

Caractérisation de l'hétérogénéité bactérienne chez la bactérie pathogène d'insectes Photorhabdus - rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens

Annabelle Mouammine

► To cite this version:

Annabelle Mouammine. Caractérisation de l'hétérogénéité bactérienne chez la bactérie pathogène d'insectes Photorhabdus - rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens. Biodiversité et Ecologie. Université de Montpellier, 2014. Français. NNT: . tel-02794739

HAL Id: tel-02794739 https://hal.inrae.fr/tel-02794739

Submitted on 5 Jun2020

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.





Délivré par UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE Et de l'unité de recherche UMR 1333 DGIMI

Spécialité : Microbiologie-Parasitologie

Présentée par Annabelle MOUAMMINE

Caractérisation de l'hétérogénéité bactérienne chez la bactérie pathogène d'insectes *Photorhabdus* - Rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens.

Soutenue le 25/11/2014 devant le jury composé de

M. G. CONDEMINE, Directeur de recherche CNRS, Lyon 1	Rapporteur
Mme S. DERZELLE, Chargé de recherche, ANSES	Rapporteur
Mme A. BLANC-POTARD, Chargé de recherche CNRS, Montpellier 2	Examinateur
M. M. SICARD, Professeur, Université Montpellier 2	Examinateur
Mme D. DESTOUMIEUX, Chargé de recherche CNRS, Montpellier	Examinateur
M. A. GIVAUDAN. Directeur de recherche INRA. Montpellier 2 Dire	(invitée) ecteur de thèse







Délivré par UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE Et de l'unité de recherche UMR 1333 DGIMI

Spécialité : Microbiologie-Parasitologie

Présentée par Annabelle MOUAMMINE

Caractérisation de l'hétérogénéité bactérienne chez la bactérie pathogène d'insectes *Photorhabdus* - Rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens.

Soutenue le 25/11/2014 devant le jury composé de

M. G. CONDEMINE, Directeur de recherche CNRS, Lyon 1	Rapporteur
Mme S. DERZELLE, Chargé de recherche, ANSES	Rapporteur
Mme A. BLANC-POTARD, Chargé de recherche CNRS, Montpellier 2	Examinateur
M. M. SICARD, Professeur, Université Montpellier 2	Examinateur
Mme D. DESTOUMIEUX, Chargé de recherche CNRS, Montpellier	Examinateur
M. A. GIVAUDAN. Directeur de recherche INRA. Montpellier 2 Dire	(invitée) ecteur de thèse



- Remerciements -

En cette fin de thèse je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour me faire l'honneur de juger ce travail.

Je souhaite également remercier l'INRA et le département SPE pour avoir financé une partie de ma thèse.

Je tiens également à remercier Alain GIVAUDAN qui aura été un directeur de thèse à l'écoute et rassurant. Tu as toujours été de bon conseil, disponible et ouvert à de nouvelles théories même farfelues ! Merci pour ces réunions atypiques plus souvent à côté de l'imprimante ou en salle de biologie moléculaire qu'en salle de réunion. Tu as toujours été prêt à répondre à la moindre de mes interrogations et je t'en remercie. J'ai beaucoup appris avec toi (y compris des expressions jurassiennes) encore merci de m'avoir consacré autant de temps.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réussite de ce projet. La première personne qui me vient à l'esprit c'est toi Anne LANOIS, tu as été là au début pour me former, au milieu pour me guider dans les manips et à la fin pour corriger les erreurs. Merci pour ta gentillesse, ta patience et ton sourire sans faille et surtout merci pour toutes ces heures passées en cytométrie parfois jusque tard le soir. Tu as toujours répondue présente et je t'en remercie.

Merci également à toi Sophie GAUDRIAULT, merci pour ces moments à discuter parfois de sciences et parfois d'autres choses. Tu t'es toujours tenue au courant de mon sujet et ton œil externe nous a permis d'avancer. Et comment ne pas te remercier pour la première publication ! Sans toi elle ne serait pas là.

Tu es arrivé plus tard dans ce bateau mais merci Julien BRILLARD. Tu as toujours été disponible pour discuter des résultats et apporter une autre vision sur les deux composantes et sur les méthylations. Je te souhaite bon courage pour la reprise de ce sujet il est parfois fatiguant mais passionnant ! Merci aussi pour tes corrections dans ce travail et, petite aparté, merci d'avoir sauvé mon poisson !

Je tiens aussi à remercier les enseignants de BIBIINE, Jean-Luc AYMERIC, Robert ZUMBIHL, Olivier THALER et surtout toi Marie-Hélène BOYER-LAVERGNE pour m'avoir permis d'enseigner et m'avoir beaucoup appris sur la bactériologie. Tu m'as fait confiance et je t'en remercie.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé dans les manips quand j'avais une question, quand j'avais un souci de matériel, de centri... et tout ce qu'une thèse implique de problèmes ! Merci à Bernard DUVIC, Christine LAROUI (merci pour les TPs), Sylvie PAGES, Jean-Claude OGIER (le danseur de Salsa !), Nadège GINIBRE, Pierre-Alain GIRARD, Wendy LEVRAT, Jean-Michel ESCOUBAS, Patrick TAILLEZ et tout le personnel de l'insectarium sans qui on ne travaillerait pas Gaétan CLABOT et Clotilde GIBARD.

Enfin, même si l'on est séparé par un étage je tiens à remercier toutes les équipes du « 4^{ème} », avec un merci tout spécial à Pascaline, Tristan, Cécilia, Fanny toujours dispo pour discuter, et Marion pour avoir été une co-organisatrice de congrès de choc !

En parlant de congrès merci à tous les thésards qui ont accepté de nous rejoindre Gaëlle et moi dans l'organisation des 5^{èmes} journées des Doctorants SPE. On n'y serait pas arrivé sans vous Ashraf, Marion, Nadine, Martin et Gaëlle, merci.

Un grand merci à tous ceux qui ont été de passage dans la salle stagiaire au cours de ces trois années, comme du vin il y a eu différents crus d'étudiants ! En cette fin de thèse je me rappelle surtout les millésimes Sylvain, Chutima, Alicia, Alban, Jérémie, Cristelle, Safia et les deux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, Emma et Sophia. Merci à chacun d'entre vous pour avoir amené bonne humeur et joie de vivre dans cette pièce. Et surtout merci à toi Gaëlle pour avoir été ma compagne de thèse durant ces trois années, pour avoir partagé les bons moments et les moments de doute et surtout les apéros avec nos compères Magali EYCHENNE et Marie FRAYSSINET. Merci à vous deux pour avoir su m'aider à décompresser d'avoir été là à chaque fois que j'ai eu besoin de parler ! Vous avez été un soutien moral (et sportif !) sans faille un grand merci à toutes les deux votre bonne humeur me manquera.

Enfin comment ne pas remercier toutes les personnes de l'ombre. Merci à tous mes amis les anciens du lycée toujours présents pour faire la fête même 10 ans après, et les moins anciens Gaëlle, Christian, Murielle, Claire, Mathilde, Anna, Sandra, Julianne et tous les autres Christian, Stan, PJ, Gaétan et tous ceux que je m'excuse par avance d'oublier ! Merci pour toutes ces soirées.

Merci à toi Afitz pour ton soutient sans faille dans les bons et les mauvais moments tu as été un pilier sur lequel j'ai pu m'appuyer chaque jour de cette thèse. MERCI.

Enfin merci à toute ma famille, mes parents, sans vous je ne serais pas qui je suis alors merci, mon gémeaux, Pierre-Yves, mon compère mon ami et mon frère, merci pour ces vacances inoubliables « I'm on top of the world hey ! » et la vieille Myriam toujours présente même à 7 heures du matin merci pour ton humour (après minuit), quelle chance d'avoir une sœur comme toi ! Vous avez toujours eu les mots justes MERCI. Enfin, merci à toi Seb pour avoir été présent, gentil et pour m'accueillir tous les ans !! Je ne te le dis pas assez souvent alors MERCI.

J'espère n'avoir oublié personne en cette heure du bilan, si c'est le cas je tiens à vous présenter mes sincères excuses. Encore une fois, à tous, MERCI pour cette magnifique aventure.

« La créativité est contagieuse, transmettez-la » -Albert Einstein-

A tous ceux que j'aime

Sommaire

Chapitre I : Introduction/introduction du sujet	1
Introduction générale	2
I- Les systèmes à deux composantes	3
A-Les histidines kinases	4
B-Les régulateurs transcriptionnels	5
La famille OmpR	6
La famille NarL	6
La famille NtrC	7
Conclusion	7
II-Le TCS PhoPQ	8
A-Les inducteurs du système	8
Le cas des cations divalents : L'exemple du Magnésium	9
Le pH acide	9
Le cas des concentrations sub-optimales en PAMs	. 10
Les mutants indépendants de l'environnement	. 11
B-La régulation de PhoPQ	. 12
Régulation temporelle et boucle de rétroaction positive	. 12
La régulation post transcriptionnelle/traductionnelle de PhoP	. 13
C-Le régulon PhoPQ	. 14
Les gènes PhoP-dépendants à activation directe : architecture et régions promotrices	. 14
Les gènes PhoP-dépendants à activation indirecte : les connecteurs du système	. 16
(i) Modèle « Boolean AND gate »	. 16
(ii) Modèle « Boolean OR gate »	. 16
(iii) Le cas de SlyA	. 17

(iv) Le cas de PmrD/PmrAB	17
III-Les peptides antimicrobiens	18
A-Rôle et caractérisation des PAMs	19
Les PAMs à motif hélice alpha	19
Les PAMs à motifs alpha-bêta stabilisés par une composition riche en cystéines	19
Les PAMs dans lesquels la proline et/ou la glycine sont surreprésentés	20
B-Mode d'action des CAMPs	20
C-La résistance aux CAMPs	21
La dégradation extracellulaire des CAMPs	21
Le piégeage extracellulaire des CAMPs	22
Les pompes à efflux	23
Les modifications du LPS	25
(i) Modification post-traductionnelle du LPS	25
(ii) L'acylation	26
(iii) La déacylation du lipide A	27
Autres mécanismes de résistance	27
IV-L'hétérogénéité bactérienne : variation de phase et bistabilité	28
A-La variation de phase génétique	29
B-Variation de phase épigénétique : la bistabilité	31
Les boucles de rétroaction positives	32
Les doubles boucles de rétroaction négatives	33
Variation de phase, switch et méthylation	33
La stratégie Bet-Hedging : le cas des persistantes	34
V-Le modèle d'étude <i>P. luminescens</i>	36
A-Le cycle parasitaire	37
B-La symbiose bactérie-nématode	38

Rôle de Photorhabdus dans la croissance et le développement du némato	de
	38
Transmission de Photorhabdus à de nouveaux IJs	39
C-L'interaction pathogène bactérie-insecte	40
Objectifs de la thèse/introduction du sujet	42
Chapitre II : Analyse des sous populations	45
I- Introduction	46
II- Matériel et Méthode	47
III- Résultats et discussion	49
Mise en évidence de la sous population résistante	49
Persistance ou résistance ?	50
L'hétérogénéité phénotypique de la résistance chez Photorhabdus	50
L'hétérogénéité phénotypique de la résistance chez Xenorhabdus	51
Conclusion	52
Chapitre III : Le régulon PhoP	53
I- Introduction	54
II- Matériels et Méthodes	55
III- Résultats et discussion	56
Conservation des protéines PhoP-PhoQ	56
Caractérisation des gènes marqueurs appartenant au régulon PhoP	57
Les inducteurs du système PhoPQ chez Photorhabdus	59
Un exemple de régulation PhoP-dépendant : le cas de <i>ail1</i> PI (Article 1)	59
Article 1	60
Conclusion	61
Chapitre IV : Rôle de PhoP dans l'hétérogénéité de la population	62
I- Introduction	63
II- Matériel et Méthode	63
III- Résultats	67
Article 2	68
IV- Données complémentaires sous forme de résultats-discussion	69

A-Introduction	9
B-Recherche du mécanisme responsable de l'hétérogénéité69	9
L'hypothèse autour de la boucle de rétroaction positive de PhoP	9
L'hypothèse d'une déficience traductionnelle	0
L'hypothèse d'une déficience post-traductionnelle	0
L'émergence de la sous-population résistante nécessite la présence du site de Phosphorylation sur PhoP71	1
PhoQ responsable de l'hétérogénéité ?72	2
Hypothèse vraisemblable : un problème en cis dans la région en amont de <i>pbgPE</i> 72	2
L'hypothèse génétique de mutation ou variation de phase	3
L'hypothèse de la méthylation du promoteur <i>pbgPE</i>	4
Caractérisation de la région promotrice de <i>pbgPE</i>	6
Conclusion/perspectives	7
Références	1
Annexes	

Liste des figures et tableaux non intégrés aux articles.

<u>Tableaux</u>

Tableau 1 : Evaluation de la concentration minimale inhibitrice de plusieurs CAMPs sur la souche sauvage et deux mutants avirulents de *P. luminescens*Tableau 2: Hétérogénéité des populations au sein du genre *Xenorhabdus*

Figures

Figure 1 : Les différentes classes d'histidines kinases

Figure 2 : Les différentes classes de régulateurs transcriptionnels

Figure 3 : Les différents inducteurs du régulon PhoP décrits

Figure 4 : L'activation de PhoQ par les CAMPs et la compétition avec les cations divalents

Figure 5 : Séquence des régions promotrice de *phoP* chez 3 entérobactéries modèles

Figure 6 : Représentation schématique de la régulation post transcriptionnelle et post traductionnelle du régulon PhoPQ

Figure 7 : Un exemple de régulation de gènes PhoP-dépendant de manière indirecte : Les modèles « boolean AND/OR gate »

Figure 8 : Le connecteur PmrD et son rôle central dans la transmission du signal

Figure 9 : L'immunité chez les insectes

Figure 10 : Les PAMs d'insectes

Figure 11 : Les différents modes d'action des CAMPs

Figure 12 : Le système AcrAB/TolC

Figure 13 : Les différentes modifications du LPS et leur régulateur

Figure 14 : Les différents modes de résistance aux CAMPs développés par les bactéries

Figure 15 : Les différents mécanismes à l'origine de l'hétérogénéité des populations bactériennes

Figure 16 : Le modèle ON-OFF des gènes pap

Figure 17 : Phylogénie des différentes espèces de Photorhabdus

Figure 18 : Cycle biologique de Photorhabdus

Figure 19 : Présence de deux sous-populations chez la souche sauvage TT01

Figure 20: Hétérogénéité des populations au sein du genre Photorhabdus

Figure 21 : Alignement des protéines PhoP de plusieurs entérobactéries des genres *Salmonella* (Typhimurium, *indica*), *Yersinia* (*pestis*, *enterocolitica*), *Erwinia* et *Photorhabdus*

Figure 22 : Alignement des protéines PhoQ de plusieurs entérobactéries des genres Salmonella Typhimurium, Yersinia (pestis, enterocolitica, enterocolitica subsp paleartica), Erwinia et Photorhabdus

Figure 23 : Identification des gènes PhoP-dépendants par RT-qPCR

Figure 24 : Recherche d'inducteurs du régulon PhoPQ

Figure 25 : Schéma des différentes hypothèses pouvant expliquer l'hétérogénéité de la population chez TT01

Figure 26: La transcription de *phoP* n'est pas responsable de l'apparition de la souspopulation résistante

Figure 27. La protéine PhoP est détectée dans toutes les cellules de P. luminescens TT01

Figure 28 : Rôle de la phosphorylation dans la sous-population résistante

Figure 29 : PhoQ est-il responsable de l'hétérogénéité ?

Figure 30 : *ail1*_{Pl} est transcrit dans toutes les cellules de TT01

Figure 31 : Spotting des souches TT01et *phoP* complémentée par les constructions pBB-Pail l_{Pl} -pbgPE en condition avec ou sans polymyxine B

Figure 32 : Identification des sites de méthylation sur la région promotrice de *pbgPE*

Figure 33 : Evaluation de l'impact des Dam et Dcm méthylases par système d'étude hétérologue chez *E. coli*.

Figure 34 : Evaluation de l'impact des Dam méthylases par un système hétérologue chez E. coli Figure 35 : Evaluation de l'impact des Dcm méthylases par un système hétérologue chez *E. coli*

Figure 36 : Le site GATC de *pbgPE* est méthylé

Figure 37 : Le site CCAGG de *pbgP* est méthylé

- **Figure 38** : Identification des sites d'initiation de la transcription pour les gènes $ail1_{Pl}$, pbgP
- Figure 39 : Schéma bilan de la thèse

Chapitre I : Introduction générale/introduction du sujet

Introduction générale

Les bactéries sont des êtres unicellulaires procaryotes présents dans tous les types d'environnement (arctique, tropicaux, désertiques...) sur terre et dans les mers. Les bactéries sont soumises aux variations environnementales du milieu dans lequel elles vivent (absence de nutriment, changement de température, d'osmolarité...). Les bactéries ont donc besoin de percevoir et de s'adapter à leur environnement. Pour cela, elles utilisent notamment un système de transduction du signal à travers les membranes en fonction des stimuli perçus dans l'environnement : il s'agit des systèmes à deux composantes (TCS). Ils désignaient il y a plus de vingt ans une nouvelle classe de régulateurs trouvés chez les bactéries. Les TCS sont le système d'adaptation le plus répandu chez les bactéries Gram positives et Gram négatives quelque soit leur niche écologique. On en retrouve plus d'une centaine chez les eubactéries, les archébactéries et seulement quelques uns chez les eucaryotes (A. M. Stock, Robinson, et Goudreau 2000). Les TCS permettent aux bactéries de modifier l'expression de leurs gènes en fonction des stimuli extérieurs comme l'azote, le changement de pH, d'osmolarité, de température, limitation en phosphate et nutriments chemo-attraction et répulsion, etc (Gross, Aricò, et Rappuoli 1989). Le processus d'adaptation médié par les TCS entrainera un changement physiologique chez la bactérie comme la sporulation, la compétence, l'utilisation de métabolites, la pathogénèse etc (Parkinson 1993).

Le TCS est composé de deux partenaires, une histidine kinase (HK) capable de sentir l'environnement et de relayer le signal jusqu'à son régulateur transcriptionnel (RR) qui va réguler l'expression des gènes cibles et médier la réponse cellulaire. Chez *E. coli* par exemple, on ne compte pas moins de 30 HK et 32 RR (Mizuno 1997), 36 HK et 34 RR chez *B. subtilis* (Fabret, Feher, et Hoch 1999) et chez *Synechocystis sp,* ils représentent 2.5% du génome (Mizuno, Kaneko, et Tabata 1996). On en dénombre beaucoup moins chez les eucaryotes avec 1 chez *S. cerevisiae* (Francesc Posas *et al.* 1996) (Maeda, Wurgler-Murphy, et Saito 1994) et 2 chez *C. albicans* (Nagahashi *et al.* 1998) impliqués dans l'osmorégulation et le développement des hyphes. Enfin on trouve également des TCS dans les plantes avec un rôle dans la maturation des fruits dépendant de l'éthylène (Chang *et al.* 1993).



Figure 1 : Les différentes classes d'histidines kinases. A : représentation schématique des différents domaines kinases en fonction de leur classe. B : l'exemple d'AcrAB chez *E. coli* qui présente une histidine kinase hybride (Mizuno 1997 ; Stock, Robinson, et Goudreau 2000)

A- Les Histidines kinases (HK)

Bien que les HK soient catalytiquement proches des Ser/thr/tyr kinases, elles diffèrent par leur type de chimie produisant respectivement des phosphoramidates et des phosphoesters (Stock, Robinson, et Goudreau 2000), de même les HK sont majoritairement retrouvées chez les bactéries alors que les Ser/Thr/Tyr sont majoritairement chez les organismes eucaryotes (Stock, Robinson, et Goudreau 2000) bien que ces distributions ne soient pas exclusives. Pour le reste de cette étude, nous allons nous intéresser aux HK présentes chez les bactéries.

La super-famille des HK est caractérisée par des séquences conservées d'environ 200 acides aminés mais leur taille globale varie de 40 kDa à plus de 200 kDa. Le domaine histidine kinase est entouré de séquences non conservées dans une même famille permettant ainsi des régulations spécifiques. Lorsque l'HK perçoit un signal ou «input», via son domaine senseur, elle subit une autophosphorylation dépendante de l'ATP sur une histidine conservée dans le « core » de la kinase (Parkinson et Kofoid 1992). Cette autophosphorylation va permettre au monomère de phosphoryler l'histidine conservée du deuxième monomère rendant l'hétérodimère actif et capable de transférer son phosphate sur son régulateur transcriptionnel (RR) ((Surette *et al.* 1996, Pan *et al.* 1993), (Y. Yang, Park, et Inouye 1993), (Wolfe et Stewart 1993), (Ninfa *et al.* 1993), (Swanson, Bourret, et Simon 1993)). Dans certains cas, les HK peuvent être bifonctionnelles et avoir une fonction phosphatase lorsque la voie qu'elles régulent nécessite d'être éteinte rapidement (CheA, DegS, NtrB) (MacFarlane et Merrick 1985 ; Henner, Yang, et Ferrari 1988 ; Mutoh et Simon 1986).

Les HK peuvent-être retrouvées sous 2 formes : les HK orthodoxes et les hybrides (figure1).

Les HK orthodoxes sont des récepteurs de la membrane périplasmique et sont elles-même classées en différentes familles, dont EnvZ qui représente le type de HK orthodoxe le plus commun. EnvZ est composée de deux régions transmembranaires, d'un domaine périplasmique N-terminal qui va sentir les variations de l'environnement et d'un domaine cytoplasmique C-terminal correspondant au domaine catalytique (ou core de la kinase). Cependant, d'autres types de topologies peuvent être trouvés : FixL (contrôle la fixation de l'azote) possède 4 domaines transmembranaires et UhpB (fait partie du système de transport du sucre) en possède 8 (Lois, Ditta, et Helinski 1993 ; Island, Wei, et Kadner 1992). De la même façon certaines HK cytoplasmiques, comme CheA et NtrB, régulent la transduction du signal via d'autres interactions avec des protéines membranaires (Stock *et al.* 1988 ; MacFarlane et Merrick 1985 ; Buelow et Raivio 2010).

Les HK hybrides sont principalement présentes chez les eucaryotes, mais on en trouve aussi chez les procaryotes. Elles contiennent plusieurs sites donneurs et accepteurs de phosphates. Chez *E. coli*, AcrB est un exemple d'HK hybride (figure 1). AcrB est impliqué dans le contrôle redox en anoxie et



Figure 2 : Les différentes classes de régulateurs transcriptionnels. En plus des trois familles de RR principales, d'autres types de RR sont retrouvés. Tous les RR possèdent un domaine de liaison à l'ADN (output domaine) à l'exception de CheY qui ne possède qu'un domaine receveur. (Mizuno 1997)

possède des régions transmembranaires en N-terminal, suivi du core de la kinase, d'un domaine semblable aux domaines régulateurs des RR et enfin, une deuxième région, contenant une histidine, appelée domaine de phosphotransfert (HPt). De la même façon, TodS (*Pseudomonas putida*) impliqué dans les voies de dégradation du toluène possède deux cores kinases dupliqués contenant chacun tous les motifs conservés (Lau *et al.* 1997).

Maintenir une bonne transmission du signal est essentiel à la survie et à l'adaptation de la bactérie. Les similarités de séquences et de structures entres les HK et les RR augmenteraient donc le risque de «cross-talk», c'est à dire l'activation d'un RR par une HK appartenant à un autre TCS. Cependant, peu de «cross-talk» ont été décrits malgré la présence de dizaines de TCS dans les bactéries ce qui dénote une forte spécificité entre l'HK et le RR (Podgornaia et Laub 2013).

B- Les Régulateurs transcriptionnels (RR)

Les RR (pour régulateurs de réponse) sont les partenaires des HK pour la transduction du signal. Chez les procaryotes, ils se situent le plus souvent en fin de voie pour modifier la réponse adaptative. Ils catalysent le transfert du phosphate situé sur l'histidine conservée de l'HK ou encore provenant de donneurs de phosphates comme l'acétyl phosphate ou le phosphoramidate sur un résidu aspartate conservé (Lukat et al. 1992). Les RR se composent de deux domaines : un domaine régulateur en Nterminal conservé et un domaine effecteur variable en C-terminal qui est, dans la plupart des cas, un domaine de liaison à l'ADN (25 des 32 RR de E. coli) avec un rôle dans l'activation ou la répression des gènes cibles (Mizuno 1997) (figure 2). Dans le domaine régulateur des RR, on retrouve 3 aspartates et une lysine très conservés. Ce domaine constitue la «phospho-pocket» du RR de par son rôle dans les transferts de phosphates. Les RR sont trouvés sous deux formes en équilibre dans les cellules : un état activé et un état inactivé, ces deux états confèrent aux RR deux aspects moléculaires différents permettant ainsi de changer les interactions protéines-protéines et protéines-ADN. Dans la plupart des cas, la phosphorylation du RR entraîne une oligomérisation du RR (dimérisation et plus) responsable du switch vers la forme active (Fiedler et Weiss 1995 ; McCleary 1996 ; Weiss, Claverie-Martin, et Magasanik 1992 ; Wyman et al. 1997 ; Webber et Kadner 1997). Ce cas est considéré comme le plus courant, cependant il existe quelques exceptions comme le RR SSK1 impliqué dans la régulation de l'osmorégulation chez les levures dont la forme phosphorylée est la forme inactive (Posas et Saito 1998). Il a été démontré qu'une phosphorylation des RR permettait un repositionnement des domaines N-terminaux et C-terminaux permettant une plus grande accessibilité à l'ADN (Djordjevic et al. 1998). Pour information, il est très difficile d'observer des RR dans leur conformation active car non seulement la demi-vie de l'acyl phosphate peut aller de

quelques secondes à plusieurs heures dans les conditions naturelles mais de plus, il n'est pas rare que les RR possèdent une activité auto-phosphatase (Hess *et al.* 1988).

Les RR sont classés en 3 familles : OmpR, NarL et NtrC. Ils ont été classés ainsi en fonction de leur domaine de liaison à l'ADN (Hakenbeck et Stock 1996).

La famille OmpR

Il s'agit de la plus grande famille de RR qui peut activer ou réprimer l'expression de gènes cibles, *ompC* et *ompF* codant pour des porines de membrane externe. OmpR interagit principalement avec la sous unité alpha de l'ARN polymérase pour transcrire ses gènes cibles (Garrett et Silhavy 1987; Matsuyama et Mizushima 1987). Cependant, ce n'est pas une généralité puisque dans cette famille PhoB interagira plutôt avec sigma 70 (Makino *et al.* 1993; Kumar *et al.* 1994). OmpR est caractérisé par la présence d'une hélice qui interagit avec le grand sillon de l'ADN, entourée de deux boucles (« wings ») interagissant avec le petit sillon de l'ADN. Chez *E. coli*, OmpR est phosphorylé par l'HK EnvZ et régule l'osmolarité de la bactérie. Lorsque OmpR est phosphorylé (et donc actif), il va avoir un rôle activateur sur *ompC* et un double rôle, activateur et répresseur sur *ompF*. La quantité d'OmpC augmente proportionnellement avec l'augmentation de l'osmolarité. En revanche OmpF sera traduit en condition de faible osmolarité et réprimé en haute osmolarité (Russo et Silhavy 1991). D'autres RR sont retrouvés dans cette famille : CutR (*S. lividans*), VirG (*A. tumefasciens*), PhoP (*E. coli, Salmonella* sp).

La famille NarL

NarL est un facteur de transcription pouvant activer ou réprimer les gènes impliqués dans le métabolisme du nitrate et du nitrite. Son mode de fonctionnement est proche de la famille OmpR avec une fixation sur le facteur sigma 70 (Galinier *et al.* 1994). NarL peut être activé par deux protéines membranaires NarX et NarQ chacune pouvant sentir indépendamment de l'autre la disponibilité en nitrate dans le milieu et transférer cette information à NarL (Schröder *et al.* 1994). De même, les gènes cibles de NarL peuvent aussi être régulés par le facteur de transcription Fnr (Tyson *et al.* 1993 ; Stewart 1993). Le domaine de liaison à l'ADN de NarL est caractérisé par quatre hélices avec un motif hélice-tour-hélice permettant la reconnaissance des gènes cibles et la liaison à l'ADN (Baikalov *et al.* 1996). On trouve aussi dans cette famille d'autres régulateurs comme FixJ (*R. meliloti*) avec un rôle dans régulation du métabolisme de l'azote (David *et al.* 1988), DegU (*B. subtilis*) avec un rôle dans la sporulation et la synthèse d'enzymes de dégradation entre autre (Msadek *et al.* 1990).

La famille NtrC

NtrC est impliqué dans la régulation de l'azote et agit sur l'ADN en se fixant sur la sous unité sigma 54 de l'ARN polymérase ((Kustu *et al.* 1989). La caractéristique de ce régulateur est qu'il possède trois domaines. Un domaine N-terminal, un domaine C-terminal (hélice-tour-hélice pour la fixation sur l'ADN) et un domaine ATPase, activé par phosphorylation, lors du transfert d'un phosphate provenant du domaine N-terminal ((Kustu, North, et Weiss 1991), (Morett et Segovia 1993), (Osuna, Soberon, et Morett 1997)). NtrC peut fixer l'ADN sous forme dimérisée ou octamérisée dans l'état phosphorylé. Cette octamérisation du RR stimule l'hydrolyse de l'ATP libérant ainsi de l'énergie pour ouvrir le complexe et activer la transcription ((V. Weiss, Claverie-Martin, et Magasanik 1992), (Wyman *et al.* 1997), (D. S. Weiss *et al.* 1991), (Austin et Dixon 1992), (Wedel et Kustu 1995).

Conclusion

Les TCS sont donc essentiels à la survie et au métabolisme des bactéries d'où leur nécessité d'être finement régulés. Ils dépendent de leur environnement et des stimuli perçus, or dans de nombreux cas, le stimulus spécifique et le mécanisme expliquant comment l'HK le perçoit sont inconnus. Il y a néanmoins quelques exceptions comme le TCS PhoP-PhoQ qui a été principalement décrit chez *Salmonella sp*.

PhoQ est une protéine kinase transmembranaire de 487 acides aminés qui possède un domaine extracellulaire capable de sentir son environnement et un domaine kinase intracellulaire qui lui permet d'interagir avec sa protéine cible PhoP. PhoQ est trouvé sous forme de dimère dans la membrane interne bactérienne et est composé de deux régions transmembranaires dont une en Nterminal créant ainsi deux domaines : un domaine senseur périplasmique et un domaine cytoplasmique contenant le site d'autophosphorylation (Histidine conservée) (Dalebroux et Miller 2014). La fonction de PhoQ dans la cellule est double : (i) il a un rôle de kinase pour s'autophosphoryler sur une histidine conservée (H277) et ensuite transférer ce phosphate sur un aspartate conservé (D52) de PhoP, et (ii) un rôle de phosphatase qui lui permet de déphosphoryler PhoP pour ramener le système à un niveau basal de fonctionnement (Sanowar, Martel, et Moual 2003). PhoP est une protéine régulatrice de 222 acides aminés assimilée à la classe des RR de OmpR et composée de deux domaines : un domaine accepteur de phosphate et un domaine de liaison à l'ADN (motif hélice-tour-hélice). PhoP peut réguler de façon positive ou négative environ 3% des gènes de la cellule chez Salmonella. Lors de cette thèse, nous avons étudié le TCS PhoP-PhoQ chez la bactérie P. luminescens afin d'essayer de mieux comprendre son fonctionnement, sa régulation et son rôle dans la virulence de la bactérie chez l'insecte.



Figure 3 : Les différents inducteurs du régulon PhoP décrits : certains sont actifs *in vivo* (pH acide, CAMPs), d'autres *in vitro* (Mg²⁺). Adapté de (Groisman 2001).

II- Le TCS PhoP-PhoQ

PhoP-PhoQ régule de nombreuses activités cellulaires dans de nombreuses espèces de bactéries Gram négatives. Bien que PhoP régule l'adaptation aux milieux carencés en Mg²⁺, il tire son nom « pho » du premier rôle identifié de ce locus chez *S*. Typhimurium dans la régulation d'une phosphatase acide non spécifique (Kier, Weppelman, et Ames 1979). De même, PhoP ne doit pas être confondu avec deux autres TCS, PhoB-PhoR et PhoP-PhoR, impliqués dans la régulation de l'adaptation aux milieux carencés en phosphate chez *E. coli* et *B. subtilis* respectivement (Wanner 1995 ; Hulett 1996). C'est dans la fin des années 1980 que PhoP-PhoQ a été pour la première fois décrit comme ayant un rôle dans la virulence chez *Salmonella sp.*, depuis il a été démontré que PhoP régule également la virulence chez d'autres bactéries Gram négatives comme *Yersinia sp* (Oyston *et al.* 2000), *Erwinia* (Flego *et al.* 2000), *Photorhabdus luminescens* (Derzelle *et al.* 2004), et *Dickeya dadantii* (Costechareyre *et al.* 2013)

Initialement décrit chez *Salmonella*, PhoP-PhoQ est un TCS composé d'un senseur membranaire avec un domaine périplasmique capable de sentir l'environnement et un domaine cytoplasmique catalytique. Comme évoqué précédemment, PhoQ a une double fonction: kinase et phosphatase. PhoQ est capable de sentir son environnement de s'autophosphoryler sur une histidine conservée puis de transférer son phosphate sur son régulateur transcriptionnel PhoP. PhoP phosphorylé a été décrit comme la forme active de PhoP chez *Salmonella* (Shin et Groisman 2005), et *E. coli* (Kato, Tanabe, et Utsumi 1999). PhoQ peut également spécifiquement déphosphoryler PhoP afin de réguler la transcription des gènes PhoP dépendant.

A- Les inducteurs du système

Plusieurs signaux sont capables de spécifiquement réguler le passage de PhoQ de sa forme kinase à sa forme phosphatase et inversement comme les cations divalents (Ca²⁺, Mn²⁺ et surtout Mg²⁺), le pH et les concentrations sub-optimales en peptides antimicrobiens (figure 3).

Le cas des cations divalents : l'exemple du Magnésium

Les cations divalents agissent généralement comme messagers secondaires ou co-facteurs. Par exemple, le Mg²⁺ est un stabilisateur de membranes et de ribosomes, et est essentiel pour les réactions nécessitant de l'ATP (Reinhart 1988). Or chez plusieurs bactéries, le Mg²⁺ a été trouvé comme étant le messager principal de la cascade de transduction du signal PhoP-PhoQ, *S*. Typhimurium (García Véscovi, Soncini, et Groisman 1996), *Yersinia* (Flamez *et al.* 2007), *Erwinia* (Llama-Palacios *et al.* 2003), par exemple. PhoP-PhoQ répond à la présence de plusieurs cations dans l'environnement comme le Mn²⁺, le Ca²⁺ et le Mg²⁺ (García Véscovi, Soncini, et Groisman 1996). Il a été démontré chez *Salmonella enterica* serovar Typhymurium que de faibles concentrations en Mg²⁺ (de l'ordre du micromolaire) permettaient la transcription de gènes activés par PhoP alors que de fortes concentrations en Mg²⁺ (de l'ordre du millimolaire), réprimaient l'expression des gènes activés par PhoP à un niveau comparable à celui retrouvé dans les mutants *phoP* ou *phoQ* (García Véscovi, Soncini, et Groisman 1996 ; Kato, Tanabe, et Utsumi 1999 ; Soncini *et al.* 1996).

Une hypothèse de la fixation du Mg^{2+} est que les cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) sont capables de se fixer sur des résidus acides du domaine périplasmique de PhoQ (Salmonella, E. coli (Waldburger et Sauer 1996)), leurs sites de fixation sont différents et n'interagissent pas l'un avec l'autre (Véscovi et al. 1997) impliquant que par exemple chez Salmonella, PhoQ ne réponde qu'aux cations divalents périplasmiques et non pas aux cations intracellulaires. Cependant, le Mg²⁺ n'est pas suffisant en soi et ne permet pas de se substituer à la phosphorylation, puisque la mutation du site de phosphorylation de PhoP D52 en valine (D52V) chez S. Typhimurium et une induction à bas Mg²⁺, ne permettent pas une fixation de PhoP sur ses sites PhoP dépendants dans les régions promotrices des gènes (Shin et Groisman 2005). Depuis quelques années, l'exemple du Mg²⁺ comme inducteur est remis en cause. En effet, il ne serait pas un inducteur naturel bien que fonctionnant in vitro. Des études chez S. Typhimurium ont montré que le Mg^{2+} n'était pas un inducteur des gènes de résistance et de survie dans les macrophages puisque l'acidification du macrophage entrainerait une augmentation de la concentration en cations divalents dans les macrophages (Alpuche et al. 1992, Christensen, Myers, et Swanson 2002). De même, la concentration en Mg²⁺ dans les macrophages serait de l'ordre du millimolaire au moment de l'expression des gènes PhoPQ dépendant ce qui va à l'encontre des précédentes études chez Salmonella (Bader et al. 2005).

