays between and inside different families of TFs is starting to emerge (6, 7). We recently characterized a transcriptional inhibitor, ErfA, recruited to downregulate the expression of a horizontally transferred operon encoding a major virulence factor, ExlA, specifically in one *P. aeruginosa* lineage (8). ErfA belongs to the large family of regulators with an XRE-like DBD that usually binds their DNA targets as homodimers. Besides its N-terminal DBD, ErfA possesses a C-terminal putative sensor domain with a “cupin” fold (8). While ErfA was rewired to also regulate the horizontally acquired *exlBA* operon in *P. aeruginosa*, its main conserved target across *Pseudomonas* species is a metabolic operon, located adjacent to the *erfA* gene, with no role in bacterial virulence. ErfA could thus act as a sensory switch in response to yet-unknown conditions. While signal-sensing TFs are widely distributed in bacteria (1), TFs sharing ErfA-specific domain architecture have not been studied, raising the question of whether ErfA-like regulators could be common and important in metabolic and/or virulence regulation.

In this work, we focused on the eight *P. aeruginosa* TFs that share ErfA architecture in order to examine their genome-wide regulatory targets. In addition to ErfA (8), the family comprises two members with incompletely defined regulons and five uncharacterized TFs. The combination of transcriptome sequencing (RNA-seq) and cistrome determination (DAP-seq) approaches allowed us to define the regulons of six of these TFs. Each family member has specific targets ranging from one to 12 binding sites in promoters of genes related to small-molecule uptake or processing. Regulators with XRE-cupin domains were found as local, specialized inhibitors that are widespread across the *Pseudomonas* genus. While many uncharacterized XRE-cupin TFs were identified, some species (such as *Pseudomonas putida*) harbored up to 10 of these regulators whereas others (i.e., *Pseudomonas stutzeri*) possess only one, potentially reflecting different metabolic versatilityes.

RESULTS

Eight TFs of the XRE-like family share similar architectures. The *P. aeruginosa* PAO1 genome encodes 19 proteins with a helix-turn-helix DNA-binding motif similar to that of the CI and Cro repressors of the phage λ that features the members of the XRE-like family (9, 10) (Fig. 1A). The XRE-like domains of about 60 residues adopt a well-characterized helical conformation with helices 2 and 3 involved in DNA binding (Fig. 1B). The DBD was found alone or associated either with a peptidase S24 domain (AlpR and PrtR) or with a predicted sensor cupin domain at the C terminus of proteins (Fig. 1C). The versatile cupin domain folds into a 6-stranded β -barrel and is associated

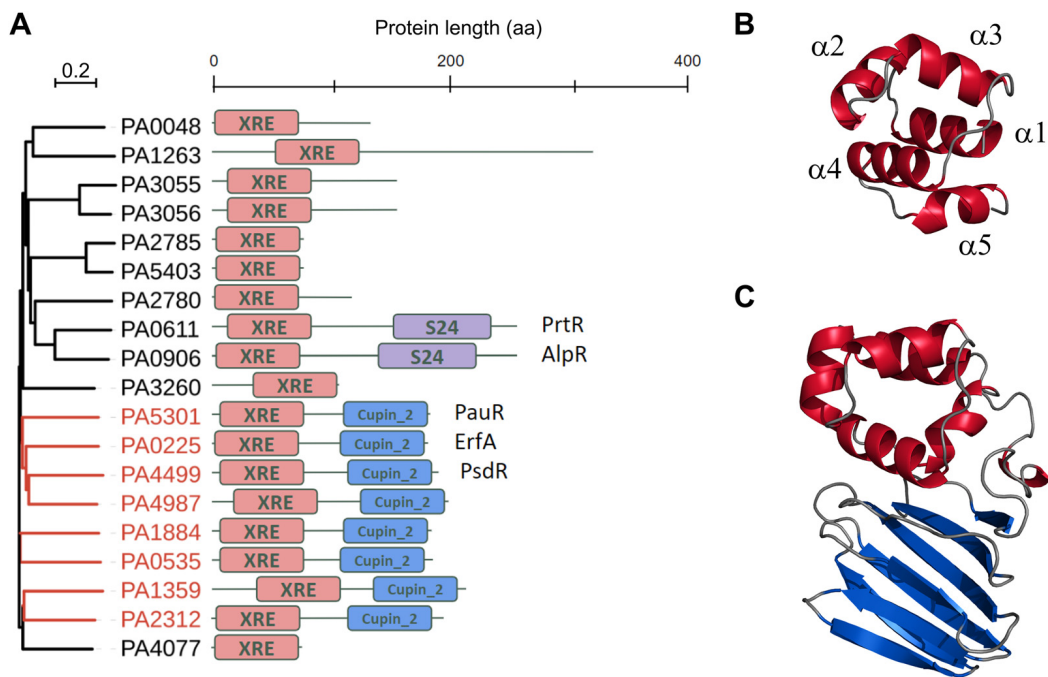


FIG 1 *P. aeruginosa* TFs belonging to the XRE family. (A) Maximum likelihood phylogenetic tree of the 19 proteins possessing an XRE DNA-binding domain in *P. aeruginosa* PAO1 (18). The branches corresponding to the eight XRE-cupin regulators are colored in red in the tree. (B) Stereo ribbon representation of the model of the XRE DNA-binding domain of ErfA. The five alpha-helices are annotated. (C) Stereo ribbon representation of the model of ErfA structure. The XRE domain is in red and the cupin domain is in blue. Model prediction was done using the SWISS-MODEL tool (34) using the structure with PDB ID 1Y9Q as the template.

with a wide range of function (11). In addition to ErfA (PA0225), seven TFs share the XRE-cupin architecture with only two having partially attributed functions: PA0535, PA1359, PA1884, PA2312, PA4499 (PsdR), PA4987, and PA5301 (PauR). Using targeted approaches, PsdR and PauR were previously shown to regulate dipeptide metabolism (12, 13) and polyamine metabolism (14), respectively. By regulating independent metabolic pathways, these two TFs play an essential role for bacterial growth in their corresponding environmental conditions, which predicts potentially important functions for the five so-far-unstudied TFs of the family.

TFs of the XRE-cupin family are local, highly specialized repressors. To get a global view on target specificities and regulatory networks of *P. aeruginosa* XRE-cupin TFs, we undertook to determine the regulons of all members of this family, except for ErfA, which we already comprehensively studied (8). To that aim, the corresponding genes were deleted in the genome of PAO1 and the transcriptomes of the engineered mutants were compared to that of the wild-type strain by RNA-seq. In parallel, we expressed and purified the seven recombinant regulators, and their targets were identified *in vitro* on fragmented *P. aeruginosa* PAO1 genome by DAP-seq (8, 15). Altogether, we determined transcriptomes and direct DNA targets for six of the seven regulators (Fig. 2A; see also Tables S3 and S4 in the supplemental material). The PA2312 protein was less soluble and stable than any of the other proteins and was thus probably inactive and/or aggregated, resulting in no significant peak detected in DAP-seq. In addition, the PA2312 gene seems not to be expressed under the tested condition, as revealed by the few reads covering the coding DNA sequence (CDS) observed by RNA-seq in the wild-type strain. Overall, the family of XRE-cupin TFs regulates 39 genes in the PAO1 strain through direct binding to 19 genomic regions in total (Fig. 2B).

In all cases, there was a strong correlation between *in vivo* and *in vitro* targets; the majority of DAP-seq peaks were centered on the promoters of genes that were also significantly dysregulated in RNA-seq. Most binding events occurred in the core promoter regions of regulated genes (Fig. 3A), and each target gene was found

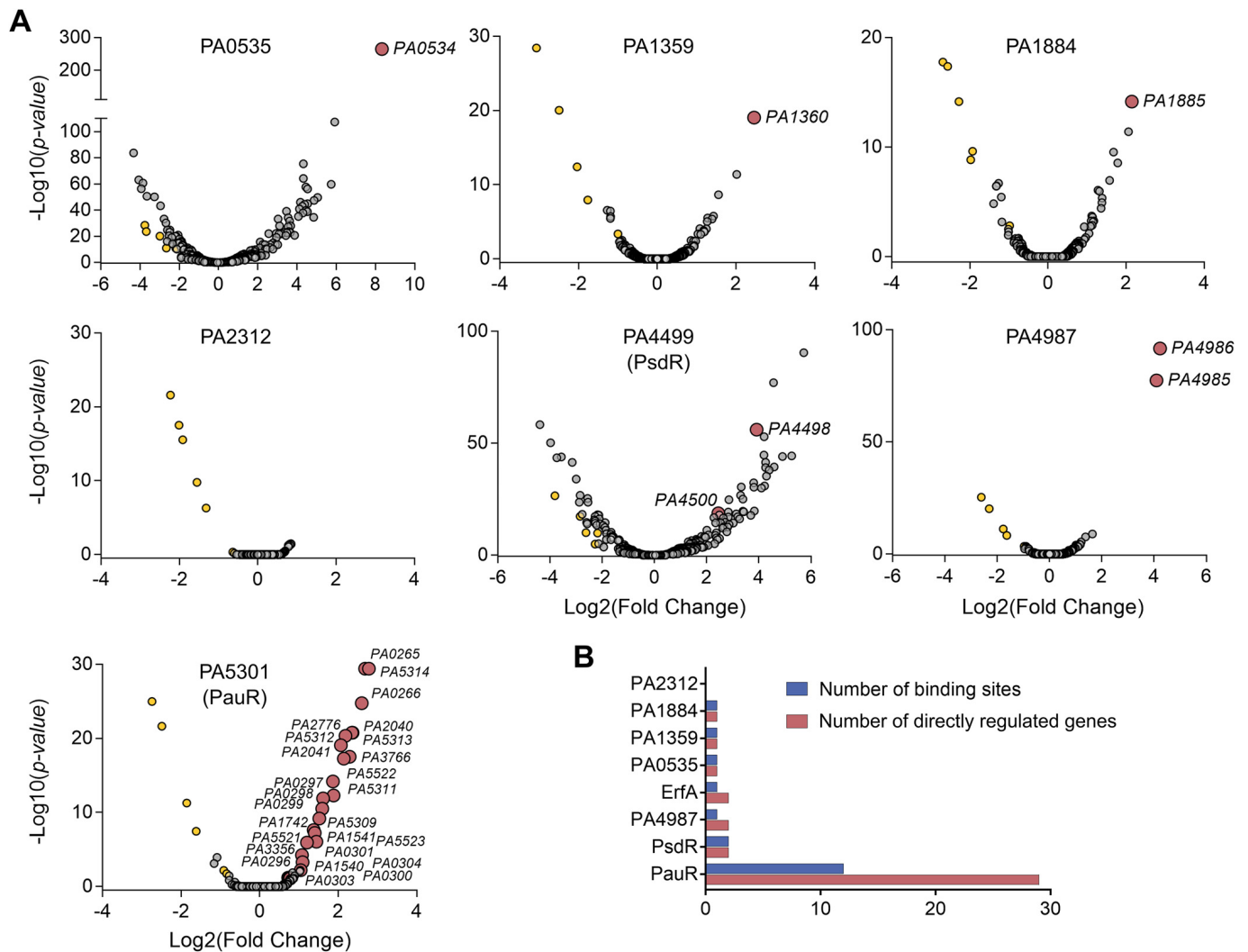


FIG 2 Determination of the regulons of the XRE-cupin regulators. (A) Volcano plots displaying the RNA-seq results of the genes differentially expressed in the respective XRE-cupin mutants versus parental strain PAO1. Genes for which a DAP-seq binding peak was identified in the promoter are represented by red circles and annotated with their gene ID. The genes (yellow circles) found commonly downregulated in all mutants represent artifacts probably due to genetic manipulation. (B) Summary of number of regulatory targets per TF in *P. aeruginosa* PAO1.

upregulated in the mutant of the corresponding regulator (Fig. 3B), showing that the XRE-cupin regulators are inhibitors of transcription. Our analyses confirmed the known regulon of PsdR and extended our knowledge on PauR, as discussed below. For most regulators, we found one or two direct targets, with the exception of PauR (PA5301), which directly regulates 29 genes (Fig. 2B). Some genes were found slightly downregulated in all mutants with no corresponding binding sites found, probably due to experimental conditions or genetic manipulations (Fig. 2A). At least one regulatory target per TF was further verified by RT-qPCR and electrophoretic mobility shift assays (EMSA), and in all cases the RNA-seq and DAP-seq results were confirmed by these targeted approaches (Fig. 4).

Strikingly, all the XRE-cupin TFs bind to at least one intergenic region directly adjacent to their own gene (Fig. 5). PauR strikes as an outlier with its 29 regulated genes scattered across 12 different genomic locations, while all other XRE-cupin repressors have one or two targets, always found in the direct vicinity of their own genes, showing that they are local, specialized regulators that form local functional units with their regulated genes. Horizontal gene transfer (HGT) is thought to shape the evolution of these gene groups and their regulatory relationships and might be at the origin of their differentiation from one another (16, 17).

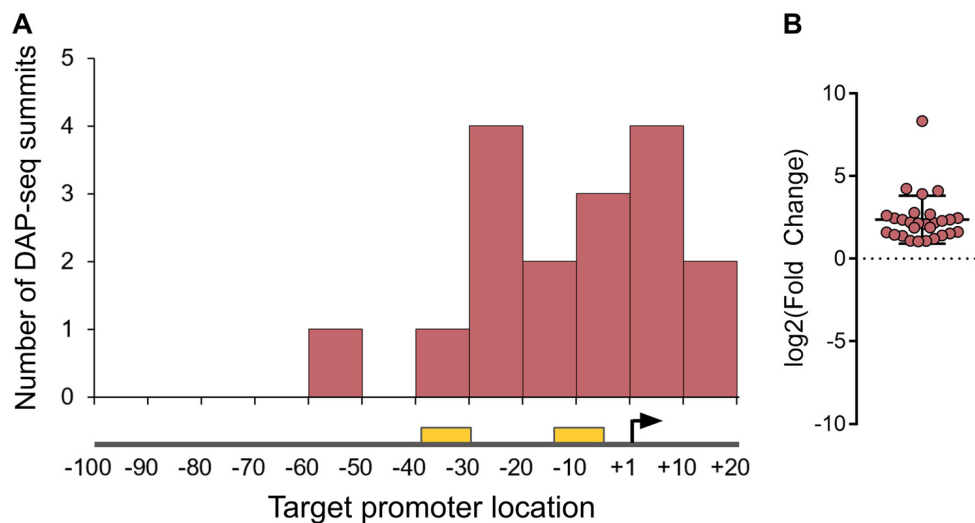


FIG 3 The XRE-cupin regulators are inhibitors of transcription. (A) Repartition of binding sites identified by DAP-seq within target promoters. RNA polymerase binding sites were either inferred from experimentally determined transcription start sites (44) or predicted using BPROM (45) if no data were available. The transcription start site is shown as a black arrow, and the -10 and -35 boxes are shown as yellow rectangles. (B) RNA-seq expression fold changes of target genes in regulator mutants compared to the wild-type strain.

Based on DAP-seq peaks, DNA-binding motifs could be generated for PsdR and PauR, which have more than one binding site (Fig. S1). These motifs exhibit a palindromic architecture, like the previously determined ErfA consensus (8), supporting DNA binding of XRE-cupin TFs as dimers. Mutations introduced into the binding site prevented PauR binding, further validating the inferred consensus (Fig. S1). Interestingly, mutation of only half the palindromic sequence recognized by PsdR led to a faster mobility fragment than that obtained with the wild-type sequence. This might correspond to the binding of one monomer to the mutated probe and supports the model in which the usual two-band shift observed with most XRE-cupin TFs corresponds to the binding of a monomer (lower, fainter band) and of a dimer (higher, stronger band) at higher concentration (Fig. 4 and Fig. S1). The three determined binding consensus sequences are quite different, probably due to differences in the amino acid composition of their DNA-binding interface observed among the TF family (Fig. S2). This supports their different DNA binding preferences and regulon specificities, as no common targets were revealed for any of the regulators.

Altogether, we defined the regulons of seven TFs, completing our knowledge of the XRE-cupin TF family in *P. aeruginosa* (Fig. 5A). Our results show that all the members of the family are inhibitors of transcription, most likely acting by occluding the promoter and preventing RNA polymerase recruitment. Despite their common features (domain architecture, local action, inhibitory function), each XRE-cupin TF targets specific regulons without overlapping roles.