<u>Le pH acide.</u>

L'induction de certains gènes PhoP-dépendant a été corrélée avec l'acidification des compartiments vacuolaires contenant du *Salmonella*. De là, est né l'hypothèse que le pH acide pouvait être un signal activateur détecté par PhoP. En effet, les mutants *phoP* et *phoQ* de *S*. Typhimurium présentent une


Figure 4 : L'activation de PhoQ par les CAMPs et la compétition avec les cations divalents. 1) les fortes concentrations en cations divalents stabilisent PhoQ dans sa conformation phosphatase. 2) Il y a une compétition entre les CAMPs et les cations divalents pour la fixation sur le domaine senseur de PhoQ. 3) les CAMPs agissent comme un levier pour déstructurer la protéine et la faire passer dans sa conformation kinase. (Bader *et al.* 2005)

hypersensibilité au pH acide (Bearson, Wilson, et Foster 1998). Cette résistance au pH a également été montrée chez d'autres bactéries comme étant médiée par PhoPQ : c'est le cas chez *E. coli* (Eguchi *et al.* 2011), *Erwinia* (Llama-Palacios *et al.* 2003) et *Yersinia* ((Flamez *et al.* 2007) entre autres.

Le cas des concentrations sub-optimales en PAMs.

Les mammifères possèdent deux types de moyens de défense contre l'infection par des pathogènes étrangers (bactéries, parasites, virus) : l'immunité innée et l'immunité acquise. Les insectes, par exemple, ne possèdent qu'une immunité innée en guise de protection. Un des composants important de l'immunité innée sont les peptides antimicrobiens cationiques qui ont été conservés dans l'évolution et sont retrouvés depuis les mammifères, jusque dans les plantes (Hancock et Diamond 2000, Ganz 2003), chez les insectes ils sont une ligne de défense importante pour résister à l'infection par les bactéries (Hoffmann et Reichhart 2002) (pour plus de détails voir III- introduction générale).

Les PAMs cationiques (ou CAMPs) les plus répandus sont de petites molécules amphipatiques basiques retrouvées dans toutes les branches du vivant (plantes, animaux, micro-organismes). Les peptides antimicrobiens cationiques chargés positivement se fixent sur la surface des bactéries (LPS) chargée négativement, et créent des pores dans la membrane entrainant une fuite du matériel cytoplasmique et donc la mort de la bactérie (Nguyen, Haney, et Vogel 2011). Les bactéries pathogènes ont développé différents mécanismes pour survivre à la présence de PAMs dans leur environnement. L'exemple le plus commun est la modification de la surface cellulaire dans lequel PhoPQ joue un rôle important en régulant différents types de modification du LPS : ajout d'un aminoarabinose sur le lipide A (*pbgPE*), palmitoylation du LPS (PagP), hydroxylation (LpxO), et déacylation du lipide A (PagL) (Guo *et al.* 1998 ; Trent *et al.* 2001 ; John S. Gunn *et al.* 2000).

Bader et ses collègues ont montré que des concentrations sub-optimales de CAMPs (1µg/ml de polymyxine B) sont capables de réguler positivement plus de 200 gènes chez *S*. Typhimurium par un facteur de 3,5 fois dont 16 gènes PhoP dépendants et de réguler négativement environ 150 gènes (Bader *et al.* 2003).

Seul PhoQ et son environnement lipidique sont nécessaires à la reconnaissance de PAMs pouvant appartenir à différentes classes (alpha hélices et feuillet beta (Tossi, Sandri, et Giangaspero 2000)) et le mécanisme par lequel PhoQ arrive à sentir les CAMPs a été décrit par Bader *et al* 2005) chez *S. Typhimurium* (figure 4). Il a été démontré que les CAMPs se fixaient directement sur le domaine périplasmique senseur de PhoQ afin de transmettre un signal d'activation « kinase » au domaine cytoplasmique (une délétion ou encore des mutations de ce domaine ne permettent plus de réponse aux CAMPs). Il a également été mis en évidence grâce à un système *in vitro* que les cations divalents

activateurs de PhoQ, comme le Mg²⁺, se fixaient sur les mêmes sites que les CAMPs suggérant une compétition entre cations divalents et CAMPs pour activer ou réprimer PhoQ. De même, les CAMPs comme le C18G ou la polymyxine B se fixent sur la surface acide du domaine senseur de PhoQ et cette fixation est dépendante de la concentration avec une saturation pour des concentrations en CAMPs de l'ordre du micromolaire. Le modèle qu'ils proposent permettant d'expliquer comment PhoQ est réprimé par les cations divalents et activé par les CAMPs est le suivant.

De par sa présence proche de la surface cellulaire chargée négativement, PhoQ est à une place de choix pour sentir les CAMPs, surtout qu'il a été montré que de nombreux CAMPs réalisaient des liaisons électrostatique avec les groupements phosphates (négatifs) du lipide A avant de s'insérer dans la membrane (Piers et Hancock 1994). L'hypothèse est donc que le même type d'interactions, qui permet le déplacement du magnésium des groupements phosphates du lipide A, est utilisé par les CAMPs pour déplacer les cations divalents de PhoQ. La liaison des CAMPs sur PhoQ va alors entrainer un changement de conformation du dimère de PhoQ qui va se propager à travers la membrane et avoir pour conséquence le passage de PhoQ de sa forme inactive (phosphatase) à sa forme active (kinase). En effet, alors que la liaison des cations divalents sur PhoQ assurait une certaine stabilité de la région senseur, la fixation des CAMPs, au contraire, va entrainer une distorsion de toute la protéine PhoQ. Les CAMPs se fixant sur le domaine senseur de PhoQ puis sur la membrane environnante vont agir comme un levier pour exposer la surface acide du domaine senseur provoquant la distorsion de la protéine et ainsi les cations divalents qui bloquaient PhoQ dans sa conformation inactive sont relargués. Bien que ce modèle soit valable pour S. Typhimurium, on ne peut pas forcement l'appliquer à d'autres modèles bactériens étant donné la plus faible conservation des domaines senseurs des différents PhoQ, contrairement au domaine kinase qui apparait plus conservé (nos travaux page 52-53). Cependant, il ouvre de nouvelles pistes pour trouver de nouveaux inducteurs de PhoQ chez d'autres modèles. C'est par exemple le cas chez P. aeruginosa, où un mutant du gène phoQ devient hyper résistant aux CAMPs, alors qu'un mutant du gène phoP est sensible aux CAMPs en haut Mg²⁺ et résistant en bas Mg²⁺ ce qui implique qu'en conditions haut Mg²⁺ un autre système intervient pour phosphoryler PhoP (Gooderham et Hancock 2009).

Les mutants indépendants de l'environnement

Chez *S.* Typhimurium deux types de mutants ont permis de s'affranchir partiellement ou complètement de la présence de signaux environnementaux pour activer l'expression des gènes PhoP-dépendants. D'une part, il y a l'allèle *phoQ* (*pho24* ou PhoP^c) qui code pour une protéine avec une seule substitution d'amino-acide dans le domaine périplasmique : T48I (Gunn, Hohmann, et



Figure 5 : Séquence des régions promotrice de *phoP* chez 3 entérobactéries modèles. En encadré sont représenté les sites -10 et -35 pour la fixation de l'ARN polymérase. Pi signifie promoteur inductible (Mg²⁺). Pc : promoteur constitutif permet d'avoir un niveau de base de transcription de phoP. SD : séquence shine dalgarno pour la traduction de l'ARNm en protéine. Les flèches représentent les PhoP box identifiées. (Derzelle *et al.* 2004)

Miller 1996). Bien que cet allèle réponde toujours au Mg²⁺ (García Véscovi, Soncini, et Groisman 1996), il est aussi atténué en virulence qu'un mutant *phoQ* (Miller et Mekalanos 1990) ce qui montre la nécessité d'une régulation fine des gènes PhoPQ dépendants. D'autre part il existe un allèle *phoP* désigné PhoP* avec une substitution d'un acide aminé en partie N-terminale. Cette substitution permet la transcription des gènes PhoP-dépendants indépendamment de la kinase PhoQ. En effet, PhoP* va s'autophosphoryler à partir de l'ACP *in vivo* (Chamnongpol et Groisman 2000).

La nécessité d'une régulation fine des gènes PhoP dépendant est une thématique récurrente dans l'étude du régulon PhoP. Par exemple, un contrôle temporel de l'expression de PhoP a été mis en évidence chez *S*. Typhimurium (Park et Groisman 2013).

B- La régulation de PhoP-PhoQ

Régulation temporelle et boucle de rétroaction positive.

Chez S. Typhimurium, la régulation temporelle ainsi que les boucles de rétroaction ont été très étudié depuis une dizaine d'années. Par exemple Shin et coll. (Shin et al. 2006) ont montré que l'activation du système PhoPQ entraîne une augmentation du niveau d'ARNm des gènes PhoPdépendants et (i) que cette induction était indépendante du gène étudié ainsi que du signal environnemental (Mg²⁺, PAMs), (ii) que cette augmentation de l'activité du système PhoPQ était due à une boucle de rétroaction positive : PhoP-Phosphorylé (ou PhoP-P) active sa propre transcription de l'opéron phoPQ (Soncini, Vescovi, et Groisman 1995). Chez Salmonella et E.coli, phoPQ est un opéron bicistronique transcrit à partir de deux promoteurs : un promoteur constitutif Pc qui permet un niveau basal de transcription de l'opéron phoPQ pour la détection du signal, et un promoteur inductible Pi répondant au bas Mg²⁺ (García Véscovi, Soncini, et Groisman 1996 ; Kato, Tanabe, et Utsumi 1999) (figure 5). En réponse aux stimuli, la quantité de PhoP-P augmente très rapidement (dizaine de minutes) puis diminue pour atteindre un état stable (environ 20-25% du pic). Il a également été montré que cette nette augmentation de l'activité dépendant d'une boucle d'autorégulation était nécessaire pour la virulence de la bactérie dans le modèle souris. En effet, la capacité de la bactérie à créer une infection létale nécessite qu'elle puisse induire l'expression rapide des gènes activés par PhoP et/ou une inhibition rapide des gènes réprimés par PhoP. La régulation de l'expression du TCS PhoPQ nécessite donc une augmentation rapide et brève dans le temps.

Récemment il a été montré que le retour de l'activation à un niveau basal était lié à une boucle de rétroaction négative au niveau de la protéine PhoQ régulant l'équilibre entre ses deux fonctions :



Figure 6 : Représentation schématique de la régulation post transcriptionnelle et post traductionnelle du régulon PhoPQ. De petits ARN (MicA, MgrR) et de petits peptides (SafA, MgrB et SlyB) peuvent réguler la transcription et la traduction de PhoP. D'après Needham et Trent 2013 avec modifications.

phosphatase et kinase (Yeo *et al.* 2012). Le domaine cytoplasmique de PhoQ est séparé en deux sous domaines, le sous-domaine DHp responsable de la dimérisation de la protéine, contenant l'histidine conservée et le sous- domaine catalytique contenant le NBP (nucleotides binding pocket) recouvert d'une boucle ou couvercle (Gao et Stock 2009). L'ATP et l'ADP peuvent tous les deux se fixer au niveau du NBP et jouer sur l'activité kinase et phosphatase respectivement. L'hypothèse est la suivante, l'ATP se fixe au niveau du NBP et est hydrolysé en ADP + Pi (phosphate inorganique) et c'est ce Pi qui permet l'autophosphorylation de PhoQ puis est transféré sur l'aspartate conservé de PhoP pour activer la transcription des gènes PhoP-dépendant. L'ADP pouvant aussi se fixer au niveau de la NBP il y a une compétition entre ADP et ATP pour ce site. Le niveau de phosphorylation diminuant très vite après fixation de l'ATP, Yeo et ses collègues suggèrent que la boucle servant de couvercle au NBP, piègent l'ADP dans la NBP inhibant ainsi l'activité autokinase de PhoQ et faisant basculer l'équilibre vers l'activité phosphatase. Cette boucle de régulation négative (courte activité autokinase et longue activité phosphatase) permet de diminuer et de contrôler le niveau de PhoP phosphorylé afin d'éviter un emballement du système et de maintenir possible la rapide augmentation de la transcription des gènes nécessaires à l'activation.

La régulation post transcriptionnelle/traductionnelle de PhoP

S. Typhimurium exprime environ 140 petits ARN régulateurs (sRNA) en début de phase stationnaire, plus de la moitié apparaissent être unique chez *Salmonella* et moins de 20% sont commun à toutes les *Enterobacteriaceae* (Kroger *et al.* 2012). Certains de ces sRNA ont un rôle dans la régulation de PhoP (figure 6) et indirectement influencent la résistance aux peptides antimicrobiens chez *Salmonella* ((Kroger *et al.* 2012), *E. coli* (Moon et Gottesman 2009) et *Yersinia* (Nuss *et al.* 2014). Par exemple chez *E. coli*, deux types de sRNA sont liés à l'expression de PhoP (i) le sRNA MicA se fixe sur l'ARN de PhoP et inhibe sa traduction par compétition avec le ribosome pour une fixation sur le RBS (ribosome binding site) (Coornaert *et al.* 2010), (ii) MgrR régule les modifications du LPS, en effet, il est transcrit par PhoP puis il va pouvoir réguler l'expression de nombreux gènes dont *eptB* (gène impliqué dans l'ajout de phosphoéthanolamine sur le LPS) qu'il régule négativement (Moon et Gottesman 2009); Raetz *et al.* 2007). Des homologues de MgrR sont retrouvés chez *Klebsiella, enterobacter* et *Citrobacter* (Moon et Gottesman 2009).

De petits peptides transmembranaires sont également capables de réguler l'activité de PhoP (figure 6). Ils peuvent avoir un rôle activateur ou au contraire inhibiteur de l'activité du régulon PhoPQ. Par exemple, SafA (sensor associating factor A), chez *E. coli*, est un petit peptide dont la région transmembranaire est capable d'interagir avec la région transmembranaire de PhoQ (Eguchi *et al.*

2012). Comme décrit précédemment de fortes concentrations en Mg²⁺ sont capable d'inhiber l'activité kinase de PhoQ pour le garder dans sa conformation phosphatase. Pourtant SafA est capable d'activer PhoQ même en présence de fortes concentrations en Mg²⁺ (Eguchi *et al.* 2012). MgrB peut également agir avec le domaine périplasmique de PhoQ et inhiber son activité kinase (contrairement à SafA) et/ou activer sa fonction phosphatase. Des homologues de MgrB sont retrouvés chez *S*. Typhimurium et *Y. pestis* (Lippa et Goulian 2009). YneN (ou B1500) membre du régulon EvgS/EvgA agit comme connecteur entre ce système à deux composantes et PhoPQ en stimulant l'activité kinase de PhoQ chez *E. coli* (Eguchi *et al.* 2007). Enfin, SlyB est capable de réprimer l'activité de PhoPQ chez *S*. Typhimurium ((Perez *et al.* 2009). Tous ces exemples confirment que l'activité de PhoPQ nécessite une régulation fine et complexe.

C- Le régulon PhoPQ

PhoPQ est un régulateur majeur dans de nombreuses bactéries. De nombreux gènes PhoPdépendants ont été identifiés à ce jour, certains impliqués dans la virulence (*pbgPE* par exemple). Les gènes PhoP dépendants peuvent être classés selon plusieurs critères, entre autre : en fonction de leur distribution phylogénétique, du moment d'expression après induction et de la nécessité ou non d'avoir besoin d'un intermédiaire pour leur activation. Cependant le classement le plus commun est la différence entre les gènes directement activés par PhoP et indirectement activés par PhoP.

Les gènes PhoP dépendants à activation directe, architecture et régions promotrices

L'étude des régions promotrices des gènes PhoP dépendant ont permis l'identification d'une PhoP box chez *Salmonella* (Soncini, Vescovi, et Groisman 1995), *E. coli* (Kato, Tanabe, et Utsumi 1999 ; Yamamoto *et al.* 2002) et *Y. pestis* entre autre (Li *et al.* 2008). Il s'agit d'un motif hexamèrique répété (T/G)GTTTA -5 pb- (T/G)GTTTA (figure 5). Ce motif est généralement trouvé 11-13 pb en amont du site -10 de l'ARN polymérase soit à la position normalement occupée par la région -35. Cependant, il est possible que la/les PhoP box se situe(nt) plus en amont que la région -35, ou encore dans plusieurs orientations possible. Le rôle de la deuxième PhoP box dépendra surtout de sa localisation, elle pourra avoir un rôle activateur de la transcription, inhibiteur de la transcription ou encore servira pour surmonter une inhibition de la transcription médiée par les protéines histones like ou H-NS (Zwir *et al.* 2012 ; Perez, Latifi, et Groisman 2008 ; Kong, Weatherspoon, et Shi 2008).

Une étude très récente réalisée chez *S*. Typhimurium a notamment permis d'établir différentes classes de promoteurs PhoP dépendants (classe I à classe V) (Zwir *et al.* 2012). Les promoteurs de classe I ont une seule PhoP box 12 pb en amont de la région -10 en orientation directe (ex: *mgtA*, *phoP*, *pmrD*), la classe II regroupe les promoteurs avec deux PhoP box, une en orientation directe avec une localisation et un phasage analogue à ceux de classe I et une deuxième PhoP box en amont de la première (ex: *virK*, *mig-14*). Les promoteurs de classe III ont une PhoP box localisée 21-23 nt en amont du site -10 dans l'orientation directe (ex: *ompX*), ceux de classe IV ont deux PhoP box, une en orientation directe avec une localisation et un phasage analogue à ceux de classe IV ont deux PhoP box, une en orientation directe avec une localisation et un phasage analogue à ceux de classe III et une deuxième PhoP box en amont ou en aval de ce site (ex : *pagP*, *pagD*). Enfin, les promoteurs de classe V possèdent deux PhoP box une en orientation «reverse» localisée 30, 37, 49, 48, 47 ou 58 nt en amont du site -10, la deuxième PhoP box soit recouvre le -10, soit se trouve en aval du site d'initiation de la transcription (ex : *pagC*, *mgtC*, *ugtL*). Les architectures des promoteurs décrites sont à mettre en corrélation avec le caractère ancestral ou acquis des gènes correspondant, plus qu'avec la fonction de chaque gène. En général ces architectures corrèlent aussi (sauf pour *mgtA*, *pmrD* et *yrbL*) avec la force du promoteur.

PhoP-P ayant un rôle de régulateur, il doit donc pouvoir reconnaitre une large gamme de promoteur et d'architectures différentes. Il a été montré que PhoP-P avait des profils de fixation différents selon le type de promoteur sur lequel il se fixe. La plupart des régulateurs transcriptionnels activent la transcription en interagissant soit avec la sous unité alpha-CTD, soit avec la sous-unité sigma 70 de l'ARN polymérase (Hochschild et Dove 1998 ; Yamamoto *et al.* 2002). Ainsi, lorsque la PhoP box ne chevauche pas la région -35, PhoP-P va interagir avec la sous unité alpha-CTD de l'ARN polymérase. En revanche, lorsque la PhoP box chevauche complètement la région -35, c'est via une interaction avec la sous-unité sigma 70 que PhoP-P va activer la transcription des gènes PhoP-dépendants. Ce comportement (choix de sous-unités différentes de l'ARN polymérase) est retrouvé chez d'autres protéines régulatrices comme PhoB et VanR (Blanco *et al.* 2002 ; Depardieu, Courvalin, et Kolb 2005). Dans les cas des promoteurs avec plusieurs PhoP box, PhoP-P peut fixer plusieurs sous-unité de l'ARN polymérase ce qui dénote de la variété des types d'interactions du régulateur transcriptionnel avec ses régions promotrices cibles. Enfin, dans certains cas, PhoP peut activer la transcription de certains gènes de manière indépendante de l'ARN polymérase (pas d'interactions entre PhoP et l'ARN polymérase) comme dans le cas d'*ugd* (Mouslim et Groisman 2003).

Certaines des architectures décrites précédemment sont retrouvées chez d'autres bactéries, par exemple le gène *mgtC* de *Y. pestis* présente une architecture de promoteur retrouvée chez *S.* Typhimurium alors que *ugtL* chez *Salmonella* présente une architecture qui n'est retrouvée pour aucun des gènes du régulon PhoP de *Yersinia* (Perez, Latifi, et Groisman 2008; Perez et Groisman 2009).



Figure 7 : Un exemple de régulation de gènes PhoP-dépendant de manière indirecte : Les modèles « boolean AND/OR gate ». A : Le modèle « boolean AND gate » l'exemple du système à deux composantes SpiR/SsrB (Kato, Groisman, et Howard Hughes Medical Institute 2008). B : Schéma représentant la régulation de SpiR/SsrB par EnvZ/OmpR (Cameron et Dorman 2012).

Les gènes PhoP-dépendant à activation indirecte: les connecteurs du système

Il existe plusieurs connecteurs décrits dans le régulon PhoP comme les protéines PmrD (*E. coli, S.* Typhimurium, *Shigella*), SlyA, les systèmes à deux composantes PmrAB (*Salmonella, E. coli*), RcsB. A partir de quelques exemples je vais essayer d'introduire des types de régulation PhoP-dependant médiés par des connecteurs pour la transcription de gènes indirectement régulé par PhoP.

(i)- Modèle « Boolean AND gate ».

Ce modèle met en exergue la nécessité d'avoir tous les signaux au plus fort (« input ») pour avoir le plus haut niveau de réponse (« output »). Dans le cas de PhoPQ, il se traduit à travers l'exemple du TCS SsrB/SpiR (figure 7A).

PhoP-P peut activer la transcription des gènes *ssrB* (RR) et *spiR* (HK) codant pour un autre système à deux composantes essentiel à la production du système de sécrétion de type III Spi/SsA régulant la survie de *Salmonella* dans les cellules phagocytaires (Ochman *et al.* 1996). En parallèle de cette activation, PhoP-P peut activer la transcription d'une troisième protéine non identifiée (Z sur le schéma) qui va permettre également l'expression de SpiR. En réponse à un stimulus extérieur SpiR va phosphoryler SsrB qui va activer la transcription de *spiC* son gène cible (Bijlsma et Groisman 2005). On parle de modèle « Boolean AND gate » car il y a nécessité de deux signaux concomitants pour transcrire le gène *spiC*: le Mg²⁺ pour PhoPQ et un signal indéterminé pour SsrB/SpiR.

(ii)- Modèle « Boolean OR gate ».

Ce modèle désigne un circuit dans lequel au moins un des signaux doit être fort pour obtenir une réponse forte. Là encore ce type de régulation peut être représenté chez PhoP (figure 7B).

SsrB/SpiR est régulé par PhoP (voir ci-dessus) mais est aussi régulé par un autre système à deux composante : EnvZ/OmpR. Alors que PhoP contrôle l'expression de SsrB à un niveau transcriptionnel et post transcriptionnel, OmpR ne régule que l'initiation de la transcription de SsrB et SpiR à partir de promoteurs séparés (Bijlsma et Groisman 2005). L'hypothèse pour expliquer cette double régulation est que la régulation par PhoPQ d'une part et par EnvZ/OmpR d'autre part permettrait de générer différentes quantités de SsrB phosphorylé impliquant donc une expression, et une fixation sur des promoteurs différents dans les macrophages (Bijlsma et Groisman 2005 ; Lee, Detweiler, et Falkow 2000). Ainsi l'expression de *spiR* est dépendante de OmpR dans les deux heures suivant l'internalisation de la bactérie, alors que 6 heures après l'internalisation, l'expression dépendante de PhoP qui est requise (Lee, Detweiler, et Falkow 2000 ; Feng, Oropeza, et Kenney 2003). Ceci est donc



Figure 8 : Le connecteur PmrD et son rôle central dans la transmission du signal. L'opéron *pbgPE* responsable de la modification du LPS et objet d'étude de cette thèse est représenté dans son intégralité (7 gènes en tout). D'après Groisman 2001, avec modifications.

un schéma « Boolean OR gate » puisque selon la situation la bactérie va réguler l'expression de ses gènes cible via l'un ou l'autre des systèmes à deux composantes.

(iii)- Le cas de SlyA

De récentes études ont montré que de petites protéines, aussi appelées connecteurs, sont capables de lier les systèmes à deux composantes et de modifier leur activité à un niveau post traductionnel (Tu *et al.* 2006 ; Kox, Wösten, et Groisman 2000 ; Kato et Groisman 2004 ; Bougdour, Wickner, et Gottesman 2006).

SlyA est une protéine de liaison à l'ADN régulant l'expression de gènes cibles comme *ugtL* (Shi *et al.* 2004) et *pagC* ((Nishio *et al.* 2005) de manière PhoP-dépendante. Elle est également retrouvée chez *Yersinia* (Ellison, Lawrenz, et Miller 2004). Les gènes *ugtL* et *slyA* sont tous les deux des gènes PhoP-dépendant mais pour pouvoir transcrire *ugtL*, PhoP et SlyA doivent conjointement se fixer sur la région promotrice d'*ugtL*. l'hypothèse a été faite que les deux protéines sont requises pour pouvoir surmonter la répression induite par l'histone-like protéine H-NS (Shi *et al.* 2004 ; Navarre *et al.* 2005) alors que seul SlyA permettrait d'avoir un rôle anti-répresseur de H-NS dans le cas de *pagC* (Navarre *et al.* 2005).

(iv)- Le cas de PmrD/PmrAB

Un des exemples les plus documenté est le connecteur PmrD (figure 8). Il est également retrouvé chez d'autres bactéries comme *E. coli* (YneN) (Eguchi *et al.* 2007). PmrD permet de transférer l'activation de PhoP à un deuxième système à deux composantes PmrAB décrit comme ayant un rôle dans la régulation des gènes responsables de la modification du LPS : *pbgPE*. PmrAB est un système à deux composantes composé d'une histidine kinase PmrB et d'un régulateur transcriptionnel PmrA. PmrB se trouve dans le périplasme et est capable de sentir l'environnement il est d'ailleurs activé par le Fe³⁺ chez *Salmonella* et *Yersinia* pour revue voir (Flamez *et al.* 2007). PmrB possède une double fonction de phosphatase et kinase, il peut donc phosphoryler et déphosphoryler PmrA. Lorsqu'il est transcrit par PhoP, PmrD va se fixer sur la forme phosphorylée de PmrA et empêche sa déphosphorylation par PmrB stimulant la transcription des gènes PmrA-activés et inhibant la transcription des gènes PmrA-réprimés. Le connecteur PmrD est donc essentiel à la connexion des deux systèmes à deux composantes PhoPQ et PmrAB. Comme montré précédemment, PhoP nécessite une régulation fine afin d'éviter tout emballement du système ainsi, lorsque les signaux bas Mg²⁺ et Fe³⁺ sont présents en même temps, PmrA peut se fixer sur le promoteur de *pmrD* pour en



Figure 9 : L'immunité chez les insectes. Elle est caractérisée par deux composantes : une composante cellulaire (à droite) et une composante humorale (à gauche). D'après Duvic Bernard.

réprimer l'expression afin d'éviter une trop grande accumulation de PmrA-P et ainsi une modification du LPS aberrante voire couteuse énergétiquement pour la bactérie (Kato, Latifi, et Groisman 2003).

III- Les peptides antimicrobiens

Dans les environnements complexes, les organismes multicellulaires sont confrontés à l'infection par des micro-organismes étrangers du type bactéries, champignons et virus. Pour se défendre tous les organismes ont développé un système immunitaire plus ou moins complexe. Une des composantes de l'immunité est cependant conservée chez tous les organismes multicellulaires depuis les plantes jusqu'à l'Homme, il s'agit de l'immunité innée. Seuls les mammifères ont pu acquérir au cours de l'évolution une immunité acquise (avec une mémoire cellulaire). L'immunité innée des insectes présente deux types de réponses à l'infection (figure 9) : (i) une réponse cellulaire caractérisée entre autre par des mécanismes tels que la phagocytose, la nodulation, et l'encapsulement cellulaire (ii) une immunité humorale caractérisée par la coagulation et la production de phénol-oxydase et de peptides antimicrobiens (ou PAMs) (Hoffmann et Reichhart 2002).

Avec plus d'un million d'espèces caractérisées et plus de 30 millions d'espèces estimées, 32 ordres et plus de 600 familles à travers le monde, les insectes représentent la majorité des animaux connus actuellement. Ils sont caractérisés par un cycle de vie court comparé aux vertébrés, une capacité à coloniser de nouvelles niches et de se nourrir sur presque toutes les espèces de plantes ou animales et enfin par la possibilité de mettre en place une réponse immunitaire nocive (Bulet et Stöcklin 2005). Depuis plusieurs dizaines d'années la recherche de nouveaux antibiotiques a mené à étudier de plus en plus les PAMs dérivés des réactions immunitaires de l'insecte. A ce jour, plus de 200 PAMs ont été identifiés chez les insectes et sont classés en 5 groupes principaux basés sur leur séquence en acides aminés et leurs activités antimicrobiennes : les cécropines, les défensines d'insectes, les peptides riches en proline, les peptides riches en glycine et les lysozymes. Cependant, on les retrouve plus généralement classés en 3 groupes : les peptides à hélices alpha linéaires sans résidus cystéines (ex : cécropines), les peptides à motifs alpha-bêta stabilisés par une composition riche en cystéines (ex : les défensines), et enfin, les peptides dans lesquels la proline et/ou la glycine sont



Figure 10 : Les PAMs d'insectes. A : classe des PAMs à motifs hélice alpha. B : Les PAMs à motifs alpha-bêta. C : les PAMs où la glycine et la proline sont surreprésentés. (Bulet et Stöcklin 2005)

surreprésentés (ex : drosocines) (Hwang *et al.* 2009). Chez les insectes holométaboles (lépidoptères) c'est-à-dire ayant une métamorphose complète de la larve, ils sont produits transitoirement par les épithelia et massivement par le corps gras atteignant parfois plusieurs mg/L, dans l'hémolymphe, après infection. En revanche chez les insectes hétérométaboles (orthoptères), c'est-à-dire que la larve ressemble à l'adulte (pas de stade nymphal), ils sont produits par les hémocytes des insectes sains et ne sont relargués dans l'hémolymphe que dans le cas d'une infection (Bulet et Stöcklin 2005).

Chez les insectes, on ne trouve que des PAMs cationiques (décrits dans la littérature), cependant il existe des PAMs anioniques comme la dermicidine retrouvée dans la sueur des Hommes (Schittek *et al.* 2001).

A- Rôle et caractérisation des PAMs

Les PAMs à motif hélice alpha

Les PAMs linéaires à motifs hélice alpha totalisent plus de 60 séquences décrites de type cécropine ou cécropine-like (figure 10A). Ils possèdent entre 29 et 42 acides aminés, sont linéaires et dépourvus de cystéine. La cécropine isolée de *Hyalophora cecropia* fut la première identifiée ce qui fait des cécropines une des familles les plus caractérisées (Steiner *et al.* 1981). Alors que les cécropines de diptères sont conservées allant de 80% à 100% d'identité selon le type de cécropine, les cécropines de lépidoptères présentent plus de variations dans leur structure primaire (Hetru, Hoffmann, et Hancock 2002 ; Duvic *et al.* 2012). La plupart des cécropines présentent un résidu tryptophane en position 1 ou 2 mais aucun n'a été trouvé chez *Aedes albopictus* (Sun, Eccleston, et Fallon 1998) or il a été montré que l'absence de tryptophane chez les *Aedes* était corrélé avec une meilleure efficacité de leur cécropine contre les bactéries Gram positives et les levures comparé à la cécropine A de drosophile (Vizioli *et al.* 2000). Cependant les PAMs à motif hélice alpha sont généralement plus actifs contre les bactéries que contre les champignons et plus particulièrement contre les bactéries Gram négatives (Bulet et Stöcklin 2005).

Les PAMs à motifs alpha-bêta stabilisés par une composition riche en cystéines

On retrouve dans ce groupe principalement des peptides de faible masse moléculaire (2-5 kDa) et contenant des cystéines comme les défensines (figure 10C). Les défensines ont été retrouvées dans tous les insectes étudiés à ce jour que ce soit la gallérymicine de *Galleria mellonella*, ou la drosomycine de *Drosophila melanogaster*. Elles sont composées d'une boucle, d'une hélice alpha



Figure 11 : Les différents modes d'action des CAMPs. Les CAMPs se fixent à la membrane bactérienne principalement par des interactions électrostatiques puis peuvent former différentes structures A : les pores thoroïdaux. B : le modèle Tapis. C : le modèle des pores transmembranaires. D : Les agrégats de canaux. (Li *et al.* 2012)

stabilisée par deux ponts disulphures et d'un feuillet bêta. Certaines sont actives contre les champignons filamenteux comme la drosomycine, l'héliomycine ou la galerymicine mais la plupart sont actives contre les bactéries Gram positives (Bulet et Stöcklin 2005).

Les PAMs dans lesquels la proline et/ou la glycine sont surreprésentés

Il s'agit de la famille la plus hétérogène, elle est composée de peptides linéaires de 14-39 acides aminés classés en deux familles : les peptides à courte chaine (<20 aa) et les peptides à longue chaine (>20 aa) (figure 10B). La proline y représente souvent plus de 25% des acides aminés totaux. La drosocine fut le premier PAM naturel O-glycosylé identifié chez la drosophile. Alors que les peptides à courte chaine ont une forte activité contre les bactéries Gram négatives appartenant à la famille des *Enterobacteriacae* uniquement (Otvos 2002), les peptides à longue chaine sont actifs contre les bactéries à Gram positif et négatif. Seul la metchnikowine est active contre les champignons filamenteux (Bulet *et al.* 1999).

Les PAMs sont donc de petits peptides hydrophobes (12-50 aa) avec une charge positive au minimum de +2 et un mode d'action large (bactéries, champignons). Leur charge positive est un avantage pour se fixer sur les membranes bactériennes qui sont chargées négativement. Ici ne seront discuté principalement que du mode d'action des PAMs cationique (CAMPs) sur les bactéries Gram négatives ainsi que des moyens de défense mis en place par ces dernières pour résister aux CAMPs.

B- Mode d'action des CAMPs

Les CAMPs ciblent principalement les membranes cytoplasmiques des bactéries. Grâce à leur charge positive, ils peuvent se fixer sur la membrane grâce à des interactions électrostatiques. Le peptide s'insère ensuite dans la membrane cytoplasmique pour désorganiser la bicouche lipidique créant ainsi des pores transitoires (certains PAMs peuvent alors atteindre leur cible intracellulaires) ou une rupture dans la membrane bactérienne entrainant une fuite du matériel cytoplasmique. Les modes d'actions des CAMPs sont classés en quatre catégories : le modèle des pores transmembranaires, le modèle du tapis, le modèle des pores thoroïdaux et enfin le modèle agrégat de canaux (Brogden 2005 ; Li *et al.* 2012) (figure 11).

1. Les pores thoroïdaux : les CAMPs se fixent sur les membranes bactériennes (interactions électrostatiques), leurs domaines hydrophobes s'enfouissent alors dans la bicouche lipidique

en déplaçant les têtes des phospholipides membranaires et les courbant de sorte qu'ils se retrouvent parallèle à la surface bactérienne, le pore est donc composé à la fois de CAMPs et de phospholipides (Mihajlovic et Lazaridis 2010 ; Li *et al*. 2012). La magainin-2 forme ce type de pore (Kim *et al*. 2009).

- 2. Le modèle Tapis : dans ce cas les CAMPs agissent comme des détergents, les peptides s'accumulent à la surface bactérienne entrainant des contraintes dans la fluidité membranaire. Lorsqu'une valeur seuil de concentration est dépassée, il y a formation de patchs membranaires dans lequel les lipides forment des agrégats thoroïdaux stabilisés par les peptides amphipathiques (Jean-François *et al.* 2008). La magainine-2 amide et la cathelicidine dérivée humain du LL-37, les défensines et les cécropines sont capable de réaliser ce type d'action très efficace sur les bactéries Gram négatives (Brogden 2005 ; Li *et al.* 2012).
- 3. Le modèle des pores transmembranaires : les CAMPs s'agrègent au niveau de la membrane plasmique et s'insèrent dans la bicouche lipidique de sorte que les résidus hydrophiles sont du côté de la lumière du pore et que les résidus hydrophobes sont en interaction avec le core des lipides. Ce mécanisme est retrouvé chez les PAMs à hélices alpha.
- 4. Les agrégats de canaux : décrit récemment, ce mécanisme implique une compétition avec les cations divalents liés au LPS (Mg²⁺ et Ca²⁺) déstabilisant ainsi l'assemblage supramoléculaire et permettant aux peptides un accès aux membranes extra et intra cellulaire. La Maculatin 1.1 isolée d'une grenouille australienne possède ce type d'action (Bond *et al.* 2008).

C- La résistance aux CAMPs

Les bactéries possèdent tout un arsenal pour se protéger de l'action des CAMPs allant de sa dégradation ou son piégeage à l'extérieur de la cellule en passant par une modification de la surface cellulaire régulée au niveau transcriptionnel et post traductionnel.

La dégradation extracellulaire des CAMPs

Certains pathogènes sont capables de produire des molécules extracellulaires ayant pour fonction de fixer et piéger les CAMPs. Par exemple, la protéine Staphylokinase de *S. aureus* forme des complexes avec les alpha-défensines réduisant de 80% leur activité antimicrobienne (Jin *et al.* 2004). De même, l'inhibiteur du complément de *Streptococcus* isolé de *S. pyogenes* permettant une résistance au LL-37

agit en fixant et en inactivant le CAMP (Frick *et al.* 2003). Une alternative pour résister aux CAMPs est de détruire le CAMP avant qu'il ne puisse se fixer sur l'enveloppe bactérienne. Pour cela certaines bactéries produisent des protéases qui vont cliver les CAMPs comme l'aureolysine et la protéase V8 de *S. aureus* (Sieprawska-Lupa *et al.* 2004) ou l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* (Schmidtchen *et al.* 2002). Chez *Photorhabdus,* on retrouve également une métalloprotéase PrtA capable de dégrader les cécropines A et B commerciales et inhiber l'activité antibactérienne de l'insecte lorsqu'elle est injectée dans des lépidoptères (pour revue voir (Nielsen-LeRoux *et al.* 2012)). Parfois, ces protéases sont associées à l'enveloppe bactérienne avec un ancrage dans le peptidoglycane ou dans la membrane externe comme la protéase PgtE de *S. enterica* ou OmpT chez *E. coli* (Guina *et al.* 2000 ; Hui *et al.* 2010).

Le piégeage extracellulaire des CAMPs

Les bactéries du Groupe A des Streptocoques (GAS) produisent la protéine M fixée à la surface bactérienne par sa partie C-terminale, le reste de la protéine adoptant une structure dimérique « coiled-coil » formant la couche de protéines fimbriales à la surface bactérienne. Les bactéries produisant le sérotype M1 de la protéine présentent des niveaux de résistance au LL-37 qui sont supérieurs à ceux observés chez les souches moins virulentes (Nizet 2006). De même, la protéine de surface PspA (Pneumococcal surface protein) produite par *S. pneumoniae* peut lier l'apolactoferrine et empêcher son activité bactéricide (Shaper *et al.* 2004).

Une des protéines bactérienne sécrétée efficace contre les peptides antimicrobiens est la protéine SK de *S. aureus*. Elle se lie directement aux alpha-défensines produites par les neutrophiles après l'infection et inhibe leur activité bactéricide. Les souches de *S. aureus* ne produisant pas de protéine SK sont sensibles à l'action des alpha-défensines, mais l'ajout de SK purifiée leur permet de résister (Jin *et al.* 2004). Une autre protéine d'intérêt est la protéine SIC (Streptoccocal inhibitor of complement) produite par les Streptocoques du Groupe A (GAS). Bien que cette protéine soit absente de la majorité des souches GAS non invasives, lorsqu'elle est produite elle est capable de lier les CAMPs LL-37 et alpha défensines afin d'inhiber leur activité bactéricide (Frick *et al.* 2003).

Enfin, une stratégie développée par les bactéries pour piéger les CAMPs est d'utiliser les molécules (proteoglycan) de l'hôte comme molécule active. En effet, *E. faecalis* et *P. aeruginosa* (du groupe A des Streptocoques) sont capables de sécréter des protéases qui vont dégrader le protéoglycan tapissant les cellules épithéliales de l'hôte (comme la decorine), cette dégradation entraîne la production de dermatan sulfate qui est capable de fixer et d'inactiver les alpha défensines humaines (Schmidtchen, Frick, et Björck 2001). La protéine LasA de *P. aeruginosa* est également capable



Figure 12 : Le système AcrAB/TolC. AcrAB forment un même opéron dans lequel TolC n'est pas inclus. AcrB est une protéine de transport dans la membrane cytoplasmique, AcrA est une protéine de fusion membranaire du périplasme formant un canal entre les deux membranes. TolC est une protéine de membrane externe de type porine expulsant la drogue (Alvarez-Ortega, Olivares, et Martínez 2013).

d'inhiber l'action de CAMPs en dégradant les heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 présent à la surface de nombreuses cellules (Park *et al.* 2000).

Chez les bactéries Gram positives, on retrouve aussi un autre type de piégeage extracellulaire des PAMs cationiques et anioniques grâce à la synthèse de capsules polysaccharidiques. Par exemple, *S. epidermidis* est capable de synthétiser des exopolymères cationiques polysaccharide intercellulaire adhésine (PIA) et des acides poly-gamma-glutamic anioniques (PGA), les deux étant capables de séquestrer les CAMPs à distance de leur cible : la membrane bactérienne. Ces exopolymères sont notamment impliqués dans la résistance au LL-37 et à la dermicidin (Vuong *et al.* 2004 ; Koprivnjak *et al.* 2002).

Les Pompes à efflux

Les systèmes bactériens d'efflux actif par des pompes membranaires sont reconnus comme un mécanisme de résistance aux antibiotiques important. Localisées sur le chromosome ou acquises par les bactéries, elles peuvent être activées par des signaux environnementaux ou par des mutations dans un gène régulateur. Il existe deux types de pompes à efflux : celles dépendant de la force proton motrice et celle dépendant de l'hydrolyse de l'ATP. Elles peuvent présenter une spécificité pour un substrat ou au contraire en accepter une large gamme. Elles sont utilisées par les bactéries pour résister à tout substrat qui pourrait leur être délétère comme les métaux lourds, les sels biliaires, les pesticides, les antibiotiques etc... (pour revue voir (Levy 2002)).

L'efflux pour la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries est principalement dû à une association entre l'imperméabilité de la membrane externe et l'expression des systèmes d'efflux avec un type de pompe particulier les pompes RND (Resistance-Nodulation cell Division) (Nikaido et Takatsuka 2009). Par exemple chez *E. coli* on retrouve le système d'efflux AcrAB-TolC qui est le plus caractérisé (figure 12). AcrB est une protéine de transport situé au niveau de la membrane plasmique, AcrA est une protéine de fusion membranaire située dans le périplasme et assurant le rôle de canal entre les deux membranes et enfin TolC est une protéine de type porine expulsant les protéines depuis la membrane externe (Borges-Walmsley, McKeegan, et Walmsley 2003). Chez *E. coli* et chez *Salmonella* ce type de pompe est associé à la résistance aux métaux (Cuivre, Zinc, indole) (Nishino, Nikaido, et Yamaguchi 2007) et à la résistance aux composés toxiques comme le SDS, les sels biliaires et la novobiocine (Baranova et Nikaido 2002 ; Nagakubo *et al.* 2002) ce qui en fait des pompes à efflux à large spectre.

En ce qui concerne la résistance aux CAMPs les pompes de type RND, MFS (Major facilitator family (Zgurskaya 2002)) et quelques transporteurs dépendant de l'ATP sont utilisés par les bactéries (Levy 2002). Le rôle des pompes à efflux est important dans la résistance aux CAMPs car elles pourraient

expliquer la résistance intrinsèque de certains pathogènes humains à l'action des CAMPs (Nizet 2006). Un des exemples est le cas de *Neisseiria gonorrhoeae*. Il a été montré que la résistance de cette bactérie à plusieurs CAMPs était dû au système d'efflux MtrCDE, qui, lorsque les gènes sont exprimés, permettent la résistance au LL-37 et à la protégrine-1 (Shafer *et al.* 1998). Chez *S. enterica* un mutant défectif du locus *sap* signifiant «sensitive to antimicrobial peptides» et analogue au système d'efflux lié au potassium chez *E. coli* et retrouvé chez *Erwinia chrysanthemi* (López-Solanilla, García-Olmedo, et Rodríguez-Palenzuela 1998) et *Vibrio fescheri* (Chen, Weng, et Lin 2000), rend la bactérie plus sensible à l'action de la protamine (Parra-Lopez *et al.* 1994). Enfin *S. aureus* possède un plasmide codant pour de nombreux gènes de résistance dont le système d'efflux QacA qui permet une résistance à certains PAMs comme la tPMP-1.

Chez les bactéries Gram positives d'autres voies de résistance aux PAMs sont décrites comme la synthèse d'exopolymères saccharidiques qui vont séquestrer les PAMs (évoquée ci-dessus p 22) ou la D-alanylation des acides techoïques permettant un changement de charge de la surface bactérienne de négative à positive (Koprivnjak et Peschel 2011) mais ces modes de résistances ne seront pas abordés plus en détails ici afin de se concentrer sur les mécanismes adoptés principalement par les bactéries Gram négatives.

Les bactéries Gram négative possèdent une épaisse couche de LPS à la surface cellulaire qui est une des premières cibles des CAMPs, le LPS conférant une charge négative aux bactéries. Le LPS est constitué de 3 parties :

- Une partie hydrophobe ou lipide A constituée de glucosamines phosphorylés liés à des chaines d'acides gras saturés.

- Un core olygosaccharidique constitué d'un core interne lié de façon covalente au lipide A par l'acide
Kdo. Il relie également la troisième partie du LPS grâce à un core externe composé d'hexoses.

- Un domaine hydrophile appelé antigène O composé d'unité répétées de saccharides.

Le LPS est reconnu par le système immunitaire de l'hôte via les Toll récepteurs (ou TLR chez les mammifères) induisant la réponse humorale. Une des meilleures protections de la bactérie pour résister aux CAMPs est alors de modifier son LPS. La cible des modifications principales chez les bactéries est le lipide A. Cependant, l'antigène O sert aussi de protection pour empêcher les CAMPs d'accéder au feuillet du LPS.

Les modifications du LPS.

Plusieurs TCS sont décrits comme ayant un rôle dans la modification du LPS et la résistance aux PAMs c'est le cas de PhoPQ (Bennett et Clarke 2005 ; Miller, Kukral, et Mekalanos 1989), PmrAB (Farizano *et al.* 2012) ou encore ParRS et CprRS (Fernández *et al.* 2012 ; Fernández *et al.* 2010).

La régulation des enzymes modificatrices du LPS par PhoPQ et/ou PmrAB est un phénomène retrouvé chez *E. coli, S.* Typhimurium, *P. luminescens* et *P. aeruginosa.* Ces modifications ont pour rôle de renforcer l'intégrité et la perméabilité de la membrane externe en présence de peptides antimicrobiens permettant une survie de la bactérie dans son hôte (Murata *et al.* 2007 ; Gunn *et al.* 2000).

(i)- Modification post-traductionnelle du LPS.

Un des moyens de lutte contre les CAMPs est la modification du LPS par des enzymes capables de modifier la charge de la surface bactérienne ou encore d'en modifier sa fluidité. Un des mécanismes de modification de charge, analogue à la compensation de charge par D-alanylation des acides techoïques anioniques chez les bactéries Gram positives, est de modifier la charge de la surface bactérienne par ajout de l'amino acide lysine chargé positivement sur le phosphatidylglycerol un des composants majeur de la surface cellulaire. Cette modification est catalysée par l'enzyme MprF qui est très conservée parmi les bactéries Gram positives et Gram négatives (Peschel et al. 2001). MprF est composée de domaines actifs : le domaine C-terminal permet la formation de lysylphosphatidylglycerol dans le feuillet interne de la membrane cytoplasmique en utilisant le phosphatidylglycerol et le lysyl-ARNt comme substrat (Peschel et al. 2001 ; Staubitz et al. 2004 ; Ernst et al. 2009), le domaine N-terminal permet, quant à lui, la translocation du lysyl-phosphatidylglycerol au feuillet externe de la membrane cytoplasmique (Ernst et al. 2009). La mutation du gène mprF entraîne, entre autre, une augmentation de la sensibilité de la bactérie aux CAMPs et une virulence atténuée dans de nombreux modèles animaux (Weidenmaier et al. 2005 ; Peschel et al. 2001). mprF est sous le contrôle du régulateur ApsRSX (Meehl et al. 2007 ; Li et al. 2007). Pour lutter contre les CAMPs les bactéries Gram négatives peuvent modifier leur surface bactérienne en modifiant le lipide A un des composants du LPS. Un des exemples les plus décrit est l'ajout d'aminoarabinose au niveau du core du lipide A cette modification change la surface nette du LPS de négative à positive ce qui va repousser les CAMPs (figure 13). Cette modification est régulée par deux loci : pmrE (ou pagA) et pmrHFIJKLM (analogue à pbgPE) chez Salmonella (Gunn et Miller 1996). Cette modification permet la résistance à la polymyxine B chez Salmonella (Gunn et al. 1998), Photorhabdus (Bennett et Clarke 2005) et P. aeruginosa (McPhee, Lewenza, et Hancock 2003). Ces modifications sont toutes sous le



ArnT (pbgPE, pmrHFIJKLM)	Ajout d'aminoarabinose	
LpxT	Phosphorylation du LPS	PhoP
EptA	Ajout PEtN	
EptB	Ajout PEtN	
PagL	déacylation	PmrAB
PagP	acylation	
LpxR	déacylation	Pas de TCS connu
LpxO	hydroxylation	

Figure 13 : Les différentes modifications du LPS et leur régulateur. A noter que chez *Salmonella, E. coli* et *Y. pestis* PmrAB est sous le contrôle de PhoPQ ce qui n'est pas vrai chez *Y. pseudotuberculosis* et *P. luminescens* (Flamez *et al.* 2007 ; Needham et Trent 2013 ; cette thèse)

contrôle direct ou indirect de PhoPQ (cf II- introduction générale). Chez Salmonella, une augmentation de la concentration extracellulaire en Fe³⁺ entraîne la transcription du système à deux composantes PmrAB qui va réguler l'expression d'un court peptide PmrR capable de se fixer sur le LPS et empêcher sa modification par LpxT qui est capable de phosphoryler le lipide A (Kato *et al.* 2012). La phosphorylation du lipide A par LpxT augmente la charge négative générale du LPS alors que son inhibition va permettre l'ajout d'autre modifications sur le LPS (par exemple aminoarabinose) pour rendre la surface cellulaire moins négative et ainsi résister au CAMPs (Herrera, Hankins, et Trent 2010). L'addition de phosphoethanolamine modifie également la charge du LPS le PEtN étant chargé positivement. Cette modification est régulée par l'enzyme PmrC chez Salmonella analogue de EptA chez *E. coli* (Lee *et al.* 2004). Sous certaines conditions ou en absence d'aminoarabinose sur le LPS, EptA peut modifier l'extrémité 4' du glucosamine du lipide A par ajout d'un second PEtN (Gibbons *et al.* 2000).

Une modification de la fluidité membranaire des bactéries permet également de résister aux CAMPs. Il peut s'agir d'une acylation, d'une déacylation, du lipide A du LPS.

(ii)- L'acylation

L'acylation du lipide A peut se faire par l'ajout de groupements acyls secondaires de laurate ou de myristate chez E. coli et S. Typhimurium (Raetz et Dowhan 1990). Ces modifications sont catalysées par des acyltransférases LpxL (ou HtrB chez Salmonella) et LpxM, pour l'ajout de laurate et de myristate respectivement, et elles agissent au niveau de la membrane externe (Brozek et Raetz 1990). Il a été montré chez E. coli que l'activation de LpxL était induite par une augmentation de la température (Clementz, Bednarski, et Raetz 1996). Chez Salmonella on retrouve également le gène paqP qui codent pour l'enzyme acétyl transférase PagP responsable de l'ajout du palmitate du phosphatidylethanolamine (donneur) sur le lipide A du LPS (Bishop et al. 2000). PagP reste à l'état dormant dans le feuillet externe en conditions standard, cependant une perturbation de la membrane par des agents extérieurs (comme l'EDTA) vont entrainer un déplacement du phosphatidylethanolamine du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane externe, le plaçant ainsi à proximité du domaine catalytique de PagP. PagP va alors cliver le phospholipide donneur et restaurer l'intégrité de la membrane en acylant le lipide A (Jia et al. 2004). Cette stabilisation est suggérée par le fait que l'incorporation de palmitate catalysée par PagP augmente la résistance aux CAMPs chez S. enterica (Guo et al. 1998) et atténue la capacité du LPS à déclencher une réponse immunitaire TLR4 dépendante (Kawasaki, Ernst, et Miller 2004). Des homologues de PagP sont retrouvés chez B. bronchioseptica, L. pneumophila, Y. pseudotuberculosis (Preston et al.



Figure 14 : Les différents modes de résistance aux CAMPs développés par les bactéries. A noter le rôle central de PhoPQ dans les modifications du LPS.

2003 ; Robey, O'Connell, et Cianciotto 2001 ; Rebeil *et al.* 2004). Chez *Salmonella* et *E. coli* l'expression de *pagP* est positivement régulée par PhoPQ avec une augmentation de l'activation en cas de stress des membranes intracellulaires ou de stress environnemental (Bishop, Kim, et El Zoeiby 2005).

(ii)- La déacylation du lipide A

Chez *Salmonella* PagL est impliqué dans la déacylation du lipide A. Situé dans la membrane externe elle catalyse la suppression de la chaine d'hydroxymyristate (position 3) du glucosamine du lipide A (Trent *et al.* 2001). L'expression de *pagL*, comme celle de *pagP*, est régulée par PhoPQ et une mutation de *pagL* entraine une augmentation de la susceptibilité à la polymyxine B chez *Salmonella enterica* par rapport à la souche sauvage (Kawasaki, China, et Nishijima 2007). LpxR est un homologue de PagL retrouvé chez *S*. Typhimurium, *E. coli, Y. enterocolitica, H. pylori* et *V. cholerae*. Il a également pour fonction de déacétyler le lipide A (Reynolds *et al.* 2006). Les deux protéines PagL et LpxR sont retrouvées à l'état inactif dans la membrane externe et ne sont activées que lorsqu'elles sont surproduites suggérant la présence d'inhibiteurs (Kawasaki, China, et Nishijima 2007). Par exemple chez *Y. enterocolitica* LpxR est actif à 37°C mais inactif à 21°C, alors que chez *S*. Typhimurium c'est la présence d'aminoarabinose sur le lipide A qui semble bloquer l'activité de PagL (Reinés *et al.* 2012).

Autres mécanismes de résistance.

Bien que peu documenté il semblerait que certaines OMPs (outer membrane proteins) jouent un rôle dans la résistance aux PAMs (figure 14). C'est le cas par exemple de OmpU et OmpT qui participent à la résistance basale de la bactérie envers les CAMPs chez *V. cholerae* (Mathur et Waldor 2004) et *V. splendidus* (Duperthuy *et al.* 2010). OmpA confère une résistance à la polymyxine B et à la protamine chez *K. pneumoniae* (Llobet *et al.* 2009).

L'interférence ou la suppression des voies de l'hôte induisant la synthèse des PAMs est un autre moyen utilisé par les bactéries pour éviter l'action du système immunitaire inné. Ceci a été démontré chez plusieurs bactéries comme *Shigella dysenteriae* qui peut réguler négativement la transcription des PAMs LL-37 et bêta-defensine-1 lors des étapes précoces de l'infection grâce à la production d'un plasmide codant pour des gènes répresseurs (Islam *et al.* 2001). Cela a également été suggéré chez *S. pyogenes* qui n'induit que très peu la synthèse de PAMs par l'hôte laissant penser à la présence d'un répresseur de la voie de production de la bêta-defensine-2 (Dinulos *et al.* 2003).
Enfin, une des stratégies employées par les bactéries est de former des populations hétérogènes afin qu'au moins une partie de la population puisse résister en cas de changement délétère dans l'environnement (par exemple les PAMs). Deux phénomènes permettent l'hétérogénéité bactérienne : la variation de phase et la bistabilité.

IV- L'hétérogénéité bactérienne : Variation de phase et bistabilité

Depuis quelques années, les bactéries ne sont plus vues comme une population homogène, mais comme un mélange hétérogène même dans un milieu constant. L'émergence de nouvelles techniques comme l'utilisation de protéines fluorescentes et l'analyse «single cell» ont permis l'étude des différences inter-individus au sein d'une culture isogénique. Et bien que la formation de sous-populations puisse être vue comme étant l'exécution d'un programme bactérien intrinsèque, elle repose surtout sur la stochasticité des événements (Paulsson 2004 ; Kearns et Losick 2005). Il existe deux moteurs à l'étude des phénomènes bistables chez les bactéries : l'industrie biotechnologique, où la diversification de types cellulaires permet dans certains cas de meilleurs rendements de production, et la médecine, où la persistance des bactéries traitées par antibiotique leur permettant une résistance au traitement est liée à des profils de signalisation bistable. Ce chapitre a pour but d'introduire la notion de bistabilité chez les bactéries. Afin de pauser les bases de l'étude de la bistabilité et des sous-populations plusieurs termes vont tout d'abord être définis.

(i) La stratégie «Bet-Hedging» : il s'agit d'une stratégie de minimisation du risque en prévention d'une fluctuation brutale de l'environnement entrainant des modifications à fort coût.

(ii) Bistabilité : il s'agit de la propriété spécifique d'un système qui peut exister dans deux états stables distincts. Les états intermédiaires sont instables.

(iii) Hétérogénéité : terme employé pour décrire une population génétiquement identique mais présentant des phénotypes différents.

Variation de phase génétique	- Glissement de brins - Recombinaison site spécifique - Recombinaison homologue - Excision/insertion/inversion
Bistabilité	 -Persistance - Compétence génétique - Sporulation et cannibalisme - nage et formation de chaines - Age cellulaire - production d'exoprotéases - production de matrice de biofilm - Sous populations hypermutables d'E. coli - Méthylation - boucles de rétroaction

Figure 15 : Les différents mécanismes à l'origine de l'hétérogénéité des populations bactériennes.

(IV) Bruit ou «Noise» : est utilisé pour caractériser une infidélité dans les processus menant à des différences inter-individus. Plus simplement, des niveaux d'expression égaux peuvent conduire à un nombre absolu de protéines différent entre deux bactéries génétiquement identiques.

(V) : Stochasticité : terme utilisé pour introduire la notion de hasard dans les processus.

(VI) : Variation de phase. Dans ce chapitre j'ai utilisé la définition de Marjan W. van der Woude
(2011) qui distingue deux type de variation de phase : celle due à des mécanismes génétiques et celle due à des mécanismes épigénétiques.

La variation de phase est une source d'hétérogénéité chez les bactéries, il s'agit d'une régulation d'un gène héritable et réversible qui entraîne différents niveaux de synthèse des protéines (généralement tout ou rien) au sein de chaque cellule dans une population clonale (Van der Woude 2011). La variation de phase est la résultante de différents mécanismes moléculaires qui peuvent être soit génétique (implique un changement de la séquence ADN : glissement de brins («slipped strand mispairing» ou SSM), recombinaison site spécifique, événements d'insertion/excision), soit épigénétique (boucles de rétro-contrôle, méthylation).

A- La variation de phase génétique

Ce terme décrit les mécanismes dans lesquels les changements d'expression d'une cellule d'un état «ON» vers un état «OFF» et *vice versa* sont dus à des changements dans les séquences ADN à des loci spécifiques. Ce type de mécanisme est notamment retrouvé dans la variation antigénique. Les changements génétiques peuvent être mineurs comme le changement d'un seul nucléotide dans le cas du glissement de brin (SSM) ou conséquent avec le réarrangement de plusieurs de fragments d'ADN de plusieurs kilobases (Van der Woude et Bäumler 2004) (figure 15).

Sur l'ADN, on peut retrouver de petites séquences répétées contigües qui peuvent être sujettes à expansion ou à contraction. Le SSM intervient lorsqu'un mauvais alignement de ces séquences répétées se produit entre le brin d'ADN parental et le brin fille durant la synthèse d'ADN, sa réplication ou sa réparation. Ce mauvais alignement va engendrer une augmentation ou une diminution du nombre de séquences répétées sur le brin néo-formé (Levinson et Gutman 1987 ; Van Belkum *et al.* 1998 ; Van Belkum *et al.* 1999). Un changement dans le nombre d'unité composant la séquence répétée peut conduire à une expression de protéine «phase-variable», si la localisation de ces répétitions est telle, que la transcription ou la traduction du gène sont affectées. La variation de phase a été associée avec des répétitions allant de 1 à 7 nucléotides (Van Belkum *et al.* 1998). Par

exemple, la variation de phase des fimbriae codés par le gène hif chez H. influenza résulte d'une variation du nombre de séquence répétées passant de 9 à 10 ou à 11 répétitions du dinucléotides TA entre les régions -10 et -35 reconnues par l'ARN polymérase conférant à la bactérie un changement dans la force du promoteur (passages entre les états ON et OFF) avec chez les clones dans l'état ON deux états : ceux avec un haut niveau de transcription et ceux avec un niveau faible (Van Ham et al. 1993). Lorsque le nombre de séquences répétées est modifié en dehors du promoteur, cela peut affecter la fixation de protéines régulatrices ou bien affecter la stabilité de l'ARN messager et entrainer de la variation de phase (observée chez B. pertussis (Willems et al. 1990) et N. meningitidis (Martin et al. 2003)). Enfin, les protéines peuvent également être affectées par le SSM si les séquences répétées se trouvent dans la région codante de l'ADN. Si la modification due au SSM n'est pas un multiple de trois nucléotides alors il va se produire un décalage du cadre de lecture entraînant l'apparition d'une protéine tronquée, non fonctionnelle. C'est le cas chez H. influenzae où le gène mod contient plus de 30 répétitions de AGTC dans sa région codante, l'ajout d'une répétition en plus provoque l'apparition d'un codon stop dans la protéine et entraine de la variation de phase (De Bolle et al. 2000). Il est intéressant de noter qu'aucune variation de phase SSM dépendante n'a été identifiée dans les facteurs de virulence de Salmonella et E. coli bien qu'il ne semble pas y avoir de contraintes mécanistiques (Ritz et al. 2001 ; Torres-Cruz et Van der Woude 2003). Il semblerait que la régulation stricte des facteurs de virulence et la nature variée des habitats bactériens aient favorisés des mécanismes de variation de phase plus complexes.

La variation génétique est aussi représentée par les recombinaisons homologues indépendantes ou partiellement dépendantes de RecA se produisant pour des fragments supérieurs à 50 pb (figure 15). Généralement elles nécessitent la présence de régions homologues de plus petite taille (2pb suffisent chez N. gonorrhoeae) et la fréquence de recombinaison est plus élevée que dans les recombinaisons dépendantes de RecA, pour revue voir (Seifert 1996). Ces modifications de l'ADN sont également responsables de l'apparition de variation antigénique chez certaines bactéries (Seifert 1996 ; Mehr et Seifert 1998 ; Zhang et al. 1997). Enfin le dernier phénomène pouvant générer de la variation de phase génétique est la recombinaison site spécifique (figure 15). Cela requiert l'action d'enzyme qui vont agir sur des séquences ADN possédant une identité de séquence le plus souvent dans des régions n'excédant pas 30 pb (Van der Woude et Bäumler 2004). Il faut faire la distinction entre la recombinaison conservatrice site-spécifique et la transposition, seule la première entraîne des événements d'inversion, excision ou insertion de l'ADN conduisant à de la variation de phase (pour revue voir (Hallet et Sherratt 1997 ; Komano 1999)). L'invertase la plus étudiée est Cre, elle permet une recombinaison d'une séquence ADN comprise entre des sites lox. L'inversion d'ADN génère de la variation de phase et a été principalement étudié pour les fimbriae chez E. coli et Proteus mirabilis (Abraham et al. 1985; Honarvar, Choi, et Schifferli 2003; Li et al. 2002). Cependant ce type de

modification ne sera pas abordé plus en détails ici, un exemple plus pertinent dans le contexte de cette thèse sera abordé. En effet, chez *Photorhabdus* il a été montré qu'une inversion de promoteur était à l'origine de l'apparition de deux sous-populations de la bactérie chez le nématode (Somvanshi *et al.* 2010). *Photorhabdus* existe à l'état de biofilm persistant dans l'intestin du nématode au stade juvénile infestant (IJ) (voir description du cycle, V- introduction générale). Le criblage de mutant défectif pour la colonisation des IJs ont mis en évidence le rôle d'un locus fimbriae unique appelé *mad* pour «maternal adhesion defective». Les gènes *mad* codent pour une chaperonne d'assemblage des fimbriae régulée par un switch ON/OFF au niveau du promoteur (inversion du sens du promoteur permet de passer de l'état ON à l'état OFF et inversement). L'état ON ou OFF du promoteur permet à *Photorhabdus* de « switcher » entre deux sous-populations différentes dans le nématode. Ils a été montré que lorsque le promoteur était dans sa conformation OFF, *Photorhabdus* était présent sous la forme **P** (pour **P**athogène : forme qui se multiplie dans l'insecte), et lorsque le promoteur est dans la conformation ON, *Photorhabdus* est sous la forme **M** (pour **M**utualiste : forme qui permet la symbiose avec le nématode) (Somvanshi *et al.* 2012). Le passage d'une forme à l'autre est régulé par l'inversion du promoteur des gènes *mad*.

Toutes ces modifications ont un rôle dans la survie des bactéries dans un environnement ou un hôte hostile. Cela leur permet entre autre de réaliser de la variation antigénique afin de ne pas être reconnu par le système immunitaire de l'hôte ou encore dans le cas de *S*. Typhimurium, qui peut adopter deux versions de la protéine des flagelles: la flagelline, grâce à une inversion chromosomique, un moyen d'échapper au système immunitaire de l'hôte lorsque celui ci a développé des anticorps contre une des deux formes de flagelline (Zieg *et al.* 1977).

B- Variation de phase épigénétique : la bistabilité.

Il y a des avantages pour les bactéries à présenter une population mixte et une façon d'y arriver, en plus de la variation de phase génétique, est la bistabilité. Les « switchs » bistables sont épigénétiques ce qui signifie qu'ils ne proviennent pas de changement au niveau de leur séquence ADN (voir cidessus) (Dubnau et Losick 2006). Plusieurs mécanismes régissent les switchs bistables permettant aux bactéries de s'adapter et/ou résister à leur environnement. Nous verrons tout d'abord l'implication des boucles de rétroaction dans la régulation de l'expression génique chez la bactérie, puis la variation de phase due à des phénomènes épigénétiques notamment la méthylation et enfin les stratégies de Bet-Hedging adoptées par les bactéries encore une fois dans le but de prévenir les risques liés à leur environnement. Il existe de nombreux exemples, certains spécifiques aux Gram

positives comme la compétence génétique chez *B. subtilis* ou encore la sporulation, et d'autres plus généralisés comme la production d'exoprotéases ou encore la production de matrice de biofilm et enfin les sous-populations hypermutables d'*E. coli*. Ces mécanismes ne seront pas abordés dans cette introduction à la bistabilité (figure 15).

La bistabilité proprement dite est caractérisée par le passage d'un profil d'expression génique unimodal à bimodal entrainant l'apparition de deux patterns d'expression distincts (Dubnau et Losick 2006 ; Laurent, Charvin, et Guespin-Michel 2005). La stabilisation du système (Bistabilité) peut être générée par soit par une boucle de rétroaction positive soit par une double boucle de rétroaction négative (Ferrell 2002 ; Casadesús et D'Ari 2002).

Les boucles de rétroaction positives

L'exemple le plus classique est l'étude de l'opéron lac d'E. coli (Novick et Weiner 1957) (figure 15). Lorsqu'il est ajouté en fortes concentrations, l'inducteur IPTG va complètement dé-réprimer l'opéron lactose et induire la culture. En revanche, à de faibles concentrations, l'IPTG est incapable d'induire une culture naïve (non induite). L'ajout d'une culture induite à un milieu contenant de faibles concentrations en IPTG permet à une sous population de rester dans un état complètement actif (Novick et Weiner 1957). Ces cellules peuvent rester complètement activées dans un milieu faible en IPTG grâce à l'action d'une boucle de rétroaction positive. En effet, Les cellules activées on un niveau de perméases élevé dans leur membrane ce qui leur permet de transporter de grandes quantités d'IPTG de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule augmentant la concentration interne en IPTG. Cette concentration élevée d'IPTG dans les cellules est nécessaire à la synthèse de fortes concentrations de perméases qui vont permettre l'entrée de grandes quantités d'IPTG et ainsi de suite (Novick et Weiner 1957). En revanche, dans certaines bactéries une diminution de la concentration interne en IPTG va entrainer une diminution de la synthèse de perméase faisant passer les cellules vers un état réprimé. Ainsi une population homogène au départ (complètement induite) a bifurqué en deux souspopulations génétiquement identiques mais phénotypiquement différentes avec certaines induites et d'autres non induites (Laurent, Charvin, et Guespin-Michel 2005 ; Casadesús et D'Ari 2002 ; Novick et Weiner 1957). Une erreur de transcription peut également induire le switch de l'opéron lac : une diminution de l'affinité de l'ARN polymérase ou encore l'absence de facteurs de transcription de fidélité peut faire basculer l'opéron lac dans le sens induit ou non induit. En effet, ces différents facteurs peuvent avoir un effet sur la quantité de répresseurs dans chaque bactérie (10 molécules par bactérie) et une faible variation de la quantité va entrainer le switch (Gordon et al. 2009 ; Satory et al. 2011). Un exemple de switch impliquant une boucle de rétroaction positive a également été décrit chez Xenorhabdus une bactérie proche du genre Photorhabdus où cette boucle permet une

régulation ON/OFF du régulon FliZ et donc une modification de la mobilité chez certaines bactéries de la population (Jubelin *et al.* 2013).

Les doubles boucles de rétroaction négatives.

Un exemple classique de bistabilité généré par une double boucle de rétroaction négative est l'exemple du bactériophage lambda (figure 15). Lorsqu'un bactériophage infecte une bactérie *E. coli* il peut adopter deux programmes de développement c'est à dire il peut soit induire un programme lytique qui va tuer la bactérie, soit induire un programme lysogénique qui va instaurer une symbiose entre la bactérie et le bactériophage suite à son intégration dans le génome. Le passage lyse/lysogénie dépend de l'état de la cellule et de facteurs environnementaux et le programme que chaque bactériophage va adopter est imprévisible ce qui en fait un élément stochastique (Casadesús et D'Ari 2002 ; Johnson *et al.* 1981 ; Munsky et Khammash 2010). Le phage lambda possède deux répresseurs : Cro et cl chacun capable de réprimer l'expression de l'autre. Cro régule le cycle lytique et cl le cycle lysogénique. Le passage d'un cycle à l'autre repose uniquement sur quel répresseur va se fixer en premier sur le site de régulation spécifique de l'ADN du phage pour réprimer l'autre répresseur (Johnson *et al.* 1981). L'effet d'une double boucle de rétroaction négative équivaut à une boucle de rétroaction positive c'est à dire que par exemple l'empêchement par cl de la synthèse de Cro équivaut à une auto-régulation positive de cl et inversement (Johnson *et al.* 1981).