XRE-cupin TFs regulate specific metabolic pathways. To determine the functions of each TF, we scrutinized the roles of their regulons in detail (Fig. 5A and B). That of ErfA was already mentioned and encompasses the *ergAB* operon in PAO1, playing a putative role in amino acid or carbohydrate metabolism (8). PA0535 has only one target: it inhibits the *pauB1* gene and potentially its own expression, the two genes being predicted as an operon (18) (Fig. 4A and Fig. 5A). PauB1 is one of the four redundant PauB proteins, which are flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent oxidoreductases working in the complex γ -glutamylatation pathway required for polyamine utilization in *P. aeruginosa* (14, 19). Although expression of its gene was shown to be increased in the presence of putrescine (20), PauB1 is required for cadaverine catabolism (14). We thus identified PA0535 as the missing regulator of the γ -glutamylatation pathway, most of the genes being under the control of PauR, or BauR (19). Indeed, the key regulator

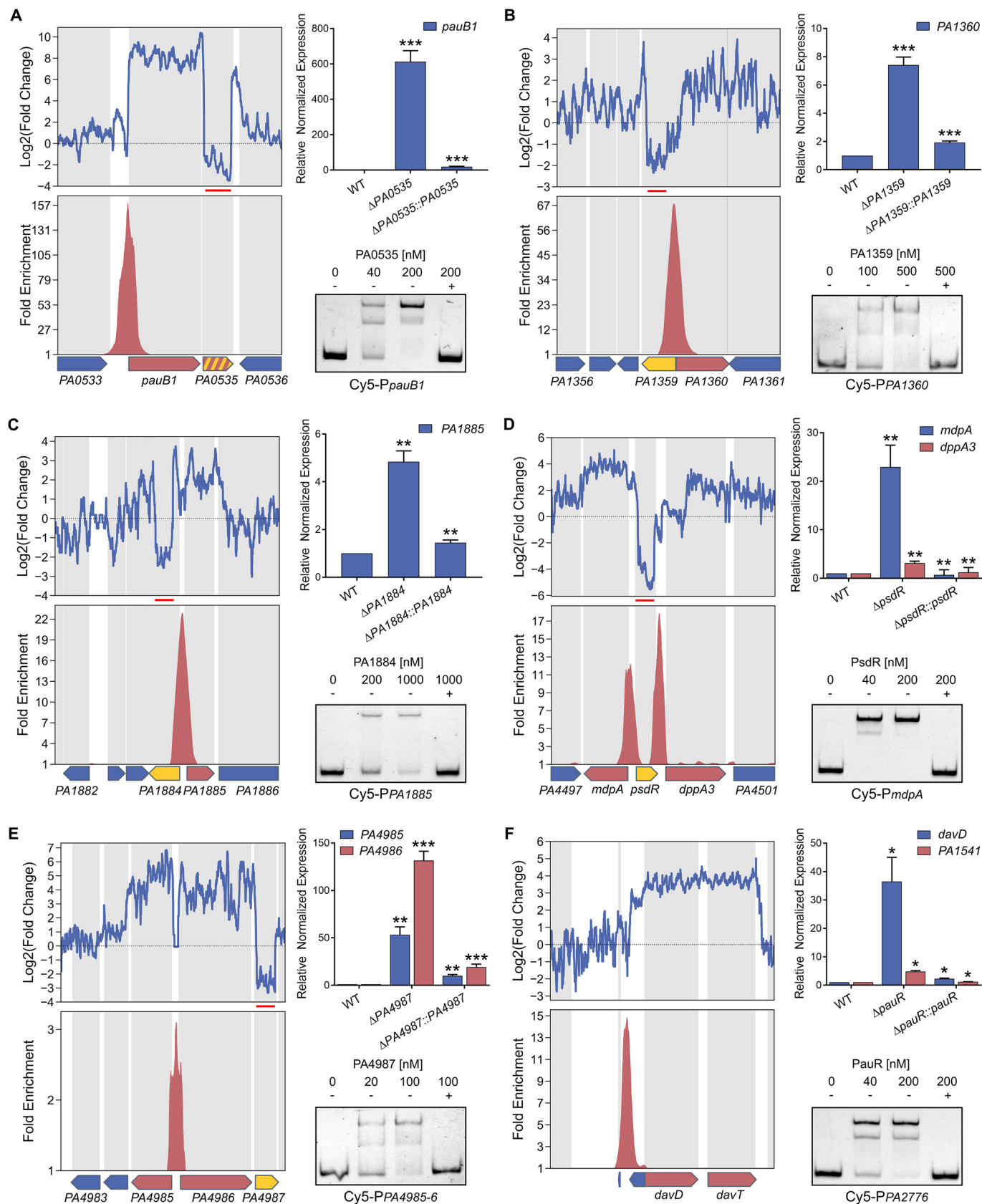


FIG 4 RT-qPCR and EMSA confirm the genome-wide results. Selected TFs and targets were PA0535 and *pauB1* (PA0534) (A), PA1359 and PA1360 (B), PA1884 and PA1885 (C), PsdR and *mdpA* (PA4498) and *dppA3* (PA4450) (D), PA4987 and PA4985-PA4986 (E), and PauR and *davD* (PA0265), PA1541 (by RT-qPCR), and PA2776 (by EMSA) (F). (Upper left panels) Local RNA-seq read abundance fold changes in the corresponding mutants compared to parental (Continued on next page)

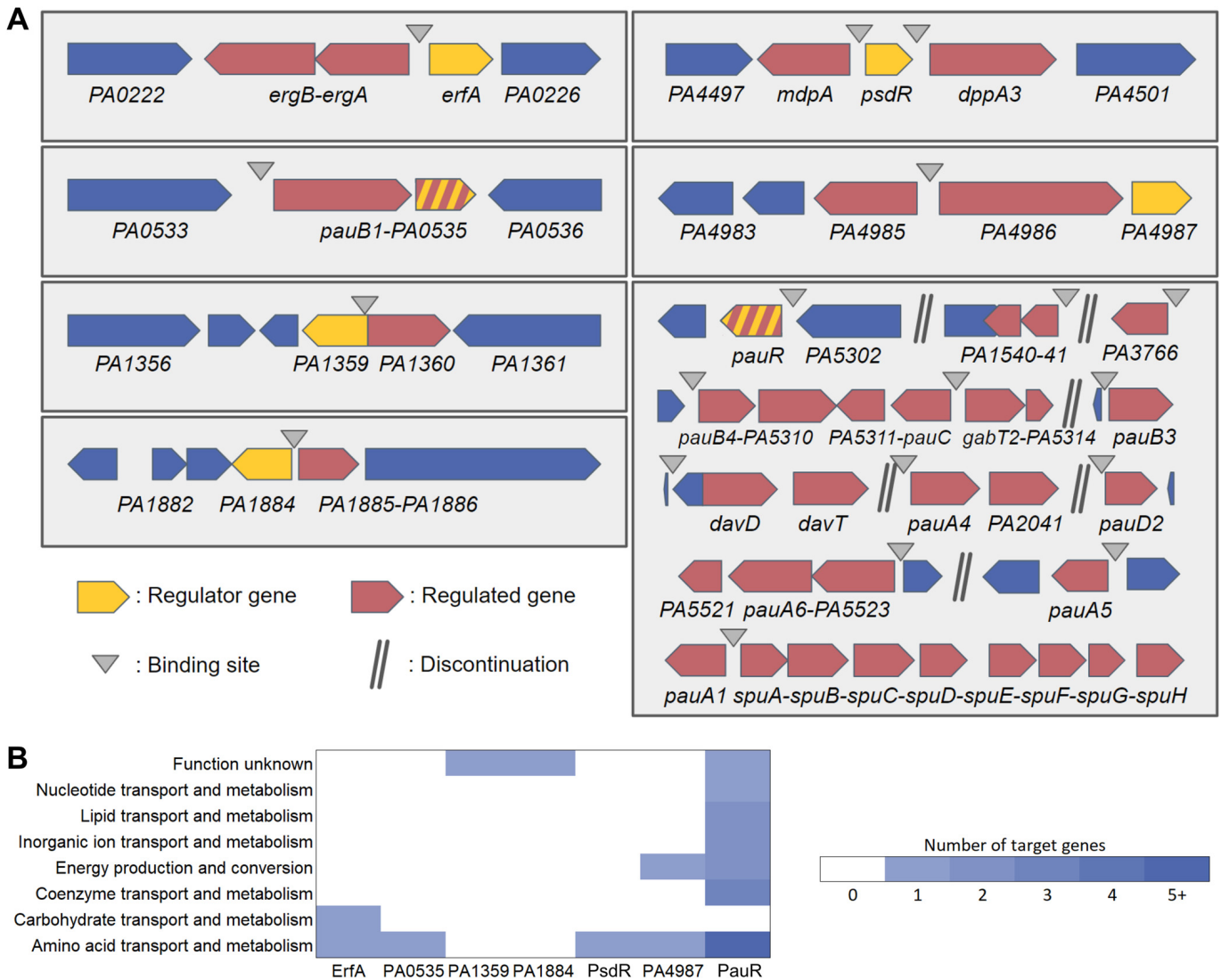


FIG 5 The complete regulons of the XRE-cupin regulators. (A) Schematic views of the local targeted regions of the seven XRE-cupin TFs with determined regulons in *P. aeruginosa* PAO1. Genes in operons, as annotated in the *Pseudomonas* genome database (18), are connected with hyphens. Genes that both have a DAP-seq peak in their promoter region and are differentially expressed (P value < 0.05) are shown as regulated genes (red arrows). (B) Functional annotation of XRE-cupin regulatory targets. COG functional annotations were retrieved from the PAO1 genome on the *Pseudomonas* database (18) for all target genes.

PauR was shown to bind *in vitro* to eight sites and thus to potentially affect expression of 18 genes (14). As mentioned above, our results confirmed all known DNA targets of PauR, and RNA-seq provided further information concerning the extent of gene expression perturbation resulting from the TF binding. Two previously reported PauR binding sites were predicted to control the expression of six genes (14), while our genome-wide expression data show that they actually impact the expression of 13 genes, *pauA1* and the *spuABCDEFGHI* operon for one, and the two divergently transcribed two-gene operons, *pauC-PA5311* and *gabT2-PA5314* for the other. Furthermore, we also

FIG 4 Legend (Continued)

strain. Red lines show the deleted region in the mutant strain. (Lower left panels) Local fold enrichments in the corresponding regulator obtained by DAP-seq compared to negative controls. Target genes are shown as red arrows, genes encoding the studied TF as yellow arrows, and others as blue arrows. Suspected autoregulation is denoted with dashed yellow-red arrows. (Upper right panels) RT-qPCR showing the regulation of the target genes in the corresponding regulatory mutants and complemented strains. Experiments were performed in triplicates and normalized to the *rpoD* transcripts. Error bars indicate the SD. Statistical significance was assessed using two-tailed t test (P value < 0.05 [*], 0.01 [***], or 0.001 [****]) and is shown against wild-type (WT) strains for mutants and against mutants for complemented strains. (Lower right panels) EMSA on target binding sites. Recombinant XRE-cupin-His₁₀ proteins were incubated with 0.5 nM Cy5-labeled probes for 15 min before electrophoresis. For competition assays, excess of unlabeled probes (100 nM) is denoted by +.

extended the *PauR* regulon by identifying four additional binding sites, one located upstream of the *pauR* gene, strongly supporting an autoregulation mechanism. Three new identified targets were the *PA3766* gene encoding a probable amino acid/polyamine transporter and two operons, *davD-davT* and *PA1541-40*, which we confirmed by RT-qPCR (Fig. 4F). While *PA1541* encodes a probable transporter, the *DavD* and *DavT* proteins are enzymes involved in the conversion from 5-aminovaleate (AMV) to glutarate (19). Cadaverine is converted into AMV through the γ -glutamylolation pathway, showing that *PauR* regulation extends beyond this metabolic pathway to further downstream steps. The *PA1359* regulator negatively controls the expression of the *PA1360* gene (Fig. 4B), coding for a putative drug/metabolite transporter similar to the threonine exporter *RhtA* in *Escherichia coli* (21). *PA1884* has also only one target, the *PA1885* gene (Fig. 4C), the product of which is a putative acyltransferase with a GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferases) domain, which could either confer antibiotic resistance or have potential metabolic functions. Even if *PA1885* is predicted to be in an operon with the downstream *polB* gene (18), RNA-seq data indicated no difference on this gene, excluding a control by the inhibitor and suggesting the existence of a *polB*-specific promoter (Fig. 4C). The *PsdR* regulator was already identified as the repressor of *dppA3* and *mdpA* (12), involved in the uptake and utilization of small peptides; our results complete the scheme by demonstrating that the control is direct and involves two binding sites surrounding the *psdR* gene (Fig. 4D). *DppA3* is a substrate-binding protein delivering tripeptides/dipeptides to the ABC transporter *DppBCDF* (22), and *MdpA* is a metallodipeptidase involved in their processing (12). Finally, *PA4987* has one binding site in the intergenic sequence of *PA4985* and *PA4986*, downregulating expression of both genes as confirmed by RT-qPCR (Fig. 4E). Although *PA4984* is predicted to be in operon with *PA4985*, we did not observe any effect on its expression (Fig. 4E). *PA4986* is a putative oxidoreductase, and *PA4985* is a possible periplasmic spermidine/putrescine-binding protein. Overall, the XRE-cupin regulators seem to regulate functions related to specific amino acids or small-molecule uptake or processing (Fig. 5B).

Based on our knowledge of their different regulons, we attempted to further investigate the XRE-cupin TFs' roles through two global phenotypic assays. We first took advantage of the *Galleria mellonella* infection model frequently used to assess overall bacterial fitness and virulence (23–25). No significant difference could be observed in survival curves between larvae infected with wild-type and mutant strains (Fig. S3). Therefore, the overexpression of genes regulated by the XRE-cupin family of repressors did not provide *P. aeruginosa* any advantage or disadvantage in this simple animal model. On the other hand, we assessed the strains' antibiotic resistance to 24 different clinically relevant antibiotics and again found no differences (Fig. S3). These results reflect the specificity of the XRE-cupin regulators and their functional units toward precise conditions. Indeed, *psdR* inactivation was shown to increase growth fitness during proteolytic growth in caseinate medium, as this provides the dipeptide substrates for the derepressed dipeptides' uptake and degradation (13). Also, *mdpA* expression is induced in the presence of X-Pro dipeptides that might explain the faster growth in their presence due to their higher metabolism (12). The fact that they do not affect fitness in global phenotypic assays illustrates that TFs of this family, along with their target genes, are niche-specific functional units allowing the bacteria to detect and respond to defined conditions.

To investigate the role of regulators under more specific conditions, in particular in relation to polyamines, we performed growth assays in LB medium and M9 minimal medium containing different carbon sources. While there were no differences in most growth media (Fig. S4), we identified a growth advantage of the *pauR* mutant when growing on putrescine and a growth defect of the *PA0535* mutant when growing on L-arginine (Fig. 6). It thus appears that disinhibition of the γ -glutamylolation pathway due to the absence of *PauR* provides a growth advantage on putrescine, most probably due to the presence of all necessary enzymes for putrescine catabolism, allowing a

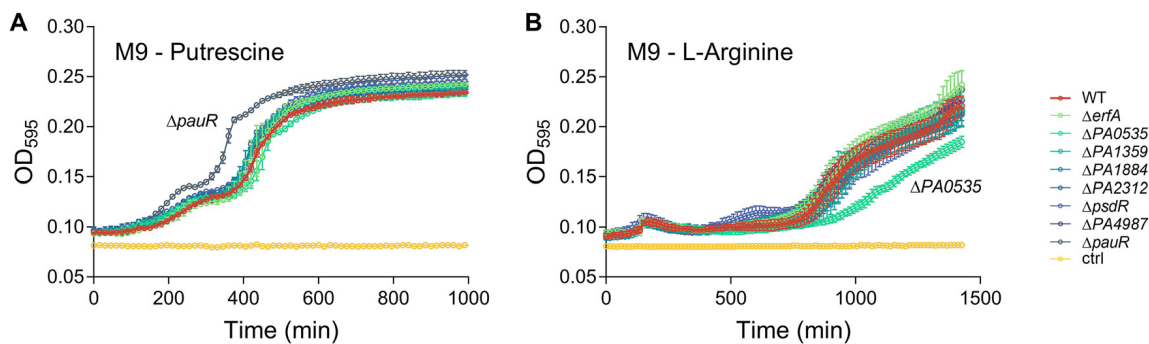


FIG 6 Growth of the strains deficient in XRE-cupin regulators on putrescine and arginine. Bacterial growth in M9 minimal medium containing putrescine (A) or L-arginine (B) as carbon source. After overnight growth at 37°C in LB, bacteria were diluted to an OD₆₀₀ of 0.02 and grown in 96-well plates at 37°C with agitation for 24 h. Cultures were performed in biological duplicates.

faster growth initiation. Additionally, PA0535 inhibits the expression of *pauB1*, encoding one of four redundant PauB proteins involved in polyamine processing (20). Interestingly, L-arginine can be used as precursor for the biosynthesis of polyamines through the arginine decarboxylase (ADC) pathway (26), which suggests that PauB1 might play a role in the initiation of this pathway. Indeed, the overexpression of PauB1 in the PA0535 mutant could induce increased metabolic flux toward the ADC pathway and thus reduce L-arginine availability for more efficient catabolic pathways such as the arginine succinyltransferase (AST) pathway, thus explaining the growth defect of the PA0535 mutant. Altogether, these results provide new insights into the functions of XRE-cupin regulators and the complex γ -glutamylamylamyl pathway.

It is hypothesized that XRE-cupin TFs are able to detect small signal molecules and detach from their DNA-binding sites upon sensing in order to induce expression of the target genes. PauR was indeed shown to be involved in the derepression of genes of the γ -glutamylamylamyl pathway in the presence of putrescine and cadaverine (14). In addition, the *E. coli* PauR homolog PuuR is known to dissociate from its binding site upon direct sensing of putrescine (27). In the same line, *mdpA* expression was shown to be induced in the presence of different dipeptides, probably sensed by PsdR (12). In all these cases, the signals were metabolites that are part or the precursors of the regulated metabolic pathways. The cupin domain in these regulators is predicted as a signal-sensing domain and thus could be responsible for the specific sensing of each regulon-related metabolite, as is often the case (28). The crystal structure of an XRE-cupin regulator from *Vibrio cholerae* has been solved and shows a binding pocket in the cupin domain with bound D-methionine (PDB ID 1Y9Q). The structure modelization of all eight *P. aeruginosa* XRE-cupin regulators also led to the identification of specific binding pockets in each cupin domain (Fig. S5). Similarly to what was found for their DNA-binding interfaces (Fig. S2), each regulator exhibits a different amino acid composition inside this putative signal-sensing pocket. These variabilities at the two major functional regions of the proteins explain the difference in DNA- and signal molecule-binding preferences and may result from evolutionary processes involving HGT that led to the multiplication and differentiation of these regulators.