Variation de phase, switch et méthylation

Un des mécanismes épigénétiques pour réguler le switch est la méthylation (Blyn, Braaten, et Low 1990 ; Wang et Church 1992) (figure 15). Le switch peut se produire lorsque le site de méthylation chevauche le site de fixation d'une protéine. La fixation de la protéine va alors empêcher l'ADN d'être méthylé (Van der Woude, Hale, et Low 1998 ; Waldron, Owen, et Dorman 2002). Chez *E. coli* la plupart adénines des sites GATC sont méthylées (plus de 94% (Fang *et al.* 2012)) excepté durant une courte période après la réplication où elles sont hémiméthylées. Cependant il existe quelques sites qui restent non méthylés à cause de la fixation de protéines sur ou autour du site GATC entraînant une compétition avec la Dam méthylase pour la fixation (Wang et Church 1992 ; Ringquist et Smith 1992). On retrouve ce type de site GATC dans l'opéron *pap* («pyelonephritis associated pili») chez *E. coli* responsable de la variation de phase des pili Pap (Hernday, Braaten, et Low 2003 ; (Van der Woude, Braaten, et Low 1992). Le switch repose sur la présence de deux sites de fixation dans la région promotrice de *pap* pour la protéine régulatrice Lrp («Leucine responsive regulatory protein») : les sites 1-3 et 4-6 (Nou *et al.* 1995). Il existe deux sites GATC un dit proximal : GATC^{prox} et un distal : GATC^{dist} et la méthylation de ces sites modifie le profil de fixation de Lrp. La méthylation du site



Figure 16 : Le modèle ON-OFF des gènes *pap*. A : Etat OFF un octamère (tétramère de dimères) de Lrp (ici n'est représenté qu'un seul tétramère) se fixe sur le promoteur proximal (sites 1-3 : carrés rouge). La fixation de Lrp sur les sites 1-3 inhibe la fixation sur les sites 4-6 (carrés verts) par exclusion mutuelle. B : Les brins d'ADN néo-synthétisés sont hémiméthylés juste après le passage de la fourche de réplication (REP 1). Ici seul le brin méthylé est représenté (cercle noir). C : Deux événements stochastiques se produisent dans lesquels PapI facilite la fixation de Lrp sur les sites 4-6 et la Dam méthylase méthyle les deux brins sur le site GATC proximal. La fixation de Lrp sur les sites 4-6 diminue son affinité pour les sites 1-3 et facilite la transcription des gènes *pap*. Ainsi la méthylation des gènes *pap*. D : Un deuxième tour de méthylation (REP 2) complète le passage dans l'état ON des gènes *pap*. D : Un deuxième tour de méthylation (REP 2) complète le passage dans l'état ON dans lequel le site GATC ^{dist} est complètement non méthylé. L'état ON est maintenu grâce à une boucle de rétroaction positive entre PapB et PapI (flèche bleu hachurée) (Casadesus et Low 2013). Cependant après la réplication si la Dam méthylase a méthylé le site GATC^{prox} la probabilité que le site GATC^{dist} soit méthylé avant que la Dam puisse se dissocier de l'ADN est augmentée cela va entrainer le passage de l'état ON à l'état OFF des gènes *pap* (Hernday, Braaten, et Low 2004).

GATC^{prox} est nécessaire pour l'activation du gène *pap* et donc du passage de l'état OFF à l'état ON (Hernday *et al.* 2002 ; Hernday, Braaten, et Low 2004) (figure 16). Le switch des gènes *pap* est également régulé par d'autres facteurs transcriptionnels répondant à l'environnement comme CpxR, RimJ et H-NS (White-Ziegler *et al.* 1998). H-NS agit en bloquant la méthylation des sites GATC en réponse à la température (White-Ziegler *et al.* 1998), CpxR répond au stress cellulaire et est phosphorylé par l'HK CpxA, la forme phosphorylé de CpxR va être en compétition avec Lrp pour la fixation sur la région promotrice de *pap* et bloquer la transcription de *pap* (Hernday *et al.* 2004 ; Raivio 2005). RimJ agit via un mécanisme peu connu en réponse à la température et à d'autres conditions environnementales (White-Ziegler *et al.* 2002).

D'autres types de switch dépendent de la méthylation c'est par exemple le cas d'OxyR qui peut bloquer la méthylation des sites GATC et inhiber la transcription du gène *agn43* (antigène 43) qui code pour une protéine de membrane externe jouant un rôle dans la formation de biofilms et la pathogénèse (Owen *et al.* 1996 ; Van der Woude et Henderson 2008). Le switch chromosomique au locus STM2209-STM2208 chez *S. Typhimurium* (Cota, Blanc-Potard, et Casadesús 2012) et le switch *gtr* du bactériophage p22 (Broadbent, Davies, et Van der Woude 2010) sont tous les deux contrôlés par OxyR et Dam avec un rôle dans la modification du LPS à la surface cellulaire.

La stratégie Bet-Hedging : le cas des persistantes

Une des questions que pose la variation de phase est quel est l'intérêt pour une bactérie d'adopter une population hétérogène ? L'hypothèse la plus simple et la plus apparente est sans doute dans une optique de minimisation des risques ou « bet-hedging ». En effet, la production de sous-populations avec des phénotypes différents assure à au moins une d'entre elles une chance de survie dans une situation donnée (Cohen 1966) (figure 15). Initialement décrit en 1944 la persistance est un des exemples les plus décrits de stratégie « Bet-hedging » (Bigger 1944 ; Lewis 2007). La persistance pose de nombreux problèmes dans le traitement de patients atteints de maladies dans les hôpitaux (Levin et Rozen 2006). En effet, en plus des pompes à efflux, de la production de protéases ou autres (voir III- introduction générale), la persistance est un des moyens de la bactérie de résister aux antibiotiques mais également un état transitoire d'arrêt de la croissance bactérie de résister aux antibiotiques mais également un état transitoire d'arrêt de la croissance persistantes et inversement est stochastique et d'origine épigénétique dans l'environnement (Balaban *et al.* 2004). Par exemple, chez *M. tuberculosis* la persistance est régulée par du bruit phénotypique et une boucle de rétroaction positive capable d'amplifier le bruit (Sureka *et al.* 2008).

Chez E. coli il a été possible d'isoler des mutants hip (pour «high persistence») qui montrent une augmentation du nombre de cellules à l'état persistant (Moyed et Bertrand 1983). Les mutants hip augmentent la fréquence d'apparition des persistantes. Ces travaux ont notamment permis de constater que seul un faible nombre de bactéries étaient capables d'entrer en persistance avant l'ajout de la drogue (Balaban et al. 2004). Il existe deux types de bactéries persistantes : les persistantes de type I sont produites durant la phase stationnaire alors que les persistantes de type II sont produites tout au long de la croissance (Balaban et al. 2004). La présence de drogue dans l'environnement va tuer la majeure partie des bactéries mais les bactéries qui étaient en persistance vont pouvoir survivre grâce à leur arrêt de croissance. Il faut attendre que la drogue soit enlevée du milieu pour que les persistantes recommencent à se multiplier pour redonner une population hétérogène constituée de bactéries non persistantes (en grand nombre) et de bactéries persistantes (en très faible nombre). Ce type d'observation a notamment pu être visualisé grâce à la microfluidique (Wakamoto et al. 2013). Une autre avancée dans l'étude des persistantes est représentée par les travaux de Keren et al. 2004 qui a conçu une méthode pour isoler les bactéries persistantes. Ils ont notamment pu montrer que les bactéries persistantes exprimaient préférentiellement les gènes des modules toxines-antitoxines (par exemples les gènes relE et hipA). En effet, selon les auteurs, les toxines empêcheraient les synthèses macromoléculaires comme la traduction, protégeant ainsi les bactéries de tous les antibiotiques ciblant le ribosome ou ciblant les bactéries d'une manière dépendante de leur croissance. Les toxines-antitoxines sont régulées par une boucle de rétroaction positive. Une diminution stochastique de la concentration en antitoxine ou l'augmentation de la concentration en toxine dans une cellule va entrainer un arrêt de la croissance et un switch vers la persistance. La persistance comme les autres phénomènes de bistabilité repose donc aussi sur un équilibre fin dont la moindre variation va permettre le passage d'un état à un autre. Et bien que l'entrée en persistance ait un coût pour la bactérie le bénéfice tiré par l'ensemble de la population est supérieur avec une meilleure chance de survie en cas de changement brusque, et une absence de compétition pour les nutriments entre cellules persistantes et non persistantes. La sporulation chez B. subtilis représente également une stratégie de « Bet-hedging » puisque la spore est une des formes de survie de la bactérie en cas de changement brusque de l'environnement (Veening et al. 2008).



Figure 17 : Phylogénie des différentes espèces de *Photorhabdus*. En vert P. *heterorhabditis*, en bleu : *P. asymbiotica*, en rouge : *P. luminescens*, en violet *P. temperata*. Analyse basée sur cinq séquences concaténées codant pour des protéines (*recA, gyrB, dnaN, gltX* et *infB*). Les valeurs « bootstrap » (pourcentage de 100 réplicats) supérieures à 70% sont indiquées sur les nœuds. Echelle : 5% de divergence de séquence. (Ferreira *et al*. 2014)

V- Le modèle d'étude : P. luminescens

Les ravageurs de cultures sont un problème actuel de société car ils sont responsables de plusieurs millions d'euros de perte agricole et leur contrôle passe souvent par l'utilisation de pesticides chimiques. Depuis plusieurs dizaines d'années des couples némato-bactériens sont utilisés en lutte biologique contre ces ravageurs. Les couples nématodes/bactéries les plus communs sont *S. carpocapse/X.nematophila* et *H. bacteriophora/P. luminescens*. Ils sont utilisés contre les insectes par lâchés inondatifs sur les cultures à forte valeur ajoutée (Ehlers 2003). L'avantage de ces couples est qu'ils ciblent de nombreux ordres d'insectes mais pas les animaux à sang chaud. Ils sont produits en masse sur milieux artificiels et commercialisés par plusieurs firmes comme Koppert (Danemark) ou Contrôle_Nema (Allemagne).

Photorhabdus luminescens est une entérobactérie bioluminescente. Cette bactérie est pathogène par injection d'un large spectre d'insectes retrouvés parmi plusieurs ordres : coléoptères, lépidoptères et diptères. Un des modèles d'étude dans le laboratoire est un lépidoptère polyphage, *Spodoptera littoralis.* Il existe plusieurs espèces chez *Photorhabdus (P. luminescens, P. asymbiotica, P. temperata* et *P. Heterorhabditis*) (Ferreira *et al.* 2014), toutes sont retrouvées en association avec des nématodes (*Heterorhabditidae*) et sont pathogènes d'insectes (figure 17). Seule *P. asymbiotica* a été retrouvé comme responsable d'infections chez l'homme (Akhurst *et al.* 2004). Les travaux de cette thèse s'appuient principalement sur l'espèce *Photorhabdus luminescens* comme modèle d'étude.

P. luminescens est nécessairement retrouvé en interaction avec un nématode du genre *Heterorhabditis* (couple *H. bacteriphora* et *P. luminescens*) et ne possède pas de stade de vie libre dans l'environnement. On retrouve cette bactérie dans le tube digestif des stades juvéniles infestant du nématode ou « IJs » (Akhurst *et al.* 1996). Ce stade de développement du nématode est le seul stade de vie libre retrouvé dans l'environnement en dehors d'un insecte parasité. Il est incapable de se nourrir et survit dans l'environnement grâce à ses réserves de lipides pendant plusieurs mois (6 à 9 mois dans de l'eau à 4°C) (Grewal, Bai, et Jagdale 2011). Le stade IJ est analogue au stade Dauer juvénile chez le nématode *C. elegans* (Ciche 2007). Il a été montré chez *C. elegans* que le passage en stade Dauer répond à des conditions environnementales devenues défavorables et n'est pas obligatoire alors que le passage au stade IJ est obligatoire pour assurer le cycle de vie d'*Heterorhabditis*. Une hypothèse a donc été émise chez *Heterorhabditis*, qui considèrerait que le passage des nématodes au stade IJ nécessiterait des signaux analogues à ceux de *C. elegans*.



Figure 18 : Cycle biologique de *Photorhabdus*. En encadré rouge sont représentés les parties du cycle ayant lieu dans l'insecte et en encadré vert, celles ayant lieu dans le sol.

Cependant aucun signal précis n'a été trouvé excepté une petite protéine de l'hémolymphe (<10kDa) stable à la chaleur (Ciche et Ensign 2003) mais dont la fonction à ce jour reste inconnue.

A- Le cycle parasitaire

Les IJs sont les formes infectieuses des nématodes entomopathogènes (NEP), ils infestent les insectes en rentrant par les orifices naturels comme la bouche, l'anus ou les stigmates et dans le cas d'Heterorhabditis en traversant de manière active la cuticule grâce à un appendice en forme de dent (Bedding et Molyneux 1982) (figure 18). Après l'entrée dans l'insecte, les nématodes migrent jusque dans l'hémocoele (compartiment contenant l'hémolymphe équivalent du sang chez les mammifères) et régurgitent leur symbionte *Photorhabdus* directement dans l'hémolymphe (Ciche et Ensign 2003). La régurgitation du symbionte est le signal qui conduit à un cycle de reproduction, qui va s'effectuer sur plusieurs générations (environs 14 jours, données laboratoire). Chaque IJ donnera un adulte hermaphrodite capable de s'auto-reproduire. La croissance de la bactérie dans l'hémolymphe est facilitée par la production de toxines et d'exo-enzymes qui vont digérer les tissus de l'insecte pour le convertir en une biomasse nutritive pour le nématode. Les adultes hermaphrodites formés à partir des IJs vont se nourrir de cette biomasse ainsi que de bactéries et vont pondre des œufs qui vont eux-mêmes subir plusieurs stades de développement (de L1 à L4). Cependant certains œufs ne seront pas pondus par le nématode, ils vont alors éclore dans l'adulte via un processus appelé « endotokia matricida » (Ciche et al. 2008). Ces nouveaux nématodes sont programmés pour devenir de nouveaux IJs qui seront colonisés par leur symbionte. La formation de nouveaux IJs capables d'émerger du cadavre de l'insecte dans l'environnement pour infecter d'autres hôtes insectes est corrélée avec le passage de Photorhabdus en phase stationnaire (Hu et Webster 2000 ; Clarke 2014). La multiplication de Photorhabdus dans l'hémolymphe provoque la mort de l'insecte en 48-72h post infestation (données laboratoire) et il a été démontré que la mort de l'insecte était liée à une septicémie plus qu'à une toxémie (Clarke et Dowds 1995 ; Watson et al. 2005).

Photorhabdus possède un cycle de vie complexe et doit « jongler » ou changer entre deux états : un état symbiotique dans le nématode et un état pathogène dans l'insecte. Ces deux stades de vie de la bactérie seront discutés ci-après.

B- La symbiose bactérie-nématode.

La symbiose entre *Heterorhabditis* et *Photorhabdus* est obligatoire pour le nématode. Les tentatives pour produire des nématodes aposymbiotiques (sans leur symbionte) ont échoué *in vitro* et *in vivo*, les IJs aposymbiotique étant incapables de tuer l'insecte et de se reproduire (Han et Ehlers 2000) *in vitro*. Cette symbiose est mutualiste car chaque partenaire en tire avantage. Le nématode permet à la bactérie de survivre dans l'environnement et agit comme un vecteur d'un insecte à un autre. Quant à la bactérie elle fourni au nématode une biomasse nutritive riche lui permettant une reproduction facilitée. La symbiose prend en compte deux facteurs : permettre la croissance du nématode et son développement et la capacité de transmission dans de nouveaux IJs.

Rôle de *Photorhabdus* dans la croissance et le développement du nématode.

Le rôle de *Photorhabdus* pour le nématode est double : il va être le signal qui déclenche la multiplication du nématode et un des signaux permettant le passage du nématode au stade IJ, stade qui servira pour l'infestation de nouveaux hôtes.

Lors de l'infestation d'un insecte par le complexe némato-bacterien environ 100 bactéries (*Photorhabdus*) sont régurgitées dans l'hémolymphe et commencent leur multiplication. *Photorhabdus* va alors déclencher un « food signal » qui va permettre au nématode de commencer son cycle de reproduction (Strauch et Ehlers 1998). Ce signal indique au nématode qu'il y a suffisamment de biomasse nutritive pour son développement et sa reproduction. La phase de croissance et de multiplication du nématode démarre après la mort de l'insecte lorsque les bactéries sont en phase stationnaire (Hu et Webster 2000 ; Johnigk *et al.* 2004) et qu'elles ont pu produire toute une gamme d'exo-enzymes pour convertir le cadavre de l'insecte.

Durant sa multiplication, *Photorhabdus* va produire un petit polykétide le 3'-5' dihydroxy-4'isoprpylstilbène (ou ST) (Joyce *et al.* 2008 ; Williams, Thomas, et Clarke 2005). Dans le cas de la symbiose *Photorhabdus-Heterorhabditis*, il est démontré que le ST est indispensable à la production de nouveaux IJs à la fin du cycle infectieux du nématode *in vitro* (Joyce *et al.* 2008). Les stilbènes sont une famille de molécules actives, naturellement produites par les plantes en réponse au stress (Shen, Wang, et Lou 2009), et initialement décrites comme ayant des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries Gram positives (Li *et al.* 1995 ; Richardson, Schmidt, et Nealson 1988). Le stilbène s'accumule durant la phase de latence de *Photorhabdus* puisque le gène *st/A* codant pour l'enzyme phenylalanine ammonium lyase nécessaire aux étapes précoces de la production du ST est régulé par des conditions limitantes en nutriments et apparait surexprimé durant la phase stationnaire (Lango-

Scholey *et al.* 2013). A ce jour *Photorhabdus* est le seul genre bactérien démontré comme pouvant produire des stilbènes (Joyce *et al.* 2008).

Photorhabdus est donc une aide au développement du nématode puisqu'en plus de convertir le cadavre de l'insecte en biomasse nutritive pour le nématode et de lui servir de nourriture, il aide au passage des nématodes au stade IJs pour pouvoir émerger et envahir un nouvel hôte insecte.

Transmission de *Photorhabdus* à de nouveaux IJs.

A la fin du cycle infectieux, respectivement in vivo et in vitro, ce sont plus de 95% et 80% d'IJs émergeant du cadavre de l'insecte qui sont colonisés par Photorhabdus. Le processus de colonisation des nouveaux IJs par Photorhabdus est complexe et n'a été décrit que récemment pour Photorhabdus luminescens. Lors de la formation des nématodes adultes hermaphrodites Photorhabdus luminescens se fixe spécifiquement aux cellules INT9 de l'intestin (distal) grâce aux fimbriae Mad exprimé à la surface cellulaire (Ciche et al. 2008 ; Somvanshi et al. 2010). La régulation des fimbriae Mad est régulée par le «madswitch», un switch réversible du promoteur situé en amont de madA et qui permet à la bactérie d'adopter deux phénotypes différents (Somvanshi et al. 2012). Dans la conformation ON, les gènes mad sont exprimés et la bactérie est recouverte de fimbriae. Cette forme est appelée la forme **M** puisqu'elle n'est retrouvée qu'en association avec le nématode (M signifie forme mutualiste). Ces variants sont avirulents pour l'insecte et ne permettent pas de supporter la croissance et le développement du nématode dans le cadavre de l'insecte (Somvanshi et al. 2012). Après l'attachement de Photorhabdus aux cellules INT9, la bactérie migre et envahie les cellules adjacentes aux cellules de la glande rectale. Puis ces cellules sont lysées par la bactérie qui se retrouve libérée dans le pseudocoelome («body cavity») de l'adulte hermaphrodite où elles vont se retrouver en contact avec de nouveaux IJs en développement lors de l'endotokia matricida. Chaque IJ sera colonisé par 1 ou 2 bactéries qui vont se fixer sur les cellules de la valve intestinale pharyngée. Les bactéries vont alors se multiplier pour atteindre environ 100 CFUs par IJ. Le complexe nématodebactérie sort alors du cadavre de l'insecte et chasse d'autres insectes cibles.

D'autres gènes ont été montrés comme étant impliqués dans la colonisation de nouveaux IJs par *Photorhabdus*. Par exemple une mutation dans le gène *hdfR* de *Photorhabdus*, codant pour un facteur transcriptionnel de type Lys-R, entraine une fréquence de transmission diminuée de 80% à 20% par rapport au sauvage bien que le mutant *hdfR* ne soit pas affecté dans sa virulence.

Différents mécanismes (*mad*, *hdfR*) et différents variants (forme **M** du nématode par opposition à la forme **P**, pathogène, dans l'insecte) de *Photorhabdus* régulent cette double capacité de la bactérie à réaliser à la fois une symbiose mutualiste avec un nématode et une interaction pathogène avec un hôte insecte. Et bien que l'interaction entre *Photorhabdus* et son hôte *Heterorhabditis* soit

obligatoire et exclusive, elle est en revanche moins stricte en ce qui concerne l'interaction avec l'hôte insecte.

C- L'interaction pathogène bactérie-insecte.

Photorhabdus est une bactérie extrêmement virulente pour l'insecte, la dose létale (LD₅₀) de bactéries par injection dans des larves de Galleria mellonella étant inférieure à 5 CFU/insecte (Forst et al. 1997; Clarke 2008). Cela en fait donc un pathogène très efficace. Lorsqu'elle est relarguée par le nématode dans l'hémolymphe de l'insecte, Photorhabdus se retrouve en contact avec les composants immunitaires de l'hémolymphe (immunité innée humorale et cellulaire). Il a été montré qu'une pré-immunisation de l'insecte par injection d'E. coli avirulent prévient l'infection par Photorhabdus. Combiné avec le fait que l'insecte meurt plus d'une septicémie que d'une toxémie cela implique que Photorhabdus est capable de s'adapter et de résister aux mécanismes de défense de l'insecte (Clarke 2008). La résistance au système immunitaire de l'insecte est primordiale pour le cycle de Photorhabdus et ne peut être assurée par la forme mutualiste associée avec le nématode. Pour se protéger après l'infestation, Photorhabdus produit une large gamme de toxines actives contre les composants de l'immunité cellulaire. On retrouve par exemple les effecteurs sécrétés par le système de sécrétion de type III, les toxines MCF et les Tc toxines (pour synthèse voir (Nielsen-LeRoux et al. 2012)) qui sont à ce jour les toxines les mieux caractérisées car on les retrouve dans plusieurs bactéries pathogènes comme Yersinia, Serratia, Xenorhabdus et Burkholderia. Les Tc toxines ont initialement été caractérisée car il a été montré que du surnageant de culture de Photorhabdus était capable de tuer des larves d'insectes lorsqu'il était mélangé à leur nourriture signifiant que les Tc toxines sont actives par voie orale (Bowen et al. 1998; Nielsen-LeRoux et al. 2012). Comme les toxines Cry de Bacillus thuringiensis, elles ont un rôle dans la dégradation des cellules intestinales du nématode. Les Tc ont également un effet inhibiteur de la phagocytose (Spinner et al. 2013). Cependant de récentes études suggèrent que les Tc toxines restent fixées à la surface bactérienne impliquant que l'ingestion de toute la bactérie est nécessaire pour induire une toxicité et seules certaines souches de Photorhabdus peuvent produire une lipase potentielle Pdt1 capable de cliver la Tc toxine pour la relarguer dans le surnageant de culture (Yang et al. 2012). Bien que le rôle des Tc toxines au cours de l'infection reste à élucider, Photorhabdus produit d'autres molécules actives contre le système immunitaire de l'insecte. Par exemple, la cyclomoduline Cif est capable de stimuler l'apoptose des cellules d'insectes (Chavez et al. 2010 ; Jubelin et al. 2009).

La rhabduscine, un produit amidoglycosyl et vinyl-isonitrile dérivé de la tyrosine, peut inhiber l'activité phénol-oxydase, une enzyme majeure du système immunitaire humorale de l'insecte (Crawford *et al.* 2012). La phénol-oxydase (ou PO) est présente sous forme de pro-phénoloxydase dans l'hémolymphe de l'insecte. Après infection, elle est clivée et devient active via une cascade sérine protéase, la PO étant le dernier composant de la cascade. Elle permet entre autre la mélanisation des corps étrangers en oxydant au départ des substrats phénoliques générant des produits quinones de vie courte qui sont ensuite transformés en polymère rigide à longue durée de vie : la mélanine. Bien que la rhabduscine soit retrouvée dans le surnageant de culture de *Photorhabdus* et que son rôle dans la virulence est avéré chez *Xenorhabdus*, une bactérie entomopathogène proche phylogénétiquement de *Photorhabdus*, son rôle chez *Photorhabdus* reste à élucider.

La deuxième composante humorale du système immunitaire de l'insecte est caractérisée par les peptides antimicrobiens. Le LPS de la bactérie a un rôle central dans la résistance aux peptides antimicrobiens. Des mutants dans l'assemblage et/ou de la production de l'antigène O du LPS ont montré son rôle dans la pathogénicité de la bactérie (Bennett et Clarke 2005). De même, le système à deux composantes PhoPQ présent chez *Photorhabdus* régule l'expression de l'opéron *pbgPE* impliqué dans l'ajout d'aminoarabinose sur le lipide A du LPS (Derzelle *et al.* 2004). Cette modification permet de modifier la charge externe de la membrane bactérienne permettant une résistance aux peptides antimicrobiens cationiques (Bennett et Clarke 2005).

Photorhabdus possède plusieurs parades pour résister au système immunitaire de l'insecte (modifications de la surface, production de molécules actives), ceci permet à la bactérie de se multiplier et de causer une septicémie responsable de la mort de l'insecte. Le génome de *Photorhabdus* est riche en gènes codant pour des molécules actives contre l'immunité innée (Duchaud *et al.* 2003 ; Crawford, Kontnik, et Clardy 2010) mais leurs fonctions sont redondantes ce qui rend leur étude et leur caractérisation complexe.

Introduction du sujet/Objectifs de la thèse

Photorhabdus luminescens est une bactérie entomopathogène avec un large spectre d'insectes. Elle vit en symbiose dans l'environnement avec un nématode du genre *Heterorhabditidae*. Le nématode chasse en quête de nouveaux hôtes insectes, une fois trouvés, il pénètre activement à travers la cuticule de ce dernier et relargue la bactérie *Photorhabdus* dans l'hémolymphe. Le cycle de vie complexe de cette bactérie nécessite une régulation fine et une adaptation à divers environnements hostiles, chaque ordre ayant des spécificités dans les molécules antimicrobiennes produites (différences entre les diptères, et les lépidoptères notamment, Voir III- introduction générale). Une fois dans l'insecte la bactérie est confrontée à deux types de défenses immunitaires : l'immunité cellulaire et l'immunité humorale.

Une des premières défenses de l'insecte après infestation est la mélanisation de corps étrangers suivi peu après par la production en masse de peptides antimicrobiens cationiques (CAMPS) (Haine et al. 2008). Photorhabdus doit pouvoir résister à ces antibactériens, et une des stratégies de résistance aux CAMPs est la modification du LPS. Cette variété de niche bactérienne nécessite une adaptation rapide et une des stratégies qui peut être privilégiée est le bet-hedging. Cette stratégie est retrouvée chez de nombreuses bactéries intracellulaires capables de faire de la variation de phase (Helaine et Holden 2013). Dans le cas des entérobactéries, l'hétérogénéité de la population clonale est généralement retrouvée que ce soit chez les pathogènes humains (S. Typhimurium), animaux (P. luminescens) ou encore de plantes (E. carotovora). L'analyse au laboratoire du profil de résistance de P. luminescens aux CAMPs a permis de mettre en évidence que les doses de CAMPs supportées par la bactérie étaient très élevées (> 250 μg/ml soit plus de 125 fois la dose inhibitrice, communément admise, de polymyxine B contre les entérobactéries (2 µg/mL)). Cependant d'autres données (Pagès et Givaudan, communication personnelle) ont montré que la résistance de P. luminescens n'était pas une propriété adoptée par toutes les bactéries qui compose la population la population sauvage. En effet, alors que la majeure partie de la population sauvage est sensible aux CAMPs une faible proportion (quelques clones) est capable de résister à des doses très élevées de CAMPs. Ces résultats ont mis en évidence la présence d'une sous-population résistante aux CAMPs dans la population sauvage. L'objectif général de mon travail de thèse a été de caractériser ces deux souspopulations sensibles et résistantes. Cependant certains points sur le régulon PhoP étaient à éclaircir avant d'aborder ce point.

L'histoire de ce sujet de thèse a démarré en 2004 lorsque Derzelle et al, ont montré le rôle du régulon PhoPQ dans la virulence de la bactérie dans l'insecte. La nouveauté de ces travaux est que c'était la première fois que ce TCS était identifié comme ayant un rôle clé dans la virulence chez une bactérie à cycle de vie extracellulaire dans un pathogène animal. En effet, la plupart des travaux

antérieurs sur PhoPQ avaient été réalisés sur des bactéries intracellulaires (*Salmonella, Yersinia*). Le système à deux composantes PhoPQ régule 3% du génome de *Salmonella* dont *pmrFHIJKLM* un analogue à *pbgPE* mais aussi *pagP*, *pagL* (cf II- introduction générale) en réponse à des stimuli extérieurs (Mg²⁺, CAMPs, pH acide). Chez *Photorhabdus*, PhoPQ permet la régulation des gènes *pbgPE* impliqués dans la modification du LPS. La majeure différence entre le régulon PhoPQ de *Salmonella* et de *P. luminescens* est que chez *Salmonella* la régulation des gènes *pbgPE* (ou *pmrHFIJKLM*) est indirectement régulé par PhoP via un deuxième système à deux composantes PmrAB (figure 8). PmrD est une petite protéine qui sert de connecteur entre les deux systèmes à deux composantes et permet de relayer l'activation de PhoP jusqu'à PmrAB. Chez *P. luminescens* aucun homologue ne code le système à deux composantes PmrAB, ni le connecteur PmrD. Cela pose la question du système de régulation des gènes impliqués dans la modification des gènes impliqués dans la modification de spère par PhoP est-elle directe comme chez *Y. pseudotuberculosis* (pas de gènes *pmrAB*) (Flamez *et al.* 2007), indirecte comme chez *Salmonella* ou y a t il un autre type de régulation? Deux questions ont donc été posées durant cette thèse :

1- Le régulon PhoPQ chez P. luminescens : comment est-il régulé, structuré ?

2- Quel mécanisme contrôle l'apparition de la sous-population résistante? Quel est le rôle biologique de cette sous-population *in vivo*?

P. luminescens appartient au genre *Photorhabdus* lui même proche d'un autre genre de bactérie entomopathogène : le genre *Xenorhabdus*. Chacun de ces deux genres est composé de plusieurs espèces de bactéries. *Photorhabdus* est composé de 4 espèces bactériennes dont *P. luminescens* à laquelle appartient notre bactérie (*P. luminescens* sous espèce laumondii TT01). Le genre *Xenorhabdus* est composé de 21 espèces (Tailliez *et al.* 2010) dont *X. nematophila* qui est l'espèce la plus décrite à ce jour. De précédents travaux (Abi Khattar 2009) ont mis en évidence la distribution de la résistance aux CAMPs chez différentes espèces de bactéries appartenant aux deux genres bactériens. Au vue de notre sujet et qu'une population résistante peut être subdivisée en plusieurs sous-populations cela amène à se poser la question suivante à savoir :

3- L'hétérogénéité des populations est-elle un phénomène conservé au sein des genres *Xenorhabus/Photorhabdus*?

Chapitre II : Analyse des souspopulations
I- Introduction

Initialement isolée à partir de son hôte nématode (stade IJ), P. luminescens est utilisé au laboratoire comme modèle d'étude de l'interaction bactérie-insecte. Lors de son passage dans l'insecte, la bactérie se retrouve en contact avec les CAMPs de l'insecte et résiste, mais elle peut également se multiplier dans l'hémolymphe (pour synthèse (Nielsen-LeRoux et al. 2012)). La caractérisation de l'interaction bactérie-insecte passe par l'étude de la résistance aux CAMPs et la description de ce mécanisme a permis de mettre en évidence l'existence d'une sous-population résistante aux CAMPs (Sylvie Pagès, Résultats non publiés). La première étape de ma thèse a donc été de caractériser in vitro cette sous-population résistante par rapport à la sous-population sensible par une approche descriptive. Bien qu'ayant un cycle de vie proche les bactéries Photorhabdus et Xenorhabdus sont très différentes d'un point de vue génétique, régulation des gènes et génomiques (Chaston et al. 2011). Actuellement, de nombreux critères phénotypiques et génétiques permettent de distinguer ces deux espèces bactériennes, mais cela n'a pas toujours été le cas ; en effet, P. luminescens étant initialement prénommée Xenorhabdus luminescens. Le genre Photorhabdus a été créé en 1993 par Boemare, Akhurst, et Mourant. Les différentes espèces sont classifiées grâce à l'analyse phénotypique (seul le genre Photorhabdus est luminescent), les analyses phylogénétiques par le séquençage de l'ARN 16S et de différents gènes du squelette génomique (Tailliez et al. 2010). Actuellement il existe 21 espèces décrites de Xenorhabdus et 4 espèces de Photorhabdus. La collection du laboratoire contient 272 souches de Xenorhabdus isolées à partir de nématodes du genre Steinernema, ainsi que 202 souches de Photorhabdus isolées à partir de nématodes du genre Heterorhabditis. Parmi les 4 espèces de Photorhabdus 3 ont principalement été décrites (P. temperata, P. asymbiotica et P. luminescens), la quatrième (P. heterorhabditis) n'ayant été identifiée que récemment (Ferreira et al. 2014). P. temperata est subdivisé en 4 sous espèces et P. luminescens en 6 sous-espèces dont P. luminescens subsp laumondii TT01, notre modèle d'étude. Ces deux espèces ont été isolées à partir de nématodes et seul P. asymbiotica a été isolé à partir de patients australiens et américains (respectivement P. asymbiotica subsp australis et P. asymbiotica subsp asymbiotica). Alors qu'elles n'étaient pas considérées comme symbiotique de nématodes, des souches de P. asymbiotica subsp australis ont été isolées à partir d'Heterorhabditis (Gerrard et al. 2006). De précédents travaux (Abi Khattar 2009), avaient déterminés la résistance aux CAMPs et la pathogénicité de 49 souches représentatives des genres Xenorhabdus et Photorhabdus. Cependant, cette étude utilisait uniquement la CMI comme critère de résistance, or ce critère ne permet pas d'observer de l'hétérogénéité des populations, nous avons donc réalisé des antibiogrammes afin

d'explorer l'hétérogénéité coloniale de la résistance de ces souches. Nous avons également estimé la proportion de bactéries résistantes dans certaines souches. La compilation de ces résultats a pour objectif de nous indiquer s'il existe une corrélation entre la présence de sous population résistante et la virulence chez l'insecte.

II- Matériels et Méthodes

Souches et conditions de culture

Les souches de *P. luminescens* (TT01, *phoP* et *pbgE*) sont cultivées à 28°C en LB. Le mutant *phoP* (Table 1 annexe) a été construit par Derzelle *et al* 2004. Le mutant *pbgE*, quant à lui a été construit par clarke et al 2005 et il est décrit en annexe table 1. Quand nécessaire les antibiotiques sont utilisés aux concentrations suivantes, polymyxine B 100 µg/mL, ciprofloxacine 1 µg/mL.

Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les CMI sont réalisées en plaque 96 puits avec une contenance maximale de 200 μ L par puits. On dépose dans tous les puits 100 μ L de LB, la polymyxine B est ajouté dans le premier puits (100 μ L) à une concentration finale de 250 μ g/mL, la colistine à 20 mg/mL, les cécropines A et B et la cécropine A isolée à partir de *Spodoptera frugiperda* à 50 μ g/mL, et diluée en cascade de puits en puits par un facteur deux. Les souches de *Photorhabdus* et *Xenorhabdus* sont ensemencées au 1/25 et mises en culture dans du LB à 28°C jusqu'à ce que la culture atteignent une DO comprise entre 0,6-0,8. Puis les cultures sont diluées par 1000 dans du LB et 100 μ L sont ajoutés à chaque puits de la plaque. Les plaques sont mises à pousser à 28°C et le résultat est contrôlé à 24 et 48 heures. Seuls les résultats à 48 heures sont indiqués ici. La CMI correspond à la concentration en CAMPs contenue dans le dernier puits ayant permis une croissance de la bactérie.

Antibiogrammes

Les souches de *Photorhabdus* et *Xenorhabdus* sont ensemencées au 1/25 et mises en culture dans du LB à 28°C jusqu'à ce que les cultures atteignent une DO comprise entre 0,6 et 0,8. Puis les cultures sont diluées par 1000 en Mueller Hinton dans un volume final de 1 mL. Des boites de Petri contenant du Mueller Hinton Agar (Biokar) sont inondées avec les 1 mL de la dilution au 1000ème et laissées reposer 5 minutes puis l'excédent est enlevé. Ensuite, deux disques de papiers stériles non imprégnés sont déposés sur les boites à distance suffisante du bord et du deuxième disque. 10 µL de

la solution mère de polymyxine B (50 mg/mL) sont déposés sur le premier disque et 10 μ L de polymyxine B diluée au 10ème sont déposés sur le second disque correspondant respectivement à 500 μ g et 50 μ g de polymyxine B finale. Les boites sont incubées 48 heures à 28°C.

Evaluation du pourcentage de bactéries résistantes par CFU

Les souches de *Photorhabdus* et *Xenorhabdus* sont cultivées en LB à 28°C jusqu'à une DO comprise entre 0,6 et 0,8. Une aliquote de culture est prélevée, lavée une fois en PBS (sans Ca²⁺ sans Mg²⁺) et diluée en LB. 100 μ L de la dilution souhaitée est étalée sur gélose nutritive (GNO) avec et sans polymyxine B 100 μ g/mL. Les boites sont ensuite incubées à 28°C. Au bout de 48 heures le nombre de colonies sur chaque boite est comptabilisé et le pourcentage de résistance est évalué en divisant le nombre de colonies dénombrées sur gélose nutritive (GNO) + polymyxine B divisé par le nombre de colonies dénombrées sur GNO, le tout multiplié par 100.

Evaluation du pourcentage de bactéries persistantes dans la population.

La souche P. *luminescens* TT01 a été ensemencée au 1/100ème dans du LB. En phase exponentielle (DO entre 0,7 et 0,8), un échantillon est prélevé, lavé dans du PBS (sans Mg²⁺ sans Ca²⁺) et étalé sur boite LB-Agar + pyruvate 0,1% et LB-Agar, pyruvate 0,1% et ciprofloxacine 2mg/mL (Somvanshi et al. 2012), ceci nous permettra d'avoir la valeur de référence du nombre de bactéries dans le milieu. Puis la ciprofloxacine est ajoutée à une concentration finale de 1µg/mL. Une aliquote est prélevée toutes les 30 minutes pendant 3 heures et étalée sur milieu LBA-pyruvate 0,1% et LBA-pyruvate 0,1%-ciprofloxacine 2 mg/mL. Les boites sont comptabilisées après 48 heures d'incubation. Le rapport du nombre de bactéries poussant sur LBA-pyruvate 0,1% après et avant l'ajout de la ciprofloxacine dans le milieu permet d'obtenir le pourcentage de bactéries persistantes. Ces expériences ont été réalisées en triplicats.

Bioessais de pathologie chez l'insecte

Les larves de *Spodoptera littoralis* sont élevées avec une photopériode de 12 heures sur un milieu artificiel à 24°C. Les stades larvaires L5 ont été sélectionnés pour les bio-essais et stérilisés dans de l'éthanol 70% (v/v) avant injection. Grâce à une seringue Hamilton des groupes de 20 larves sont injectés avec 10^3 CFU de bactéries en phase exponentielle de croissance dans un volume total de 20 µL. Les larves ainsi injectées ont été incubées pendant plus de 96 heures et la mortalité des insectes est dénombrée au cours du temps. Travaux réalisés par injection directe dans l'insecte *Spodoptera littoralis* (noctuelle) dans le cadre de la thèse de Z. Abi Khattar (Abi Khattar 2009).

Tableau 1 : Evaluation de la concentration minimale inhibitrice de plusieurs CAMPs sur la souche sauvage et deux mutants avirulents de *P. luminescens*.

Strains	MIC (µg/mL) (minimal inhibitory concentration)				
	colistin	Cecropin A	Cecropin B	Cecropin A (S. frugiperda)	polymyxine B
TT01	>10.000	>25	>25	>50	>250
<i>phoP</i> mutant	20	1.56	6.25	6-12	1-3
<i>pbgE</i> mutant	<20	7.8-15.5	3.9-7.8	6-12	0.2-0.5

III- Résultats et discussion

Mise en évidence de la sous population résistante.

La première étape de ce travail de thèse a tout d'abord été de reconfirmer les précédents résultats obtenus avec P. luminescens TT01 et de les enrichir avec de nouvelles souches. Ainsi, la concentration minimale inhibitrice de CAMPs a été évaluée sur la souche sauvage TT01 ainsi que sur deux mutants phoP et pbgE impliqués dans la modification du LPS par ajout d'un amino-arabinose au niveau du core du lipide A entrainant une modification globale de la charge bactérienne de négative à positive (Guo et al. 1997). Plusieurs CAMPs ont été testés : ceux existant chez les insectes comme les cécropines A et B (SIGMA) et de S. frugiperda et ceux produits par des bactéries comme la polymyxine B et la colistine (polymyxine E). Les CMIs envers les CAMPs ont été évalués (tableau 1). La souche sauvage TT01 résiste à de très fortes concentrations (>125 μ g/mL) de polymyxine B et les valeurs de résistance sont également élevées pour les autres CAMPs, alors que le mutant phoP voit sa croissance inhibée dès 1-3 µg/mL de polymyxine B ce qui en fait un mutant hypersensible. Il en est de même pour le mutant pbgE qui est inhibé entre 0,2 et 0,5 µg/mL de polymyxine B. Le profil est similaire pour les autres CAMPs, la souche sauvage est résistante à de très fortes doses et les mutants sont inhibés à de très faibles doses. La polymyxine B est un cyclopeptide cationique produit par la bactérie Bacillus polymyxa. La société française de microbiologie (SFM) a estimé que les bactéries à croissance rapide, parmi lesquelles on trouve les entérobactéries, étaient inhibées dès des concentrations de 2 µg/mL (Abi Khattar 2009), ce qui fait de TT01 une souche particulièrement résistante (plus de 75 fois plus résistante) alors que les mutants sont bien, quant à eux, dans la zone de sensibilité. Ces résultats confirment également les premiers résultats du laboratoire (Abi Khattar 2009 ; Pagès Sylvie). A la vue de ces résultats la souche sauvage TT01 apparait comme résistante, les mutants comme sensible (*pbqE*) ou à la limite (*phoP*) mais rien ne laissait supposer que la population de TT01 puisse être hétérogène.

Cependant, lorsque l'on réalise des antibiogrammes sur ces mêmes souches (figure 19 et article 2) on peut voir que le profil de résistance de la population sauvage est hétérogène et non pas homogène. En diffusant dans la gélose, la polymyxine B crée un gradient de concentration qui permet d'évaluer la résistance ou la sensibilité d'une bactérie envers un antibiotique. Pour la souche sauvage, quelques clones sont capables de pousser dans le halo d'inhibition de croissance de la polymyxine B. Cela signifie que seuls quelques clones sont réellement résistants à la polymyxine B alors que la majeure partie apparaît sensible. Pour les deux mutants sensibles *phoP* et *pbgE*, aucun clone n'est capable de



Figure 19 : Présence de deux sous-populations chez la souche sauvage TT01. Dans le cercle rouge : clone capable de pousser en présence de polymyxine B. Les quantités sur les figures correspondent à la dose de polymyxine B déposée sur le filtre au centre du halo.

pousser dans le halo d'inhibition ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par CMI et confirme la sensibilité globale de ces souches envers les CAMPs.

Persistance ou résistance ?

Le premier exemple qui vient à l'esprit lorsque l'on parle de résistance aux antibiotiques est la persistance bactérienne. La persistance est un état de dormance de la bactérie (Gefen et al. 2008; Moyed et Broderick 1986). Comme précisé en introduction, lorsque la bactérie se retrouve en présence d'antibiotique, la plupart de la population meurt excepté quelques bactéries qui résistent et survivent grâce à un arrêt de leur croissance. Il faut attendre le retrait de l'antibiotique du milieu pour que la croissance puisse reprendre. La résistance aux antibiotiques en revanche représente des bactéries capables de se multiplier et de se diviser en présence d'antibiotiques. La présence de colonies dans le halo d'inhibition de croissance de l'antibiogramme nous permet de dire que les bactéries sont bien capables de se multiplier en présence de CAMPs même à fortes concentrations (clones pouvant pousser près de la pastille où la concentration en polymyxine B est la plus forte). Nous avons également quantifié la persistance de TT01 liée à la présence de ciprofloxacine dans le milieu. La ciprofloxacine appartient à la classe des fluoroquinolones et cible les enzymes bactériennes comme l'ADN gyrase ou la topoisomérase IV empêchant ainsi la multiplication bactérienne. Nous avons choisi cet antibiotique et non des CAMPs pour évaluer la persistance car il a été montré chez les insectes que les CAMPs permettaient un contrôle des bactéries persistantes en les éliminant après infection (Haine et al. 2008). Lorsque la ciprofloxacine est ajoutée au milieu à une concentration finale de 1 µg/mL, on a pu estimer que le nombre de bactéries persistantes était de 0.09% ce qui représente un log de moins que le pourcentage de bactéries résistantes évalué dans la population sauvage de Photorhabdus (nb : 0,5% cf article 2) contre >0,15% et 0,003% de bactéries persitantes respectivement pour les formes M et P de P. luminescens (Somvanshi et al. 2012). En conclusion, nous avons bien un phénomène de résistance active d'une sous-population chez la souche P. luminescens TT01.

L'hétérogénéité phénotypique de la résistance chez Photorhabdus

Le tableau figure 20 regroupe toutes les données sur différentes souches de *Photorhabdus* prises au sein des 3 espèces les plus décrites. Plusieurs profils sont retrouvés au sein du genre *Photorhabdus*. Nous avons nommé 3 profils d'état bactérien (voir photos figure 20): le profil homogène sensible (S) lorsque le halo d'inhibition de croissance est sans clone (ex: mutant *phoP*, souche US3105/77), le profil homogène résistant (R) lorsque le tapis bactérien est au contact du filtre (souche AU9802397) et enfin le profil hétérogène (H) (souche Meg) lorsque l'on est dans la situation de TT01 à savoir il n'y

			СМІ	Antibiogramme	CFU	TL ₅₀ (heures)	
	SOUCHE	Nématode associé	Conc. μg/mL	500 µg	%R	S. littoralis	
XLNach	P.t.temperata	H. megidis	62.5-125 μg/mL	R	ND	175 h	Profil homogène sensible (S)
Meg	P.t.khanii	H. megidis	> 125 µg/mL	н	6.15%	42 h	UR ALAN JER
T327t	P.t.tasmaniensis	H. zealandica	>125 μg/mL	н	3.7%	ND	US 3105/77
CIP108428t	P.I.khayaii	H. bacteriophora	> 125 µg/mL	н	0.04%	40 h	
FRG04t	P.I.akhurstii	H. indica	> 125 µg/mL	н	0.73%	37 h	50µg 500µg
Hbt	P.I.luminescens	H. bacteriophora	> 125 µg/mL	н	0.19%	28 h	
Au9802892t	P.as.australis	Patients humains	>125 μg/mL	R	74.62%	49 h	Profil hétérogène (H)
US3105/77	P.as.asymbiotica	Patients humains	1 μg/mL	S	0%	120 h	Meg
AU9802336	P.as.australis	Patients humains	>250 µg/mL	Н	ND	49 h	
AUSN98-1	P.as.australis	Patients humains	>250 µg/mL	R	ND	ND	500 5000
AU 9802397	P.as.australis	Patients humains	>250 µg/mL	R	ND	26 h	Drafil homosine régister t (P)
US 1216/79	P.as.asymbiotica	Patients humains	>250 µg/mL	н	ND	ND	r rorn nomogene resistant (K)
US 2407/88	P.as.asymbiotica	Patients humains	>250 µg/mL	н	ND	ND	AU9802397
US 3265/86t	P.as.asymbiotica	Patients humains	>125 µg/mL	н	ND	33 h	
JP 163	P.as.asymbiotica?	Non identifié	>250 µg/mL	Н	ND	ND	50μg 500μg
JP 40	P.as.asymbiotica?	Non identifié	62.5-125 μg/mL	Н	ND	ND	

Figure 20: Hétérogénéité des populations au sein du genre *Photorhabdus*. Les résultats des antibiogrammes, CMI et CFU sont listés dans le tableau lorsqu'ils ont pu être déterminés (ND = non déterminé). %R désigne le pourcentage de bactéries résistantes à la polymyxine B évalué par CFU. TL₅₀ désigne le nombre d'heures nécessaire à la bactérie pour tuer 50% de larves de *Spodoptera littoralis*. Toutes les espèces de *Photorhabdus* sont en association avec un nématode du genre *Heterorhabditis* simplifié par la nomenclature *H*. dans le tableau. Les photos illustrent les trois types de profils retrouvés dans l'environnement. Les profils bactériens sont indiqués comme suit (S) profil homogène sensible, (R) profil homogène résistant et (H) profil hétérogène.

a que quelques clones dans le halo d'inhibition de croissance. Ces trois profils sont retrouvés chez Photorhabdus avec une majorité de souches à profil H, quatre souches à profil R et une seule à profil S. Il est intéressant de noter que la souche P. asymbiotica US3105/77 est la seule homogène sensible, or les souches de P. asymbiotica sont pathogènes pour l'homme et de plus, cette souche ne présente pas les régions impliquées dans la colonisation du nématode (Gaudriault et al. 2006). A l'inverse un autre isolat clinique (Au9802892t) a un profil R avec plus de 74% de la population qui résiste à la polymyxine B et une CMI >125µg/mL. La souche XLNach en revanche a un profil R avec une CMI entre 62.5 et 125µg/mL, or elle est complètement avirulente pour l'insecte S. littoralis et il a été montré que cette souche, comme la souche US3105/77, ne possédait pas non plus les régions impliquées dans la colonisation du nématode (Gaudriault et al. 2006). Tous les profils hétérogènes H ont des CMI élevés et des CFU entre 0,04% et 6%, avec des TL₅₀ proches de notre modèle d'étude P. luminescens TT01 à savoir 35 heures. Il est intéressant de noter que la souche P. luminescens khayaii CIP 108428t ne présente que 0,04% de bactéries résistantes à la polymyxine B et pourtant elle tue l'insecte avec une TL₅₀ proche de TT01 et présente un profil de CMI très résistant. Ainsi on peut voir qu'il suffit qu'une très faible proportion de la population sauvage soit résistante aux CAMPs pour induire tout le phénomène de pathogénicité chez Photorhabdus. On peut également établir une corrélation chez Photorhabdus entre résistance et virulence. En effet, hormis la souche XLNach de P. temperata (résistante et avirulente) qui apparait comme la seule exception dans ce crible de 16 souches de Photorhabdus, toutes les autres présentent une corrélation entre leur capacité à résister aux CAMPs et leur capacité à tuer l'insecte.

L'hétérogénéité phénotypique de la résistance chez Xenorhabdus

Plusieurs souches de *Xenorhabdus* ont également été testées au laboratoire, des souches décrites comme virulentes et d'autre comme avirulentes pour l'insecte (Tableau 2). Aucune souche ne présente de profil homgène R, elles sont soit à profil S soit à profil H. On peut voir que chez *Xenorhabdus*, il n'y a pas de corrélation entre hétérogénéité, pourcentage de résistants dans la population et virulence dans l'insecte. La souche de *X. bovienii CSO3* est avirulente pour l'insecte avec une CMI <1 µg/mL et 0% de sa population résistante aux CAMPs. En revanche, la souche *X. hominickii KRO1* a une CMI >125 µg/mL, 34% de sa population résistante à la polymyxine B mais elle est complètement avirulente pour l'insecte. De la même manière la souche de *X. bovienii Si* est virulente pour l'insecte avec une TL₅₀ de 27 heures, une CMI 125 µg/mL et seulement 0,18% de sa population résistante à la polymyxine B.

Alors que chez *Photorhabdus* 0,04% de bactéries résistantes suffisent à tuer l'insecte chez *Xenorhabdus* 34% de bactéries ne suffisent pas à être virulent pour l'insecte. Ceci rejoint les

Tableau 2: Hétérogénéité des populations au sein du genre *Xenorhabdus*. Les résultats des antibiogrammes, CMI et CFU sont listés dans le tableau. %R désigne le pourcentage de bactéries résistantes à la polymyxine B évalué par CFU. TL₅₀ désigne le nombre d'heures nécessaire à la bactérie pour tuer 50% des insectes. Ici les tests pathologiques ont été réalisés sur des larves de *Spodoptera littoralis*. Toutes les espèces de *Xenorhabdus* sont en association avec un nématode du genre *Steinernema* simplifié par la nomenclature *S*. Dans le tableau les profils bactériens sont indiqués comme suit (S) profil homogène sensible et (H) profil hétérogène.

			СМІ	Antibiogramme	CFU	TL ₅₀ (heures)
SOUCHE		Nématode associé	Conc. μg/mL	500 µg	%R	S. littoralis
KRO1	X.hominickii	S. sarii	>125 μg/mL	Н	34.76%	175
Q58t	X.beddingii	Steinernema sp	>125 μg/mL	Н	0.94%	175 h
VN01	Xenorhabdus sp.	S. sangi	>125 μg/mL	Н	0.04%	50 h
DSM16342	X.budapestensis	S. bicornutum	>125 µg/mL	S	0%	90 h
Si	X.bovienii	S. intermedium	>125 μg/mL	Н	0.18%	27 h
Q1	X.miraniensis	Steinernema sp	>125 μg/mL	Н	0.02%	175 h
PR06-A	X.romanii	S. puertoriconse	0.98 μg/mL	S	0%	175 h
CS03	X.bovienii	S. weiserii	0.98 μg/mL	S	0%	175 h
VC01	X.mauleonii	Steinernema sp	>125 μg/mL	н	6.81%	175 h
DSM17382	X.indica	S. thermophilum	>125 μg/mL	н	0.004%	60 h

conclusions de Duvic *et al.* 2012 qui suggère que les bactéries du genre *Xenorhabdus* auraient développées différentes stratégies afin de contourner les défenses humorales soit en augmentant leur résistance aux CAMPs soit en empêchant leur expression.

Conclusion

Le phénomène d'hétérogénéité observé chez TT01 est retrouvé conservé au sein des genres *Photorhabdus* et *Xenorhabdus*, en revanche la corrélation entre hétérogénéité et virulence chez l'insecte semble plus conservée chez *Photorhabdus*, contrairement au sein du genre *Xenorhabdus* où aucune corrélation n'a été mise en évidence. L'apparition de la sous-population résistante chez TT01 est dépendante de PhoP. En effet, le mutant *phoP* ne présente plus de clone dans le halo d'inhibition de croissance et les CMI des mutants confirment que le mutant *phoP* ne peut plus résister aux CAMPs. Ces résultats sont également cohérents avec les résultats publiés par Derzelle *et al* 2004. PhoP apparait donc comme un élément clé dans l'apparition de la sous population résistante.

Chez *Salmonella*, PhoP régule de nombreux gènes en plus des gènes de modification du LPS, en revanche chez *Photorhabdus*, le régulon PhoP a été très peu étudié. Afin de mieux comprendre et caractériser la sous-population résistante, nous avons entrepris de décrire plus en détail ce régulon (voir ci-dessous).

Chapitre III : Le régulon PhoP

I- Introduction

Chez les entérobactéries, de nombreux gènes sont importants pour la pathogénicité comme la capsule qui s'oppose à la phagocytose, les systèmes de captation des ions fer indispensables à la multiplication bactérienne, les adhésines avec le rôle prédominant des pili, les toxines comme les endotoxines, les entérotoxines et les cytotoxines et enfin les protéines de la membrane externe et le LPS permettant un échappement face aux molécules bactéricides présentes chez l'hôte (ex: complément chez l'homme, CAMPs chez l'insecte). Parmi cette dernière classe, on trouve un régulateur majeur de la modification du LPS décrit chez de nombreuses entérobactéries comme *Salmonella, Yersinia, E. coli* et *Erwinia* : le système à 2 composants : PhoPQ. Les approches globales de transcriptomique et protéomique ont permis de mettre en évidence de nombreux gènes comme étant directement ou indirectement régulé par PhoP. Le modèle le plus communément admis de régulon PhoP est le modèle *Salmonella/E. coli* avec PhoP régulant de manière indirecte les gènes de modification du LPS *pbgPE* via un second système à deux composantes PmrAB (voir figure 8). Or certaines exceptions au dogme ont été décrites, par exemple chez *Y. pseudotuberculosis* la régulation de *pbgPE* se fait de manière directe indépendamment de PmrAB (Flamez *et al.* 2007). Aussi, la question de quel type de régulation est retrouvé chez *Photorhabdus* se pose.

Chez Photorhabdus, aucune de ces approches globales n'a été publiée et le régulon PhoPQ reste peu décrit. Dans ce chapitre, plusieurs gènes candidats ont été testés pour définir leur appartenance au régulon PhoP. De précédents travaux du laboratoire utilisant des puces à ADN afin de comparer l'expression des gènes dans la population sauvage par rapport au mutant phoP avaient été réalisés (Gaudriault, communication personnelle). Cependant l'hétérogénéité de la population (voir Chapitre II) n'ayant pas été mise en évidence à cette époque, peu de résultats étaient reproductibles. Parmi les gènes différentiellement exprimés entre la souche sauvage et le mutant phoP (et donc dépendant de PhoP), le gène ail (Adhesion and invasion locus) était celui qui avait la plus forte différence d'expression (Gaudriault et Lanois, communication personnelle). Ail appartient à la grande famille de protéines Ail/PagC/OmpX. Initialement décrit chez Yersinia, Ail possède un rôle dans la virulence, l'attachement et l'invasion des cellules. Dans le génome de P. luminescens TT01 (Duchaud et al. 2003), deux paralogues d'ail sont retrouvés et nommés $ail1_{Pl}$ et $ail2_{Pl}$. Alors que le rôle de $ail1_{Pl}$ reste à élucider, ail2_{Pl} aurait un rôle dans la résistance au sérum lorsqu'il est exprimé chez E. coli (Mouammine et al. 2014). Comme c'est le cas pour pagC chez Salmonella (cf introduction générale page 16), pagC de Photorhabdus pourrait appartenir au régulon PhoP. Aussi nous avons démontré qu'au sein de la famille Ail/PagC de Photorhabdus, seul ail1_{Pl} appartenait au régulon PhoP en

revanche du point de vue biologique, seul $ail2_{Pl}$ semble avoir un rôle dans la résistance au sérum chez *Photorhabdus* alors que les rôles de $ail1_{Pl}$ et *pagC* restent à élucider (article 1).

Nous avons obtenu des résultats complémentaires en utilisant la même démarche sur d'autres gènes comme *pbgP* et *pbgE* qui correspondent au premier de chacun des deux groupes de gènes appartenant à l'opéron *pbgPE* (figure 8) et avaient été décrit comme PhoP-dépendant par Derzelle et al. 2004. Le mutant *pbgE* est notamment sensible à la polymyxine B et présente un défaut de colonisation des IJs et de virulence (Bennett et Clarke 2005). *pbgE1* est homologue au gène *pmrK* chez *Salmonella* qui joue un rôle dans la fixation de l'aminoarabinose sur le lipide A. Nous avons pu démontrer que ces deux gènes étaient également des marqueurs du régulon PhoP et grâce à ces marqueurs un inducteur du système PhoPQ chez *Photorhabdus* a pu être validé. Dans ce chapitre nous avons donc décrit, dans une première partie, un peu plus le régulon PhoP (recherche de marqueurs et de signaux inducteurs), puis, dans une seconde partie, nous avons présenté un exemple de régulation PhoP-dépendante en décrivant plus en détails le rôle et la régulation des gènes *ail* chez *Photorhabdus*.

II- Matériels et Méthodes

Souches et conditions de culture

Les souches de *P. luminescens* sont cultivées à 28°C en LB ou en milieu minimum M9 supplémenté de 0,1 % de casamino acides, 0,41 mM d'acide nicotinic, 9,1 mM de pyruvate de sodium, 0,2 % de glycérol et de 0,1 mM de CaCl₂. Quand nécessaire, les antibiotiques sont utilisés aux concentrations suivantes : kanamycine (Km) 20 µg/ml, polymyxine B 100 µg/ml.

Analyse du régulon PhoP par RT-qPCR

Les souches TT01 et *phoP* sont cultivées en LB à 28°C. Lorsque la DO atteint environ 0,4, une aliquote est prélevée et les ARN en sont extraits en utilisant le kit Qiagen RNeasy miniprep incluant un traitement à la DNAse. Pour chaque extraction l'ARN a été contrôlé par PCR sur le gène 16S afin d'évaluer sa contamination par de l'ADN. Sa qualité et sa quantité ont été évaluées par analyse sur un agilent 2100 bioanalyzer en utilisant les RNA 6000 nano lab chip kit et au spectrophotomètre nanodrop 2000 respectivement. Les RT-qPCR ont été réalisées comme précisé dans les articles 1 et 2. Les résultats présentent le rapport entre le mutant *phoP* et la souche sauvage.



Figure 21 : Alignement des protéines PhoP de plusieurs entérobactéries des genres *Salmonella* (Typhimurium, *indica*), *Yersinia* (*pestis*, *enterocolitica*), *Erwinia* et *Photorhabdus*. Les domaines importants de PhoP sont indiqués sur le schéma. Brièvement, en vert se trouve le site actif de PhoP avec la phospho-pocket et en jaune le domaine HTH de liaison à l'ADN. En position 52, les aspartates sont retrouvés conservés chez toutes les bactéries testées. Alignement par le logiciel MultiAlign, annotation des domaines NCBI.

<u>Construction des fusions P_{pbaPE}-gfp[AAV] et P_{pbaPE}-gfp[mut3]</u>

Des plasmides exprimant soit le gène rapporteur *gfp*[AAV] soit le gène *gfp*[mut3] correspondant respectivement à une GFP déstabilisée et à une GFP stable sous le contrôle du promoteur de *pbgPE* ont été construits en utilisant une méthode décrite dans l'article 2. Brièvement, un fragment de 198 pb en amont du gène *pbgPE* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN de TT01 en utilisant les amorces listées en annexe Table 2 contenant les amorces *Kpn*I et *Xba*I puis cloné dans les plasmides à partir des mêmes sites. Ces constructions ont été transférées par conjugaison dans les souches TT01 et *phoP*.

Recherche d'inducteurs du système

La souche TT01/P_{pbaPE}-gfp[mut3] a été cultivée dans une plaque 96 puits. Pour chaque puits une dilution au 1/1000 d'une culture overnight a été ajoutée soit au milieu LB supplémenté de Kanamycine et de différents inducteurs (ACP 2, 5, 10, 15, 20, 40 et 50 mM, acétate 20 mM, MgSO4 50 mM, KCl 50 mM, CuSO4 1mM, 2-2' dipyrydil 0.2 mM, EDTA 50 μM et glucose 1%). Soit en milieu minimum M9 supplémenté de Kanamycine et de MgSO4 à différentes concentrations (10 µM et 10 mM). Puis, la plaque est mise à incuber à 28°C pour 45 heures avec agitation dans un lecteur de microplaque Infinite (TECAN). L'absorbance à 600 nm et l'intensité de la fluorescence de la GFP (excitation à 485 ± 4.5 nm; émission à 520 ± 10 nm) sont mesurés toutes les 30 minutes. La fluorescence spécifique est obtenue en divisant les unités de fluorescence au maximum d'expression par la valeur de l'absorbance. Les résultats présentés ici ont été normalisés par rapport à la valeur de fluorescence spécifique obtenue en LB sans inducteur. Afin de savoir si certains inducteurs ont un effet sur la proportion de sous-population résistante, nous avons étalés la souche sauvage sur des milieux nutritifs avec ACP 50 mM ou 2'-2 dipyrydyl 0,2 mM et sur milieux nutritif avec ACP 50 mM ou 2'-2 dipyrydyl 0,2 mM + polymyxine B 100 µg/mL. Le même protocole a été réalisé sur des milieux minimum M9 supplémentés avec différentes concentrations en MgSO4 (inductrices 10µM et inhibitrices 10mM) avec et sans polymyxine B.

III- Résultats et Discussion

Conservation des protéines PhoPQ

Nous avons tout d'abord comparé les protéines PhoP et PhoQ entre plusieurs entérobactéries en utilisant les logiciels BLAST de MAGE et NCBI. En effet, des divergences ou des ressemblances



Figure 22 : Alignement des protéines PhoQ de plusieurs entérobactéries des genres Salmonella Typhimurium, Yersinia (pestis, enterocolitica, enterocolitica subsp paleartica), Erwinia et Photorhabdus. Les domaines importants de PhoQ sont indiqués sur le schéma. Brièvement, En marron se trouve le domaine senseur de PhoQ et en jaune le domaine Histidine kinase avec en rouge l'histidine conservée essentielle à la transmission du signal à PhoP. Alignement par le logiciel MultiAlign, annotation des domaines NCBI.

pourraient nous orienter vers une meilleure compréhension du fonctionnement de la protéine et une meilleure appréhension de son régulon (figure 21 et 22). En ce qui concerne la protéine PhoP, il y a respectivement 70%, 73%, 74% et 68% d'identité de séquence protéique entre PhoP de *Photorhabdus* et PhoP des *Salmonella* (Typhimurium et *indica*), *Y. enterocolitica, Y. pestis,* et *Erwinia*. Les régions les plus conservées sont la région N-terminale qui contient un site de phosphorylation très conservé parmi toutes ces entérobactéries et l'environnement de ce site est aussi conservé (partie verte figure 21). De même la région de dimérisation est conservée entre les protéines. En revanche la partie C-terminale est plus divergente, sans doute du fait de cibles différentes selon les espèces bactériennes observées.

Pour PhoQ, on trouve 57%, 69%, 68% et 63% d'identité de séquence protéique respectivement entre PhoQ de *Photorhabdus* et celui de *S*. Typhimurium, *Y. pestis, Y. enterocolitica* et *Erwinia*. Contrairement à PhoP, dans le cas de PhoQ, c'est la partie C-terminale qui est la plus conservée entre les différentes espèces alors que la partie N-terminale est divergente (figure 22). Ceci peut s'expliquer par la forte complémentarité entre PhoQ et son partenaire PhoP. En effet, la spécificité entre les partenaires permet d'éviter tout-cross talk entre plusieurs systèmes à deux composantes (Podgornaia et Laub 2013). En revanche les parties N-terminale contenant le domaine senseur sont plus différentes. Ceci peut s'expliquer par la variété de signaux inducteurs que chaque protéine peut sentir. Cependant à l'heure actuelle il a été démontré que les CAMPs, le Mg²⁺, et le pH acide étaient des inducteurs du système chez *Salmonella* (Groisman 2001), *Yersinia* (Flamez *et al.* 2007), seul le Mg²⁺ a été montré comme étant un inducteur de PhoPQ chez *Photorhabdus* (Derzelle *et al.* 2004 ; Mouammine *et al.* 2014). L'hypothèse la plus probable est que les signaux identifiés sont les mêmes car ils seraient généralistes ou encore parce qu'ils fonctionnent mieux *in vitro* qu'*in vivo*, mais il est fort probable (notamment pour *Photorhabdus*) qu'il reste plusieurs signaux à découvrir qui pourraient varier d'une espèce à une autre selon leur mode de vie et leurs niches écologiques.

Caractérisation de gènes marqueurs appartenant au régulon PhoP

Les ARN prélevés sur des cultures de TT01 et *phoP* en début de phase exponentielle ont été purifiés et l'expression de gènes candidats a été comparée par RT-qPCR (figure 23). Comme attendu (du fait de la présence de l'interposon), l'expression de *phoP* est complètement abolie dans le mutant *phoP*. De la même façon, *pbgP* est 100 fois moins exprimés dans le mutant *phoP* par rapport à TT01. *pbgE*, *ail1*_{Pl} et *ail2*_{Pl} sont respectivement 5 fois moins, 15 fois moins et équivalent dans leur expression. Nous confirmons que *pbgP*, *pbgE* (Derzelle et al. 2004) et *ail1*_{Pl} (Mouammine *et al.* 2014) sont bien des gènes PhoP-dépendant. Il apparait que l'expression de *pbgE*. Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat



Figure 23 : Identification des gènes PhoP-dépendants par RT-qPCR. Les données présentent l'expression des gènes dans le mutant *phoP* et dans la souche sauvage. Les écarts types représentent les triplicats techniques. Les résultats significatifs (p value <0.05) sont annotés avec un astérisque (*). Les résultats et l'analyse statistique ont été traités par le logiciel ROCHE.

serait la présence d'un promoteur en amont de *pbgE* (après le dernier gène de *pbgP* : *pbgP4* et avant le premier gène de *pbgE* : *pbgE1* ; voir régulon figure 8) et indépendant de PhoP. La régulation PhoPdépendante de *pbgE1* quand à elle sera dû au polycistron de 7 gènes permettant de transcrire l'ensemble de l'opéron *pbgP* et *pbgE*. La régulation d'*ail2*_{Pl} en revanche semble indépendante de PhoP chez TT01. Aussi, *ail1*_{Pl} et *pbgP* sont de bons marqueurs du régulon PhoP.

Les inducteurs du système PhoPQ chez Photorhabdus.

Nous avons choisi de suivre la dynamique de l'expression de pbgPE au cours du temps en présence de plusieurs inducteurs différents. En effet, alors que le Mg²⁺, le pH acide et les CAMPs ont été décrits comme des inducteurs chez Salmonella, les seules données actuelles chez P. luminescens sont les travaux de Derzelle et al 2004 qui montrent que pbqP et phoP ont une expression dépendante du Mg²⁺ et que *phoP* répond aussi au Ca²⁺ comme cela a été démontré chez Salmonella. Afin de pouvoir tester d'autres inducteurs du système, nous avons construits deux fusions transcriptionnelles, une entre le promoteur de l'opéron *pbgPE* et une GFP stable (*gfp*[mut3]), une entre le même promoteur et une GFP déstabilisée (gfp[AAV]) avec une demi-vie de 30 minutes chez E. coli. L'avantage d'une GFP instable par rapport à une GFP stable est que cela permet de suivre l'activation du promoteur des gènes de résistance au cours du temps et donc d'avoir un suivi dynamique. Cependant, avec les fusions instables, le signal était trop faible pour pouvoir être détecté au microfluoromètre (cf chapitre IV. en relation avec le faible nombre de cellules fluorescentes), c'est pourquoi nous avons utilisé une GFP stable qui va permettre de cumuler le signal GFP (figure 24). Nous avons testés plusieurs inducteurs comme l'acétyl-phosphate qui permet une activation de PhoP indépendamment de PhoQ, l'acétate qui appartient à la voie de biosynthèse de l'acétyl-phosphate (ACP), le MgSO4, le KCl, et le CuSO4 tous produisant des cations divalents or plusieurs cations divalents activent PhoP chez Salmonella (Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺), l'EDTA qui va complexer les cations divalents du milieux de culture, le 2-2'-Dipyridyl qui complexe les ions Fe³⁺ du milieux (le Fe³⁺ est le signal d'activation de pbgPE via PmrAB chez Salmonella), et enfin le glucose 1% (figure 24).

Nous avons également testé des concentrations sub-optimales de polymyxine B (concentrations testées : de 1,25 µg/mL à 0,08 µg/mL). Cependant les expériences étaient peu reproductibles (la valeur de concentration sub-optimale variant entre chaque expérience). On a pu néanmoins observer que les concentrations sub-optimales de polymyxine B n'augmentaient pas le signal de fluorescence. Seuls quelques inducteurs sortent du lot avec un facteur de multiplication du signal de fluorescence par environ 2. On retrouve l'ACP 50 mM, le 2'-2 dipyrydyl 0,2 mM et le MgSO4 10 μ M. En revanche le MgSO4 10 mM diminue le signal GFP par environ 5 (figure 24). Afin de savoir si les inducteurs sélectionnés ont un effet sur la proportion de sous-populations résistantes, nous avons réalisés des



Figure 24 : Recherche d'inducteurs du régulon PhoPQ. L'expression du promoteur *pbgPE* fusionné à la GFP dans la souche TT01 a été mesurée en présence de différents inducteurs dans le milieu LB (sauf pour l'encadré rouge où le milieu utilisé est le milieu minimal M9). Les résultats présentent un ratio d'augmentation ou de diminution du signal dans la condition avec inducteur par rapport à la condition sans inducteur (LB seul) calculé à partir du pic d'expression de chaque condition. Expériences réalisées en triplicat.

CFU sur des milieux en présence d'un inducteur et avec ou sans polymyxine B. Le 2'2- dipyrydyl n'a pas donné de résultat car il a un effet négatif sur la croissance bactérienne sur boite et l'effet de l'ACP sera discuté dans le chapitre IV. Les résultats MgSO4 ont été confirmés par RT-qPCR où on observe une augmentation de la transcription des gènes à 10 μ M de MgSO4 par rapport à 10 mM (voir article 2). Cela confirme que le MgSO4 est bien un inducteur du système PhoPQ et le seul identifié chez *Photorhabdus* parmi toute la liste d'inducteurs testés. Ce résultat est analogue à ce qui a déjà été découvert chez les autres entérobactéries (*Salmonella, Yersinia, E. coli*).