XRE-cupin regulators are diverse and differently conserved between *Pseudomonas* species. As XRE-cupin TFs seem to regulate small individual metabolic pathways that could reflect the different environments encountered by the bacteria and their ability to adapt, we assessed the conservation of this family across the *Pseudomonas* genus. We first examined the conservation of the eight regulators studied here and found different conservation between *Pseudomonas* species (Fig. 7A). Interestingly, PA1359 and PauR were conserved in nearly all strains, suggesting a more central role or ancestral origin. The six other regulators are less conserved between strains and species. We can notice that although PA2312 seems not to be active in the PAO1 strain, its gene is conserved within *P. aeruginosa* strains and is present in other species, underlining its physiological importance. Here again, the conservation of the TFs and their regulatory

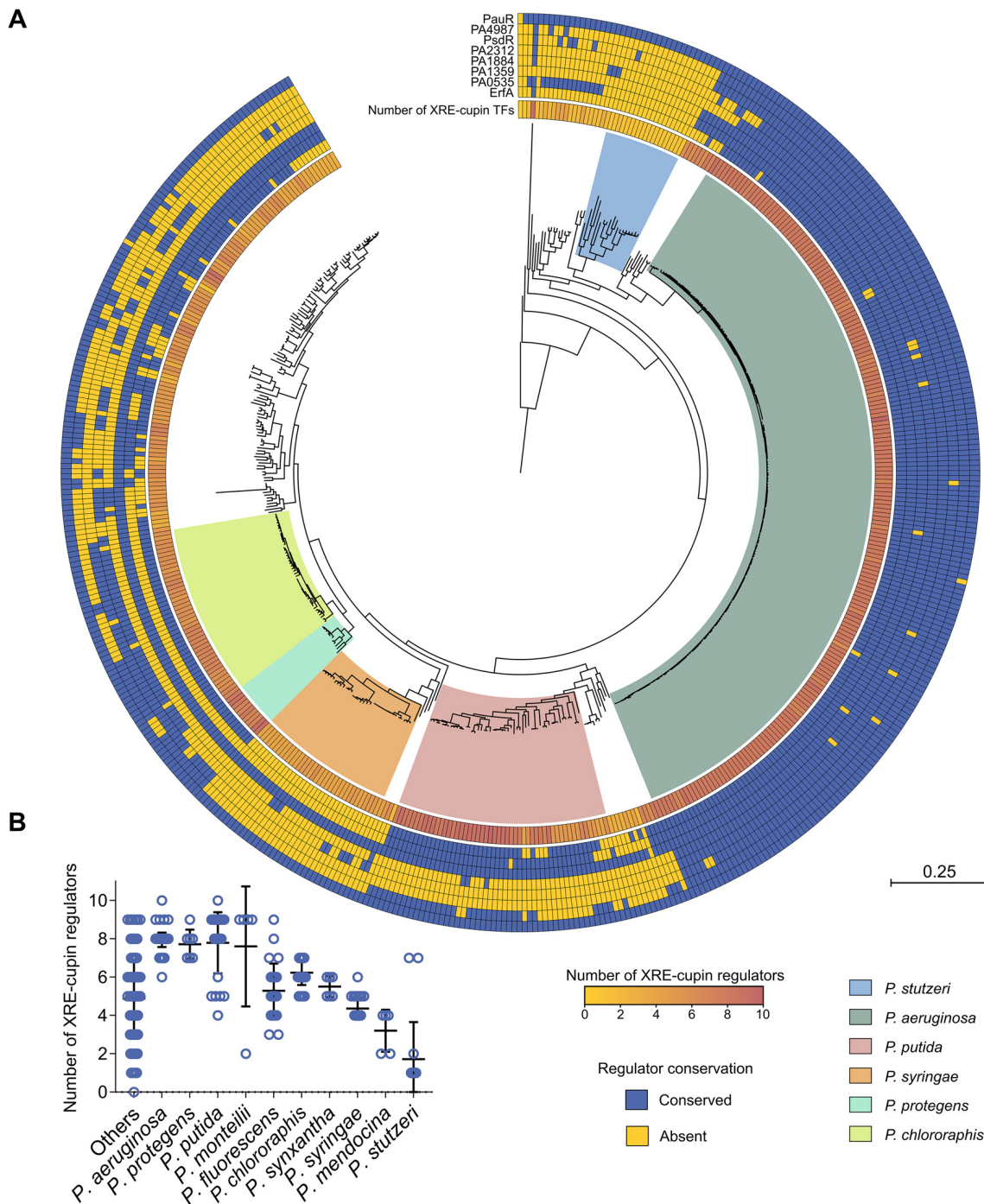


FIG 7 Phylogenetic analysis of the conservation of the XRE-cupin regulatory family across the *Pseudomonas* genus. (A) Maximum-likelihood phylogenetic tree of 503 *Pseudomonas* complete genomes. The tree was generated from the multiple alignment of the concatenated sequences of 66 core genes for each strain with 100 bootstraps. The most represented species are delineated with a colored background. The number of XRE-cupin proteins detected through the hidden Markov model search is shown as the inner circle yellow-to-red heatmap. The outer circles show the results of homolog search by Reciprocal Best BLAST Hit search for the eight regulators studied here. (B) Dot plot showing the distribution of number of XRE-cupin regulators per strain for each species. Species represented by fewer than five strains are grouped in the “Others” column.

targets probably depends on the environments encountered by each species which might require or not the associated metabolic functional units.

To apprehend the importance of these regulators, we investigated the presence of other XRE-cupin TFs in all strains. Using all XRE-cupin sequences available on NCBI ($n = 23,072$) as the templates, we created and validated a hidden Markov model for the

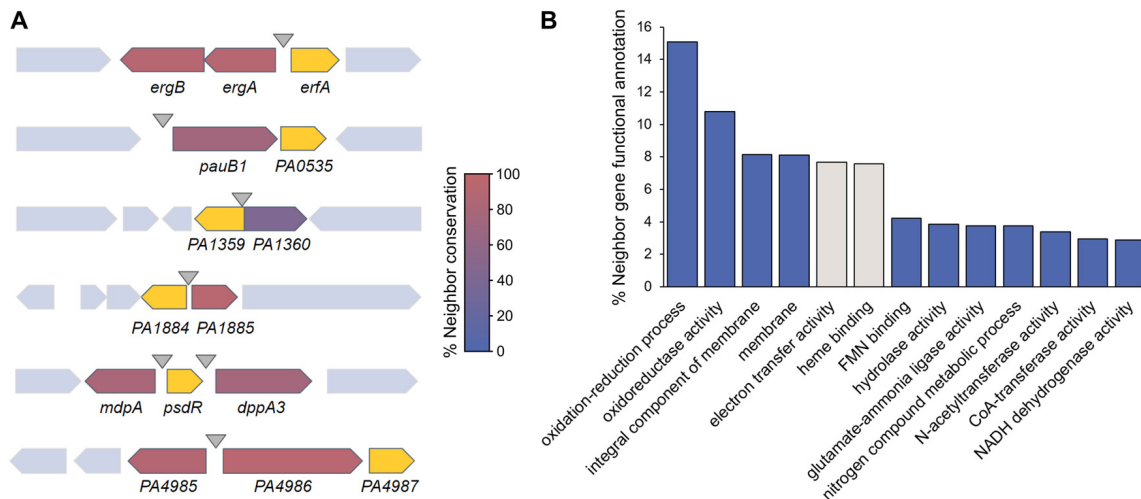


FIG 9 Gene synteny and genetic environment of the XRE-cupin regulators. (A) Conservation of XRE-cupin neighboring target genes. Regulator-encoding genes are shown in yellow. Target genes are colored depending on how often they were found as conserved neighbors of their associated XRE-cupin TF. (B) Histogram showing the proportion of the most represented (>2%) GO functional annotations. Functional annotations were obtained from Pfam results of InterProScan search on 6,294 genes neighboring XRE-cupin regulators from 503 *Pseudomonas* genomes. Two categories are shown in gray as they correspond to the *cycB* gene, a conserved neighbor of *pauR* not regulated by *PauR*, and thus are not representing XRE-cupin regulatory targets.

all XRE-cupin regulators, we assessed the functions of the neighbor genes of all 3,147 regulators identified in *Pseudomonas* here. Based on GO Term annotations of all 6,294 direct genetic neighbors, the vast majority of them encode either enzymes or small-molecule transporters (Fig. 9B). This result strongly corroborates the fact that local functional units comprising XRE-cupin regulators act as metabolic modules for the response to the presence of specific metabolites.

DISCUSSION

In the present study, we characterized a family of eight TFs sharing the same domain architecture (XRE-cupin TFs) in *P. aeruginosa* and identified their regulatory targets. The XRE-cupin family members are exclusive inhibitors of the transcription of metabolism-related genes probably needed under defined, specific conditions. The current model is that these TFs act as regulatory switches that keep the transcription of their neighboring target genes down until their products are needed for a given metabolic pathway. Upon sensing of the precursor metabolite of the regulated pathway through their cupin domain, they disengage from the DNA in order to allow transcription of the genes coding for enzymes or transporters that will process the sensed molecule. This could include catabolism for nutrient source, as seen for *PsdR*, or detoxification via export of sensed molecules, as predicted for *PA1359*.

In most cases, the target genes were found located in the direct vicinity of the regulator gene, revealing the local nature of these regulatory interactions. Neighbor regulation is a common feature in bacteria, which has been explained by different models (16, 29). Genes that are functionally related, including regulators and regulated targets, tend to regroup together on the chromosome in order to be a complete functional unit when transferred by HGT. Different types of neighbor regulation are known (16), three of which were found in this study: simple neighbor regulation and coregulation of neighbors in both *cis* and *trans*, with some instances of autoregulation. In all cases, the total number of targets was small, allowing the formation of these local functional units. The very specific functions of the XRE-cupin regulons explain the small number of regulated genes and the fact that these units are local and probably easily transferable gene clusters.

We found a high conservation of some of the studied TFs and their neighboring target genes across the *Pseudomonas* genus. These functional units may have been exchanged by HGT between bacteria that encounter similar environmental conditions. Additionally, a large number of different XRE-cupin regulators, each associated with their specific genetic neighborhood, were identified across the *Pseudomonas* genus. Out of the eight TFs studied here, none shared any common regulatory targets, and the two known sensed signals (dipeptides and polyamines) are different. This is explained by differences found at both DNA-binding and signal-sensing interfaces. Such differences are thought to happen through evolution, after and during repurposing or duplication events, and explain the presence of different XRE-cupin regulators in each species. The large number of this type of regulator illustrates their ancestral nature and their importance as condition-specific, transferrable means of metabolic diversification.

Pseudomonas species are famous for their wide metabolic versatility, encompassing many condition-specific metabolic pathways (30). While the prediction of metabolism-related functions works relatively well, experimental studies are still needed to pinpoint the exact pathways represented by uncharacterized genes. As illustrated by the target genes found here which mostly have only predicted functions, there is still a great need of phenotypic characterization of putative new metabolic pathways. Such studies would complete our knowledge on the mode of action of the XRE-cupin family of regulators and help understand both the function and sensed signals of this class of TFs. We also believe that family-wide and interspecies studies of TFs should become more common in order to be able to decipher global regulatory networks, especially in bacteria where they are still scarce.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The bacterial strains used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. *P. aeruginosa* and *E. coli* strains were grown in lysogeny broth (LB) at 37°C under agitation (300 rpm). *P. aeruginosa* strains were selected on *Pseudomonas* isolation agar (PIA) plates. Antibiotics were added when needed at the following concentrations: for *P. aeruginosa*, 200 µg/ml carbenicillin, 200 µg/ml gentamicin, and 200 µg/ml tetracycline; for *E. coli*, 100 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml gentamicin, and 10 µg/ml tetracycline.

For growth assays, after overnight growth at 37°C in LB, bacteria were diluted to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.02 in 200 µl of LB or M9 minimal medium (48 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 9 mM NaCl, 19 mM NH₄Cl) supplemented with 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, and different carbon sources with equal concentrations of carbon ([C] = 66 mM): 0.2% glucose, 0.24% pyruvate, 0.28% acetate, 0.2% Casamino Acids, 0.2% succinate, 0.27% putrescine, or 0.23% L-arginine. Growth in 96-well plates was assessed by following the OD₅₉₅ using a microplate reader for 24 h at 37°C with agitation.

Plasmids and genetic manipulations. Plasmids and primers are listed in Tables S1 and S2, respectively. For overproduction of recombinant His₁₀-tagged proteins, each gene sequence was amplified by PCR using PAO1 genomic DNA as a matrix and appropriate primer pairs and then integrated by sequence- and ligation-independent cloning (SLIC) in pET-52b cut with NcoI-SacI and sequenced.

To generate *P. aeruginosa* deletion mutants, upstream and downstream flanking regions of each gene were amplified using appropriate primer pairs (sF1/sR1 and sF2/sR2 for each construct). The two resulting, overlapping fragments were then cloned into SmaI-cut pEXG2 by SLIC (31) and sequenced.

For complementation of PA1359, PA1884, PA4499, and PA5301 mutants, a fragment encompassing the promoter (around 500 bp upstream from the start codon) and the CDS was amplified by PCR and cloned by SLIC into the mini-CTX1 plasmid cut by SmaI. When the gene was predicted as the second gene of an operon (PA0535, PA2312, and PA4987) (18), the operon promoter was directly fused to the regulator gene. To do so, two fragments were generated, the upstream fragment carrying around 500 bp upstream and the first 3 codons of the first gene of the operon and the second one carrying the last few codons and the entire CDS of the gene of interest. Then, the two overlapping fragments were cloned by SLIC in pEXG2 and sequenced.

All mini-CTX1- and pEXG2-derived plasmids were transferred by triparental mating into *P. aeruginosa*, using the pRK600 helper plasmid. For allelic exchange, merodiploids resulting from cointegration events were selected on PIA plates containing gentamicin. Colonies were then plated on NaCl-free LB agar plates containing 10% sucrose to select for the loss of plasmid. The resulting sucrose-resistant strains were checked for gentamicin sensitivity, and the mutant genotypes were determined by PCR. For complementation using mini-CTX1-derived plasmids, bacteria with an *att* site-inserted plasmid were selected on PIA plates containing tetracycline, and then they were cured from the mini-CTX1 backbone by excising the FLP recombination target (FRT) cassette with pFLP2 plasmid as previously described (32).

Structure modeling. Protein sequences from the eight *P. aeruginosa* XRE-cupin TFs were aligned against the RCSB Protein Data Bank (33) in order to find an experimentally obtained three-dimensional

(3D) structure to use as a template for modeling. The 1.90-Å 3D structure of an XRE-cupin transcription factor from *V. cholerae* (PDB ID 1Y9Q) was used as the template as it permitted the best modeling confidence using the SWISS-MODEL tool (34).

Protein purification. All the pET-52b plasmids were transformed into *E. coli* BL21 Star(DE3). For protein overproduction, overnight cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.05 in LB medium containing 100 µg/ml ampicillin, and expression was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 with 1 mM IPTG. After 3 h of growth at 37°C, bacteria were harvested by centrifugation at 6,000 × *g* for 10 min at 4°C and resuspended in L buffer (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 5% glycerol, pH 8, containing Roche protease inhibitor cocktail). Bacteria were then lysed by sonication. After centrifugation at 66,500 × *g* for 30 min at 4°C, the soluble fraction was directly loaded onto a 1-ml nickel column (Protino Ni-nitrilotriacetic acid [NTA]; Macherey-Nagel). The column was washed with wash buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8) containing increasing imidazole concentrations (20, 40, and 60 mM), and proteins were eluted with 200 mM imidazole. Aliquots from the peak protein fractions were analyzed by SDS-PAGE, and the fractions containing the proteins of interest were pooled and dialyzed against ErfA buffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 50 mM KCl, 10% glycerol, 0.5% Tween20, pH 7).

DAP-seq experimental procedure, sequencing, and data analysis. DAP-seq was carried out in triplicates on PAO1 genomic DNA exactly as previously described (8). Sequencing was performed by the high-throughput sequencing core facility of I2BC (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>) using an Illumina NextSeq500 instrument. Approximately 8 million single-end reads per sample were generated on average with >90% of reads uniquely aligning to the PAO1 genome. Data analysis was performed as previously described (8). Briefly, peaks were generated with MACS2 (35) for each replicate against a pool of the three control samples (with *q* value of <0.05), and peaks present in all three replicates were selected for further analysis.

RNA isolation. *P. aeruginosa* strains were grown from overnight cultures diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in 3 ml of fresh LB medium at 37°C under agitation in duplicate. Total RNA was isolated at an OD₆₀₀ of 1.0 using hot phenol-chloroform extraction as previously described (8).

RNA-seq library construction, sequencing, and data analysis. After RNA isolation and DNase treatment, RNA sample quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer, yielding RNA integrity numbers (RINs) of 9 or higher. Then, rRNAs were depleted using the RiboMinus transcriptome isolation kit (ThermoFisher) following manufacturer instructions. The cDNA libraries were then constructed from 50 ng of depleted RNA using the NEBNext Ultra II directional RNA library prep kit following manufacturer instructions (New England Biolabs [NEB]). Libraries were size-selected to 200 to 700 bp using SPRIselect beads, and quality was assessed on the Agilent Bioanalyzer using high-sensitivity DNA chips. Sequencing was done on an Illumina NextSeq500, and approximately 12 million single-end reads per sample were generated. Data analysis was performed as previously described (8).

RT-qPCR. After total RNA isolation and DNase treatment, cDNA synthesis was carried out using 2 µg of RNA as previously described (8). The experiments were performed with 3 biological replicates for each strain, and the relative expression of mRNAs was analyzed with the CFX Manager software (Bio-Rad) using the Pfaffl method relative to *rpoD* reference quantification cycle (*C_q*) values. Statistical analyses were performed by two-tailed *t* test. The sequences of primers are listed in Table S2 in the supplemental material.

Electrophoretic mobility shift assay. Genomic DNA was used as a matrix to generate wild-type sequence probes. To amplify probes bearing mutagenized binding sites, three different matrices were created: the one with a mutated binding site in P_{PA0534} resulted from the fusion of two overlapping fragments generated by primer pairs pEXG2-mut-PA0534-BS-sF1/sR1 and pEXG2-mut-PA0534-BS-sF2/sR2. PCR fragments with modified binding sites in P_{PA2776} and P_{mdpA} were produced by using primer pairs CTX-PA2776-lacZ-sF/PA2776-mut-lacZ-sR and CTX-mdpA-lacZ-sF/mdAmut-lacZ sR, respectively. Then, all fluorescent DNA probes were generated by PCR in two steps: a first PCR using specific primer pairs amplified the target DNA regions (83 to 96 bp) flanked by a 21-bp region which is targeted in a second PCR by a single Cy5-labeled primer. The resulting labeled probes were purified on DNA cleanup columns (NEB) and then incubated at 0.5 nM for 5 min at 37°C in EMSA buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1 mg/ml bovine serum albumin [BSA], pH 8) containing 25 ng/µl poly(dI-dC). For competition assays, 100 nM unlabeled DNA probes (200-fold excess) were incubated with the labeled probes. Recombinant proteins were added at the indicated concentration in a final reaction volume of 20 µl and incubated for an additional 15 min at 25°C. Samples were then loaded on a native 8% Tris-acetate-EDTA (TAE) polyacrylamide gel and run at 100 V and 4°C in cold 1 × TAE buffer. Fluorescence imaging was performed using a ChemiDoc MP.

Galleria mellonella infection assay. *G. mellonella* larva infections were performed as previously described (8). Animals injected with sterile phosphate-buffered saline (PBS) served as a control for physical trauma. CFU for each dilution were systematically counted from the insulin pen and were 7 ± 1 CFU per injection. Twenty larvae were injected per condition. Infection development was followed for 24 h at 37°C, and the animals were considered dead when not reacting to touch. Strains were independently randomized and blinded, ensuring no bias in CFU spotting and counting, and in animal death counting, which was also done by a different person. Statistical significance was assessed using a log rank test.

Antibiotic resistance screening. Antimicrobial susceptibility was assessed by broth microdilution using the automated BD Phoenix system (Becton, Dickinson, France) according to the manufacturers' recommendations. In brief, colonies were suspended in BD Phoenix ID broth to obtain approximately a 0.5 McFarland (1.5 × 10⁸-CFU/ml) suspension. Broth was then placed on a BD Phoenix AP system that

automatically adjusts the optical density and further dilutes the bacterial suspension in BD Phoenix AST broth (a cation-adjusted formulation of Mueller-Hinton broth containing 0.01% Tween 80) to obtain a final bacterial concentration in the AST broth of approximately 5×10^5 CFU/ml. A redox indicator was then added to the AST broth. Inoculated AST broth was then poured into a BD Phoenix NMIC-417 panel, loaded into the BD Phoenix M50 instrument, and incubated at $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Results were interpreted by the BD EpiCenter system according to CASFM-EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) 2019 V1 breakpoints.

Phylogenetic analysis and XRE-cupin identification. All *Pseudomonas* complete genomes ($n=503$) were retrieved from the *Pseudomonas* Genome Database (18). The sequences from 66 core genes were concatenated for each genome, and a multiple alignment was performed with MAFFT Galaxy version 7.221.3 (36) using default settings. The resulting alignment was used to build a maximum-likelihood phylogenetic tree using MEGA X with 100 bootstraps which was visualized and annotated using iTOL v5 (37, 38). XRE-cupin homolog identification was performed by Reciprocal Best BLAST Hit (RBBH) analysis (39) on the European Galaxy server (40) using protein sequences from *P. aeruginosa* PAO1 against all protein sequences from the other 502 genomes.

For XRE-cupin identification, the ErfA protein sequence was used to retrieve all protein sequences ($n=23,072$) with an XRE-cupin domain architecture (HTH_3 and Cupin_2) from the NCBI Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (41). A multiple alignment was performed on these sequences using MAFFT Galaxy version 7.221.3 (36) with default settings. The resulting alignment was used to build a hidden Markov model (HMM) using hmmbuild from HMMER (42). All 2,862,589 protein sequences from the 503 *Pseudomonas* genomes were then scanned through the model using hmmscan from HMMER (42). A bimodal distribution of HMMER scores could be observed, which led to the determination of a true-positive XRE-cupin threshold (HMMER score >100), which was validated by functional prediction from both sides (Fig. S6). All proteins above this threshold ($n=3,147$) were considered XRE-cupin regulators.

For XRE-cupin identification across phylogenetic classes, all RefSeq representative complete bacterial genomes were retrieved from NCBI ($n=2,664$) and their protein sequences (>9.4 million unique sequences) were scanned through the XRE-cupin model using hmmscan from HMMER (42).

Genetic neighbor functional prediction. Gene IDs from all proteins matching the HMM were used to identify the direct upstream and downstream neighbor genes from all 503 genome annotation files using Python 3.7. The corresponding 6,294 protein sequences were then used for functional prediction analysis using the InterProScan functional prediction tool (43). GO annotations associated with Pfam predicted functions were then used for functional prediction.

Data availability. RNA-seq and DAP-seq data files have been deposited in National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (GEO) and can be accessed through GEO Series accession numbers [GSE155521](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE155521) and [GSE155522](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE155522), respectively.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, TIF file, 1.1 MB.

FIG S2, TIF file, 1.5 MB.

FIG S3, TIF file, 0.7 MB.

FIG S4, TIF file, 1.8 MB.

FIG S5, TIF file, 2.2 MB.

FIG S6, TIF file, 0.4 MB.

TABLE S1, PDF file, 0.6 MB.

TABLE S2, PDF file, 0.5 MB.

TABLE S3, XLSX file, 3.6 MB.

TABLE S4, XLSX file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Peter Panchev, Yvan Caspar, Eric Faudry, and Viviana Job for their help with *G. mellonella* experiments, antibiotic resistance assays, biochemistry, and structural modeling advice, respectively.

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche [ANR-15-CE11-0018-01], the Laboratory of Excellence GRAL financed within the Grenoble Alpes University graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS [ANR-17-EURE-0003], and the Fondation pour la Recherche Medicale [Team FRM 2017, DEQ20170336705]. Julian Trouillon received a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Education and Research. We further acknowledge support from CNRS, INSERM, CEA, and Grenoble Alpes University.

We declare no competing financial interests.

Conceived and designed the experiments: J.T., I.A., S.E. Performed the experiments: J.T., M.R., V.S., S.E. Analyzed the data: J.T., I.A., S.E. Wrote the initial draft: J.T., S.E. Manuscript finalization: J.T., I.A., S.E.

REFERENCES

- Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13:52–56. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.12.006>.
- Sanchez I, Hernandez-Guerrero R, Mendez-Monroy PE, Martinez-Nunez MA, Ibarra JA, Perez-Rueda E. 2020. Evaluation of the abundance of DNA-binding transcription factors in prokaryotes. *Genes (Basel)* 11:52. <https://doi.org/10.3390/genes11010052>.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>.
- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Mejean V, Foglino M. 2000. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* 8:498–504. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01833-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01833-3).
- Galan-Vasquez E, Luna B, Martinez-Antonio A. 2011. The regulatory network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Inform Exp* 1:3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-1-3>.
- Huang H, Shao X, Xie Y, Wang T, Zhang Y, Wang X, Deng X. 2019. An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 10:2931. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10778-w>.
- Rajeev L, Garber ME, Mukhopadhyay A. 2020. Tools to map target genes of bacterial two-component system response regulators. *Environ Microbiol Rep* 12:267–276. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12838>.
- Trouillon J, Sentausa E, Ragno M, Robert-Genthon M, Lory S, Attree I, Elsen S. 2020. Species-specific recruitment of transcription factors dictates toxin expression. *Nucleic Acids Res* 48:2388–2400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1232>.
- Wood HE, Devine KM, McConnell DJ. 1990. Characterisation of a repressor gene (*xre*) and a temperature-sensitive allele from the *Bacillus subtilis* prophage, PBSX. *Gene* 96:83–88. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90344-Q](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90344-Q).
- Ohiendorf DH, Anderson WF, Lewis M, Pabo CO, Matthews BW. 1983. Comparison of the structures of *cro* and *lambda* repressor proteins from bacteriophage *lambda*. *J Mol Biol* 169:757–769. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80169-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80169-7).
- Dunwell JM, Purvis A, Khuri S. 2004. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65:7–17. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.016>.
- Kiely PD, O'Callaghan J, Abbas A, O'Gara F. 2008. Genetic analysis of genes involved in dipeptide metabolism and cytotoxicity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology (Reading)* 154:2209–2218. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/015032-0>.
- Asfahl KL, Walsh J, Gilbert K, Schuster M. 2015. Non-social adaptation defers a tragedy of the commons in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *ISME J* 9:1734–1746. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.259>.
- Chou HT, Li JY, Peng YC, Lu CD. 2013. Molecular characterization of *PauR* and its role in control of putrescine and cadaverine catabolism through the gamma-glutamyl pathway in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 195:3906–3913. <https://doi.org/10.1128/JB.00275-13>.
- Bartlett A, O'Malley RC, Huang SC, Galli M, Nery JR, Gallavotti A, Ecker JR. 2017. Mapping genome-wide transcription-factor binding sites using DAP-seq. *Nat Protoc* 12:1659–1672. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.055>.
- Hershberg R, Yeger-Lotem E, Margalit H. 2005. Chromosomal organization is shaped by the transcription regulatory network. *Trends Genet* 21:138–142. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.01.003>.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2008. Horizontal gene transfer and the evolution of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Genome Biol* 9:R4. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r4>.
- Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillion BK, Shay JA, Brinkman FS. 2016. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* 44:D646–D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>.
- Luengo JM, Olivera ER. 2020. Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* 22:1174–1192. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14912>.
- Chou HT, Kwon DH, Hegazy M, Lu CD. 2008. Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 190:1966–1975. <https://doi.org/10.1128/JB.01804-07>.
- Livshits VA, Zakataeva NP, Aleshin VV, Vitushkina MV. 2003. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 154:123–135. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00036-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00036-6).
- Pletzer D, Lafon C, Braun Y, Kohler T, Page MG, Mourez M, Weingart H. 2014. High-throughput screening of dipeptide utilization mediated by the ABC transporter DppBCDF and its substrate-binding proteins DppA1-A5 in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 9:e111311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111311>.
- Tsai CJ, Loh JM, Proft T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7:214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>.
- Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. 2014. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Invertebr Pathol* 115:14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.006>.
- Hernandez RJ, Hesse E, Dowling AJ, Coyle NM, Feil EJ, Gaze WH, Vos M. 2019. Using the wax moth larva *Galleria mellonella* infection model to detect emerging bacterial pathogens. *PeerJ* 6:e6150. <https://doi.org/10.7717/peerj.6150>.
- Yang Z, Lu CD. 2007. Functional genomics enables identification of genes of the arginine transaminase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189:3945–3953. <https://doi.org/10.1128/JB.00261-07>.
- Nemoto N, Kurihara S, Kitahara Y, Asada K, Kato K, Suzuki H. 2012. Mechanism for regulation of the putrescine utilization pathway by the transcription factor *PuuR* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 194:3437–3447. <https://doi.org/10.1128/JB.00097-12>.
- Fernandez-Lopez R, Ruiz R, de la Cruz F, Moncalian G. 2015. Transcription factor-based biosensors enlightened by the analyte. *Front Microbiol* 6:648. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00648>.
- Lawrence JG. 2003. Gene organization: selection, selfishness, and serendipity. *Annu Rev Microbiol* 57:419–440. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090816>.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35:652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.
- Li MZ, Elledge SJ. 2007. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 4:251–256. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77–86. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00130-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00130-9).
- Burley SK, Berman HM, Bhikadiya C, Bi C, Chen L, Di Costanzo L, Christie C, Dalenberg K, Duarte JM, Dutta S, Feng Z, Ghosh S, Goodsell DS, Green RK, Guranovic V, Guzenko D, Hudson BP, Kalro T, Liang Y, Lowe R, Namkoong H, Peisach E, Periskova I, Prlc A, Randle C, Rose A, Rose P, Sala R, Sekharan M, Shao C, Tan L, Tao Y-P, Valasatava Y, Voigt M, Westbrook J, Woo J, Yang H, Young J, Zhuravleva M, Zardecki C. 2019. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Res* 47:D464–D474. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1004>.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42:W252–W258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eickhout J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS. 2008. Model-based analysis

- of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9:R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>.
36. Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
37. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
38. Letunic I, Bork P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47:W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
39. Cock PJ, Chilton JM, Gruning B, Johnson JE, Soranzo N. 2015. NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. *Gigascience* 4:39. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0080-7>.
40. Jalili V, Afgan E, Gu Q, Clements D, Blankenberg D, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A. 2020. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic Acids Res* 48(W1):W395–W402. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa434>.
41. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH. 2015. CDD: NCBI’s conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43:D222–D226. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1221>.
42. Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. 2018. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 46:W200–W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>.
43. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong SY, Lopez R, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>.
44. Wurtzel O, Yoder-Himes DR, Han K, Dandekar AA, Edelheit S, Greenberg EP, Sorek R, Lory S. 2012. The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog* 8: e1002945. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002945>.
45. Salamov VSA, Solovyevand A. 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences, p 61–78. *In* Li RW (ed), *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.

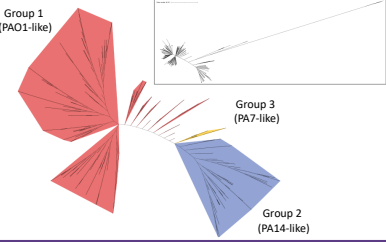
B COMMUNICATIONS

Communications scientifiques :

- Octobre 2021 - Groupement de recherche *Pseudomonas* : Présentation orale
- Mars 2022 - Groupe de Régional de Recherche en Microbiologie des Interactions : Présentation orale
- Juin 2023 - Journée de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble : Présentation flash et poster
- Février 2023 - Journée scientifique Bacto-Gre : Présentation orale

Regulatory network of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa)

Phylogenetic tree of *Pseudomonas aeruginosa*

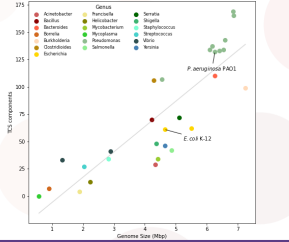


Pseudomonas aeruginosa (Pa) has one of the most complex bacterial regulatory networks, which is largely responsible for the high adaptability of this opportunistic human pathogen.

Two-component systems (TCSs) play a major role in these networks: they allow bacteria to perceive and adapt to physicochemical changes in their environment. TCSs generally consist of two partners communicating by phosphate transfer: a **histidine kinase (HK)** which detects the signal and transmits it to the **response regulator (RR)** which is often a transcription factor.

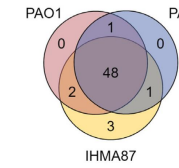
Particularly numerous in Pa (**62 HKs and 73 RRs in PAO1, the reference strain**), TCSs are highly studied because of their physicochemical changes in their environment. However, our knowledge of the signals they detect and the genes they regulate is largely incomplete. A recent study conducted by our team used the **DAP-seq (DNA Affinity Purification-sequencing)** technique to determine *in vitro* the set of binding sites for 55 Pa RRs on the genomes of 3 strains belonging to the 3 main phylogenetic groups.¹

TCS network of pathogenic genus

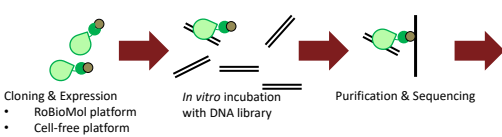


DAP-seq (DNA affinity purification & sequencing) of 55 response regulators

Conservation of the 55 RRs

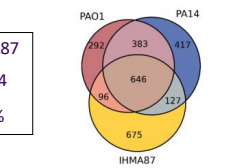


→ *in vitro* identification of DNA binding sites



	PAO1	PA14	IHMA87
Targeted genes	2263	2549	2484
% of targeted genes	39%	42%	39%

Conservation of inferred targets

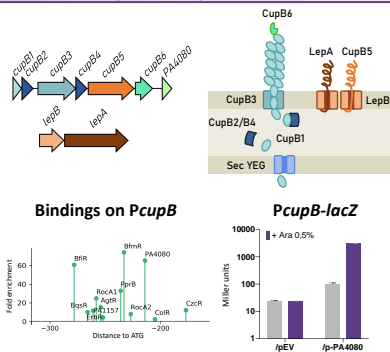


1. PA4080 upregulates *cupB* operon

Chaperoneusher pathways (*cup*) pili are fimbriae involved in adhesion.

PA4080 is an orphan unknown response regulator encoded downstream *cupB* operon.

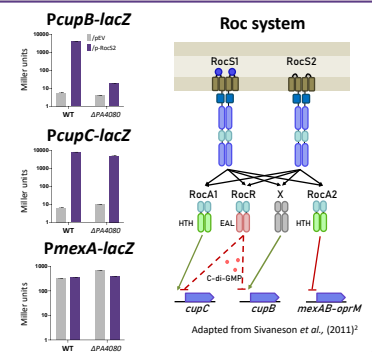
- Promoter of *cupB* is massively targeted by RRs, including PA4080
- Overexpression of PA4080 activates *cupB* transcription



2. PA4080 belongs to Roc system

Roc (Regulation of *cup*), is an interconnected network of TCS composed of 2 HKs and 3 RRs.

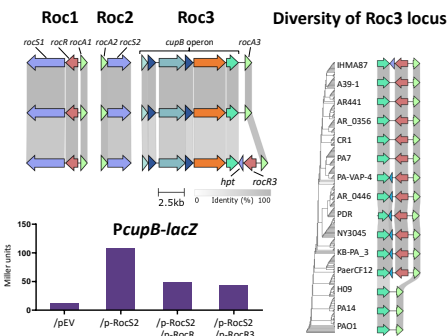
- Roc system activates *cupB* through PA4080
- PA4080 is not involved in regulation of *cupC* and *mexA*
- PA4080 is thus named RocA3



3. Locus of PA4080 is diversified

Locus of PA4080 is different in IHMA87 strain and encodes a RR (RocR3) and a HPT module.

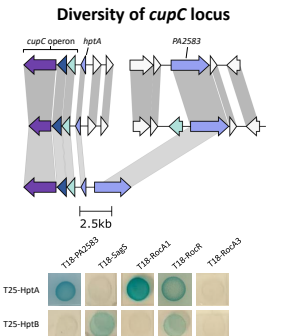
- RocR3, as RocR, represses indirectly *cupB*
- The Roc3 locus is diverse in PA7-like strains, suggesting a specie-specific degeneration



4. Synteny suggests additional actors

Locus of *cupC* shows also some particularities in IHMA87 strain and code for a HK suggesting a potential Roc4 locus.

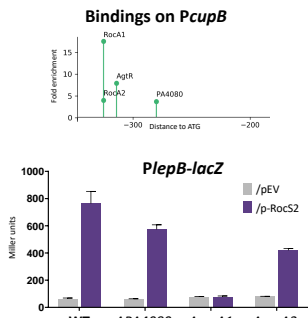
- PA2583 interacts with HptA
- HptA interacts with both RocA1 and RocR but not RocA3



5. *lepBA* is activated by RocA1

LepBA code for a large exoprotease able to modulate host-response during bacterial infection³.

- RocA1, RocA2 and RocA3 target *lepBA* promoter in DAP-seq
- Roc system activates *lepB* through RocA1



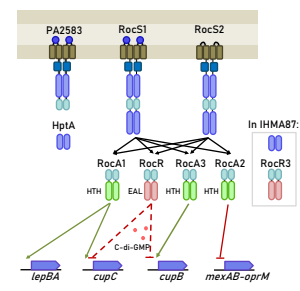
Conclusion & Perspectives

This study exploit cistromic data from DAP-seq to flesh out a one-of-a-kind TCS network involved in biofilm formation in *P. aeruginosa*.

What's next?

- Assess the interaction between RocA3 and RocS1 and RocS2
- Investigate the role of PA2583 as a potential RocS4
- Study the role of RocA3 in biofilm formation

Hypothetical model of Roc system



1. Trouillon, I., Lambert, L., Villard, A.-M., Vernet, T., Attree, I., Elsen, S. Determination of the Two-Component Systems Regulatory Network Reveals Core and Accessory Regulations across *Pseudomonas aeruginosa* Lineages. *Nucleic Acids Research* 2021, 49 (20), 11476–11490.
 2. Svanesson, M., Mikkelson, H., Ventre, I., Bondi, C., Filloux, A. Two-Component Regulatory Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Intricate Network Mediating Fimbrial and Efflux Pump Gene Expression. *The Pseudomonas Aeruginosa Roc Systems*. *Molecular Microbiology* 2011, 79 (5), 1353–1366.
 3. Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., Kuwano, K. A Novel Secreted Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Activates NF-κB through Protease-Activated Receptors. *Cell Microbiol* 2008, 10 (7), 1491–1504.

BIBLIOGRAPHIE

- AGRAWAL, Ruchi et al. (2016). “Cross-talk and specificity in two-component signal transduction pathways”. *Future Microbiology* 11.5, p. 685-697. DOI : 10.2217/fmb-2016-0001.
- ALI, Farhan et al. (2020). “Dynamics of genetic variation in transcription factors and its implications for the evolution of regulatory networks in Bacteria”. *Nucleic Acids Research* 48.8, p. 4100-4114. DOI : 10.1093/nar/gkaa162.
- ALM, Eric et al. (2006). “The Evolution of Two-Component Systems in Bacteria Reveals Different Strategies for Niche Adaptation”. *PLoS Computational Biology* 2.11, e143. DOI : 10.1371/journal.pcbi.0020143.
- ANANTHARAMAN, Vivek et al. (2000). “Cache – a signaling domain common to animal Ca²⁺-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors”. *Trends in Biochemical Sciences* 25.11, p. 535-537. DOI : 10.1016/S0968-0004(00)01672-8.
- ANDERS, Simon et al. (2015). “HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data”. *Bioinformatics* 31.2, p. 166-169. DOI : 10.1093/bioinformatics/btu638.
- ARAVIND, L et al. (2005). “The many faces of the helix-turn-helix domain : Transcription regulation and beyond”. *FEMS Microbiology Reviews* 29.2, p. 231-262. DOI : 10.1016/j.femsre.2004.12.008.
- ARNOLD, Brian J. et al. (2022a). “Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria”. *Nature Reviews Microbiology* 20.4, p. 206-218. DOI : 10.1038/s41579-021-00650-4.
- (2022b). “Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria”. *Nature Reviews Microbiology* 20.4, p. 206-218. DOI : 10.1038/s41579-021-00650-4.
- ARORA, S K et al. (1997). “A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner”. *Journal of Bacteriology* 179.17, p. 5574-5581. DOI : 10.1128/jb.179.17.5574-5581.1997.
- AZAM, Talukder Ali et al. (1999). “Twelve Species of the Nucleoid-associated Protein from *Escherichia coli*”. *Journal of Biological Chemistry* 274.46, p. 33105-33113. DOI : 10.1074/jbc.274.46.33105.
- BADAL, Divakar et al. (2020). “*Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes requires multiple two-component systems”. *Journal of Medical Microbiology* 69.6, p. 906-919. DOI : 10.1099/jmm.0.001199.
- BAIKALOV, Igor et al. (1996). “Structure of the *Escherichia coli* Response Regulator NarL”. *Biochemistry* 35.34, p. 11053-11061. DOI : 10.1021/bi960919o.
- BALLEZA, Enrique et al. (2009). “Regulation by transcription factors in bacteria : beyond description”. *FEMS Microbiology Reviews* 33.1, p. 133-151. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x.