Un exemple de régulation PhoP-dépendant : le cas de *ail1*_{Pl} (Article 1)

Article 1 :

Ail and PagC-related proteins in the

entomopathogenic bacteria of

Photorhabdus genus

PLOS ONE

Ail and PagC-related proteins in the entomopathogenic bacteria of Photorhabdus **genus** --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-14-32796R1				
Article Type:	Research Article				
Full Title:	Ail and PagC-related proteins in the entomopathogenic bacteria of Photorhabdus genus				
Short Title:	Ail/PagC proteins in Photorhabdus				
Corresponding Author:	Sophie Gaudriault Institut National de la Recherche Agronomique, Université Montpellier 2 Montpellier Cedex 05, FRANCE				
Keywords:	Ail; PagC; PhoPQ; serum resistance; duplication; Photorhabdus				
Abstract:	Among pathogenic Enterobacteriaceae, the proteins of the Ail/OmpX/PagC family form a steadily growing family of outer membrane proteins with diverse biological properties potentially involved in virulence such as human serum resistance, adhesion and entry into eukaryotic culture cells. We studied the proteins Ail/OmpX/PagC in the bacterial Photorhabdus genus. The Photorhabdus bacteria form symbiotic complexes with nematodes of Heterorhabditis species, associations which are pathogenic to insect larvae. Our phylogenetic analysis indicated that in Photorhabdus asymbiotica and Photorhabdus luminescens only Ail and PagC proteins are encoded. The genomic analysis revealed that the Photorhabdus ail and pagC genes were present in a unique copy, except two ail paralogs from P. luminescens. These genes, referred to as ail1PI and ail2Pl, probably resulted from a recent tandem duplication. Surprisingly, only ail1P expression was directly controlled by PhoPQ and low external Mg2+ conditions. In P. luminescens, the magnesium-sensing two-component regulatory system PhoPQ regulates the outer membrane barrier and is required for pathogenicity against insects In order to characterize Ail functions in Photorhabdus, we showed that only ail2Pl and pagCPl had the ability, when expressed into Escherichia coli, to confer resistance to complement in human serum. However no effect in resistance to antimicrobial peptide was found. Thus, the role of Ail and PagC proteins in Photorhabdus life cycle is				
Order of Authors:	Annabelle Mouammine				
	Anne Lanois				
	Sylvie Pagès				
	Bénédicte Lafay				
	Virginie Molle				
	Marc Canova				
	Pierre-Alain Girard				
	Bernard Duvic				
	Alain Givaudan				
	Sophie Gaudriault				
Suggested Reviewers:	David Clarke University College Cork, Ireland david.clarke@ucc.ie specialist of Photorhabdus and of gene regulation in this genus				
	Guy Condemine Université Lyon 1, France guy.condemine@insa-lyon.fr specialist of :- bacteria interacting both with plant and insects- of the PhoPQ regulon				

Ail and PagC-related proteins in the entomopathogenic bacteria of *Photorhabdus* genus 1 2 Annabelle Mouammine^{1,2}, Anne Lanois^{1,2}, Sylvie Pages^{1,2}, Bénedicte Lafay^{3,4}, Virginie 3 Molle⁵, Marc Canova⁵, Pierre-Alain Girard^{1,2}, Bernard Duvic^{1,2}, Alain Givaudan^{1,2}, Sophie 4 Gaudriault^{1,2}# 5 6 ¹ INRA, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), 7 8 Montpellier, France ² Université Montpellier 2, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-9 Insectes (DGIMI), Montpellier, France 10 ³ Université de Lyon, Écully, France 11 ⁴ CNRS, UMR5005 - Laboratoire Ampère, École Centrale de Lyon, Écully, France 12 ⁵Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, 13 Universités de Montpellier 2 et 1, CNRS, UMR 5235, Montpellier, France 14 15 Short title: Ail/PagC proteins in Photorhabdus 16 17 Key words: Ail; PagC; PhoPQ; serum resistance; duplication; *Photorhabdus* 18 19 #Corresponding Author: Sophie Gaudriault, INRA, UMR Diversité, Génomes et 20 Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), Université Montpellier 2, CC 54, 34095 21 Montpellier Cedex 05, France; tel: +33 4 67 14 48 12, fax: +33 4 67 14 42 99; e-mail: 22 sgaudriault@univ-montp2.fr 23

24

25 Abstract

26 Among pathogenic Enterobacteriaceae, the proteins of the Ail/OmpX/PagC family form a steadily growing family of outer membrane proteins with diverse biological properties, 27 potentially involved in virulence such as human serum resistance, adhesion and entry into 28 eukaryotic culture cells. We studied the proteins Ail/OmpX/PagC in the bacterial 29 Photorhabdus genus. The Photorhabdus bacteria form symbiotic complexes with nematodes 30 of Heterorhabditis species, associations which are pathogenic to insect larvae. Our 31 phylogenetic analysis indicated that in Photorhabdus asymbiotica and Photorhabdus 32 luminescens only Ail and PagC proteins are encoded. The genomic analysis revealed that the 33 *Photorhabdus ail* and *pagC* genes were present in a unique copy, except two *ail* paralogs 34 from *P. luminescens*. These genes, referred to as $ail1_{Pl}$ and $ail2_{Pl}$, probably resulted from a 35 recent tandem duplication. Surprisingly, only *aill*_{Pl} expression was directly controlled by 36 PhoPQ and low external Mg²⁺ conditions. In *P. luminescens*, the magnesium-sensing two-37 component regulatory system PhoPQ regulates the outer membrane barrier and is required for 38 pathogenicity against insects. In order to characterize Ail functions in Photorhabdus, we 39 showed that only ail_{Pl} and $pagC_{Pl}$ had the ability, when expressed into *Escherichia coli*, to 40 confer resistance to complement in human serum. However no effect in resistance to 41 antimicrobial peptides was found. Thus, the role of Ail and PagC proteins in *Photorhabdus* 42 life cycle is discussed. 43

44

45

46 Introduction

47

Various surface-exposed components present in the outer leaflet of the outer membrane play a 48 49 crucial role in Gram-negative bacteria survival. Surface components have a dual role in virulent bacteria, first as factors maintaining the proper architecture of the outer membrane 50 and as virulence factors [1]. About 50% of the outer membrane mass of Gram-negative 51 bacteria consists of proteins, either lipoproteins that are anchoring the outer membrane to the 52 underlying peptidoglycan or, integral membrane proteins [2]. The hallmark of integral outer 53 membrane proteins is the folding into anti-parallel β -barrels [2,3]. The most abundant integral 54 membrane proteins of the bacterial outer membrane are porins, which are essentially trimeric 55 56 β -barrels (16 or 18 β -strands) forming channels with various grades of selectivity [3]. Other 57 barrel proteins having monomeric structure and fewer strands have been investigated, most displaying a specific function not related to the diffusion of hydrophilic molecules [3]. 58

59 The family of related outer membrane proteins Ail/OmpX/PagC belongs to the latter category and was initially described in organisms like Yersinia enterocolitica and Yersinia 60 pseudotuberculosis (Ail), Salmonella Typhimurium (Rck, PagC), Escherichia coli (OmpX, 61 Lom) and *Enterobacter* (OmpX) [4]. These proteins display small size (from 15 to 18 kDa) 62 and fold in eight β -barrels. Moreover, the Ail/OmpX/PagC proteins appear to be important for 63 virulence by neutralizing host defense mechanisms. Ail from Y. enterocolitica promotes 64 adhesion to and entry into eukaryotic tissue culture cells [5,6]. PagC from S. Typhimurium is 65 responsible for survival in macrophages [7,8]. OmpX from *Enterobacter aerogenes* induces a 66 β -lactam resistance mediated by a decrease in the porin production [9]. Lom from 67 bacteriophage λ participates in *E. coli* adhesion to human buccal epithelial cells [10]. 68 69 However, clear separation of functions between the different members of the Ail/OmpX/PagC

family is not obvious. Indeed, Ail from *Y. enterocolitica* [5,6,11] and from *Yersinia pestis*[12], Rck from *S.* Typhimurium [6], PagC from *S. enterica* serovar Cholerasuis [13] are
responsible for conferring resistance to complemented-mediated killing, but this property is
not shared by PagC from *S.* Typhimurium, OmpX from *E. cloacae* or Lom from *E. coli* [6].
This discrepancy is probably due to gene annotation, which does not rely on an exhaustive
phylogenetic analysis.

The expression of genes encoding outer membrane proteins has been found to be under a 76 complex transcriptional regulation, acting as an adaptive response toward environmental 77 physical attack of cell integrity. Modulation of expression of abundant outer membrane 78 79 proteins such as porins are generally transcriptionally regulated by the two-component 80 regulatory system OmpR-EnvZ and small RNAs [14]. Regulatory pathways controlling the expression of genes encoding proteins from the Ail/OmpX/PagC family have been elucidated 81 in some Gram-negative bacteria, but there is no convergence towards a common pathway. For 82 instance, in Y. enterocolitica 8081, ail is regulated by temperature [15]. By contrast, ail from 83 Y. enterocolitica O:9 is not subjected to thermoregulation but is under the control of the 84 OmpR transcription factor [16]. *ompX* is regulated by a small RNA in S. Typhimurium [17]. 85 The regulation of *pagC* is under the control of the two-component system PhoP-PhoQ 86 through SlyA in S. Typhimurium [18]. This PhoPQ system has been extensively studied in 87 bacteria and especially in S. Typhimurium, in which the response regulator PhoP regulates 88 about 3% of Salmonella genes, subdivided into the PhoP-activated genes, pag, and the PhoP-89 90 repressing genes, prg [19]. In a variety of Gram-negative bacterial pathogens, numerous PhoP-regulated genes encode enzymes involved in LPS modifications [20-23], as well as 91 several secreted and outer membrane proteins [24]. 92

93

94 Photorhabdus (Enterobacteriaceae) is an insect pathogen living in a symbiotic association
with entomopathogenic nematodes Heterorhabditis [25]. Heterorhabditis bacteriophora 95 nematodes invade insect larvae and regurgitate bacteria from their gut directly into the 96 hemolymph, the insect blood [26]. The bacteria overcome the insect immune system and 97 colonize the insect body cavity leading to lethal septicemia [25]. Bacterial virulence factors 98 and insecticidal toxins also participate to the insect death [27,28]. Once the insect host is 99 dead, bacteria bioconvert the tissues and the nematode partner feeds off the bacteria while 100 nematode reproduction occurs through several generations [29]. Photorhabdus also 101 102 successfully competes with saprophytic scavenging organisms. It produces antimicrobial factors in order to kill any invading and competing microbes [25]. Several rounds of 103 104 nematode reproduction and bacterial replication lead to a new generation of infective juvenile (IJ) nematodes. Photorhabdus bacteria colonize specifically the posterior-intestinal cells of 105 the maternal adult nematode before re-associating with the new IJ [30,31]. The dual 106 107 requirement for symbiosis and virulence makes Photorhabdus an excellent model organism for studying host-bacteria interactions. The genus Photorhabdus comprises four distinct 108 109 species: Photorhabdus temperata, Photorhabdus luminescens, Photorhabdus heterorhabditis 110 and Photorhabdus asymbiotica [32]. Although all four are highly pathogenic to insects, P. asymbiotica also causes infection in humans [33-35]. 111

112 In an attempt to identify host-interacting bacterial proteins, we were interested in proteins from the Ail/OmpX/PagC family of Photorhabdus genus. Duchaud et al. [36] already 113 described three Ail-like homologs in P. luminescens strain TT01. Thus, we exhaustively 114 searched for proteins from the Ail/OmpX/PagC family encoded in the genomes of P. 115 luminescens strain TT01 [36] and P. asymbiotica strain ATCC43949 [37]. Analysis of 116 Ail/OmpX/PagC phylogeny supports a robust annotation showing that the *Photorhabdus* 117 genus only encodes Ail and PagC orthologs. Then, we present the first detailed investigation 118 into the role and the regulation of Ail and PagC proteins from *Photorhabdus*. 119

121 Material and Methods

122

123 Bacterial strains, plasmids, primers and growth conditions

124 The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. All primers used in this study (Eurogentec) are listed in Supplemental Table 1. Photorhabdus and Escherichia coli strains 125 were routinely grown at 28°C and 37°C, respectively, in Luria-Bertani (LB) broth or on LB 126 solid medium. Photorhabdus was grown in M9 liquid medium with concentrations of MgSO₄ 127 (10 µM and 10 mM) and supplemented with 0.1 % casamino acids, 0.41 mM nicotinic acid, 128 9.1 mM sodium pyruvate, 0.2 % glycerol and 0.1 mM CaCl₂. When required, antibiotics were 129 used at the following final concentrations: kanamycin (Km) 20 µg/ml, gentamicin (Gm) 30 130 μ g/ml, ampicillin (Ap) 100 μ g/ml. 131

132

133 Inference of the evolutionary relationships of Ail, PagC and OmpX-related proteins

Ail, PagC or OmpX annotated proteins in Photorhabdus luminescens TT01 (plu1967, 134 plu2480, plu2481) and Photorhabdus asymbiotica ATCC43949 (PAU 02047 and 135 PAU 02601) were identified and retrieved using the protein family analysis tool PipeAlign 136 [38]. Outputs were pooled and resulting dataset were curated for protein multiple occurrences. 137 138 The sequences were aligned using ClustalW [38] followed by manual curation. The sequence alignment was generated by Gblocks [39] and unambiguously aligned amino acid sites were 139 retained for phylogeny inference using the maximum likelihood method implemented in 140 141 PhyML [40]. Analyses were engendred under the LG model of amino acid replacement [41] with a gamma distribution of evolutionary rates across sites [42]. Internal branch supportswere evaluated using the approximate Likelihood Ratio Test [43].

144

145 Molecular techniques and RNA preparation

146

DNA manipulations were carried out as previously described [44]. Plasmids were introduced 147 into E. coli WM3064 (Table 1) by transformation and transferred to P. luminescens TT01 by 148 149 filter mating [45]. All constructs were sequenced by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Total RNA was extracted with TRIzol reagent according to manufacturer's 150 instructions (Invitrogen) and purified using RNeasy miniprep kit (Qiagen), including a DNase 151 I treatment step. For each RNA preparation, we assessed DNA contamination by carrying out 152 a control PCR. The quantity and quality of RNA were assessed with a NanoDrop 2000 153 spectrophotometer (Thermo Scientific) and an Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 154 Nano LabChip kit (Agilent), respectively. Material for real-time quantitative polymerase 155 chain reaction (RT-qPCR) analysis was prepared by extracting total RNA from the 156 157 *P. luminescens* wild-type strain and the *phoP* mutant grown in Luria broth ($OD_{540}=0.5-0.8$). The gene expression level was evaluated during the growth phase. 158

159

160 Real-time quantitative polymerase chain reaction analysis

161

162 RT-qPCR was performed in two steps. First, the cDNA was synthesized from 500 ng of total 163 RNA, with Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random hexamers 164 (100 ng/ μ l) (Applied Biosystems). We then carried out qPCR in triplicate with the 165 LightCycler 480 SYBR Green I Master kit from Roche Diagnostics, with 1 μ l of cDNA

synthesis mixture (diluted 1:100) and 1 µM of specific primers for the genes studied 166 (Supplemental Table 1). The enzyme was activated by heating for 10 min at 95°C. All gPCRs 167 were performed in three technical replicates, with 45 cycles of 95°C for 5 seconds, 60°C for 5 168 seconds and 72°C for 10 seconds, and were monitored with the Light Cycler 480 system 169 (Roche). Melting curves were analyzed for each reaction and each curve contained a single 170 peak. The data for each sample were expressed relatively to the expression level of gyr, using 171 REST software 2009 [46] as previously described [47]. This method provided a relative 172 quantification of the target gene expression with respect to a reference gene (gyrB). 173

- 174
- 175

176 Overexpression and purification of PhoP recombinant protein

177

178 The entire coding region of *phoP* gene from TT01 strain was amplified by PCR and digested by NdeI and BamHI. The obtained PCR product was ligated into the same site of the 179 expression vector, pETPhos [48] inserting a His-tag in the N-terminal part of PhoP thus 180 181 generating the plasmid P_{T7}PhoP-His. The recombinant plasmid encoding a PhoP-His fusion protein was transformed into E. coli BL21 (DE3) pLysS cells. At an OD between 0.5-0.8, the 182 expression of PhoP-His was induced by adding Isopropyl-beta-D-thiogalactoside at 0.5 mM. 183 An overnight induction was then performed at 18°C. Bacterial culture was centrifuged at 184 7,000 x g for 15 min at 4°C and washed twice in resuspension buffer (Tris 5 mM pH 7.5, 185 NaCl 300 mM, glycerol 10 %, Imidazole 10 mM). The pellet was frozen at -80°C for 30 min, 186 then suspended in 5 ml resuspension buffer and lysed by sonication during 10 min at 4°C. 187 Lysis products were centrifuged at 10,000 x g during 30 min at 4°C. Five hundred µl of pre-188 189 equilibrated beads of Ni-NTA agarose (Qiagen) in wash buffer (Tris 5 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, glycerol 10 %, Imidazole 15 mM) were added to the supernatant fraction and 190

incubated during 45 min with shaking at 4°C. The fraction was centrifuged at 500 x g during
2 min at 4°C and wash 5 times with wash buffer. Protein was eluted twice in 1 ml elution
buffer (Tris 5 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, glycerol 10%, Imidazole 200 mM). Concentration
of recombinant protein was assessed by Bradford assay and controlled by SDS-PAGE gel.
Recombinant proteins were conserved at -80°C until use.

196

197 Electrophoretic mobility-shift assays

198

The promoter of aill_{Pl} was PCR-amplified from the genomic DNA of TT01 strain using 199 specific primers (Supplemental Table 1) and purified using the High Pure PCR Product 200 Purification kit (ROCHE). The 5' ends of DNA fragment were labeled using $[\gamma^{-32}P]$ ATP and 201 T4 polynucleotide kinase (Promega). Radioactive DNA probe (2000 cpm/ml), 200 ng of 202 203 poly(dI-dC)-poly(dI-dC) (SIGMA) and different amounts of PhoP-His were mixed with binding buffer (50 mM tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 50 µg/ml BSA) in a total 20 µl volume 204 205 and incubated for 20 min at room temperature. The mixture was then loaded onto a native 206 6 % (w/v) polyacrylamide TBE precast Gel (Invitrogen) and electrophoresed in 1 % TBE (Tris-Borate-EDTA) buffer for 1 h at 100 V. Radioactive species were detected by 207 autoradiography. PhoP-His was activated by in vitro phosphorylation with acetyl phosphate 208 209 as previously described [49].

210

Construction of plasmids expressing *gfp*[AAV] under the control of *ail1*_{Pl} or *ail2*_{Pl} promoters

Plasmids expressing the reporter gene gfp[AAV] under the control of $ail1_{Pb}$, $ail2_{Pl}$ or *lac* gene promoters were constructed using a previously described method [50]. The construction of

P_{*lac-gfp*[AAV] has been described elsewhere [51]. Briefly, DNA fragments located upstream from *ail1*_{Pl} (360 bp) *and ail2*_{Pl} (358 bp) were amplified by PCR from *P. luminescens* TT01 genomic DNA with primers containing the *Eco*RI and *Bam*HI restriction site (Supplemental Table 1). The PCR products were *Eco*RI- and *Bam*HI-hydrolyzed and inserted into the corresponding sites of pPROBE-*gfp*[AAV]. Finally, P_{*lac-gfp*[AAV], P_{*ail1Pl-gfp*[AAV], P_{*ail2Pl-gfp*[AAV] were transferred by filter bacterial mating [45] in *P. luminescens* TT01 wild type and *phoP* strains.}}}}

223

Quantification of *ail1*_{Pl} and *ail2*_{Pl} expression in bacterial populations grown in different media

226

Wild-type strains carrying either $P_{ail/Pl}-gfp[AAV]$, $P_{ail/Pl}-gfp[AAV]$ or $P_{lac}-gfp[AAV]$ 227 228 constructs were cultured in black-sided, clear-bottomed 96-well plates (Greiner). For each well, a 1:20 dilution of an overnight culture was added to the M9 minimal medium 229 supplemented with kanamycin and different concentrations of MgSO4 or to LB medium 230 supplemented with kanamycin. Then, the plates were incubated at 28°C for 45 h with shaking 231 on an orbital shaker, in an Infinite M200 microplate reader (Tecan). Absorbance at 600 nm 232 and GFP fluorescence intensity (excitation at 485 ± 4.5 nm; emission at 520 ± 10 nm) were 233 measured every 30 min. Specific fluorescence was obtained by dividing fluorescence units (at 234 the maximum level of expression) by the absorbance value. 235

236

237 Serum-killing assay

The serum-killing assay was performed as described previously [5] with overnight culture of *Escherichia coli* strain XL1Blue in LB with ampicillin 100 μ g/ml at 37°C. For each bacterial strain, three independent assays were performed with human serum from human male AB

sterile plasma (Sigma-Aldrich, reference: H4522) or with serum that was heat-treated to 241 inactivate complement (56°C, 30 min). The number of viable bacteria after incubation with 242 serum at 37°C for 60 min was calculated by serial dilution, plating on LB agar with ampicillin 243 100 µg/ml and counting the colony forming units (CFU). The degree of killing was calculated 244 as follow: $\log kill = (\log_{10} CFU \text{ per milliliter of initially added bacteria}) - (\log_{10} CFU \text{ per$ 245 milliliter of bacteria surviving the incubation). The resistance was expressed as the difference 246 in log kill between XL1-Blue harboring pUC19 incubated in 50% human serum and XL1Blue 247 harboring the recombinant plasmid incubated either in 50% human serum or heat-inactivated 248 249 serum.

250

251 Cell association assays

The cell invasion and association assays were performed as described previously [52]. 252 Escherichia coli strain XL1Blue were grown at 37°C in LB broth supplemented with 253 ampicillin 100 µg/ml for 2.5 hours (10⁸ CFU/ml; optical density at 540 nm of 0.5; 254 exponential-growth phase). Chinese hamster ovary cells (CHO) were grown and maintained 255 at 37°C in RPMI Medium 1460-glutamax I (Gibco) complemented with 10% foetal bovine 256 serum (Lonza), and 1% PenStrep 5000 U/ml (Gibco). Spodoptera littoralis cells derived from 257 hemocytes (Sl2b) were grown and maintained at 28°C in G3 Medium pH 6,2 (TC100 2% 258 from Gibco modified with 0.037% α -ketoglutaric acid, 0.04% β -fructose, 0.005% fumaric 259 acid, 0.067% malic acid, 0.006% succinic acid, 0.26% sucrose, 0.02% choline chloride, 260 0.02% β-alanine, 0.035% sodium bicarbonate, 0.33% lactalbumin hydrolysate, and 261 complemented with 5% foetal bovine serum, 0.016% penicillin, 0.006% streptomycin). 262

263

264 Susceptibility to antimicrobial peptides

In vitro susceptibility to polymyxin B sulfate (Sigma), colistin methanesulfate (Sigma), cecropin A (Sigma), *Spodoptera frugiperda* cecropin B was evaluated by determination of minimal inhibition concentration as previously described [53].

- 268
- 269 **Results**

270

271 Phylogeny of Ail, PagC and OmpX-related proteins among Bacteria

Ail, PagC and OmpX homologs were searched in genome databases (see Material and 272 Methods). Phylogenetic analysis (Fig. 1A) clearly separated the 89 proteins from 53 bacterial 273 species into three well-supported groups. The Ail group recovered the y1324 canonical Ail 274 protein described in Y. pestis KIM [4]. The PagC group contained the STM3031 PagC protein 275 276 from Salmonella Typhimurum [54]. Finally, the OmpX group was characterized by several proteins annotated OmpX, such as Ent638 1301 from Enterobacter sp. 638. Interestingly, the 277 protein y1682 of Y. pestis KIM usually named Ail clusters with the OmpX group [4]. Our 278 phylogenetic analysis clearly indicates that all the *Photorhabdus* proteins clustered within the 279 Ail group (plu2480 and plu2481 from *P. luminescens* and PAU 02047 from *P. asymbiotica*) 280 and the PagC group (plu1967 from *P. luminescens* and PAU 02601 from *P. asymbiotica*). 281

282

283 Genomic organization of *ail* and *pagC* genes in *Photorhabdus* genomes

Analysis of the *P. asymbiotica* ATCC43949 and *P. luminescens* TT01 genome sequences [36,37] revealed that *ail* and *pagC* genes were located in conserved regions in the two *Photorhabdus* species, previously described as genomic islands in *P. luminescens* TT01 (Fig. 1B) [55]. Both insertion points and contents in the coding sequences were similar. The genomic islands from *P. luminescens* genomes were composed of additional genes encoding proteins potentially involved in infectious process. The *toxBCD* operon in the vicinity of the *ail* genes (GI_59) is involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae* [56]. The *phaxA1B1* genes in the vicinity of the *pagC* (GI_47) encodes the XaxAB-like binary toxin with insecticidal and cytotoxic activity [57,58].

The two *ail* genes from *P. luminescens*, referred to as $ail1_{Pl}$ and $ail2_{Pl}$ hereafter, shared 71% of nucleotidic identity and 66% of aminoacids identity and were separated by 517 nucleotides. This adjacent position (Fig. 1B) together with their closed clustering inside the Ail group (Fig. 1A) suggests a recent tandem duplication. By contrast, the *ail* gene from *P. asymbiotica* (*ail*_{Pa}), the *pagC* genes of *P. luminescens* and *P. asymbiotica* (*pagC*_{Pl} and *pagC*_{Pa}, respectively) were present in single copy.

299

300 **PhoP is directly regulating the expression of** $ail1_{Pl}$

301

302 Data on expression of genes encoding outer membrane proteins of the Ail/OmpX/PagC family remains limited except for PagC. Indeed, pagC gene in S. Typhimurium is a PhoP-303 activated gene [7]. A phoP mutant has been previously constructed and described for P. 304 *luminescens* TT01 [21]. We therefore performed RT-qPCR to measure levels of $pagC_{Pb}$, $aill_{Pl}$ 305 and *ail2*_{Pl} mRNA and to calculate their ratio of values in *phoP* and wild type backgrounds of 306 307 P. luminescens TT01 (Fig. 2A). Only the level of ail1_{Pl} transcript was lower in the phoP mutant than in the wild type strain, indicating that the $ail1_{Pl}$ gene expression requires PhoP. 308 Contrarily, ail_{Pl} and $pagC_{Pl}$ expression was not PhoP-dependent. The differential regulation 309

of *ail* paralogs were independently confirmed by measuring expression of P_{ail/Pl}-gfp[AAV] 310 and P_{ail2Pl}-gfp[AAV] fusions in wild-type and phoP backgrounds (Fig. 2B). Next, the possible 311 direct binding of PhoP protein upstream of *ail1*_{Pl} was investigated. Electrophoretic mobility 312 shift assays (EMSAs) were carried out to compare the interaction profiles of different 313 amounts of PhoP protein on the 360-bp aill_{Pl} promoter region (Fig. 2C). A recombinant N-314 terminal His-tag PhoP protein (PhoP-His) was first produced from P_{T7}PhoP-His vector (Table 315 1). The PhoP-His protein was purified and phosphorylated in vitro by incubation with acetyl 316 phosphate. Phosphorylation efficiency and dimer formation were assessed by migration on 317 precast Phos-tag gel (Fig. S1). Then, different amounts of phosphorylated and 318 319 unphosphorylated PhoP-His were mixed with radiolabeled *ail1*_{Pl} promoter. A gel shift pattern was observed when 1.5 µM of phosphorylated PhoP-His was added (Fig. 2C). No shifted 320 bands were observed upon incubation with unphosphorylated PhoP-His. Therefore, PhoP-His 321 322 protein can specifically bind to the promoter region of *ail1*_{Pl} and the active form of PhoP corresponds to the phosphorylated isoform. 323

324

325 *ail1*_{Pl} expression is high at low MgSO₄ concentrations

It has been shown that low concentrations of Mg^{2+} activate the expression of PhoP-dependent 326 genes in Salmonella whereas high Mg^{2+} concentrations repress the system (for review see 327 [59,60]. In order to evaluate the role of Mg²⁺ concentration on $aill_{Pl}$ or $ail2_{Pl}$ expression, 328 wild-type strain containing PailIPI-gfp[AAV], Pail2PI-gfp[AAV] or Plac-gfp[AAV] were grown 329 in minimal medium M9 supplemented with 10 μ M (activating concentration) or 10 mM 330 (repressing concentration) of MgSO₄ and gene expression was monitored by recording GFP 331 fluorescence (Fig. 2D). We observed a 5-fold decrease of *ail1*_{Pl} expression at 10 mM MgSO₄, 332 whereas *ail2*_{Pl} expression was not dependent on the concentration of MgSO₄. As observed for 333 PhoP-activated genes in S. Typhimurium [19], low MgSO4 concentration increases aill_{Pl} 334

*ail2*_{Pl} and *pagC*_{Pl} genes confer human serum resistance but no eukaryotic cell association phenotype

339

340 When introduced into Escherichia coli, individual members of the Ail/PagC/OmpX-related 341 protein family have the property to confer resistance to human serum complement and to associate with eukaryotic cell [5,6,11,13]. In order to test if the ail and pagC genes from 342 P. luminescens and P. asymbiotica have similar phenotypes, we introduced ail1_{Pl}, ail2_{Pl}, 343 $pagC_{Pl}$, ail_{Pa} and $pagC_{Pa}$ under the control of the constitutive promoter P_{lac} into the high copy 344 number pUC19 plasmid and transformed these pUC19 derivatives into an E. coli XL1blue 345 strain. Active transcription of corresponding cloned genes in E. coli XL1Blue was controlled 346 by real-time PCR (data not shown). We first evaluated the human serum resistance of the E. 347 348 *coli* XL1Blue strains harboring the different derivative plasmids (Fig. 3). The positive control, E. coli XL1Blue expressing the ail gene from Y. pestis strain KIM, y1324 (ail_{Yp}), showed an 349 elevated serum resistance, similar to the one observed in all strains when the complement in 350 351 the serum was heated-inactivated. Moreover, we observed intermediate serum resistance with the $ail2_{Pl}$ and $pagC_{Pl}$ genes whereas the resistance with the $ail1_{Pl}$, ail_{Pa} and $pagC_{Pa}$ genes was 352 weak. 353

In order to assess if the association of *E. coli* XL1Blue to eukaryotic cells was affected by expression of *Photorhabdus ail* or *pagC* genes, association assays of mammals cells (CHO) and insect cells (Sl2b) were performed. *E. coli* XL1Blue expressing *ail*_{Yp} displayed association with CHO cells (% of association of 30.43 ± 17.06) in regards to *E. coli* XL1Blue harboring the pUC19 plasmid (% of association of 0.57 ± 0.05), which is consistent with previously published data [52]. None of the *Photorhabdus* over-expressed genes, *ail1*_{Pl}, *ail2*_{Pb}. 360 $pagC_{Pl}$, ail_{Pa} and $pagC_{Pa}$, was able to confer to *E. coli* XL1Blue strain an improved association 361 with Sl2b cells to *E. coli* XL1Blue strain (average % of association of 10.60±6.80).

362

363 $ail1_{Pl}$, $ail2_{Pl}$ and $pagC_{Pl}$ do not confer antimicrobial peptide resistance

364

Since P. luminescens TT01 and P. asymbiotica ATCC43949 are pathogenic towards insect, 365 the role of *ail* and *pagC* genes was studied by cultivating recombinant *E. coli* in insect 366 hemolymph, which is analogous to the mammalian blood regarding the immune system. The 367 growth of the E. coli XL1Blue derivatives was not affected when cultivated in sterile 368 hemolymph of Spodoptera littoralis fifth-instar larvae (data not shown). Then, we compared 369 370 the susceptibility to different antimicrobial peptides of the negative control E. coli 371 XL1Blue/pUC19 and the E. coli XL1Blue harboring the different derivative plasmids. Similar minimal inhibitory concentrations were observed towards colistin (1.5-3 µg/ml), polymyxin B 372 (0.1-0.2 µg/ml), cecropin A (6-12.5 µg/ml) or cecropin B from the Lepidoptera Spodoptera 373 374 *frugiperda* (1.5-3 µg/ml).

375

376 **Discussion**

377 *Photorhabdus* genomes only harbor *ail* and *pagC* gene homologs

Our analysis of 89 proteins from 53 bacterial species belonging to the Ail/PagC/OmpX family clearly distinguished three sub-families. In the two whole-assembled genomes of *Photorhabdus*, both Ail and PagC proteins are encoded. Interestingly, in *P. luminescens* TT01, we identified two intra-genome homologs *ail1* and *ail2*. Such homologs can arise through duplication, where both gene copies are named paralogs, or by acquiring similar genes from outside sources through horizontal gene transfer, where both gene copies are

named xenologs [61]. The adjacent position of $ail1_{Pl}$ and $ail2_{Pl}$ genes suggests recent tandem 384 duplication. Duplication is an important hallmark of the genome plasticity of P. luminescens 385 both in short-term adaptation and long-term evolution. Several dozen of duplicated genes 386 have already been described in P. luminescens TT01 [36]. Interestingly, another gene 387 encoding an outer membrane protein, the *ompF*-like gene, probably underwent a tandem 388 duplication [62]. Characteristic features of an ancient whole-genome duplication were also 389 detected in the P. luminescens TT01 genome [63]. In addition, a 275-kilobase single block 390 duplication, with cryptic phenotypic consequences, was observed in phenotypic variants of P. 391 *luminescens* [64]. 392

393

394 What are the factors regulating *ail/pagC* gene expression in *Photorhabdus*?

No data about transcription factors involved in the control of *ail/pagC* expression in the 395 396 Photorhabdus genus are currently available. P. asymbiotica is considered an emerging human pathogen [34]. In an attempt to find host-interacting proteins that are relevant to either human 397 or insect infections is interesting, Wilkinson et al. identified a thermoregulation of the 398 secretion for its Ail-like homolog in P. asymbiotica ATCC43949 (Ail_{Pa} in our study) as Ail_{Pa} 399 is secreted at 37°C but not at 30°C [37]. In our study, we decided to use the available phoP 400 mutant of P. luminescens TT01 [21] to compare relative expression of $ail1_{Pl}$, $ail2_{Pl}$ and $pagC_{Pl}$ 401 in wild-type and *phoP* backgrounds. Only *P. luminescens ail1* expression is PhoP-dependent 402 by contrast with ail_{Pl} and $pagC_{Pl}$. The pagC gene from S. Typhimurium is regulated by PhoP 403 in a indirect way via SlyA [18]. Surprisingly, our electromobility shift assays showed that the 404 His-tagged PhoP protein from P. luminescens directly binds to the promoter region of ail1. 405 406 This is the first time that ail has been described to rely on the direct control of PhoP in Gramnegative bacteria. In addition, we monitored the kinetic of aill expression in different culture 407

conditions and determined that *ail1* expression was reduced in the presence of high 408 concentrations of MgSO₄. The environmental deprivation of Mg^{2+} as a signal activating the 409 PhoP/PhoQ signal transduction cascade was first described in Salmonella [19]. In 410 Photorhabdus, Derzelle et al. [21] showed that PhoP-dependent expression of the first gene of 411 the *pbgPE* operon, involved in LPS modifications, relies on the Mg^{2+} concentrations in the 412 culture medium. Like *pbgPE*, expression *ail1*_{Pl} is higher at low Mg^{2+} concentrations than at 413 high concentrations. In Salmonella and P. luminescens, both the phoP gene and the pbgPE 414 operon are involved in virulence in the mouse and the insect models, respectively 415 [7,21,65,66]. In P. luminescens, it is likely that the deficience of PhoP-dependent pbgPE 416 expression is responsible for the avirulence of *phoP* mutant rather than the one of $ail1_{Pl}$. 417

418

419 What are the functions of Ail and PagC proteins in the life cycle of *Photorhabdus*?

To answer this question, we used a well-established assay by expressing in E. coli ail and 420 pagC homologs from the Photorhabdus strains. Such strategy was successfully used for 421 characterizing the role of proteins from the Ail/PagC/OmpX family in Salmonella and 422 Yersinia in human serum resistance and invasion/adherence to eukaryotic culture cells [4]. 423 424 Recombinant Escherichia coli clones, expressing cosmids from Photorhabdus, were also used in assays to study gain of toxicity against insects, nematodes, amoeba, and mammalian 425 426 macrophages [67] and to attribute biological function to several Photorhabdus potential virulence loci [68-70]. With this heterologous assay, we showed that none of the over-427 expressed genes displayed a role in adherence to the tested mammal (CHO) or insect (Sl2b) 428 cells. Photorhabdus life cycle is mainly extracellular except a transient invasive stage during 429 the symbiont transmission to the new generation of IJ before they exit the insect cadaver [30]. 430 This transmission stage is dependent on the production of the bacterial Mad pili [71]. By 431

contrast with Ail and PagC from Yersinia and Salmonella species [5-8], our results do not 432 suggest a role of Ail1, Ail2 or PagC in cell invasion. While P. asymbiotica ATCC43949 is a 433 clinical isolate from human wounds resistant to human serum at 30°C and 37°C [37], it is 434 surprising that neither $aill_{Pa}$ nor $pagC_{Pa}$ participated in the human serum resistance. It is 435 tempting to speculate that other P. asymbiotica proteins could be involved in serum 436 resistance. Finally, when expressed in E. coli, only ail_{2Pl} and $pagC_{Pl}$ appear to play a role in 437 human serum resistance whereas P. luminescens TT01 was not described as a clinical isolate. 438 One hypothesis could be that Ail2_{Pl} and PagC_{Pl} could play a role in resistance toward 439 components of the insect blood, the hemolymph. Thus, we tested the resistance of 440 recombinant E. coli bacteria toward different AMPs, a key component of the insect humoral 441 insect immunity, though without any success. In pathogenic Yersinia species, Ail proteins 442 bind substrates such as the host cell extracellular matrix proteins, fibronectin and laminin, as 443 444 well as the complement regulatory proteins C4bp and factor H [72]. Therefore, in insects, Ail2_{Pl} and PagC_{Pl} may interact with similar hemolymph components yet to be identified. 445

446

What is the evolutionary significance of the two Ail proteins in *P. luminescens* TT01, Ail1_{Pl} and Ail2_{Pl}?

In *Y. pestis* KIM, four genes encoding the proteins from the Ail/PagC/OmpX family were identified including one OmpX protein (y1682) and three Ail proteins (y2446, y2034 and y1324). These three Ail proteins are phylogenetically distant and their corresponding genes are not adjacent on the *Y. pestis* KIM genome [73]. In *P. luminescens* TT01, we propose that the two *ail* genes result from a recent tandem duplication (see above). The genomic redundancy in prokaryotes can be explained as a consequence of three selective processes, (i) elevated protein dosage (identical and duplicated genes), (ii) protein diversification (divergent

paralogs) and (iii) adaptation to environmental variations (ecoparalogs of intermediate 456 divergence) [74]. The intermediate aminoacids identity between Ail1_{Pl} and Ail2_{Pl} suggests a 457 case of ecoparalogs. Three clues also argue in favour of this hypothesis. First, as already 458 described with ecoparalogs predicted to be on the outer membrane or in the periplasmic space 459 where the environment influence is important for protein function and stability [74], Ail1_{Pl} 460 and Ail2_{Pl} differ by their isoelectric point values (respectively, 9.0 and 7.0). Second, a usual 461 role identified in the Ail/PagC/OmpX family, the resistance to human serum, was only 462 conserved for one protein, Ail2_{Pl}. Finally, regulation of the expression of $ail1_{Pl}$ and 463 $ail2_{\rm Pl}$ genes is obviously different and in the case of $ail1_{\rm Pl}$, we showed that the influence of 464 external environment fluctuation by the way of magnesium concentration is important. All 465 together, the existence of these two ecoparalogs is highly suggestive of an adaptation to 466 multiple niches (at least, insect and nematode) in response to external fluctuation. 467

468

469 Acknowledgements

This work was supported by grant n° 2011-1333-03 from National Institute of Agronomical
Research. We thank Philippe Clair for expert-technical assistance with RT-qPCR.

472 Refe	erences
-----------------	---------

- Białas N, Kasperkiewicz K, Radziejewska-Lebrecht J, Skurnik M (2012) Bacterial cell
 surface structures in *Yersinia enterocolitica*. Arch Immunol Ther Exp 60: 199–209.
 doi:10.1007/s00005-012-0168-z.
- 477 2. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer
 478 membrane proteins: barrels in a nutshell. Mol Microbiol 37: 239–253.
- Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Pepa Della ME, et al. (2012) Microbehost interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. Curr Protein
 Pept Sci 13: 843–854.
- 482 4. Kolodziejek AM, Hovde CJ, Minnich SA (2012) *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a
 483 single protein. Front Cell Infect Microbiol 2: 103–103. doi:10.3389/fcimb.2012.00103.
- 484 5. Wachtel MR, Miller VL (1995) *In vitro* and *in vivo* characterization of an *ail* mutant of
 485 *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 63: 2541–2548.
- 486 6. Heffernan EJ, Wu L, Louie J, Okamoto S, Fierer J, et al. (1994) Specificity of the
 487 complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane
 488 protein genes *rck* from *Salmonella typhimurium* and *ail* from *Yersinia enterocolitica*.
 489 Infect Immun 62: 5183–5186.
- 490 7. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ (1989) A two-component regulatory system
 491 (PhoP PhoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc Natl Acad Sci USA 86:
 492 5054–5058.
- 493 8. Miller VL, Beer KB, Loomis WP, Olson JA, Miller SI (1992) An unusual

- 494 *pagC*::TnphoA mutation leads to an invasion- and virulence-defective phenotype in
 495 *Salmonellae*. Infect Immun 60: 3763–3770.
- 496 9. Dupont M, Dé E, Chollet R, Chevalier J, Pagès J-M (2004) *Enterobacter aerogenes*497 OmpX, a cation-selective channel *mar* and osmo-regulated. FEBS Lett 569: 27–30.
 498 doi:10.1016/j.febslet.2004.05.047.
- Vica Pacheco S, García González O, Paniagua Contreras GL (1997) The *lom* gene of
 bacteriophage lambda is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal
 epithelial cells. FEMS Microbiol Lett 156: 129–132.
- 502 11. Bliska JB, Falkow S (1992) Bacterial resistance to complement killing mediated by the
 503 Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 3561–3565.
- Kolodziejek AM, Sinclair DJ, Seo KS, Schnider DR, Deobald CF, et al. (2007)
 Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM.
 Microbiology 153: 2941–2951. doi:10.1099/mic.0.2006/005694-0.
- Nishio M, Okada N, Miki T, Haneda T, Danbara H (2005) Identification of the outermembrane protein PagC required for the serum resistance phenotype in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. Microbiology 151: 863–873. doi:10.1099/mic.0.276540.
- 511 14. Guillier M, Gottesman S, Storz G (2006) Modulating the outer membrane with small
 512 RNAs. Genes Dev 20: 2338–2348. doi:10.1101/gad.1457506.
- 513 15. Pierson DE, Falkow S (1993) The *ai*l gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the
 ability of the organism to survive serum killing. Infect Immun 61: 1846–1852.
- 515 16. Skorek K, Raczkowska A, Dudek B, Miętka K, Guz-Regner K, et al. (2013)

Regulatory protein OmpR influences the serum resistance of *Yersinia enterocolitica*O:9 by modifying the structure of the outer membrane. PLoS ONE 8: e79525.
doi:10.1371/journal.pone.0079525.

- 519 17. Papenfort K, Pfeiffer V, Lucchini S, Sonawane A, Hinton JCD, et al. (2008)
 520 Systematic deletion of *Salmonella* small RNA genes identifies CyaR, a conserved
 521 CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis. Mol Microbiol 68: 890–906.
 522 doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06189.x.
- 18. Navarre WW, Halsey TA, Walthers D, Frye J, McClelland M, et al. (2005) Coregulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to
 antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. Mol Microbiol 56: 492–508.
 doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04553.x.
- 527 19. Garcia Vescovi E, Soncini FC, Groisman EA (1996) Mg2+ as an extracellular signal:
 528 environmental regulation of *Salmonella* virulence. Cell 84: 165–174.
- 529 20. Gunn JS, Ryan SS, Van Velkinburgh JC, Ernst RK, Miller SI (2000) Genetic and
 530 functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide
 531 modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella* 532 *enterica* serovar typhimurium. Infect Immun 68: 6139–6146.
- 533 21. Derzelle S, Turlin E, Duchaud E, Pages S, Kunst F, et al. (2004) The PhoP-PhoQ two534 component regulatory system of *Photorhabdus luminescens* is essential for virulence in
 535 insects. J Bacteriol 186: 1270–1279.
- 536 22. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, et al. (1998) Lipid A Acylation and
 537 Bacterial Resistance against Vertebrate Antimicrobial Peptides. Cell 95: 189–198.

538	23.	Trent MS, Pabich W, Raetz CR, Miller SI (2001) A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL)	
539		that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of Salmonella	
540		typhimurium. J Biol Chem 276: 9083–9092. doi:10.1074/jbc.M010730200.	

- 541 24. Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M, Miller SI (2000) A PhoP-regulated outer
 542 membrane protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes resistance
 543 to alpha-helical antimicrobial peptides. J Bacteriol 182: 4077–4086.
- 544 25. Waterfield NR, Ciche T, Clarke D (2009) *Photorhabdus* and a Host of Hosts. Annual
 545 Review of Microbiology 63: 557–574.
- 546 26. Ciche TA, Ensign JC (2003) For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which
 547 end of a nematode is out? Appl Environ Microbiol 69: 1890–1897.
- 548 27. Silva CP, Waterfield NR, Daborn PJ, Dean P, Chilver T, et al. (2002) Bacterial
 549 infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. Cell
 550 Microbiol 4: 329–339.
- Nielsen-LeRoux C, Gaudriault S, Ramarao N, Lereclus D, Givaudan A (2012) How the
 insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy
 their hosts. Curr Opin Microbiol 15: 220–231. doi:10.1016/j.mib.2012.04.006.
- Clarke DJ (2014) The genetic basis of the symbiosis between *Photorhabdus* and its
 invertebrate hosts. Adv Appl Microbiol 88: 1–29. doi:10.1016/B978-0-12-8002605.00001-2.
- 557 30. Ciche TA, Kim K-S, Kaufmann-Daszczuk B, Nguyen KCQ, Hall DH (2008) Cell
 558 invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by
 559 *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. Appl Environ Microbiol 74: 2275–2287.

560 doi:10.1128/AEM.02646-07.

- 561 31. Stock SP, Lee M-M, Flores-Lara Y (2012) The rectal glands of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) hermaphrodites and their role in
 symbiont transmission. J Invertebr Pathol 110: 135–138. doi:10.1016/j.jip.2012.03.018.
- 564 32. Ferreira T, van Reenen CA, Endo A, Tailliez P, Pages S, et al. (2014) *Photorhabdus*565 *heterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic nematode
 566 *Heterorhabditis zealandica*. Int J Syst Evol Microbiol 64: 1540–1545.
 567 doi:10.1099/ijs.0.059840-0.
- 568 33. Farmer JJ, Jorgensen JH, Grimont PA, Akhurst RJ, Poinar GO, et al. (1989) *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical
 specimens. J Clin Microbiol 27: 1594–1600.
- 34. Gerrard J, Waterfield N, Vohra R, Ffrench-Constant R (2004) Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. Microbes Infect 6: 229–
 237. doi:10.1016/j.micinf.2003.10.018.
- 574 35. Peel MM, Alfredson DA, Gerrard JG, Davis JM, Robson JM, et al. (1999) Isolation,
 575 identification, and molecular characterization of strains of *Photorhabdus luminescens*576 from infected humans in Australia. J Clin Microbiol 37: 3647–3653.
- 577 36. Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, Buchrieser C, Givaudan A, et al. (2003) The
 578 genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Nat
 579 Biotechnol 21: 1307–1313. doi:10.1038/nbt886.
- 580 37. Wilkinson P, Waterfield NR, Crossman L, Corton C, Sanchez-Contreras M, et al.
 581 (2009) Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus*

- *asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. BMC Genomics 10:
 302. doi:10.1186/1471-2164-10-302.
- 584 38. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007)
 585 Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947–2948.
 586 doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
- S87 39. Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their
 use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol 17: 540–552.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large
 phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52: 696–704.
 doi:10.1080/10635150390235520.
- 592 41. Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. Mol
 593 Biol Evol 25: 1307–1320. doi:10.1093/molbev/msn067.
- 42. Yang Z (1996) Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses.
 Trends Ecol Evol 11: 367–372. doi:10.1016/0169-5347(96)10041-0.
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A
 fast, accurate, and powerful alternative. Syst Biol 55: 539–552.
 doi:10.1080/10635150600755453.
- 44. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG (1993) Current Protocols
 in Molecular Biology. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et
 al., editors New York: John Wiley and Sons.
- 602 45. Brillard J, Duchaud E, Boemare N, Kunst F, Givaudan A (2002) The PhIA hemolysin
 603 from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* belongs to the two-

partner secretion family of hemolysins. J Bacteriol 184: 3871–3878.

- 46. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST)
 for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. Nucleic Acids Res 30: e36.
- 47. Jubelin G, Lanois A, Severac D, Rialle S, Longin C, et al. (2013) FliZ Is a Global
 Regulatory Protein Affecting the Expression of Flagellar and Virulence Genes in
 Individual *Xenorhabdus nematophila* Bacterial Cells. PloS Genet 9: e1003915.
 doi:10.1371/journal.pgen.1003915.s007.
- 612 48. Canova MJ, Kremer L, Molle V (2008) pETPhos: a customized expression vector
 613 designed for further characterization of Ser/Thr/Tyr protein kinases and their
 614 substrates. Plasmid 60: 149–153. doi:10.1016/j.plasmid.2008.05.002.
- 49. Tang YT, Gao R, Havranek JJ, Groisman EA, Stock AM, et al. (2012) Inhibition of
 Bacterial Virulence: Drug-Like Molecules Targeting the *Salmonella enterica* PhoP
 Response Regulator. Chem Biol Drug Des 79: 1007–1017. doi:10.1111/j.17470285.2012.01362.x.
- 50. Jubelin G, Pages S, Lanois A, Boyer M-H, Gaudriault S, et al. (2011) Studies of the
 dynamic expression of the *Xenorhabdus* FliAZ regulon reveal atypical iron-dependent
 regulation of the flagellin and haemolysin genes during insect infection. Environ
 Microbiol 13: 1271–1284. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02427.x.
- 51. Abi Khattar Z (2009) Impact de la résistance aux peptides antimicrobiens et aux
 composés toxiques sur les interactions bactéries-insectes : cas des infections par
 Photorhabdus luminescens et *Bacillus cereus*. PhD thesis, Université Montpellier 2.

- 626 52. Miller VL, Falkow S (1988) Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica*627 that can promote invasion of epithelial cells. Infect Immun 56: 1242–1248.
- Abi Khattar Z, Rejasse A, Destoumieux-Garzón D, Escoubas J, Sanchis V, et al. (2009)
 The *dlt* Operon of *Bacillus cereus* is Required for Resistance to Cationic Antimicrobial
 Peptides and Virulence in Insects. J Bacteriol 191: 7063–7073. doi:10.1128/JB.0089209.
- 54. Pulkkinen WS, Miller SI (1991) A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar
 to a *Yersinia enterocolitica* invasion protein and a bacteriophage lambda outer
 membrane protein. J Bacteriol 173: 86–93.
- 635 55. Ogier J-C, Calteau A, Forst S, Goodrich-Blair H, Roche D, et al. (2010) Units of
 636 plasticity in bacterial genomes: new insight from the comparative genomics of two
 637 bacteria interacting with invertebrates, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. BMC
 638 Genomics 11: 568. doi:10.1186/1471-2164-11-568.
- 56. Suzuki F, Sawada H, Azegami K, Tsuchiya K (2004) Molecular characterization of the *tox* operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia gluma*e. J Gen Plant
 Pathol 70: 97–107. doi:10.1007/s10327-003-0096-1.
- 57. Zhang X, Hu X, Li Y, Ding X, Yang Q, et al. (2014) XaxAB-like binary toxin from *Photorhabdus luminescens* exhibits both insecticidal activity and cytotoxicity. FEMS
 Microbiol Lett 350: 48–56. doi:10.1111/1574-6968.12321.
- 58. Vigneux F, Zumbihl R, Jubelin G, Ribeiro C, Poncet J, et al. (2007) The *xaxAB* genes
 encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are
 present in plant and human pathogens. J Biol Chem 282: 9571–9580.
 doi:10.1074/jbc.M604301200.

- 649 59. Groisman EA (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. J
 650 Bacteriol 183: 1835–1842. doi:10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001.
- 651 60. Kato A, Groisman EA, Howard Hughes Medical Institute (2008) The PhoQ/PhoP
 652 regulatory network of *Salmonella enterica*. Adv Exp Med Biol 631: 7–21.
- 653 61. Gevers D, Vandepoele K, Simillon C, Van de Peer Y (2004) Gene duplication and
 654 biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. Trends Microbiol 12:
 655 148–154. doi:10.1016/j.tim.2004.02.004.
- 656 62. Papamichail D, Delihas N (2006) Outer membrane protein genes and their small non657 coding RNA regulator genes in *Photorhabdus luminescens*. Biol Direct 1: 12.
 658 doi:10.1186/1745-6150-1-12.
- 659 63. Hirayama S, Mizuta S (2009) Significant Deviations in the Configurations of
 660 Homologous Tandem Repeats in Prokaryotic. Genomes. Genomics, Proteomics &
 661 Bioinformatics 7: 163–174. doi:10.1016/S1672-0229(08)60046-7.
- 662 64. Gaudriault S, Pages S, Lanois A, Laroui C, Teyssier C, et al. (2008) Plastic architecture
 663 of bacterial genome revealed by comparative genomics of *Photorhabdus* variants.
 664 Genome Biol 9: R117. doi:10.1186/gb-2008-9-7-r117.
- 665 65. Bennett HPJ, Clarke DJ (2005) The pbgPE operon in *Photorhabdus luminescens* is
 666 required for pathogenicity and symbiosis. J Bacteriol 187: 77–84.
 667 doi:10.1128/JB.187.1.77-84.2005.
- 668 66. Strandberg KL, Richards SM, Tamayo R, Reeves LT, Gunn JS (2012) An altered
 669 immune response, but not individual cationic antimicrobial peptides, is associated with
 670 the oral attenuation of Ara4N-deficient Salmonella enterica serovar Typhimurium in

mice. PLoS ONE 7: e49588. doi:10.1371/journal.pone.0049588.

- 672 67. Waterfield NR, Sanchez-Contreras M, Eleftherianos I, Dowling A, Yang G, et al.
 673 (2008) Rapid Virulence Annotation (RVA): identification of virulence factors using a
 674 bacterial genome library and multiple invertebrate hosts. Proc Natl Acad Sci USA 105:
 675 15967–15972. doi:10.1073/pnas.0711114105.
- 676 68. Vlisidou I, Eleftherianos I, Dorus S, Yang G, Ffrench-Constant RH, et al. (2010) The
 677 KdpD/KdpE two-component system of *Photorhabdus asymbiotica* promotes bacterial
 678 survival within M. sexta hemocytes. J Invertebr Pathol 105: 352–362.
 679 doi:10.1016/j.jip.2010.09.020.
- 680 69. Yang G, Hernández-Rodríguez CS, Beeton ML, Wilkinson P, Ffrench-Constant RH, et
 681 al. (2012) Pdl1 Is a Putative Lipase that Enhances *Photorhabdus* Toxin Complex
 682 Secretion. PLoS Pathog 8: e1002692. doi:10.1371/journal.ppat.1002692.
- 70. Yang G, Dowling AJ, Gerike U, ffrench-Constant RH, Waterfield NR (2006) *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax
 moth. J Bacteriol 188: 2254–2261. doi:10.1128/JB.188.6.2254-2261.2006.
- Somvanshi VS, Kaufmann-Daszczuk B, Kim K-S, Mallon S, Ciche TA (2010) *Photorhabdus* phase variants express a novel fimbrial locus, *mad*, essential for
 symbiosis. Mol Microbiol 77: 1021–1038. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07270.x.
- Tsang TM, Wiese JS, Felek S, Kronshage M, Krukonis ES (2013) Ail Proteins of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* Have Different Cell Binding and Invasion
 Activities. PLoS ONE 8: e83621. doi:10.1371/journal.pone.0083621.
- 692 73. Deng W, Burland V, Plunkett G, Boutin A, Mayhew GF, et al. (2002) Genome

sequence of Yersinia pestis KIM. J Bacteriol 184: 4601-4611.

- 694 74. Sanchez-Perez G, Mira A, Nyiro G, Pašić L, Rodriguez-Valera F (2008) Adapting to
 695 environmental changes using specialized paralogs. Trends Genet 24: 154–158.
 696 doi:10.1016/j.tig.2008.01.002.
- Fischer-Le Saux M, Viallard V, Brunel B, Normand P, Boemare NE (1999) Polyphasic
 classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens*subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 : 1645–1656.
- 702 76. Paulick A, Koerdt A, Lassak J, Huntley S, Wilms I, et al. (2009) Two different stator
 703 systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. Mol Microbiol
 704 71: 836–850. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06570.x.
- 705 77. Miller WG, Leveau JH, Lindow SE (2000) Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range
 706 promoter-probe vectors. Mol Plant Microbe Interact 13: 1243–1250.
 707 doi:10.1094/MPMI.2000.13.11.1243.

709 Figure legends

710

711 Figure 1: The *Photorhabdus* genus harbors *ail* and *pagC* genes.

A. Evolutionary relationships of Ail, PagC and OmpX-related proteins. Stars indicate branch
supports higher than 0.85 (used as significance threshold). The scale bar corresponds to the
number of substitutions per amino acid residue site.

B. Conserved genomic context of the *ail* (up) and *pagC* (bottom) genes in *Photorhabdus luminescens* TT01 (Pl) and *Photorhabdus asymbiotica* ATCC43949 (Pa) genomes. The boxes
above and below the axis represent ORFs in the forward and reverse orientations,
respectively. The names of some genes are indicated. The names of genomic islands (GI)
previously described in the *P. luminescens* and *P. asymbiotica* genomes [55] are given.

720

721

722 Figure 2: Only *ail1*_{Pl} is directly regulated by PhoP

723

724 A. RT-qPCR: *ail1*_{Pl} expression is PhoP-dependent.

Total RNA from phoP mutant or TT01 wild-type strain of Photorhabdus luminescens was 725 726 used for RT-qPCR analysis with internal primers specific for the indicated genes. mRNA levels were normalized against those of a reference gene (gyrB). Data are presented as a ratio 727 728 of values for *phoP* mutant and TT01 wild-type strain. A ratio of 1 indicates no difference in expression level between both strains. The bars indicate standard errors calculated using 729 Taylor's series. Significant differences (*p*-value < 0.05) are indicated by asterisks (*). The 730 relative quantification results were obtained from three independent experiments with the 731 REST 2009 program. 732

B. Gene transcription monitored by GFP quantification: *ail1*_{Pl} promoter region is positively regulated by PhoP

The dynamic expression of $ail1_{Pl}$ and $ail2_{Pl}$ promoter in TT01 and *phoP* backgrounds was monitored over time after growth in LB medium. Each histogram represents the specific fluorescence at the peak of expression for each condition. One experiment representative of more than three independent experiments is shown. Standard deviations represent technical replicates.

740

741 C. PhoP-His binds the promoter region of *ail1*_{Pl}

Electrophoretic mobility shift assay was carried out to test the binding of PhoP-His protein activated *in vitro* with ACP 10 mM (P-PhoP-His) or non activated PhoP-His (PhoP-His) on *ail1*_{Pl} promoter. The PhoP-His concentrations indicated are in micromolar. To ensure that the fixation is specific, we used BSA proteins and poly(dI-dC) in the binding buffer.

746

747 D. *ail1*_{Pl} expression is higher at low MgSO₄ concentrations.

We evaluated the impact of low and high MgSO₄ concentrations on $ail1_{Pl}$ and $ail2_{Pl}$ expression. Cultures diluted at 1/200 were grown in M9 minimal medium supplemented with 10 μ M or 10 mM MgSO₄. Each histogram represents specific fluorescence at the peak of expression for each condition. Experiments were realized at least three times.

752

Figure 3: Human serum resistance of *Escherichia coli* XL1Blue strains carrying the plasmid pUC19 and its derivatives harboring *ail* or *pagC* genes. Overnight grown bacteria were tested for viability at 37°C in 50% serum (black histograms) or heat-inactivated serum (hatched histograms). The resistance was expressed as the difference in log kill between XL1-Blue harboring pUC19 incubated in 50% human serum and XL1Blue harboring the

- recombinant plasmid incubated either in 50% human serum or heat-inactivated serum. Means
- and standard errors of results from triplicate experiments are shown.

Strain or plasmid	Genotype or relevant characteristics	Source or reference
P. luminescens strain		
TT01	Strain isolated from the nematode <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> THO1 in Trinidad; wild-type form	[75]
phoP	TT01 <i>phoP</i> ::cat, <i>phoP</i> mutant	[21]
TT01/ P _{ailIP1} -gfp[AAV]	Conjugative strain, TT01 carrying $P_{ail/P1}$ -gfp[AAV] plasmid, Km ^R	this work
TT01/ P _{ail2Pl} -gfp[AAV]	Conjugative strain, TT01 carrying P_{ail2Pl} -gfp[AAV] plasmid, Km ^R	this work
TT01/ P_{lac} -gfp[AAV]	Conjugative strain, TT01 carrying P _{lac} -gfp[AAV] plasmid, Km ^R	[51]
<i>phoP</i> / P _{ailIPl} - <i>gfp</i> [AAV]	Conjugative strain, <i>phoP</i> carrying P _{ail/Pl} - <i>gfp</i> [AAV] plasmid, Km ^R	this work
<i>phoP</i> / P _{ail2Pl} - <i>gfp</i> [AAV]	Conjugative strain, <i>phoP</i> carrying P_{ail2Pl} - <i>gfp</i> [AAV] plasmid, Km ^R	this work
<i>E.coli</i> strain		
XL1Blue	F' proAB lacl ^q Z Δ M15 Tn10(Tet ^R)	Laboratory stock
BL21 (DE3) pLysS	$F^- dcm \ ompT \ hsdS(r_B^-m_B^-) \ gal \ \lambda(DE3) \ (pLysS \ Cam^R)$	Laboratory stock
WM3064	thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ Δ M15 RP4-1360 Δ (araBAD)567 Δ dapA1341::[erm pir (wt)]	[76]
Plasmid		
pUC19	High copy number vector, Ap ^R	Laboratory stock
pUC- <i>ail</i> Yp	0.65 kb PCR fragment obtained with y1324-PstI and y1324-SacI primers and inserted between the PstI and SacI sites of pUC19	this work
pUC- <i>ail1</i> Pl	0.7 kb PCR fragment obtained with plu2480- <i>Pst</i> I and plu2480- <i>Sac</i> I primers and inserted between the <i>Pst</i> I and <i>Sac</i> I sites of pUC19	this work
pUC- <i>ail2</i> Pl	0.7 kb PCR fragment obtained with plu2481- <i>Pst</i> I and plu2481- <i>Sac</i> I primers and inserted between the <i>Pst</i> I and <i>Sac</i> I sites of pUC19	this work
pUC- <i>pagC</i> PI	0.8 kb PCR fragment obtained with plu1967- <i>Pst</i> I and plu1967- <i>Sac</i> I primers and inserted between the <i>Pst</i> I and <i>Sac</i> I sites of pUC19	this work
pUC- <i>ail</i> _{Pa}	0.65 kb PCR fragment obtained with PAU_02047- <i>Pst</i> I and PAU_02047- <i>Sac</i> I primers and inserted between the <i>Pst</i> I and <i>Sac</i> I	this work

TABLE 1: Strains and plasmids used in this study

	sites of pUC19	
pUC <i>-pagC</i> _{Pa}	0.7 kb PCR fragment obtained with PAU_02601- <i>Pst</i> I and PAU_02601- <i>Sac</i> I primers and inserted between the <i>Pst</i> I and <i>Sac</i> I sites of pUC19	this work
pPROBE- <i>gfp</i> [AAV]	Plasmid (pBBR1 replicon) containing gfp [AAV] gene downstream from a multiple cloning site, Km ^R	[77]
P_{lac} -gfp[AAV]	pPROBE with $gfp[AAV]$ under the control of P_{lac} promoter; Km^{R}	[51]
P_{ailIPl} -gfp[AAV]	pPROBE with gfp [AAV] under the control of <i>ail1</i> (plu2480) gene promoter; Km ^R	this work
P_{ail2Pl} -gfp[AAV]	pPROBE with <i>gfp</i> [AAV] under the control of <i>ail2</i> (plu2481) gene promoter; Km ^R	this work
pETPhos	pET28 replicon, Ap ^R	[48]
P _{T7} PhoP-His	pET28 producing PhoP(His-tag) in N-terminal under the control of T7 promoter; Ap ^R	this work















Supplemental Table 1: Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Use	
y1324-PstI	GCGCCTGCAGTTGGCTGGCCACTTTAGTCT	cloning of <i>ail</i> (y1324) from <i>Yersinia pestis</i> CO92	
y1324-SacI	GCGCGAGCTCTCAGCAATTTGAAACCACCA		
plu2480-PstI	GCGCCTGCAGCGCGCCTCGTAATTAATCTTT	cloning of <i>ail 1</i> (plu2480) from <i>Photorhabdus luminescens</i> TT01	
plu2480-SacI	GCGCGAGCTCGATAACTGGGTGAGCACATCG		
plu2481-PstI	GCGCCTGCAGCCACGTTACATTTTGTTTTTCG	cloning of <i>ail 2</i> (plu2481) from <i>Photorhabdus luminescens</i> TT01	
plu2481-SacI	GCGCGAGCTCTGCACAGATCACAAAAGTTGG		
Plu1967-PstI	GCGCCTGCAGCAAATCGTTTAAATGCGTTAT	cloning of pagC (plu1967) from Photorhabdus luminescens	
Plu1967-SacI	GCGCGAGCTCGACAAATCACCAAGGTTGTCA	TT01	
PAU_02047-PstI	GCGCCTGCAGCGCGATTGGCGATTAGTTAT	cloning of ail (PAU_02047) from Photorhabdus asymbiotica	
PAU_02047-SacI	GCGCGAGCTCCCTGTCACAAGACAGGGAATC	ATCC43949	
PAU_02601-PstI	GCGCCTGCAGGTCGGTCTGCAAACCATTTT	cloning of pagC (PAU_02601) from Photorhabdus asymbiotica	
PAU_02601-SacI	GCGCGAGCTCAATCACCAAGGCGATAAATCA	ATCC43949	
L-plu2480Eco	CGGAATTCAAAGCGGGTATCCAGGTTTA	cloning of the region upstream <i>ail 1</i> from <i>Photorhabdus</i> <i>luminescens</i> TT01	
R-plu2480Bam	CGGGATCCCCTACCGCTACCACTGAAGC		
L-plu2481Eco	CGGAATTCCTGAATGGTACTCTTAATTACGC	cloning of the region upstream ail 2 from Photorhabdus	
----------------------------	---	--	
R-plu2481Bam	CGGGATCCCTGCCACTGCTGAGGCTAT	luminescens TT01	
L-gyrB	ATACACGAAGAAGAAGGTGTTTCAG	qRT-PCR of an internal region within <i>gyrB</i> from <i>Photorhabdus</i>	
R-gyrB	TACCTGTCTGTTCAGTTTCTCCAAC	luminescens 1101	
L-plu2480	AGAACATTAGTGGCTTCAGTGGTAG	qRT-PCR of an internal region within <i>ail 1</i> from <i>Photorhabdus</i>	
R-plu2480	ATTATCCAACTCGTAGCGGTATTTC	luminescens 1101	
L-plu2481	AGCAAGATTGGTACTGGTGATTTAG	qRT-PCR of an internal region within <i>ail 2</i> from <i>Photorhabdus</i>	
R-plu2481	CATAAGCAGCAGAGGTCTTACTCTC	luminescens 1101	
L-plu1967	GTATCTGCGATAACTTTACCTGCTC	qRT-PCR of an internal region within <i>pagC</i> from <i>Photorhabdus</i>	
R-plu1967	CATTATAGCTGTAGCCAAGATGGAC	luminescens 1101	
L- PhoP-His-NdeI	CGCGCGCCGCATATGCGGATATTGATCGTTGAAGACAACATGTTACTGC	Cloning of <i>phoP</i> from <i>P</i> . <i>luminescens</i> TT01	
R- PhoP-His- <i>Bam</i> HI	GCGCGGATCCTTACACATCGAAGCGATAGCCTTGGCCCCG	Cloning of <i>phoP</i> from <i>P</i> . <i>luminescens</i> TT01	

Figure S1: Acetyl phosphate can phosphorylate PhoP-His in vitro

To evaluate the efficiency of PhoP-His phosphorylation by acetyl phosphate, precast 12.5% polyacrylamide Mn²⁺-Phos-tag gel (Wako Chemicals, Japon) was used. When present the Phos-tag and its associated divalent cation Mn²⁺ form a complex with phosphorylated forms and retard protein migration. Four micrograms of purified PhoP-His were incubated *in vitro* either with 50 mM acetyl phosphate (lane 2) or without acetyl phosphate (lane 1) using the buffer described for EMSA protocol. SDS-PAGE was performed using standard protocols and gel was run at 4°C and 150 V to avoid phosphate hydrolysis until 10 min after loading blue sorting. Thereafter, the gel was incubated during 10 min in the Cathode buffer (40 mM 6-amino caproic acid, 25 mM Tris, 20 % methanol) supplemented with 1 mM EDTA in order to quench Mn²⁺ cations and 20 min in the cathode buffer without EDTA to remove excess of EDTA. The gel was stained with coomassie brilliant blue.

In absence of acetyl phosphate, only unphosphorylated PhoP-His is found (lane 1) whereas phosphorylated PhoP-His and dimerization are observed in presence of acetyl phosphate (lane 2) showing that acetyl phosphate can phosphorylate PhoP-His *in vitro*.



<u>Conclusion</u>

Dans ce chapitre, nous avons abordé la caractérisation de gènes PhoPQ dépendant chez *P. luminescens* avec des analyses moléculaires classiques (RT-qPCR) abordant l'expression des gènes à l'échelle des populations bactériennes. Le marqueur *pbgPE* nous a permis de confirmer que le MgSO4 est bien un inducteur de PhoQ chez *P. luminescens*. Avec le second marqueur, *ail1*_{Pl}, validé par RT-qPCR nous avons pu confirmer qu'*ail1*_{Pl} répond aussi au MgSO4 dans l'article ci-dessus. Dans le travail sur Ail, nous avons également pu mettre en évidence *in vitro* (addition d'ACP) que PhoP phosphorylé était la forme active de PhoP, capable de transcrire les gènes. Bien qu'Ail et PagC appartiennent à la même famille de protéines, nous avons pu déterminer que seul *ail1*_{Pl} était directement régulé par PhoP. Jusqu'à présent, ce résultat n'avait pas été décrit chez d'autres bactéries pathogènes, ce qui est différent des résultats décrits chez *Salmonella* où *pagC* est indirectement régulé par PhoP. Afin de caractériser les interactions entre PhoP et *pbgPE*, nous avons abordé dans le chapitre suivant une approche à l'échelle de la cellule bactérienne en utilisant des techniques dites « single cell ».

Chapitre IV : Rôle de PhoP dans I'hétérogénéité de la population

I- Introduction

Bien que nous ayons pu approfondir le mécanisme de régulation des gènes PhoP-dépendant notre approche jusqu'ici était majoritairement restée globale. Afin de détecter le mécanisme à l'origine de l'apparition de la sous-population résistante, nous avons approfondi également l'étude de cellules unique grâce à la cytométrie de flux et à l'utilisation d'une GFP déstabilisée (article 2).

Nos premiers résultats (article 1) montrent que l'architecture du réseau de régulation PhoPdépendant est différente entre Photorhabdus et Salmonella. Chez Salmonella l'activation de pbgPE par PhoP est indirecte et nécessite un deuxième système à deux composantes PmrAB et le connecteur pmrD. Or chez P. luminescens les gènes pmrAB et pmrD ne sont pas présents dans le génome (Duchaud et al. 2003), ainsi cela pose la question de la fixation de PhoP sur pbgPE, est-elle directe comme pour $ail1_{Pl}$? ou indirecte? Le mécanisme de régulation a été élucidé pour $ail1_{Pl}$ et nous aide à mieux comprendre comment fonctionne le régulon, cependant ail1_{Pl} n'est pas responsable de l'apparition de la sous-population résistante aux CAMPs ; en effet il s'agit des gènes pbqPE. Dans ce chapitre nous avons caractérisé la sous-population résistante chez Photorhabdus dépendante de PhoP et surtout de pbgPE afin de mieux caractériser l'architecture du régulon PhoP (article 2). Dans cet article nous avons pu mettre en évidence la régulation directe des gènes pbgPE et phoP par PhoP chez Photorhabdus traduisant d'une part, le rôle clé de PhoP et pbgPE dans l'apparition de la souspopulation résistante et, d'autre part, montrant une boucle de rétroaction positive au niveau de l'expression de phoP. Enfin nous avons pu démontrer que seule la sous-population résistante était responsable de la mort de l'insecte (article 2). Puis dans un second temps, nous avons cherché quel mécanisme précis est responsable de l'apparition de cette sous population (données complémentaires). Afin de compléter les résultats de notre second article, nous avons tenté d'élucider le mécanisme responsable de l'apparition de la sous-population résistante. Nous avons testé plusieurs hypothèses grâce à des approches globales et en cellule unique et nous avons pu identifier que la zone du switch se situait dans les 95 pb en amont de l'ATG des gènes pbgPE.