- BARABÁSI, Albert-László et al. (2004). “Network biology : understanding the cell’s functional organization”. *Nature Reviews Genetics* 5.2, p. 101-113. DOI : 10.1038/nrg1272.
- BARAQUET, C. et al. (2012). “The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP”. *Nucleic Acids Research* 40.15, p. 7207-7218. DOI : 10.1093/nar/gks384.
- BARAQUET, Claudine et al. (2013). “Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.46, p. 18478-18483. DOI : 10.1073/pnas.1318972110.
- BARR, Helen L. et al. (2015). “*Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis”. *European Respiratory Journal* 46.4, p. 1046-1054. DOI : 10.1183/09031936.00225214.
- BERRY, Alice et al. (2018). “cAMP and Vfr Control Exolysin Expression and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomic Outliers”. *Journal of Bacteriology* 200.12, e00135-18, /j.b/200/12/e00135-18.atom. DOI : 10.1128/JB.00135-18.
- BERVOETS, Indra et al. (2019). “Diversity, versatility and complexity of bacterial gene regulation mechanisms : opportunities and drawbacks for applications in synthetic biology”. *FEMS Microbiology Reviews* 43.3, p. 304-339. DOI : 10.1093/femsre/fuz001.
- BILWES, Alexandrine M. et al. (2003). “Structure and Function of CheA, the Histidine Kinase Central to Bacterial Chemotaxis”. In : *Histidine Kinases in Signal Transduction*. Elsevier, p. 47-72. DOI : 10.1016/B978-012372484-7/50005-9.
- BLEVES, Sophie et al. (2005). “Quorum Sensing Negatively Controls Type III Secretion Regulon Expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”. *Journal of Bacteriology* 187.11, p. 3898-3902. DOI : 10.1128/JB.187.11.3898-3902.2005.
- BODEY, G. P et al. (1983). “Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*”. *Clinical Infectious Diseases* 5.2, p. 279-313. DOI : 10.1093/clinids/5.2.279.
- BORDI, Christophe et al. (2010). “Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis : *P. aeruginosa* signalling via HptB, RetS and sRNA”. *Molecular Microbiology* 76.6, p. 1427-1443. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2010.07146.x.
- BORGERT, Sebastian Roman et al. (2022). “Moonlighting chaperone activity of the enzyme PqsE contributes to RhlR-controlled virulence of *Pseudomonas aeruginosa*”. *Nature Communications* 13.1, p. 7402. DOI : 10.1038/s41467-022-35030-w.
- BOSE, Baundauna et al. (2008). “A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis”. *Molecular Microbiology* 70.3, p. 570-582. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2008.06414.x.
- BOTELHO, João et al. (2021). “The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution”. *Trends in Microbiology* 29.1, p. 8-18. DOI : 10.1016/j.tim.2020.05.011.
- BOUCHER, J. C. et al. (1997). “*Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis : role of mucC in the regulation of alginate production and stress sensitivity”. *Microbiology* 143.11, p. 3473-3480. DOI : 10.1099/00221287-143-11-3473.
- BOURRET, Robert B (2010). “Receiver domain structure and function in response regulator proteins”. *Current Opinion in Microbiology* 13.2, p. 142-149. DOI : 10.1016/j.mib.2010.01.015.

- BRENCIC, Anja et al. (2009a). “Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA”. *Molecular Microbiology* 72.3, p. 612-632. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2009.06670.x.
- BRENCIC, Anja et al. (2009b). “The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs”. *Molecular Microbiology* 73.3, p. 434-445. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x.
- BREWSTER, Jodi L. et al. (2016). “Structural basis for ligand recognition by a Cache chemosensory domain that mediates carboxylate sensing in *Pseudomonas syringae*”. *Scientific Reports* 6.1, p. 35198. DOI : 10.1038/srep35198.
- BROSSE, Anaïs et al. (2022). “Synthesis of the NarP response regulator of nitrate respiration in *Escherichia coli* is regulated at multiple levels by Hfq and small RNAs”. *Nucleic Acids Research* 50.12, p. 6753-6768. DOI : 10.1093/nar/gkac504.
- BROWNING, Douglas F et al. (2010). “Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression”. *Current Opinion in Microbiology* 13.6, p. 773-780. DOI : 10.1016/j.mib.2010.09.013.
- BUSCHIAZZO, Alejandro et al. (2019). “Two-Component Sensing and Regulation : How Do Histidine Kinases Talk with Response Regulators at the Molecular Level?” *Annual Review of Microbiology* 73.1, p. 507-528. DOI : 10.1146/annurev-micro-091018-054627.
- CADORET, Frédéric et al. (2014). “Txc, a New Type II Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA7, Is Regulated by the TtsS/TtsR Two-Component System and Directs Specific Secretion of the CbpE Chitin-Binding Protein”. *Journal of Bacteriology* 196.13, p. 2376-2386. DOI : 10.1128/JB.01563-14.
- CAI, Sheng Jian et al. (2002). “EnvZ-OmpR Interaction and Osmoregulation in *Escherichia coli*”. *Journal of Biological Chemistry* 277.27, p. 24155-24161. DOI : 10.1074/jbc.M110715200.
- CAIAZZA, Nicky C. et al. (2005). “Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*”. *Journal of Bacteriology* 187.21, p. 7351-7361. DOI : 10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005.
- CAILLE, Olivier et al. (2007). “A Copper-Activated Two-Component System Interacts with Zinc and Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Journal of Bacteriology* 189.13, p. 4561-4568. DOI : 10.1128/JB.00095-07.
- CAO, Pengbo et al. (2023). “A *Pseudomonas aeruginosa* small RNA regulates chronic and acute infection”. *Nature* 618.7964, p. 358-364. DOI : 10.1038/s41586-023-06111-7.
- CAPRA, Emily J. et al. (2012). “Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems”. *Annual Review of Microbiology* 66.1, p. 325-347. DOI : 10.1146/annurev-micro-092611-150039.
- CASINO, Patricia et al. (2009). “Structural Insight into Partner Specificity and Phosphoryl Transfer in Two-Component Signal Transduction”. *Cell* 139.2, p. 325-336. DOI : 10.1016/j.cell.2009.08.032.
- (2010). “The mechanism of signal transduction by two-component systems”. *Current Opinion in Structural Biology* 20.6, p. 763-771. DOI : 10.1016/j.sbi.2010.09.010.
- CASTANG, Sandra et al. (2008). “H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.48, p. 18947-18952. DOI : 10.1073/pnas.0808215105.

- CHAMBONNIER, Gaël et al. (2016). “The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*”. *PLOS Genetics* 12.5, e1006032. DOI : 10.1371/journal.pgen.1006032.
- CHANG, C H et al. (1992). “Functional roles assigned to the periplasmic, linker, and receiver domains of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein”. *Journal of Bacteriology* 174.21, p. 7033-7039. DOI : 10.1128/jb.174.21.7033-7039.1992.
- CHARRIN, A et al. (1890). “Recherches expérimentales sur l’action des produits sécrétés par le bacille pyocyanique sur le système nerveux vaso-moteur. Dédution pathologiques.” *Arch Physiol*, p. 724-38.
- CHEUNG, Shou-Ting et al. (2019). “Cyclic-di-GMP binds to histidine kinase RavS to control RavS-RavR phosphotransfer and regulates the bacterial lifestyle transition between virulence and swimming”. *PLOS Pathogens* 15.8, e1007952. DOI : 10.1371/journal.ppat.1007952.
- CHEUNG, Jonah et al. (2010). “Sensor domains of two-component regulatory systems”. *Current Opinion in Microbiology* 13.2, p. 116-123. DOI : 10.1016/j.mib.2010.01.016.
- CHEVALIER, Sylvie et al. (2017). “Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins”. *FEMS Microbiology Reviews* 41.5, p. 698-722. DOI : 10.1093/femsre/fux020.
- CHIHARA, Kotaro et al. (2021). “Global identification of RsmA/N binding sites in *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* UV CLIP-seq”. *RNA Biology* 18.12, p. 2401-2416. DOI : 10.1080/15476286.2021.1917184.
- CHOU, Han Ting et al. (2014). “Functional Characterization of the agtABCD and agtSR Operons for 4-Aminobutyrate and 5-Aminovalerate Uptake and Regulation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”. *Current Microbiology* 68.1, p. 59-63. DOI : 10.1007/s00284-013-0446-y.
- CIOFU, Oana et al. (2019). “Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics”. *Frontiers in Microbiology* 10, p. 913. DOI : 10.3389/fmicb.2019.00913.
- CLARK, Clifford G. et al. (2020). “Distribution of heavy metal resistance elements in Canadian *Salmonella* 4,[5],12 :i :- populations and association with the monophasic genotypes and phenotype”. *PLOS ONE* 15.7, e0236436. DOI : 10.1371/journal.pone.0236436.
- COOLEY, Richard B et al. (2016). “Coincidence detection and bi-directional transmembrane signaling control a bacterial second messenger receptor”. *eLife* 5, e21848. DOI : 10.7554/eLife.21848.
- CORNELIS, Pierre (2020). “Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy”. *MicrobiologyOpen* 9.2. DOI : 10.1002/mbo3.962.
- CORRIGAN, Rebecca M. et al. (2013). “Cyclic di-AMP : another second messenger enters the fray”. *Nature Reviews Microbiology* 11.8, p. 513-524. DOI : 10.1038/nrmicro3069.
- CRONE, Stephanie et al. (2020). “The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*”. *APMIS* 128.3, p. 220-231. DOI : 10.1111/apm.13010.
- CURY, Jean et al. (2017). “Integrative and conjugative elements and their hosts : composition, distribution and organization”. *Nucleic Acids Research* 45.15, p. 8943-8956. DOI : 10.1093/nar/gkx607.
- DALTON, Trevor et al. (2011). “An In Vivo Polymicrobial Biofilm Wound Infection Model to Study Interspecies Interactions”. *PLoS ONE* 6.11, e27317. DOI : 10.1371/journal.pone.0027317.
- DAMKJÆR, Søren et al. (2013). “Evolutionary remodeling of global regulatory networks during long-term bacterial adaptation to human hosts”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.19, p. 7766-7771. DOI : 10.1073/pnas.1221466110.

- DANGLA-PÉLISSIER, Gauthier et al. (2021). “The horizontal transfer of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ICE PAPI-1 is controlled by a transcriptional triad between TprA, NdpA2 and MvaT”. *Nucleic Acids Research* 49.19, p. 10956-10974. DOI : 10.1093/nar/gkab827.
- DARWIN, Andrew J. et al. (1997). “Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement”. *Molecular Microbiology* 25.3, p. 583-595. DOI : 10.1046/j.1365-2958.1997.4971855.x.
- DAVEY, Mary Ellen et al. (2000). “Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular Genetics”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64.4, p. 847-867. DOI : 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000.
- DESAI, Stuti K. et al. (2017). “To P or Not to P? Non-canonical activation by two-component response regulators : Non-canonical RR activation”. *Molecular Microbiology* 103.2, p. 203-213. DOI : 10.1111/mmi.13532.
- DIGGLE, Stephen P et al. (2020). “Microbe Profile : *Pseudomonas aeruginosa* : opportunistic pathogen and lab rat : This article is part of the Microbe Profiles collection.” *Microbiology* 166.1, p. 30-33. DOI : 10.1099/mic.0.000860.
- DILLON, Shane C. et al. (2010). “Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression”. *Nature Reviews Microbiology* 8.3, p. 185-195. DOI : 10.1038/nrmicro2261.
- DJOKO, Karrera Y. et al. (2015). “The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against Bacterial Pathogens”. *Journal of Biological Chemistry* 290.31, p. 18954-18961. DOI : 10.1074/jbc.R115.647099.
- DJORDJEVIC, Snezana et al. (1998). “Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.4, p. 1381-1386. DOI : 10.1073/pnas.95.4.1381.
- DOBRINDT, U (2001). “Whole genome plasticity in pathogenic bacteria”. *Current Opinion in Microbiology* 4.5, p. 550-557. DOI : 10.1016/S1369-5274(00)00250-2.
- DOBRINDT, Ulrich et al. (2010). “Bacterial genome plasticity and its impact on adaptation during persistent infection”. *International Journal of Medical Microbiology* 300.6, p. 363-366. DOI : 10.1016/j.ijmm.2010.04.010.
- DORMAN, Charles J et al. (2020). “When is a transcription factor a NAP?” *Current Opinion in Microbiology* 55, p. 26-33. DOI : 10.1016/j.mib.2020.01.019.
- DU, Dijun et al. (2018). “Multidrug efflux pumps : structure, function and regulation”. *Nature Reviews Microbiology* 16.9, p. 523-539. DOI : 10.1038/s41579-018-0048-6.
- DUBEY, Badri N. et al. (2020). “Hybrid histidine kinase activation by cyclic di-GMP-mediated domain liberation”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117.2, p. 1000-1008. DOI : 10.1073/pnas.1911427117.
- DUCRET, Verena et al. (2021). “Global Analysis of the Zinc Homeostasis Network in *Pseudomonas aeruginosa* and Its Gene Expression Dynamics”. *Frontiers in Microbiology* 12, p. 739988. DOI : 10.3389/fmicb.2021.739988.
- DUCRET, Verena et al. (2023). “Zinc homeostasis in *Pseudomonas*”. *BioMetals* 36.4, p. 729-744. DOI : 10.1007/s10534-022-00475-5.
- DUDEK, Christian-Alexander et al. (2022). “PRODORIC : state-of-the-art database of prokaryotic gene regulation”. *Nucleic Acids Research* 50.D1, p. D295-D302. DOI : 10.1093/nar/gkab1110.
- DUNWELL, Jim M et al. (2004). “Cupins : the most functionally diverse protein superfamily?” *Phytochemistry* 65.1, p. 7-17. DOI : 10.1016/j.phytochem.2003.08.016.

- DUPRÉ, Elian et al. (2013). “Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS : mechanical role in signal transmission”. *BMC Microbiology* 13.1, p. 172. DOI : 10.1186/1471-2180-13-172.
- DUPRÉ, Elian et al. (2015a). “Signal Transduction by BvgS Sensor Kinase”. *Journal of Biological Chemistry* 290.38, p. 23307-23319. DOI : 10.1074/jbc.M115.655720.
- DUPRÉ, Elian et al. (2015b). “Virulence Regulation with Venus Flytrap Domains : Structure and Function of the Periplasmic Moiety of the Sensor-Kinase BvgS”. *PLOS Pathogens* 11.3, e1004700. DOI : 10.1371/journal.ppat.1004700.
- DUTTA, Tanmay et al. (2018). “Small RNA-mediated regulation in bacteria : A growing palette of diverse mechanisms”. *Gene* 656, p. 60-72. DOI : 10.1016/j.gene.2018.02.068.
- DWYER, Mary A et al. (2004). “Periplasmic binding proteins : a versatile superfamily for protein engineering”. *Current Opinion in Structural Biology* 14.4, p. 495-504. DOI : 10.1016/j.sbi.2004.07.004.
- ELSEN, Sylvie et al. (2014). “A Type III Secretion Negative Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Employs a Two-Partner Secreted Exolysin to Induce Hemorrhagic Pneumonia”. *Cell Host & Microbe* 15.2, p. 164-176. DOI : 10.1016/j.chom.2014.01.003.
- FERNANDEZ-CIRUELOS, Blanca et al. (2023). *Cross-talk between QseBC and PmrAB two-component systems is crucial for regulation of motility and colistin resistance in Enteropathogenic Escherichia coli*. preprint. Microbiology. DOI : 10.1101/2023.04.06.535820.
- FERRÁNDEZ, Abel et al. (2002). “Cluster II *che* Genes from *Pseudomonas aeruginosa* Are Required for an Optimal Chemotactic Response”. *Journal of Bacteriology* 184.16, p. 4374-4383. DOI : 10.1128/JB.184.16.4374-4383.2002.
- FILLOUX, Alain et al. (2004). “Fimbrial Genes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*”. In : *Pseudomonas*. Boston, MA : Springer US, p. 721-748. DOI : 10.1007/978-1-4419-9086-0_24.
- FOCARELLI, Francesca et al. (2022). “Copper microenvironments in the human body define patterns of copper adaptation in pathogenic bacteria”. *PLOS Pathogens* 18.7, e1010617. DOI : 10.1371/journal.ppat.1010617.
- FRANCIS, Vanessa I. et al. (2017). “Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*”. *FEMS Microbiology Letters* 364.11. DOI : 10.1093/femsle/fnx104.
- FRANCIS, Vanessa I. et al. (2018). “Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Nature Communications* 9.1, p. 2219. DOI : 10.1038/s41467-018-04640-8.
- FRESCHI, Luca et al. (2019). “The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity”. *Genome Biology and Evolution* 11.1, p. 109-120. DOI : 10.1093/gbe/evy259.
- FREYRE-GONZÁLEZ, Julio A. et al. (2022). “System Principles Governing the Organization, Architecture, Dynamics, and Evolution of Gene Regulatory Networks”. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10, p. 888732. DOI : 10.3389/fbioe.2022.888732.
- FUCHS, Erin L. et al. (2010). “*In V itro* and *In V ivo* Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Cyclic AMP (cAMP) Phosphodiesterase CpdA, Required for cAMP Homeostasis and Virulence Factor Regulation”. *Journal of Bacteriology* 192.11, p. 2779-2790. DOI : 10.1128/JB.00168-10.
- GABRIELAITE, Migle et al. (2020). “Gene Loss and Acquisition in Lineages of *Pseudomonas aeruginosa* Evolving in Cystic Fibrosis Patient Airways”. *mBio* 11.5, e02359-20. DOI : 10.1128/mBio.02359-20.

- GALÁN-VÁSQUEZ, Edgardo et al. (2011). “The Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa*”. *Microbial Informatics and Experimentation* 1.1, p. 3. DOI : 10.1186/2042-5783-1-3.
- GALPERIN, Michael Y (2010). “Diversity of structure and function of response regulator output domains”. *Current Opinion in Microbiology* 13.2, p. 150-159. DOI : 10.1016/j.mib.2010.01.005.
- GAO, Rong et al. (2010). “Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity”. *Current Opinion in Microbiology* 13.2, p. 160-167. DOI : 10.1016/j.mib.2009.12.009.
- GAO, Rong et al. (2019). “Structural Basis of Response Regulator Function”. *Annual Review of Microbiology* 73.1, p. 175-197. DOI : 10.1146/annurev-micro-020518-115931.
- GARCÍA-CONTRERAS, Rodolfo (2016). “Is Quorum Sensing Interference a Viable Alternative to Treat *Pseudomonas aeruginosa* Infections?” *Frontiers in Microbiology* 7. DOI : 10.3389/fmicb.2016.01454.
- GARNETT, James A. et al. (2015). “Structure–function analysis reveals that the *Pseudomonas aeruginosa* Tps4 two-partner secretion system is involved in CupB5 translocation”. *Protein Science* 24.5, p. 670-687. DOI : 10.1002/pro.2640.
- GATT, Yair E. et al. (2023). “Convergent Within-Host Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* through the Transcriptional Regulatory Network”. *mSystems* 8.2, e00024-23. DOI : 10.1128/msystems.00024-23.
- GEBHARDT, Michael J. et al. (2020). “Widespread targeting of nascent transcripts by RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117.19, p. 10520-10529. DOI : 10.1073/pnas.1917587117.
- GELFAND, Mikhail S (2006). “Evolution of transcriptional regulatory networks in microbial genomes”. *Current Opinion in Structural Biology* 16.3, p. 420-429. DOI : 10.1016/j.sbi.2006.04.001.
- GEROVAC, Milan et al. (2021). “A Grad-seq View of RNA and Protein Complexes in *Pseudomonas aeruginosa* under Standard and Bacteriophage Predation Conditions”. *mBio* 12.1, e03454-20. DOI : 10.1128/mBio.03454-20.
- GESSARD, C (1882). “De la pyocyanine et de son microbe”. *These pour le doctorat en medecine*.
- GIARDINA, Giorgio et al. (2011). “The *Pseudomonas aeruginosa* DNR transcription factor : light and shade of nitric oxide-sensing mechanisms”. *Biochemical Society Transactions* 39.1, p. 294-298. DOI : 10.1042/BST0390294.
- GIRAUD, Caroline et al. (2011). “The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-usher pathway system assembling fimbriae : *P. aeruginosa* CupE fimbriae”. *Environmental Microbiology* 13.3, p. 666-683. DOI : 10.1111/j.1462-2920.2010.02372.x.
- GIRAUD, Caroline et al. (2012). “Inside the complex regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chaperone usher systems : Regulation of chaperone usher loci in *P. aeruginosa*”. *Environmental Microbiology* 14.8, p. 1805-1816. DOI : 10.1111/j.1462-2920.2011.02673.x.
- GÓMEZ-LOZANO, María et al. (2012). “Genome-wide identification of novel small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* : Small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Environmental Microbiology* 14.8, p. 2006-2016. DOI : 10.1111/j.1462-2920.2012.02759.x.
- GÓMEZ-LOZANO, María et al. (2015). “Diversity of small RNAs expressed in *Pseudomonas* species : Conservation of small RNAs in *Pseudomonas*”. *Environmental Microbiology Reports* 7.2, p. 227-236. DOI : 10.1111/1758-2229.12233.

- GOODMAN, Andrew L. et al. (2004). "A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*". *Developmental Cell* 7.5, p. 745-754. DOI : 10.1016/j.devcel.2004.08.020.
- GOTTESMAN, Susan (1984). "Bacterial Regulation : Global Regulatory Networks". *Annual Review of Genetics*, 18 :415-41. DOI : 10.1146/annurev.ge.18.120184.002215.
- GRACE, Amber et al. (2022). "Pseudomonas aeruginosa reference strains PAO1 and PA14 : A genomic, phenotypic, and therapeutic review". *Frontiers in Microbiology* 13, p. 1023523. DOI : 10.3389/fmicb.2022.1023523.
- GROISMAN, Eduardo A. (2016). "Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems". *Annual Review of Microbiology* 70.1, p. 103-124. DOI : 10.1146/annurev-micro-102215-095331.
- GROSSE, Cornelia et al. (2023). "Interplay between Two-Component Regulatory Systems Is Involved in Control of *Cupriavidus metallidurans* Metal Resistance Genes". *Journal of Bacteriology* 205.4, e00343-22. DOI : 10.1128/jb.00343-22.
- GUCKES, Kirsten R. et al. (2013). "Strong cross-system interactions drive the activation of the QseB response regulator in the absence of its cognate sensor". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.41, p. 16592-16597. DOI : 10.1073/pnas.1315320110.
- GUÉDON, Gérard et al. (2017). "The Obscure World of Integrative and Mobilizable Elements, Highly Widespread Elements that Pirate Bacterial Conjugative Systems". *Genes* 8.11, p. 337. DOI : 10.3390/genes8110337.
- GUMEROV, Vadim M et al. (2020). "MiST 3.0 : an updated microbial signal transduction database with an emphasis on chemosensory systems". *Nucleic Acids Research* 48.D1, p. D459-D464. DOI : 10.1093/nar/gkz988.
- GUSHCHIN, Ivan et al. (2017). "Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases". *Science* 356.6342, eaah6345. DOI : 10.1126/science.aah6345.
- GUSHCHIN, Ivan et al. (2018). "Transmembrane Signal Transduction in Two-Component Systems : Piston, Scissoring, or Helical Rotation?" *BioEssays* 40.2, p. 1700197. DOI : 10.1002/bies.201700197.
- HA, Dae-Gon et al. (2015). "c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion : a *Pseudomonas Aeruginosa* Review". *Microbiology Spectrum* 3.2, p. 3.2.27. DOI : 10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014.
- HARRISON, Ewan M. et al. (2010). "Pathogenicity Islands PAPI-1 and PAPI-2 Contribute Individually and Synergistically to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14". *Infection and Immunity* 78.4, p. 1437-1446. DOI : 10.1128/IAI.00621-09.
- HAURYLIUK, Vasili et al. (2015). "Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology". *Nature Reviews Microbiology* 13.5, p. 298-309. DOI : 10.1038/nrmicro3448.
- HE, Jianxin et al. (2004). "The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.8, p. 2530-2535. DOI : 10.1073/pnas.0304622101.
- HENDRIKSEN, Wouter T. et al. (2007). "Regulation of Gene Expression in *Streptococcus pneumoniae* by Response Regulator 09 Is Strain Dependent". *Journal of Bacteriology* 189.4, p. 1382-1389. DOI : 10.1128/JB.01144-06.
- HENRY, Jonathan T. et al. (2011). "Ligand-Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context". *Annual Review of Microbiology* 65.1, p. 261-286. DOI : 10.1146/annurev-micro-121809-151631.

- HICKMAN, Jason W. et al. (2008). "Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor". *Molecular Microbiology* 69.2, p. 376-389. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x.
- HILKER, Rolf et al. (2015). "Interclonal gradient of virulence in the *Pseudomonas aeruginosa* pangenome from disease and environment : *Pseudomonas aeruginosa* pangenome". *Environmental Microbiology* 17.1, p. 29-46. DOI : 10.1111/1462-2920.12606.
- HOFFMAN, Lucas R. et al. (2010). "Nutrient Availability as a Mechanism for Selection of Antibiotic Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF Airway". *PLoS Pathogens* 6.1, e1000712. DOI : 10.1371/journal.ppat.1000712.
- HSU, Jye-Lin et al. (2008). "Characterization of the Histidine-containing Phosphotransfer Protein B-mediated Multistep Phosphorelay System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1". *Journal of Biological Chemistry* 283.15, p. 9933-9944. DOI : 10.1074/jbc.M708836200.
- HUA, Canfeng et al. (2022). "Bacterial Transcription Factors Bind to Coding Regions and Regulate Internal Cryptic Promoters". *mBio* 13.5, e01643-22. DOI : 10.1128/mbio.01643-22.
- HUANG, Hao et al. (2019). "An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*". *Nature Communications* 10.1, p. 2931. DOI : 10.1038/s41467-019-10778-w.
- HUNG, Danielle L. et al. (1998). "Pilus Biogenesis via the Chaperone/Usher Pathway : An Integration of Structure and Function". *Journal of Structural Biology* 124.2-3, p. 201-220. DOI : 10.1006/jsbi.1998.4049.
- HYRE, Amanda N. et al. (2017). "Copper Is a Host Effector Mobilized to Urine during Urinary Tract Infection To Impair Bacterial Colonization". *Infection and Immunity* 85.3, e01041-16. DOI : 10.1128/IAI.01041-16.
- IRIE, Yasuhiko et al. (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA : *Pseudomonas aeruginosa* RpoS and RsmA regulate Psl". *Molecular Microbiology*, no-no. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x.
- IRIE, Yasuhiko et al. (2020). "Hfq-Assisted RsmA Regulation Is Central to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Polysaccharide PEL Expression". *Frontiers in Microbiology* 11, p. 482585. DOI : 10.3389/fmicb.2020.482585.
- JACOB, François et al. (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins". *Journal of Molecular Biology* 3.3, p. 318-356. DOI : 10.1016/S0022-2836(61)80072-7.
- JANSSEN, Kayley H. et al. (2018a). "Functional Analyses of the RsmY and RsmZ Small Noncoding Regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Bacteriology* 200.11. DOI : 10.1128/JB.00736-17.
- JANSSEN, Kayley H. et al. (2018b). "RsmV, a Small Noncoding Regulatory RNA in *Pseudomonas aeruginosa* That Sequesters RsmA and RsmF from Target mRNAs". *Journal of Bacteriology* 200.16. DOI : 10.1128/JB.00277-18.
- JANSSEN, Kayley H. et al. (2020). "Hfq and sRNA 179 Inhibit Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* cAMP-Vfr and Type III Secretion Regulons". *mBio* 11.3, e00363-20. DOI : 10.1128/mBio.00363-20.
- JEAN-PIERRE, Fabrice et al. (2017). "Broth versus Surface-Grown Cells : Differential Regulation of RsmY/Z Small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB System". *Frontiers in Microbiology* 7. DOI : 10.3389/fmicb.2016.02168.
- JENAL, Urs et al. (2017). "Cyclic di-GMP : second messenger extraordinaire". *Nature Reviews Microbiology* 15.5, p. 271-284. DOI : 10.1038/nrmicro.2016.190.

- JENSEN, Peter Østrup et al. (2010). “The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 59.3, p. 292-305. DOI : 10.1111/j.1574-695X.2010.00706.x.
- JIN, Yongxin et al. (2011). “MexT Regulates the Type III Secretion System through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Journal of Bacteriology* 193.2, p. 399-410. DOI : 10.1128/JB.01079-10.
- JOGE, Shubham et al. (2018). *Two-component systems regulate swarming in Pseudomonas aeruginosa PA14*. preprint. Microbiology. DOI : 10.1101/445015.
- JOHNSON, Christopher M. et al. (2015). “Integrative and Conjugative Elements (ICEs) : What They Do and How They Work”. *Annual Review of Genetics* 49.1, p. 577-601. DOI : 10.1146/annurev-genet-112414-055018.
- JONES, Allison M. et al. (2005a). “Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis* : BvgA phosphorylation and DNA binding mutants”. *Molecular Microbiology* 58.3, p. 700-713. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2005.04875.x.
- (2005b). “Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis* : BvgA phosphorylation and DNA binding mutants”. *Molecular Microbiology* 58.3, p. 700-713. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2005.04875.x.
- JUAN, Carlos et al. (2005). “Molecular Mechanisms of β -Lactam Resistance Mediated by AmpC Hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49.11, p. 4733-4738. DOI : 10.1128/AAC.49.11.4733-4738.2005.
- KHALEDI, Ariane et al. (2016). “Transcriptome Profiling of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60.8, p. 4722-4733. DOI : 10.1128/AAC.00075-16.
- KOLLARAN, Ameen M. et al. (2019). “Context-Specific Requirement of Forty-Four Two-Component Loci in *Pseudomonas aeruginosa* Swarming”. *iScience* 13, p. 305-317. DOI : 10.1016/j.isci.2019.02.028.
- KONG, Weina et al. (2013). “Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS : PA1611 regulates infection transition via interaction with RetS”. *Molecular Microbiology* 88.4, p. 784-797. DOI : 10.1111/mmi.12223.
- KONG, Weina et al. (2022). “Dual GGDEF/EAL-Domain Protein RmcA Controls the Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* by Interaction with CbrB”. *ACS Infectious Diseases* 8.12, p. 2441-2450. DOI : 10.1021/acsinfecdis.2c00212.
- KONSTANTINIDIS, Konstantinos T. et al. (2005). “Towards a Genome-Based Taxonomy for Prokaryotes”. *Journal of Bacteriology* 187.18, p. 6258-6264. DOI : 10.1128/JB.187.18.6258-6264.2005.
- KORGAONKAR, Aishwarya et al. (2013). “Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 6. DOI : 10.1073/pnas.1214550110.
- KORGAONKAR, Aishwarya K. et al. (2011). “*Pseudomonas aeruginosa* Enhances Production of an Antimicrobial in Response to *N*-Acetylglucosamine and Peptidoglycan”. *Journal of Bacteriology* 193.4, p. 909-917. DOI : 10.1128/JB.01175-10.
- KRÄMER, J. et al. (2007). “Citrate Sensing by the C₄-Dicarboxylate/Citrate Sensor Kinase DcuS of *Escherichia coli* : Binding Site and Conversion of DcuS to a C₄-Dicarboxylate- or Citrate-

- Specific Sensor”. *Journal of Bacteriology* 189.11, p. 4290-4298. DOI : 10.1128/JB.00168-07.
- KRIBELBAUER, Judith F. et al. (2019). “Low-Affinity Binding Sites and the Transcription Factor Specificity Paradox in Eukaryotes”. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 35.1, p. 357-379. DOI : 10.1146/annurev-cellbio-100617-062719.
- KUCHMA, Sherry L. et al. (2005). “A Three-Component Regulatory System Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Journal of Bacteriology* 187.4, p. 1441-1454. DOI : 10.1128/JB.187.4.1441-1454.2005.
- KUCHMA, Sherry L. et al. (2022). “Surface-Induced cAMP Signaling Requires Multiple Features of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pili”. *Journal of Bacteriology* 204.10, e00186-22. DOI : 10.1128/jb.00186-22.
- KULASEKARA, Bridget R. et al. (2006). “Acquisition and Evolution of the *exoU* Locus in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Journal of Bacteriology* 188.11, p. 4037-4050. DOI : 10.1128/JB.02000-05.
- KULASEKARA, Hemantha D. et al. (2004). “A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes : Regulation of *P. aeruginosa* Cup fimbriae by Roc 1”. *Molecular Microbiology* 55.2, p. 368-380. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2004.04402.x.
- KUNG, Vanderlene L. et al. (2010). “The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74.4, p. 621-641. DOI : 10.1128/MMBR.00027-10.
- LANGMEAD, Ben et al. (2012). “Fast gapped-read alignment with Bowtie 2”. *Nature Methods* 9.4, p. 357-359. DOI : 10.1038/nmeth.1923.
- LARA, Paloma et al. (2023). *A Gold Standard for Transcription Factor-Gene Regulatory Interactions in Escherichia coli K-12 : Architecture of the Evidence Types*. preprint. Genomics. DOI : 10.1101/2023.02.25.530038.
- LAU, Gee W. et al. (2004). “The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection”. *Trends in Molecular Medicine* 10.12, p. 599-606. DOI : 10.1016/j.molmed.2004.10.002.
- LAUB, Michael T. et al. (2007). “Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways”. *Annual Review of Genetics* 41.1, p. 121-145. DOI : 10.1146/annurev.genet.41.042007.170548.
- LAVENTIE, Benoît-Joseph et al. (2019). “A Surface-Induced Asymmetric Program Promotes Tissue Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*”. *Cell Host & Microbe* 25.1, 140-152.e6. DOI : 10.1016/j.chom.2018.11.008.
- LEE, Jasmine et al. (2015). “The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Protein & Cell* 6.1, p. 26-41. DOI : 10.1007/s13238-014-0100-x.
- LEE, Kang-Mu et al. (2011). “Anaerobiosis-Induced Loss of Cytotoxicity Is Due to Inactivation of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Infection and Immunity* 79.7, p. 2792-2800. DOI : 10.1128/IAI.01361-10.
- LEE, Seok-Yong et al. (2001). “Crystal Structure of Activated CheY”. *Journal of Biological Chemistry* 276.19, p. 16425-16431. DOI : 10.1074/jbc.M101002200.
- LEE, Seok-Yong et al. (2003). “Regulation of the transcriptional activator NtrC1 : structural studies of the regulatory and AAA⁺ ATPase domains”. *Genes & Development* 17.20, p. 2552-2563. DOI : 10.1101/gad.1125603.
- LI, Li-Guan et al. (2017). “Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection”. *The ISME Journal* 11.3, p. 651-662. DOI : 10.1038/ismej.2016.155.

- LI, Xian-Zhi et al. (2015). "The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria". *Clinical Microbiology Reviews* 28.2, p. 337-418. DOI : 10.1128/CMR.00117-14.
- LISTER, Philip D. et al. (2009). "Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms". *Clinical Microbiology Reviews* 22.4, p. 582-610. DOI : 10.1128/CMR.00040-09.
- LIU, Pei et al. (2022). "The function of small RNA in *Pseudomonas aeruginosa*". *PeerJ* 10, e13738. DOI : 10.7717/peerj.13738.
- LIVNY, J. (2006). "Identification of 17 *Pseudomonas aeruginosa* sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatic tool sRNAPredict2". *Nucleic Acids Research* 34.12, p. 3484-3493. DOI : 10.1093/nar/gkl453.
- LORUSSO, Andre Bittencourt et al. (2022). "Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*". *International Journal of Molecular Sciences* 23.24, p. 15779. DOI : 10.3390/ijms232415779.
- LOVE, Michael I et al. (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2". *Genome Biology* 15.12, p. 550. DOI : 10.1186/s13059-014-0550-8.
- LUKAT, G S et al. (1992). "Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.2, p. 718-722. DOI : 10.1073/pnas.89.2.718.
- MA, Sheng et al. (1998). "Phosphorylation-Independent Activity of the Response Regulators AlgB and AlgR in Promoting Alginate Biosynthesis in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Bacteriology* 180.4, p. 956-968. DOI : 10.1128/JB.180.4.956-968.1998.
- MADAN BABU, M. (2003a). "Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*". *Nucleic Acids Research* 31.4, p. 1234-1244. DOI : 10.1093/nar/gkg210.
- (2003b). "Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*". *Nucleic Acids Research* 31.4, p. 1234-1244. DOI : 10.1093/nar/gkg210.
- MADDOCKS, Sarah E. et al. (2008). "Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins". *Microbiology* 154.12, p. 3609-3623. DOI : 10.1099/mic.0.2008/022772-0.
- MAJDALANI, Nadim et al. (2005). "THE RCS PHOSPHORELAY : A Complex Signal Transduction System". *Annual Review of Microbiology* 59.1, p. 379-405. DOI : 10.1146/annurev.micro.59.050405.101230.
- MALHOTRA, Vandana et al. (2015). "Mycobacterium tuberculosis Response Regulators, DevR and NarL, Interact in Vivo and Co-regulate Gene Expression during Aerobic Nitrate Metabolism". *Journal of Biological Chemistry* 290.13, p. 8294-8309. DOI : 10.1074/jbc.M114.591800.
- MANCL, Jordan M. et al. (2019). "Helix Cracking Regulates the Critical Interaction between RetS and GacS in *Pseudomonas aeruginosa*". *Structure* 27.5, 785-793.e5. DOI : 10.1016/j.str.2019.02.006.
- MARDEN, Jeremiah N. et al. (2011). "Cyclic GMP controls *Rhodospirillum centenum* cyst development : cGMP control of encystment". *Molecular Microbiology* 79.3, p. 600-615. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2010.07513.x.
- MARIS, Ann E. et al. (2002). "Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator". *Nature Structural Biology* 9.10, p. 771-778. DOI : 10.1038/nsb845.

- MARSDEN, Anne E. et al. (2016). "Vfr Directly Activates *exsA* Transcription To Regulate Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System". *Journal of Bacteriology* 198.9, p. 1442-1450. DOI : 10.1128/JB.00049-16.
- MARTÍNEZ, Eriel et al. (2019). "Oxylipins mediate cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa*". *Communications Biology* 2.1, p. 66. DOI : 10.1038/s42003-019-0310-0.
- MARTÍNEZ, Eriel et al. (2022). "*Pseudomonas aeruginosa* Secretes the Oxylipin Autoinducer Synthases OdsA and OdsB via the Xcp Type 2 Secretion System". *Journal of Bacteriology* 204.7, e00114-22. DOI : 10.1128/jb.00114-22.
- MARVIG, Rasmus Lykke et al. (2015). "Within-host microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in Italian cystic fibrosis patients". *BMC Microbiology* 15.1, p. 218. DOI : 10.1186/s12866-015-0563-9.
- MASCHER, Thorsten et al. (2006). "Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70.4, p. 910-938. DOI : 10.1128/MMBR.00020-06.
- MATHEE, Kalai et al. (2008). "Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.8, p. 3100-3105. DOI : 10.1073/pnas.0711982105.
- MATSUYAMA, Bruno Y. et al. (2016). "Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.2. DOI : 10.1073/pnas.1523148113.
- MATTHEWS, B W et al. (1982). "Structure of the DNA-binding region of lac repressor inferred from its homology with cro repressor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79.5, p. 1428-1432. DOI : 10.1073/pnas.79.5.1428.
- MCDONOUGH, Kathleen A. et al. (2012). "The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens : from signal to sword". *Nature Reviews Microbiology* 10.1, p. 27-38. DOI : 10.1038/nrmicro2688.
- MCKELLAR, James L. O. et al. (2015). "A high-throughput screen for ligand binding reveals the specificities of three amino acid chemoreceptors from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*". *Molecular Microbiology* 96.4, p. 694-707. DOI : 10.1111/mmi.12964.
- MCLEOD, Sarah M et al. (2002). "The C-terminal domains of the RNA polymerase subunits : contact site with fis and localization during co-activation with CRP at the Escherichia coli proP P2 promoter". *Journal of Molecular Biology* 316.3, p. 517-529. DOI : 10.1006/jmbi.2001.5391.
- MEIER-KOLTHOFF, Jan P et al. (2022). "TYGS and LPSN : a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes". *Nucleic Acids Research* 50.D1, p. D801-D807. DOI : 10.1093/nar/gkab902.
- MIKKELSEN, Helga et al. (2009). "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD Fimbrial Genes Is Antagonistically Controlled by RcsB and the EAL-Containing PvrR Response Regulators". *PLoS ONE* 4.6, e6018. DOI : 10.1371/journal.pone.0006018.
- MIKKELSEN, Helga et al. (2011a). "Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* : Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms". *Environmental Microbiology* 13.7, p. 1666-1681. DOI : 10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x.

- MIKKELSEN, Helga et al. (2011b). "The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in *ladS*". *PLoS ONE* 6.12, e29113. DOI : 10.1371/journal.pone.0029113.
- MIKKELSEN, Helga et al. (2013). "The pathogenicity island encoded PvrSR / RcsCB regulatory network controls biofilm formation and dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* PA14". *Molecular Microbiology* 89.3, p. 450-463. DOI : 10.1111/mmi.12287.
- MILLER, Christine L. et al. (2016). "RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions". *BMC Microbiology* 16.1, p. 155. DOI : 10.1186/s12866-016-0771-y.
- MINEZAKI, Y. et al. (2006). "Genome-Wide Survey of Transcription Factors in Prokaryotes Reveals Many Bacteria-Specific Families Not Found in Archaea". *DNA Research* 12.5, p. 269-280. DOI : 10.1093/dnares/dsi016.
- MIRANDA, Samantha Wellington et al. (2022). "Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing". In : *Pseudomonas aeruginosa*. T. 1386. Series Title : Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham : Springer International Publishing, p. 95-115. DOI : 10.1007/978-3-031-08491-1_4.
- MITROPHANOV, Alexander Y. et al. (2010). "Positive Autoregulation Shapes Response Timing and Intensity in Two-component Signal Transduction Systems". *Journal of Molecular Biology* 401.4, p. 671-680. DOI : 10.1016/j.jmb.2010.06.051.
- MIYADA, C G et al. (1984). "Regulation of the *araC* gene of *Escherichia coli* : catabolite repression, autoregulation, and effect on *araBAD* expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81.13, p. 4120-4124. DOI : 10.1073/pnas.81.13.4120.
- MÖGLICH, Andreas et al. (2009). "Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains". *Structure* 17.10, p. 1282-1294. DOI : 10.1016/j.str.2009.08.011.
- MONK, Ian R. et al. (2019). "Zinc-binding to the cytoplasmic PAS domain regulates the essential Walk histidine kinase of *Staphylococcus aureus*". *Nature Communications* 10.1, p. 3067. DOI : 10.1038/s41467-019-10932-4.
- MORADALI, M. Fata et al. (2017). "Pseudomonas aeruginosa Lifestyle : A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. DOI : 10.3389/fcimb.2017.00039.
- MORRIS, Joshua D. et al. (2011). "Imaging and Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Swarming and Rhamnolipid Production". *Applied and Environmental Microbiology* 77.23, p. 8310-8317. DOI : 10.1128/AEM.06644-11.
- MOSCOSO, Joana A. et al. (2011). "The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signalling : Protein secretion and c-di-GMP signalling". *Environmental Microbiology* 13.12, p. 3128-3138. DOI : 10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x.
- MOSQUERA-RENDÓN, Jeanneth et al. (2016). "Pangenome-wide and molecular evolution analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* species". *BMC Genomics* 17.1, p. 45. DOI : 10.1186/s12864-016-2364-4.
- MOUSLIM, Chakib et al. (2003). "Control of the *Salmonella* *ugd* gene by three two-component regulatory systems : Complex regulation by two-component systems". *Molecular Microbiology* 47.2, p. 335-344. DOI : 10.1046/j.1365-2958.2003.03318.x.
- MULCAHY, Heidi et al. (2008). "*Pseudomonas aeruginosa* RsmA Plays an Important Role during Murine Infection by Influencing Colonization, Virulence, Persistence, and Pulmonary Inflammation". *Infection and Immunity* 76.2, p. 632-638. DOI : 10.1128/IAI.01132-07.

- NGUYEN, Christine C. et al. (2019). "Association between heavy metals and antibiotic-resistant human pathogens in environmental reservoirs : A review". *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 13.3, p. 46. DOI : 10.1007/s11783-019-1129-0.
- NINFA, A J et al. (1988). "Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon : evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85.15, p. 5492-5496. DOI : 10.1073/pnas.85.15.5492.
- NITZAN, Mor et al. (2017). "Integration of Bacterial Small RNAs in Regulatory Networks". *Annual Review of Biophysics* 46.1, p. 131-148. DOI : 10.1146/annurev-biophys-070816-034058.
- NIXON, B T et al. (1986). "Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83.20, p. 7850-7854. DOI : 10.1073/pnas.83.20.7850.
- NORIEGA, Chris E. et al. (2010). "Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12". *Molecular Microbiology* 75.2, p. 394-412. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2009.06987.x.
- NORSWORTHY, Allison N. et al. (2015). "Signaling between two interacting sensor kinases promotes biofilms and colonization by a bacterial symbiont : Two interacting kinases permit biofilm formation". *Molecular Microbiology* 96.2, p. 233-248. DOI : 10.1111/mmi.12932.
- NOVOA-APONTE, Lorena et al. (2020). "The Two-Component System CopRS Maintains Sub-femtomolar Levels of Free Copper in the Periplasm of *Pseudomonas aeruginosa* Using a Phosphatase-Based Mechanism". *mSphere* 5.6, e01193-20. DOI : 10.1128/mSphere.01193-20.
- O'HARA, B. P. (1999). "Crystal structure and induction mechanism of AmiC-AmiR : a ligand-regulated transcription antitermination complex". *The EMBO Journal* 18.19, p. 5175-5186. DOI : 10.1093/emboj/18.19.5175.
- OCHMAN, Howard et al. (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation". 405.
- OKSUZ, Ozgur et al. (2023). "Transcription factors interact with RNA to regulate genes". *Molecular Cell* 83.14, 2449-2463.e13. DOI : 10.1016/j.molcel.2023.06.012.
- OLIVER, Antonio et al. (2015). "The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones". *Drug Resistance Updates* 21-22, p. 41-59. DOI : 10.1016/j.drug.2015.08.002.
- ORTET, Philippe et al. (2012). "P2TF : a comprehensive resource for analysis of prokaryotic transcription factors". *BMC Genomics* 13.1, p. 628. DOI : 10.1186/1471-2164-13-628.
- ORTET, Philippe et al. (2015). "P2CS : updates of the prokaryotic two-component systems database". *Nucleic Acids Research* 43.D1, p. D536-D541. DOI : 10.1093/nar/gku968.
- OZER, Egon A et al. (2019). "The Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Is Characterized by Genetic Isolation of exoU⁺ and exoS⁺ Lineages". *Genome Biology and Evolution* 11.7, p. 1780-1796. DOI : 10.1093/gbe/evz119.
- PAMP, Sünje Johanna et al. (2007). "Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Bacteriology* 189.6, p. 2531-2539. DOI : 10.1128/JB.01515-06.
- PANG, Zheng et al. (2019). "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : mechanisms and alternative therapeutic strategies". *Biotechnology Advances* 37.1, p. 177-192. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.

- PARK, Heiyoung et al. (1998). “Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.12, p. 6728-6732. DOI : 10.1073/pnas.95.12.6728.
- PARKINSON, John S. (2010). “Signaling Mechanisms of HAMP Domains in Chemoreceptors and Sensor Kinases”. *Annual Review of Microbiology* 64.1, p. 101-122. DOI : 10.1146/annurev.micro.112408.134215.
- PEREZ, J. Christian et al. (2009). “Evolution of Transcriptional Regulatory Circuits in Bacteria”. *Cell* 138.2, p. 233-244. DOI : 10.1016/j.cell.2009.07.002.
- PERRON, Karl et al. (2004). “CzcR-CzcS, a Two-component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*”. *Journal of Biological Chemistry* 279.10, p. 8761-8768. DOI : 10.1074/jbc.M312080200.
- PESAVENTO, Christina et al. (2009). “Bacterial nucleotide-based second messengers”. *Current Opinion in Microbiology* 12.2, p. 170-176. DOI : 10.1016/j.mib.2009.01.007.
- PETROVA, Olga E. et al. (2009). “A Novel Signaling Network Essential for Regulating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development”. *PLoS Pathogens* 5.11, e1000668. DOI : 10.1371/journal.ppat.1000668.
- (2010). “The Novel Two-Component Regulatory System BfiSR Regulates Biofilm Development by Controlling the Small RNA *rsmZ* through CafA”. *Journal of Bacteriology* 192.20, p. 5275-5288. DOI : 10.1128/JB.00387-10.
- (2011). “SagS Contributes to the Motile-Sessile Switch and Acts in Concert with BfiSR To Enable *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation”. *Journal of Bacteriology* 193.23, p. 6614-6628. DOI : 10.1128/JB.00305-11.
- PITA, Tiago et al. (2018). “Small Noncoding Regulatory RNAs from *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* Complex”. *International Journal of Molecular Sciences* 19.12, p. 3759. DOI : 10.3390/ijms19123759.
- PODGORNAIA, Anna I. et al. (2013). “Structural Basis of a Rationally Rewired Protein-Protein Interface Critical to Bacterial Signaling”. *Structure* 21.9, p. 1636-1647. DOI : 10.1016/j.str.2013.07.005.
- POIREL, L. et al. (2002). “Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamases and their Genetic Support”. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 3.2, p. 117-127. DOI : 10.2174/1389201023378427.
- POTVIN, Eric et al. (2008). “Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*”. *FEMS Microbiology Reviews* 32.1, p. 38-55. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x.
- QIU, X. et al. (2009). “Role of Horizontal Gene Transfer in the Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence”. In : *Genome Dynamics*. T. 6. S. Karger AG, p. 126-139. DOI : 10.1159/000235767.
- QUINTANA, Julia et al. (2017). “Copper homeostasis networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*”. *Journal of Biological Chemistry* 292.38, p. 15691-15704. DOI : 10.1074/jbc.M117.804492.
- QUIROZ-MORALES, Sara E. et al. (2022). “Tracking the Origins of *Pseudomonas aeruginosa* Phylogroups by Diversity and Evolutionary Analysis of Important Pathogenic Marker Genes”. *Diversity* 14.5, p. 345. DOI : 10.3390/d14050345.
- RAJPUT, Akanksha et al. (2022). “Machine learning from *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes identifies independently modulated sets of genes associated with known transcriptional regulators”. *Nucleic Acids Research* 50.7, p. 3658-3672. DOI : 10.1093/nar/gkac187.

- RAMSAY, Joshua P et al. (2006). "Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS". *Molecular Microbiology* 62.3, p. 723-734. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2006.05396.x.
- RAO, Feng et al. (2008). "Catalytic Mechanism of Cyclic Di-GMP-Specific Phosphodiesterase : a Study of the EAL Domain-Containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Bacteriology* 190.10, p. 3622-3631. DOI : 10.1128/JB.00165-08.
- RAPUN-ARAIZ, Beatriz et al. (2020). "The impact of two-component sensorial network in staphylococcal speciation". *Current Opinion in Microbiology* 55, p. 40-47. DOI : 10.1016/j.mib.2020.02.004.
- REBOUD, Emeline et al. (2017). "Exolysin Shapes the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clonal Outliers". *Toxins* 9.11, p. 364. DOI : 10.3390/toxins9110364.
- REID, Colm J. et al. (1998). "Roles of DctA and DctB in Signal Detection by the Dicarboxylic Acid Transport System of *Rhizobium leguminosarum*". *Journal of Bacteriology* 180.10, p. 2660-2669. DOI : 10.1128/JB.180.10.2660-2669.1998.
- REN, Bin et al. (2014). "The phzA2-G2 Transcript Exhibits Direct RsmA-Mediated Activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18". *PLoS ONE* 9.2, e89653. DOI : 10.1371/journal.pone.0089653.
- REYNOLDS, Dan et al. (2021). "The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections : An Update". *Drugs* 81.18, p. 2117-2131. DOI : 10.1007/s40265-021-01635-6.
- RICHTER, Michael et al. (2009). "Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.45, p. 19126-19131. DOI : 10.1073/pnas.0906412106.
- RODRIGUE, Agnès et al. (2000). "Cell signalling by oligosaccharides. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* : why so many?" *Trends in Microbiology* 8.11, p. 498-504. DOI : 10.1016/S0966-842X(00)01833-3.
- RÖMLING, Ute et al. (2005). "C-di-GMP : the dawning of a novel bacterial signalling system : C-di-GMP signalling in bacteria". *Molecular Microbiology* 57.3, p. 629-639. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x.
- RÖMLING, Ute et al. (2013). "Cyclic di-GMP : the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77.1, p. 1-52. DOI : 10.1128/MMBR.00043-12.
- ROSSELLO, Jessica et al. (2017). "The EAL-domain protein FcsR regulates flagella, chemotaxis and type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* by a phosphodiesterase independent mechanism". *Scientific Reports* 7.1, p. 10281. DOI : 10.1038/s41598-017-09926-3.
- ROSSI, Chiara et al. (2018). "Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry". *Food Control* 86, p. 241-248. DOI : 10.1016/j.foodcont.2017.11.018.
- ROSSI, Elio et al. (2021). "*Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis". *Nature Reviews Microbiology* 19.5, p. 331-342. DOI : 10.1038/s41579-020-00477-5.
- ROWLAND, Michael A. et al. (2014). "Crosstalk and the evolution of specificity in two-component signaling". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.15, p. 5550-5555. DOI : 10.1073/pnas.1317178111.

- ROY, Paul H. et al. (2010). "Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7". *PLoS ONE* 5.1, e8842. DOI : 10.1371/journal.pone.0008842.
- RUDRA, Bashudev et al. (2022). "Phylogenomic and comparative genomic studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains : proposal to transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraaeruginosa* sp. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72.11. DOI : 10.1099/ijsem.0.005542.
- RUER, Ségolène et al. (2007). "Assembly of Fimbrial Structures in *Pseudomonas aeruginosa* : Functionality and Specificity of Chaperone-Usher Machineries". *Journal of Bacteriology* 189.9, p. 3547-3555. DOI : 10.1128/JB.00093-07.
- SALL, Khady Mayebine et al. (2014). "A *gacS* Deletion in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolate CHA Shapes Its Virulence". *PLoS ONE* 9.4, e95936. DOI : 10.1371/journal.pone.0095936.
- SANA, T. G. et al. (2019). "Differential Modulation of Quorum Sensing Signaling through QslA in *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14". *Journal of Bacteriology* 201.21. DOI : 10.1128/JB.00362-19.
- SANKHE, Gaurav D. et al. (2023). "Sequestration of histidine kinases by non-cognate response regulators establishes a threshold level of stimulation for bacterial two-component signaling". *Nature Communications* 14.1, p. 4483. DOI : 10.1038/s41467-023-40095-2.
- SANTOS-ZAVALA, Alberto et al. (2019). "RegulonDB v 10.5 : tackling challenges to unify classic and high throughput knowledge of gene regulation in *E. coli* K-12". *Nucleic Acids Research* 47.D1, p. D212-D220. DOI : 10.1093/nar/gky1077.
- SAUER, Frederic G. et al. (2004). "Fiber assembly by the chaperone-usher pathway". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694.1-3, p. 259-267. DOI : 10.1016/j.bbamcr.2004.02.010.
- SAUER, Karin et al. (2022). "The biofilm life cycle : expanding the conceptual model of biofilm formation". *Nature Reviews Microbiology* 20.10, p. 608-620. DOI : 10.1038/s41579-022-00767-0.
- SCHIJFFELN, Maarten J et al. (2010). "Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis". *BMC Genomics* 11.1, p. 376. DOI : 10.1186/1471-2164-11-376.
- SENTAUSA, Erwin et al. (2020). "Insertion sequences drive the emergence of a highly adapted human pathogen". *Microbial Genomics* 6.9. DOI : 10.1099/mgen.0.000265.
- SHAO, Xiaolong et al. (2023). "The transcriptional regulators of virulence for *Pseudomonas aeruginosa* : Therapeutic opportunity and preventive potential of its clinical infections". *Genes & Diseases* 10.5, p. 2049-2063. DOI : 10.1016/j.gendis.2022.09.009.
- SILBY, Mark W. et al. (2011). "*Pseudomonas* genomes : diverse and adaptable". *FEMS Microbiology Reviews* 35.4, p. 652-680. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x.
- SINGH, Krishna Kumar et al. (2019). "Acetylation of Response Regulator Proteins, TcrX and MtrA in *M. tuberculosis* Tunes their Phosphotransfer Ability and Modulates Two-Component Signaling Crosstalk". *Journal of Molecular Biology* 431.4, p. 777-793. DOI : 10.1016/j.jmb.2019.01.004.
- SINGH, Pradeep K. et al. (2000). "Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms". *Nature* 407.6805, p. 762-764. DOI : 10.1038/35037627.

- SIVANESON, Melissa et al. (2011). "Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa* : an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression : The *Pseudomonas aeruginosa* Roc systems". *Molecular Microbiology* 79.5, p. 1353-1366. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2010.07527.x.
- SKERKER, Jeffrey M et al. (2005). "Two-Component Signal Transduction Pathways Regulating Growth and Cell Cycle Progression in a Bacterium : A System-Level Analysis". *PLoS Biology* 3.10, e334. DOI : 10.1371/journal.pbio.0030334.
- SKERKER, Jeffrey M. et al. (2008). "Rewiring the Specificity of Two-Component Signal Transduction Systems". *Cell* 133.6, p. 1043-1054. DOI : 10.1016/j.cell.2008.04.040.
- SMITH, Jenny G. et al. (2003). "A search for amino acid substitutions that universally activate response regulators : Activating substitutions in response regulators". *Molecular Microbiology* 51.3, p. 887-901. DOI : 10.1046/j.1365-2958.2003.03882.x.
- SOBRAN, M. Ashley et al. (2019). "The BvgS PAS Domain, an Independent Sensory Perception Module in the *Bordetella bronchiseptica* BvgAS Phosphorelay". *Journal of Bacteriology* 201.17. DOI : 10.1128/JB.00286-19.
- SORGER-DOMENIGG, Theresa et al. (2007). "Distinct and overlapping binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq and RsmA proteins on the non-coding RNA RsmY". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352.3, p. 769-773. DOI : 10.1016/j.bbrc.2006.11.084.
- STAEHLIN, Benjamin M. et al. (2016). "Evolution of a heavy metal homeostasis/resistance island reflects increasing copper stress in Enterobacteria". *Genome Biology and Evolution*, evw031. DOI : 10.1093/gbe/evw031.
- STEWART, Lewis et al. (2014). "Draft genomes of 12 host-adapted and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their positions in the core genome phylogeny". *Pathogens and Disease* 71.1, p. 20-25. DOI : 10.1111/2049-632X.12107.
- STEWART, Philip S et al. (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms". *The Lancet* 358.9276, p. 135-138. DOI : 10.1016/S0140-6736(01)05321-1.
- STICKLAND, Hannah G. et al. (2010). "Mutation of *nfxB* Causes Global Changes in the Physiology and Metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Proteome Research* 9.6, p. 2957-2967. DOI : 10.1021/pr9011415.
- STOVER, C. K. et al. (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen". *Nature* 406.6799, p. 959-964. DOI : 10.1038/35023079.
- STRAGIER, P et al. (1983). "Regulatory pattern of the *Escherichia coli* *lysA* gene : expression of chromosomal *lysA-lacZ* fusions". *Journal of Bacteriology* 156.3, p. 1198-1203. DOI : 10.1128/jb.156.3.1198-1203.1983.
- STRAGIER, Patrick et al. (1983). "Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*". *Journal of Molecular Biology* 168.2, p. 333-350. DOI : 10.1016/S0022-2836(83)80022-9.
- STRANDWITZ, Philip (2018). "Neurotransmitter modulation by the gut microbiota". *Brain Research* 1693, p. 128-133. DOI : 10.1016/j.brainres.2018.03.015.
- STUFFLE, Erwin C et al. (2021). "PAS domains in bacterial signal transduction". *Current Opinion in Microbiology* 61, p. 8-15. DOI : 10.1016/j.mib.2021.01.004.
- SU, Tiantian et al. (2015). "The REC domain mediated dimerization is critical for FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* to function as a c-di-GMP receptor and flagella gene regulator". *Journal of Structural Biology* 192.1, p. 1-13. DOI : 10.1016/j.jsb.2015.09.002.

- SUH, Sang-Jin et al. (1999). "Effect of *rpoS* Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Bacteriology* 181.13, p. 3890-3897. DOI : 10.1128/JB.181.13.3890-3897.1999.
- TAM, R et al. (1993). "Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria". *Microbiological Reviews* 57.2, p. 320-346. DOI : 10.1128/mr.57.2.320-346.1993.
- TAMAYO, Rita et al. (2007). "Roles of Cyclic Diguanylate in the Regulation of Bacterial Pathogenesis". *Annual Review of Microbiology* 61.1, p. 131-148. DOI : 10.1146/annurev.micro.61.080706.093426.
- TEITZEL, Gail M. et al. (2003). "Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*". *Applied and Environmental Microbiology* 69.4, p. 2313-2320. DOI : 10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003.
- THOMASON, Maureen K. et al. (2019). "A *rhII* 5' UTR-Derived sRNA Regulates RhlR-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*". *mBio* 10.5, e02253-19. DOI : 10.1128/mBio.02253-19.
- TIAN, Zhe-Xian et al. (2009). "MexT modulates virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* independent of the MexEF-OprN efflux pump". *Microbial Pathogenesis* 47.4, p. 237-241. DOI : 10.1016/j.micpath.2009.08.003.
- TIERRAFRÍA, Víctor H. et al. (2022). "RegulonDB 11.0 : Comprehensive high-throughput datasets on transcriptional regulation in *Escherichia coli* K-12". *Microbial Genomics* 8.5. DOI : 10.1099/mgen.0.000833.
- TOUSSAINT, Jean-Paul et al. (2017). "Gene Duplication in *Pseudomonas aeruginosa* Improves Growth on Adenosine". *Journal of Bacteriology* 199.21. DOI : 10.1128/JB.00261-17.
- TREANGEN, Todd J. et al. (2011). "Horizontal Transfer, Not Duplication, Drives the Expansion of Protein Families in Prokaryotes". *PLoS Genetics* 7.1, e1001284. DOI : 10.1371/journal.pgen.1001284.
- TROUILLON, Julian et al. (2020). "Species-specific recruitment of transcription factors dictates toxin expression". *Nucleic Acids Research* 48.5, p. 2388-2400. DOI : 10.1093/nar/gkz1232.
- TROUILLON, Julian et al. (2021a). "Determination of the two-component systems regulatory network reveals core and accessory regulations across *Pseudomonas aeruginosa* lineages". *Nucleic Acids Research* 49.20, p. 11476-11490. DOI : 10.1093/nar/gkab928.
- TROUILLON, Julian et al. (2021b). "Transcription Inhibitors with XRE DNA-Binding and Cupin Signal-Sensing Domains Drive Metabolic Diversification in *Pseudomonas*". *mSystems* 6.1, e00753-20. DOI : 10.1128/mSystems.00753-20.
- TROUILLON, Julian et al. (2022). "The core and accessory Hfq interactomes across *Pseudomonas aeruginosa* lineages". *Nature Communications* 13.1, p. 1258. DOI : 10.1038/s41467-022-28849-w.
- TURKINA, Maria V. et al. (2019). "Bacteria-Host Crosstalk : Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections". *Journal of Innate Immunity* 11.3, p. 263-279. DOI : 10.1159/000494069.
- TURNER, Keith H. et al. (2015). "Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.13, p. 4110-4115. DOI : 10.1073/pnas.1419677112.
- ULRICH, Luke E. et al. (2005). "One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes". *Trends in Microbiology* 13.2, p. 52-56. DOI : 10.1016/j.tim.2004.12.006.

- UPADHYAY, Amit A. et al. (2016). “Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes”. *PLOS Computational Biology* 12.4, e1004862. DOI : 10.1371/journal.pcbi.1004862.
- URBANOWSKI, Mark L. et al. (2005). “A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.28, p. 9930-9935. DOI : 10.1073/pnas.0504405102.
- VALENTINI, Martina et al. (2016a). “Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling : Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria”. *Journal of Biological Chemistry* 291.24, p. 12547-12555. DOI : 10.1074/jbc.R115.711507.
- VALENTINI, Martina et al. (2016b). “The Diguanylate Cyclase HsbD Intersects with the HptB Regulatory Cascade to Control *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Motility”. *PLOS Genetics* 12.10, e1006354. DOI : 10.1371/journal.pgen.1006354.
- VALLET, I. et al. (2001). “The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa* : Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.12, p. 6911-6916. DOI : 10.1073/pnas.111551898.
- VALLET, Isabelle et al. (2004). “Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* : Fimbrial cup Gene Clusters Are Controlled by the Transcriptional Regulator MvaT”. *Journal of Bacteriology* 186.9, p. 2880-2890. DOI : 10.1128/JB.186.9.2880-2890.2004.
- VALOT, Benoît et al. (2015). “What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated”. *PLOS ONE* 10.5, e0126468. DOI : 10.1371/journal.pone.0126468.
- VEMPARALA, Bharadwaj et al. (2022). “An Evolutionary Paradigm Favoring Cross Talk between Bacterial Two-Component Signaling Systems”. *mSystems* 7.6, e00298-22. DOI : 10.1128/mSystems.00298-22.
- VENKATESH, G. Raja et al. (2010). “BglJ-RcsB Heterodimers Relieve Repression of the *Escherichia coli* bgl Operon by H-NS”. *Journal of Bacteriology* 192.24, p. 6456-6464. DOI : 10.1128/JB.00807-10.
- VÉSCOVI, Elenora García et al. (1997). “Characterization of the Bacterial Sensor Protein PhoQ”. *Journal of Biological Chemistry* 272.3, p. 1440-1443. DOI : 10.1074/jbc.272.3.1440.
- VIRIEUX-PETIT, Maxine et al. (2022). “From Copper Tolerance to Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards Patho-Adaptation and Hospital Success”. *Genes* 13.2, p. 301. DOI : 10.3390/genes13020301.
- VOGEL, Jörg et al. (2011). “Hfq and its constellation of RNA”. *Nature Reviews Microbiology* 9.8, p. 578-589. DOI : 10.1038/nrmicro2615.
- WAGNER, Dirk et al. (2005). “Elemental Analysis of *Mycobacterium avium* -, *Mycobacterium tuberculosis* -, and *Mycobacterium smegmatis* -Containing Phagosomes Indicates Pathogen-Induced Microenvironments within the Host Cell’s Endosomal System”. *The Journal of Immunology* 174.3, p. 1491-1500. DOI : 10.4049/jimmunol.174.3.1491.
- WANG, Feng et al. (2018). “BrlR from *Pseudomonas aeruginosa* is a receptor for both cyclic di-GMP and pyocyanin”. *Nature Communications* 9.1, p. 2563. DOI : 10.1038/s41467-018-05004-y.
- WANG, Tingting et al. (2021). “An atlas of the binding specificities of transcription factors in *Pseudomonas aeruginosa* directs prediction of novel regulators in virulence”. *eLife* 10, e61885. DOI : 10.7554/eLife.61885.

- WATERS, Christopher M. et al. (2005). "QUORUM SENSING : Cell-to-Cell Communication in Bacteria". *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21.1, p. 319-346. DOI : 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.
- WATERS, Lauren S. et al. (2009). "Regulatory RNAs in Bacteria". *Cell* 136.4, p. 615-628. DOI : 10.1016/j.cell.2009.01.043.
- WHITCHURCH, Cynthia B. et al. (2002). "Phosphorylation of the *Pseudomonas aeruginosa* Response Regulator AlgR Is Essential for Type IV Fimbria-Mediated Twitching Motility". *Journal of Bacteriology* 184.16, p. 4544-4554. DOI : 10.1128/JB.184.16.4544-4554.2002.
- WIESMANN, Christina L. et al. (2023). "The ColR/S two-component system is a conserved determinant of host association across *Pseudomonas* species". *The ISME Journal* 17.2, p. 286-296. DOI : 10.1038/s41396-022-01343-3.
- WINSOR, Geoffrey L. et al. (2016). "Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database". *Nucleic Acids Research* 44.D1, p. D646-D653. DOI : 10.1093/nar/gkv1227.
- WOLTER, Daniel J. et al. (2008). "Emergence of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Patient with Cystic Fibrosis in the Absence of Carbapenem Therapy". *Clinical Infectious Diseases* 46.12, e137-e141. DOI : 10.1086/588484.
- XIE, Yingpeng et al. (2022). "An atlas of bacterial two-component systems reveals function and plasticity in signal transduction". *Cell Reports* 41.3, p. 111502. DOI : 10.1016/j.celrep.2022.111502.
- YAMAMOTO, Kaneyoshi et al. (2005). "Functional Characterization in Vitro of All Two-component Signal Transduction Systems from *Escherichia coli*". *Journal of Biological Chemistry* 280.2, p. 1448-1456. DOI : 10.1074/jbc.M410104200.
- YAO, Xiangyu et al. (2011). "Functional Characterization of Seven γ -Glutamylpolyamine Synthetase Genes and the *bauRABCD* Locus for Polyamine and β -Alanine Utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1". *Journal of Bacteriology* 193.15, p. 3923-3930. DOI : 10.1128/JB.05105-11.
- YU, Liang et al. (2022). "A novel copper-sensing two-component system for inducing Dsb gene expression in bacteria". *Science Bulletin* 67.2, p. 198-212. DOI : 10.1016/j.scib.2021.03.003.
- ZHANG, Qihong et al. (2020). "Identification of genes regulated by the two-component system response regulator NarP of *Actinobacillus pleuropneumoniae* via DNA-affinity-purified sequencing". *Microbiological Research* 230, p. 126343. DOI : 10.1016/j.micres.2019.126343.
- ZHANG, Yang et al. (2022). "Genome-Wide Analysis Reveals that PhoP Regulates Pathogenicity in *Riemerella anatipestifer*". *Microbiology Spectrum* 10.5, e01883-22. DOI : 10.1128/spectrum.01883-22.
- ZHANG, Yong et al. (2008). "Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS)". *Genome Biology* 9.9, R137. DOI : 10.1186/gb-2008-9-9-r137.
- ZORAGHI, Roya et al. (2004). "Properties and Functions of GAF Domains in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Other Proteins". *Molecular Pharmacology* 65.2, p. 267-278. DOI : 10.1124/mol.65.2.267.

RÉSUMÉ

Explorations ciblées des systèmes de régulation à deux composants Agt, Roc et Cus de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste humain responsable notamment d'infections nosocomiales. Cette bactérie est capable de s'adapter à large éventail de conditions environnementales en partie grâce à un réseau de régulation génétique particulièrement élaboré. Parmi les acteurs de ce réseau, les systèmes de régulation à deux composants (TCS) jouent un rôle clé dans l'adaptation de la physiologie cellulaire aux signaux extérieurs. Ces systèmes consistent typiquement en l'association de deux protéines communiquant par transfert de phosphate : une histidine kinase (HK) et un régulateur de réponse (RR). La HK joue le rôle de senseur membranaire et active un RR partenaire qui est généralement un facteur de transcription capable de se fixer à l'ADN pour modifier la transcription des gènes. Récemment, l'ensemble des sites de fixation des RRs contenant un domaine de liaison à l'ADN de *P. aeruginosa* ont été déterminés par la méthode de DAP-seq (DNA affinity purification and sequencing). Ce travail de thèse s'appuie sur l'analyse de ces données qui a permis de sélectionner trois RRs afin de mener des études ciblées : AgtR, PA4080 et CusR. Les travaux menés sur AgtR suggèrent que ce RR pourrait être impliqué dans la formation de biofilm mais ont échoué à identifier de nouvelles cibles pour ce système. L'étude de PA4080 a permis de l'identifier comme étant le RR manquant du système Roc impliqué dans l'activation de l'opéron *cupB*. L'analyse par génomique comparative de ce système dans les différentes lignées de *P. aeruginosa* a mis en évidence la diversité de ce réseau. L'étude de CusR, un RR acquis par transfert horizontal de gène dans certaines souches, a révélé son implication dans l'homéostasie du cuivre en démontrant l'intégration de ce système et de son régulon dans le réseau de régulation endogène.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, systèmes de régulation à deux composants, régulation

Targeted explorations of the two-component regulatory systems Agt, Roc et Cus of *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen responsible in particular for nosocomial infections. This bacterium is able to adapt to a wide range of environmental conditions partly thanks to a particularly elaborate genetic regulatory network. Among the actors of this network, two-component regulatory systems (TCS) play a key role in adapting cellular physiology to external signals. These systems typically consist of the association of two proteins communicating by phosphate transfer : a histidine kinase (HK) and a response regulator (RR). The HK acts as a membrane sensor and activates a partner RR, which is generally a transcription factor able to bind DNA to modify gene transcription. Recently, all the binding sites of RRs containing a DNA-binding domain in *P. aeruginosa* were determined using the DAP-seq (DNA affinity purification and sequencing) method. This PhD work is based on the analysis of these data, which allowed three RRs to be selected for targeted studies : AgtR, PA4080 and CusR. Work on AgtR suggested that this RR might be involved in biofilm formation but failed to identify new targets for this system. The study of PA4080 identified it as the missing RR in the Roc system involved in activation of the *cupB* operon. Comparative genomic analysis of this system in different *P. aeruginosa* lineages highlighted the diversity of this network. The study of CusR, a RR acquired by horizontal gene transfer in certain strains, revealed its involvement in copper homeostasis by demonstrating the integration of this system and its regulon into the endogenous regulatory network.

Key words : *Pseudomonas aeruginosa*, two-component regulatory systems, regulation