II- Matériels et Méthodes

Souches et conditions de culture

Les souches de Photorhabdus et d'E. coli sont cultivées à 28°C et à 37°C respectivement en LB ou en

milieu minimum M9 supplémenté de 0,1 % de casamino-acides, 0,41 mM d'acide nicotinic, 9,1 mM de pyruvate de sodium, 0,2 % de glycérol et de 0,1 mM de CaCl₂. Quand nécessaire, les antibiotiques sont utilisés aux concentrations suivantes : kanamycine (Km) 20 μ g/ml, polymyxine B (polyB) 100 μ g/ml, gentamicine (Gm) 15 μ g/mL, chloramphenicol (CAM) 30 μ g/mL.

Construction de la protéine PhoP-His, Surproduction et purification de PhoP-His

La stratégie pour tagger PhoP utilisée durant cette thèse est différente de la stratégie communément employé chez les PhoP de *Salmonella* et *E. coli*. En effet dans ces bactéries PhoP était majoritairement taggées en C-terminale soit après le domaine de liaison à l'ADN. Or il a été montré qu'un tag en C-terminal modifiait les propriétés de fixation de la protéine PhoP sur ses gènes cibles en affectant ses propriétés structurales. Nous avons donc choisi de tagger PhoP sur sa partie Nterminale (tag 6-histidine) c'est à dire avant le domaine d'interaction avec PhoQ (domaine accepteur de phosphate). Les méthodes employées pour obtenir la construction, ainsi que la surproduction et la purification de la protéine PhoP-His utilisées pour les EMSA ont été décrite dans les articles 1 et 2.

Détection de la protéine PhoP

(i) Production de l'antiséum contre PhoP

Cette construction a ensuite été électro-éluée d'un gel afin d'en assurer une pureté >95%. La protéine purifiée a ensuite été utilisée pour injecter 2 lapins "New-zealand white germ-free" pour à terme obtenir des anticorps contre la protéine PhoP-His. La production d'anticorps a été réalisée par la boite de production Eurogentech selon le protocole "speedy" de 28 jours.

(ii) Western blot

Les extraits totaux bactériens des souches TT01 et *phoP* sont dénaturés à 95°C pendant 10 minutes et sont déposés à migrer sur gel de polyacrylamide à 15% dans du tampon Tris glycine à 250 V pendant 3 heures. A la fin de la migration le gel est transféré sur membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec dans un appareil BioRad pendant 1h30, l'ampérage étant calculé selon la formule : 1.2 mA par cm² de membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été mise à saturer dans une solution de PBS tween (0.005%) + lait (10%) (PBST-lait 10%) sur la nuit à température ambiante avec agitation. Puis la membrane est lavée 3 fois dans une solution de PBS tween 0.005% (PBST) pendant 10 minutes. L'anticorps est dilué (au 1/1000ème pour l'anti-HA et l'anti His-tag et au 1/500ème pour l'anticorps anti-PhoP) dans du PBST-lait 1% et laissé pendant 1h à température ambiante sous agitation. Puis la membrane est lavée 3 fois 5 minutes avec du PBST et l'anticorps secondaire antilapin dilué au 1/500ème dans du PBST-lait 1% est mis sur la membrane pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. Puis la membrane est lavée 3 fois 5 minutes dans du PBST.

L'anticorps secondaire étant couplé à une péroxidase, on réalise une révélation par chimieluminescence (GE Healthcare) sur film photo Kodak.

(iii) Immunofluorescence assay

La souche sauvage TT01 a été cultivée dans du LB jusqu'à une DO=0,6-0,9. Après centrifugation et lavage, 250 µL de bactéries ont été fixées par ajout de 750 µL de PBS-paraformaldéhyde 4% (w/v) pendant 20 minutes dans la glace. Après lavage de l'excédent de formaldéhyde, 20 µL de bactéries sont déposées sur lame poly-lysine puis séchées à température ambiante. On traite ensuite les cellules avec 2 mg/mL de lysozyme pour perméabiliser les membranes pendant 5-10 minutes puis on lave 3 fois avec du PBS-tween 0.005% (PBST). Une étape de saturation des sites non spécifique par du PBS-BSA (2% w/v) pendant 15 minutes est ensuite réalisée. Après retrait de l'excédent de solution de saturation, l'AC anti PhoP-His (1/200^{ème}) est déposé sur les cellules et laissé à incuber pendant 1h en chambre humide. Après 3 lavages de la solution d'anticorps par du PBST l'AC secondaire anti-lapin (1/500^{ème}) couplé FITC est déposé sur les cellules et laissé incuber 2 heures dans le noir en chambre humide.

Construction du plasmide pBB-Plac-PhoPHA

On a construit une protéine PhoP-taggée hémaglutinine en C-terminale. Pour cela le gène *phoP* (684 pb) a été amplifié par PCR avec les amorces décrites an annexe dans la table 2 et digéré par *BamH*1 et *Xba*1. Le produit de PCR obtenu a été ligaturé dans les mêmes sites de restriction du plasmide pBBmcs2 (Kovach et al. 1995). Le plasmide recombinant pBB-P_{lac}-PhoPHA a été transféré par conjugaison dans les souches de *P. luminescens* TTO1 et *phoP*.

Construction du plasmide pBB-P_{ail1Pl}-pbgPE

On a construit une fusion trandcriptionnelle entre la région promotrice de $ail1_{Pl}$ et les gènes de résistance *pbgPE*. Pour cela la région promotrice de $ail1_{Pl}$ (360 pb) a été amplifié par PCR avec les amorces décrites an annexe dans la table 2 et digéré par *Ncol* et *Xhol*. Le produit de PCR obtenu a été ligaturé dans les mêmes sites de restriction du plasmide pBBmcs5 (Kovach *et al.* 1995). Le plasmide recombinant pBB-P_{ail1Pl}-pbgPE a été transféré par conjugaison dans les souches de *P. luminescens* TT01 et *phoP*.

Mutations ponctuelle de PhoP, PhoQ et pbgPE (site GATC)

Les constructions pBB-P_{lac}-PhoPHA, pBB-P_{lac}-PhoPQ et P_{pbgPE}-gfp[AAV] ont été mutées afin de tester l'effet de la phosphorylation et de la Dam méthylation dans l'apparition de la sous population résistante. Les amorces contenant les mutations ont été commandées chez Eurogentech et purifiée par HPLC. Le plasmide purifié à partir d'*E. coli* (maxiprep kit Qiagen) a servi de matrice. Brièvement,

35 ng de matrice ont été utilisé et muté sur l'aspartate 52 de PhoP, la thiamine 45 ou l'alanine 46 de PhoQ et l'alanine du site GATC du promoteur de *pbgPE* en suivant les instructions fournies par le Kit QuickChange Lightening Site-directed mutagenesis (Agilent). Les constructions obtenues pBB-P_{lac}-PhoPHA(D52E), pBB-P_{lac}-PhoPHA(D52A), pBB-P_{lac}-PhoPQ(T45I), pBB-P_{lac}-PhoPQ(A46T) et P_{*pbgPE*}(GTTC)-*gfp*[AAV] ont été transférées par conjugaison dans les souches de *P. luminescens* TT01 et *phoP*.

Construction de la protéine PhoP tronqué : conservation du domaine HTH

Afin d'obtenir une forme constitutivement active de PhoP nous avons produit une protéine tronquée pour ne garder que le domaine de liaison à l'ADN (HTH). Le site de coupure du domaine HTH a été choisi après l'interface de dimérisation de la protéine (TKPF) après discussion avec V. Molle. La région HTH (363 pb) a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces listées en annexe Table 2 et digéré par *Nde*I et *Bam*H1. Le produit de PCR obtenu a été ligué dans les mêmes sites de restriction du plasmide pBBmcs2. Le plasmide recombinant a été transféré par conjugaison dans le mutant *phoP* de *P. luminescens*.

Recherche d'une méthylation différentielle de l'ADN

(i) Tests hétérologues chez E. coli pour les méthylations

La construction P_{pbgPE} -gfp[AAV], a été introduite par éléctroporation (2.5 V, 25 µF) dans les souches d'*E. coli* XI1 blue (dam+/dcm+), JMM110 (dam-/dcm-), dam16::Km (dam-/dcm+), JW144-2 (dam+/dcm-) et sa parentale BW25113 (dam+/dcm+). Les transformants ont été cultivés dans une plaque 96 puits. Pour chaque puits une dilution au 1/1000^{ème} d'une culture overnight a été ajoutée soit au milieu LB supplémentée de chloramphénicol 30 µg/mL, soit au milieu minimum M9 supplémenté de chloramphénicol 30 µg/mL et de MgSO4 à différentes concentrations (10 µM et 10 mM). Puis, la plaque est mise à incuber à 28°C pour 20 heures avec agitation dans un lecteur de microplaque Infinite (TECAN). L'absorbance à 600 nm et l'intensité de la fluorescence de la GFP (excitation à 485 ± 4.5 nm; émission à 520 ± 10 nm) sont mesurés toutes les 30 minutes. La fluorescence spécifique est obtenue en divisant les unités de fluorescence au maximum d'expression par la valeur de l'absorbance.

(ii) Southern Blot

5 μg d'ADN génomique ou 150 ng d'ADN plasmidique ont été digéré 2 heures à 37°C par les enzymes de restriction sensible *Dpn*I et insensibles *Sau*3A et *EcoR*I aux méthylations. La sonde ADN (229 pb en amont de *pbgPE*) a été amplifiée par PCR classique en remplaçant les dNTP par des dNTP marqués à la Digoxygénine (PCR dIG labelling mix ROCHE). La pureté et la quantité ont été contrôlées sur gel

d'agarose puis la sonde a été purifiée par le kit High pure PCR purification (ROCHE). Le southern a été réalisé d'après (Givaudan, Lanois, et Boemare 1996) avec des modifications mineures : température d'hybridation de 63°C.

(iii) Conversion au bisulfite

La conversion bisulfite a été réalisée sur de l'ADN génomique de TTO1 ou plasmidique purifié à partir de culture de la souche TTO1/P_{pbgPE}-gfp[AAV] cultivées en conditions avec et sans polymyxine B par le kit d'extraction MaxiPrep (Mashrey Nagel). La conversion a été réalisée sur 300 ng d'ADN environ en suivant les instructions du kit Methyledge bisulfite conversion system (Promega). L'ADN modifié a été amplifié par PCR avec les amorces en annexe Table 2 et envoyé à séquencer (Eurofins).

Construction d'une fusion transcriptionnelle entre une forme réduite du promoteur *pbgPE* et la *gfp*[AAV].

La région promotrice de *pbgPE* (123 pb dont 95 pb en amont de l'ATG) a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces listées en annexe Table 2 et digérée par *Sbfl* et *Sal*I. Le produit de PCR obtenu a été ligaturé dans les mêmes sites de restriction du plasmide pPROBE-*gfp*[AAV]. Le plasmide recombinant a été transféré par conjugaison dans le mutant *phoP* de *P. luminescens*.

III- Résultats

Article 2 :

Cationic antimicrobial peptide resistant sub-population in *P. luminescens* TT01 strain is responsible for virulence in insects

1	Cationic antimicrobial peptide resistant sub-population in P. luminescens TT01 strain is
2	responsible for virulence in insects
3	
4	Annabelle Mouammine ^{1,2} , Anne Lanois ^{1,2} , Gregory Jubelin ³ , Sylvie Pages ^{1,2} , Alain
5	Givaudan ^{1,2}
6	¹ INRA, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI),
7	Montpellier, France
8	² Université Montpellier 2, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-
9	Insectes (DGIMI), Montpellier, France
10 11	³ INRA, Microbiote intestinal : Fonctions et impacts sur la nutrition et la santé de l'hôte, Clermont- Ferrand, France
12	
13	
14	Short title: Resistant sub-population
15	
16	Key words: CAMPs resistance, pbgPE, PhoPQ; heterogeneity; Photorhabdus
17	
18	#Corresponding Author: Alain Givaudan, INRA, UMR Diversité, Génomes et Interactions
19	Microorganismes-Insectes (DGIMI), Université Montpellier 2, CC 54, 34095 Montpellier
20	Cedex 05, France; tel: +33 4 67 14 48 12, fax: +33 4 67 14 42 99; e-mail: givaudan@univ-
21	montp2.fr
22	

23 Introduction

24 Bacteria live in environments that undergo perpetual alterations and in which they are challenged by antibiotics, bacteriophages, mutagens, toxins and more. Which strategies do 25 bacteria use to optimize their chance of surviving? Among mechanisms used by bacteria to 26 survive, there are two key strategies: phase and antigenic variation (Van der Woude 2011) 27 28 that corresponds to genetic alterations and the bistability generated by epigenetic mechanisms 29 on clonal population (Dubnau et Losick 2006). Both of these strategies lead to bacterial 30 heterogeneity. Bacterial population has been traditionally seen as an isogenic and clonal population genetically and phenotipically identical. The development of single cell 31 32 technology such as cytometry and fluorescence microscopy allowed the development of studies showing heterogeneous gene expression in bacterial cells (Smits, Kuipers, et Veening 33 2006). Heterogeneity is found in various bacteria like Salmonella in Salmonella-containing 34 vacuoles (Helaine et Holden 2013) or Photorhabdus during the colonization of nematodes 35 36 (Somvanshi et al. 2012).

37

38 Photorhabdus luminescens subsp laumondii TT01 is an entomopathogenic bacterium (Enterobacteriaceae) living in a symbiotic association with the nematode Heterorhabditis. The 39 bacteria-nematode complex invades insect larvae and the nematode regurgitates its bacterial 40 41 symbiont directly into the hemolymph, the insect blood. The bacteria can overcome the insect immune system and colonize the insect body cavity leading to lethal septicemia (Waterfield, 42 Ciche, and Clarke 2009). Bacterial virulence factors and insecticidal toxins also participate to 43 the insect death (Silva et al. 2002; Nielsen-LeRoux et al. 2012). Once the insect host is dead, 44 45 bacteria bioconvert the tissues, digest the content of the cadaver and the nematode feeds on it 46 as a food source while reproduction occurs through several generations (Clarke 2014). According to its dual lifestyle, Photorhabdus is a good model to study bacteria-insects and 47 bacteria-nematode interactions. Recently, it has been demonstrated that the *mad* genes 48 expression is under the control of a genetic switch of the promoter region. In the ON state 49 mad genes can be transcribed and the bacteria are covered with fimbriae. This form of 50 51 *Photorhabdus* is called the M form (for mutualistic form) because it is found only during the symbiosis with the nematode. But, when the mad promoter is in the OFF conformation, no 52 53 fimbriae are produced on the bacterial cell surface and only the P form (for pathogenic form) of *Photorhabdus* is found. Only the P form, can multiply and kill the insect and can support 54 55 nematode growth (Somvanshi et al. 2012).

Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) are produced following insect infection (Bang et al. 56 2012 ; Haine et al. 2008) and act in complement of cellular immunity to fight against bacterial 57 invasion. CAMPs are small amphipathic basic peptides from 15-40 amino acids (for review 58 see (Bulet and Stöcklin 2005)) secreted by a large number of organisms including plants, 59 animals and microbes and present a large variety of structure. However, the two prominent 60 classes involved alpha-helical and beta-sheet peptides (Tossi, Sandri, and Giangaspero 2000). 61 CAMPs have antibacterial activity acting through charge interactions with the anionic 62 bacterial surface, predominantly binding to the acidic lipid A moiety of the LPS (Rana et al. 63 1991 ; Srimal et al. 1996). 64

PhoPQ has been extensively studied in Salmonella where it controls about 3% of Salmonella 65 gene expression either in a direct or indirect pathway (Kato, Groisman, and Howard Hughes 66 Medical Institute 2008). Among genes regulated by PhoPQ, virulence factors or genes 67 68 implicated in LPS modifications are found such as pagP and pbgPE. pagP is directly regulated by PhoP in Salmonella spp, and responsible for addition of palmitate residue on 69 70 lipid A of the LPS. This lipid A palmitoylation confers resistance towards cationic antimicrobial peptides (CAMPs) (Guo et al. 1998) and reduce bacterial recognition by 71 72 immune system in a TLR4 dependant pathway (Kawasaki, Ernst, et Miller 2004). Another 73 modification involved in LPS modification is the addition of an amino-arabinose on lipid A core of the LPS (Gunn et Miller 1996). This modification modifies the global net charge of 74 bacterial cell membrane from negative to positive conferring resistance towards CAMPs 75 76 (Gunn et al. 1998). In Salmonella the pbgPE operon codes for enzymes responsible for amino-arabinose addition on lipid A. PhoP indirectly regulates *pbgPE* expression via another 77 two component system PmrAB (Gunn et Miller 1996). pbgPE expression is activated at low 78 Mg^{2+} concentrations. *pbgPE* has been shown to have a role in bacterial virulence and 79 homologues have been described in other Gram negative bacteria such as Yersinia, E. coli and 80 Photorhabdus. pbgPE operon in Photorhabdus is also required for virulence in insects 81 (Bennett et Clarke 2005) but neither pmrAB nor pmrD genes were found in P.luminescens 82 83 genome (Duchaud et al. 2003). In addition, PhoP-PhoQ also plays an essential role in virulence phenotype in that phoP mutant lead to completely avirulent phenotype in 84 lepidopteran insects and sensibility towards CAMPs such as polymyxin B and cecropins A 85 and B (Derzelle et al. 2004). In addition, we recently showed that aill_{Pl} gene encoding an 86 OMP belonging to the Ail/OmpX/PagC/Lom family was directly regulated by PhoP. ail1_{Pl} 87 also respond to Mg²⁺, the main *in vitro* inductor, responsible for PhoPQ activation as reported 88 in Salmonella (Mouammine et al. 2014). 89

90	Here, we demonstrated that the virulence strategy of P. luminescens is to produce a stable
91	sub-population resistant towards CAMPs which is responsible of septicemia in insects. The
92	resistant bacteria represent only 0.5% of the wild type population in P. luminescens TT01
93	during in vitro cultures and we demonstrated that this heterogeneity relies on PhoP and
94	pbgPE. Heterogeneity appears to be a key mechanism for Photorhabdus life cycle.
95	
96	
97	
98	Material and Methods
99	
100	Bacterial strains, plasmids, and growth conditions
101	
102	The strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. P. luminescens strains were
103	routinely grown at 28°C in Luria-Bertani (LB) or Mueller Hinton broth (Biokar), nutrient agar
104	medium (Difco), NBTA agar (Brunel et al. 1997). Photorhabdus was also grown in M9
105	liquid medium supplemented with 0.1 % casamino acids, 0.41 mM nicotinic acid, 9.1 mM
106	sodium pyruvate, 0.1 mM CaCl2 and 0.2 % glycerol with different concentrations of $MgSO_4$
107	(10 μ M and 10 mM). When required, antibiotics were used at the following final
108	concentrations: polymyxin B 100 mg.l ⁻¹ , kanamycin, 20 mg.l ⁻¹ , gentamicin, 15 mg.l ⁻¹ ,
109	erythromycin 15 mg.l ⁻¹ .
110	
111	
112	Antibacterial activity.
113	
114	In vitro susceptibility tests to determine MICs were performed by the broth microdilution

directly to 96-well microtiter plates in twofold serial dilutions. 10^4 bacteria grown at a OD 0.6-0.8 was dispensed into each microdilution well. The MICs were determined in Mueller-

method according to National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed

guidelines (Hetru et Bulet 1997), with some modifications. Stock solutions of colistin

methane sulfonate (Sigma) and polymyxin B (Sigma) were diluted in sterile water to obtain

concentrations of 20 and 50 mg/ml, respectively. Stock solutions of cecropin A and B were

prepared in 0.5% acetic acid to obtain a concentration of 0.4 mg/ml, cecropin A from

S. frugiperda was prepared in distilled water at 0.5 mg/ml. Antibiotics were then added

115

116

117

118

119

120

Hinton broth (Biokar) following incubation at 28°C for 48 h. The microtiter plates were read
by visual observation.

- 125
- 126

127 Protein PhoP-His purification protocol

128

The entire coding region of phoP gene from TT01 strain was amplified by PCR and digested 129 by NdeI and BamHI (Table S2). The ligation of the PCR product obtained was performed into 130 131 the same site of the expression vector, pETPhos (Pfaffl, Horgan, et Dempfle 2002) inserting a His-tag in N-term part of proteins thereby generating P_{T7}PhoP-His. The recombinant plasmid 132 encoding a PhoP-His fusion protein was transformed into E. coli BL21 (DE3) pLysS cells. At 133 an OD between 0.5-0.8, the expression of PhoP-His was induced by adding isopropyl-beta-D-134 135 thiogalactoside at 0.5 mM, then an overnight induction was performed at 18°C. Bacterial culture was centrifuged at 7,000 x g for 15 min at 4°C, washed twice in resuspension buffer 136 137 (Tris 5 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, Glycerol 10 %, Imidazole 10 mM) and pellet was frozen at -80°C for 30 min. Pellet was then suspended in 5 ml resuspension buffer and lysed by 138 139 sonication during 10 min at 4°C. Lysis products were centrifuged at 10,000 x g during 30 min 140 at 4°C. 500 µL of pre-equilibrated beads of Ni-NTA agarose (Qiagen) in the wash buffer (Tris 5 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, glycerol 10 %, Imidazole 15 mM) were added to the 141 supernatant fraction and incubated during 45 min with shaking at 4°C. The fraction was 142 143 centrifuged at 500 x g during 2 min at 4°C and wash 5 times with wash buffer. Protein was eluted twice in 1 mL elution buffer (Tris 5 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, glycerol 10%, 144 Imidazole 200 mM). Concentration of recombinant protein was assessed by Bradford assay 145 and controlled by SDS-page gel. Recombinant proteins were conserved at -80°C until use. 146

- 147
- 148

149 Electrophoretic mobility-shift assays (EMSA)

150

The promoter of *ail1*_{Pl} was amplified by PCR from the genomic DNA of TT01 strain using primers (Table S2) and purified using the High Pure PCR Product Purification kit (ROCHE). The 5' ends of DNA were labeled using $[\gamma^{-32}P]$ ATP and T4 polynucleotide kinase (Promega). Radioactive DNA probe (2000 cpm/ml), 200ng of poly(dI-dC)-poly(dI-dC) (SIGMA) and different amounts of PhoP-His were mixed with binding buffer (50 mM tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 50 µg/mL BSA) in a total 20µl volume and incubated for 20 min at room

temperature. The mixture was then loaded onto a native 6 % (w/v) polyacrylamide TBE
precast Gel (Invitrogen) and electrophoresed in 1 % TBE (Tris-Borate-EDTA) buffer for 1 h
at 100 V. Radioactive species were detected by autoradiography. PhoP-His was activated by

- 160 in vitro phosphorylation with acetyl phosphate as previously described (Jubelin *et al.* 2013).
- 161

162 Molecular techniques and RNA preparation

163

DNA manipulations were carried out as previously described (Ausubel et al. 1999). Plasmids 164 165 were introduced into E. coli Wm3064 (Table S1) by transformation and transferred to P. luminescens by filter mating (Brillard et al. 2002). All constructs were sequenced by MWG 166 167 operon Eurofins. Total RNA was extracted and purified with the RNeasy miniprep kit (Qiagen), including a DNase I treatment step. For each RNA preparation, we assessed DNA 168 169 contamination by carrying out a control PCR. The quantity and quality of RNA, respectively, were assessed with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and an Agilent 170 171 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent). Material for qPCR analysis was prepared by extracting total RNA from the P. luminescens wild-type strain 172 173 grown in Luria broth, in Luria broth supplemented with polymyxin B or M9 medium 174 supplemented with 10 μ M or 10 mM MgSO4. For the comparison between total and resistant population, RNA were prepared from an OD540=0.3 culture before adding polymyxin B in 175 the medium and after adding polymyxin B (around 10-12 hours later when the OD reach 176 again 0.3). Samples were differentially analyzed to evaluate gene expression level before and 177 after adding polymyxin B (three independent biological replicates) and in 10 µM versus 10 178 mM MgSO4 M9 supplemented medium. The primers used in this study (Eurogentec) are 179 180 described in Table S2.

- 181
- 182

183 RT-qPCR analysis

184

185 RT-qPCR was performed in two steps. First, the cDNA was synthesized from 500 ng of total 186 RNA, with Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random hexamers 187 (100 ng/ μ l) (Applied Biosystems). We then carried out qPCR in triplicate with the 188 LightCycler 480 SYBR Green I Master kit from Roche Diagnostics, with 1 μ l of cDNA 189 synthesis mixture (diluted 1:100) and 1 μ M of specific primers for the genes studied (Table 190 S2). The enzyme was activated by heating for 10 min at 95°C. All qPCRs were performed in

three technical replicates, with 45 cycles of 95°C for 5 seconds, 60°C for 5 seconds and 72°C for 10 seconds, and were monitored with the LightCycler 480 system (Roche). Melting curves were analyzed for each reaction and each curve contained a single peak. The data for each sample are expressed relative to the expression level of *gyr*, using REST software 2009 (Pfaffl, Horgan, et Dempfle 2002) as previously described in (Jubelin *et al.* 2013). This method provided a relative quantification of the expression of a target gene with respect to a reference gene, for the comparison of the wild-type strain in different growth conditions.

- 198
- 199

200 Evaluation of resistant sub-population.

201

Antibiograms are performed as follows. An exponentially phase culture was diluted in Mueller-Hinton medium and 1 mL of a total of 10^3 CFU was spread on Mueller Hinton agar plates and lay for 5 minutes. The excess was removed and plates were let to dry for 5 to 10 minutes. Paper discs were filed on the plates on which 500 µg and 50 µg of polymyxin B were added in a maximal volume of 10 µl. Plates were incubated at 28°C and results were observed after 48h incubation.

To quantify the proportion of resistant sub-population in total population *in vitro*, we assessed CFU on nutrient agar plates. Samples of the same culture of wild-type strains were diluted and at least three dilutions were spread on plates with nutrient agar or nutrient agar supplemented with polymyxin B 100μ g.mL⁻¹ final concentration to isolate the resistant subpopulation. Samples were collected during bacterial growth at each key point (lag, exponential and stationary phase). Plates were counted 48 h after incubation at 28°C.

- 214
- 215

216 Construction of plasmids expressing gfp[AAV] under the control of pbgPE gene promoter.

217

As described in (Jubelin *et al.* 2011), we use a similar method to construct plasmids expressing the reporter gene gfp[AAV] under the control of the pbgPE or lac promoter region. The construction of P_{lac} -gfp[AAV] has been described elsewhere (Abi Khattar 2009). The construction of the P_{pbgPE} -gfp[AAV] was performed as follows. Briefly, DNA fragment corresponding to the pbgPE promoter region (198-bp) was amplified by PCR from TT01 genomic DNA with primers containing a *Kpn*I or *Xba*I restriction site. The PCR products were digested and inserted into the corresponding sites of pPROBE-gfp[AAV] plasmid.

Finally, P_{lac} -gfp[AAV] and P_{pbgPE} -gfp[AAV] were transferred by bacterial mating in TT01 strain.

227

228 *pbgPE* expression in individual bacterial cells by flow cytometry

229

Bacterial strains were grown in LB supplemented with kanamycin at 28°C. All the cultures 230 were standardized with initial OD₅₄₀=0.05 in 100 mL LB medium. For kinetic analyses, 231 samples were taken at the indicated time points, washed once with PBS (without calcium and 232 magnesium) and bacteria were fixed in PBS-formaldehyde 2% for 15 minutes at room 233 temperature. For resistant subpopulation analysis, samples were collected at an $OD_{540}=0.3$ 234 before adding polymyxin B 100 μ g.ml⁻¹ and at an OD₅₄₀=0.3 after culture treatment by 235 polymyxin B. Samples were then washed once with PBS and bacterial pellets were stored at 236 237 4°C until flow cytometry analysis. Thereafter, all samples were analyzed in a FACS Canto II flow cytometer (ROCHE), and tested for GFP quantification and live dead analysis. Ten 238 239 milliliter of culture were washed once with PBS and resuspended in 1 mL PBS for each color or multicolor staining: Hoechst 33342 strain (ROCHE) which colors dead and live cells (1/10 240 241 diluted), Fixable Viability Dye eFluor 660 (ROCHE) (1 µL for 1 mL), Hoechst + eFluor 660 and none treatment. Cells were stained in Hoechst for 15 minutes at room temperature in dark 242 and 30 minutes in e660 in dark and at 4°C. Then the samples were washed once in PBS and 243 fixed as described above. 244

Forward scatter (FSC), side scatter (SSC) and GFP parameters were set to log, and biexponential display was used for the GFP parameter. A total of 30,000 bacteria for each sample were captured unless otherwise indicated and raw data were analyzed with FlowJo version 8.8.6 software (TreeStar). Compensations were done if necessary. Only live cells were count in GFP analysis (Hoechst positive and eFluor 660 negative).

- 250
- 251

252 In vivo pathogenicity assays.

253

The common cutworm, *Spodoptera littoralis*, was reared with a photoperiod of 12 h on an artificial diet at 24°C. Fifth-instar larvae were selected and surface sterilized with 70% (vol/vol) ethanol prior to intrahemocoelic injection. Then, with a Hamilton syringe, groups of 20 larvae were injected with 20 μ l a total of 10³ CFU of bacteria in exponential growth phase culture supplemented with antibiotics when necessary (polymyxin B 100 μ g.ml⁻¹). Treated

larvae were individually incubated for up to 96 h, and the time at which insects died was
recorded. Bacterial concentrations were determined by CFU by plating dilutions onto nutrient
agar. Statistical analysis was performed by comparing survival experiments. The rank test
(Wilcoxon test) was used to compare mortality patterns as previously described (Jubelin *et al.*2011).

For bacterial growth kinetics in insect larvae, 60 fifth-instar larvae were injected with 20µL of 264 overnight cultures prior washed once and diluted in PBS (with antibiotics if necessary). 20 265 and 40 larvae are respectively used to monitor the pathogenicity and the bacterial growth in 266 267 hemocoel. 4 groups of 2 larvae are surface sterilized with 70% (vol/vol) ethanol, crushed 268 using a TissueLyzer II (Qiagen) at each point of the kinetic in 3 mL LB medium and then 269 centrifuged at 400 x g during 2 min to remove large larval debris. Number of bacteria is evaluated by observing an aliquot in fluorescence microscope, the extract is diluted following 270 271 the estimation and bacterial concentration was determined by CFU plating dilutions onto NBTA nutrient agar supplemented with erythromycin 15 μ g.ml⁻¹. To evaluate bacterial 272 273 concentration of the resistant sub-population the plates were supplemented with erythromycin 15 μ g.ml⁻1 and polymyxin B 100 μ g/ml. 274

275

276

277 **<u>Results</u>**

278

279 *phoP* and *pbgPE* are required to CAMP resistance in *P. luminescens*

The resistance profile of wild type population (TT01), phoP, the complemented 280 phop/P_{lac}phoPQ mutant strain, pbgE and the complemented pbgE/P_{lac}pbgPE mutant strain, 281 toward cationic antimicrobial peptides (CAMPs) was analyzed by minimal inhibitory 282 concentration (MIC). As previously reported (Derzelle et al. 2004; Bennett et Clarke 2005), 283 TT01 resists to high doses of CAMPs when phoP and pbgE mutant strains are susceptible at 284 very low doses of antimicrobials especially MIC with polymyxin B (Table 1). The 285 complementated strains (phop/PlacphoPQ, pbgE/PlacpbgPE) restore the wild-type resistant 286 phenotypes. The main explanation would be that the wild-type population is completely 287 resistant toward CAMPs and that PhoP and *pbgPE* are fully required to induce CAMPs 288 resistance. However, when a log less CFU of wild-type strain was used as inoculum in the 289 MIC assays, the bacterial growth in presence of high concentration of polymyxin B is weak 290 (Pagès S., data not shown). 291

292 PhoP directly controls *pbgPE* and *phoP* expression in *P. luminescens in vitro*

In other Gram negative bacteria, *pbgPE* has been described to be under the indirect regulation 293 of the two component system PhoP-PhoQ, like in S. Typhimurium (Gunn et Miller 1996), or 294 under the direct regulation of PhoPQ like in Y. pseudotuberculosis (Flamez et al. 2007). 295 Moreover, we previously showed that the phosphorylated form of PhoP can directly bind the 296 promoter region of ail1_{Pl} gene, a PagC related protein (Mouammine et al. 2014). In order to 297 have a better understanding of PhoP regulon in Photorhabdus, we described the interactions 298 between PhoP and *pbgPE* promoter region using electro-mobility shift assays (EMSA), 299 300 EMSAs were carried out to compare the interaction profiles of different amounts of PhoP protein on the 198-bp *pbgPE* and 206-bp *phoP* promoter regions (figure 1). A recombinant N-301 terminal His-tag PhoP protein (PhoP-His) was first produced from P_{T7}PhoP-His vector (Table 302 S1). The PhoP-His protein was purified and phosphorylated *in vitro* by incubation with acetyl 303 304 phosphate. Then, different amounts of phosphorylated and unphosphorylated PhoP-His were mixed with radiolabeled *phoP* and *pbgPE* promoters. A gel shift pattern was observed when 305 306 1.5 μ M, in the case of *phoP*, and 3.1 μ M, in the case of *pbgP*, of phosphorylated PhoP-His was added (figure 1). No shifted bands were observed upon incubation with unphosphorylated 307 308 PhoP-His. Therefore, PhoP-His protein can specifically bind to the promoter region of phoP and *pbgPE* confirming that the active form of PhoP corresponds to the phosphorylated 309 isoform and showing the positive feedback loop of PhoP on its own expression. 310

311

312 Low magnesium activate PhoP-dependent gene expression in *P. luminescens*

It has been shown that low concentrations of Mg^{2+} activate the expression of PhoP-dependent 313 genes in Salmonella whereas high Mg^{2+} concentrations repress the system ((for review see 314 (Groisman 2001 ; Kato, Groisman, et Howard Hughes Medical Institute 2008). We also 315 previously demonstrated that in *Photorhabdus ail1*_{Pl} gene, which is a PhoP activated gene, 316 responds to low Mg^{2+} concentrations. To extend our study to *pbgPE* among other genes, we 317 used RT-qPCR approach to evaluate the effect of low Mg^{2+} concentrations on PhoP-318 dependent genes expression. RT-qPCR was performed on RNA from TT01 strain grown in 319 M9 minimal medium supplemented with 10 µM or 10 mM MgSO4 at an OD around 0.3. The 320 figure 2 shows that in 10 µM MgSO4 condition *pbgP* expression in TT01 is 8-fold more 321 important than at 10 mM whereas it only represent a 2.5-fold increase for *pbgE*. For *ail1*_{Pl} 322 gene expression is similar to pbgP at 10 μ M with 9-fold increase. This confirms that pbgPE is 323 also induced at low concentrations of MgSO4 in P. luminescens. It has previously been 324 shown that in S. Typhimurium, suboptimal concentrations of CAMPs can also activate PhoP-325

dependent gene expression (Bader *et al.* 2005). The involvement of CAMPs suboptimal
concentrations on *pbgPE* expression was investigated and no increasing in *pbgPE* expression
was detected compared to wild type strain without treatment (data not shown).

To go further, we defined the transcriptionnal starts of pbgPE and $aill_{Pl}$ genes. The 329 transcriptionnal start of phoP was already identified by Derzelle et al 2004 (figure 3). RACE 330 PCR approach was used to determine the transcriptional start by analyzing RNA extracted 331 from TT01 cultures in 10 µM MgSO4, the inducing condition. We identified conserved -35 332 box and more divergent -10 box, two conserved sites for the fixation of RNA polymerase 333 enzyme (figure 3). When compared to S. Typhimurium, no conserved PhoP box was 334 identified in *Photorhabdus* and no consensus between the *ail1*_{Pl}, *phoP* and *pbgPE* genes of 335 336 Photorhabdus were found.

337

338 Only 0.5 % of the bacterial population resists to CAMPs.

Unlike MIC, antibiogram allows analysis of bacterial resistance towards CAMPs at the 339 340 individual level. We analyzed the resistance profile of wild type population, *phoP* and *pbgE* mutant and their respective complementation phoP/PlacphoPQ, pbgE/PlacpbgPE strains 341 342 (figure 4). Surprisingly, only few colonies from TT01 can grow in the halo containing a gradient of polymyxin B concentration demonstrating that the most part of the wild type strain 343 appears to be susceptible to polymyxin B. In contrast, no clones were observed in the halo for 344 phoP and pbgE strains. The phoP/PlacphoPQ complemented strain has a similar profile than 345 the wild-type strain with more resistant clones (about 7% of resistant bacteria in total 346 population) and the *pbgE*/P_{lac}pbgPE complementated strain has a fully resistance phenotype. 347 We can conclude that the TT01 strain is heterogenous with the major part of its population 348 349 which is susceptible towards CAMPs and a few part resistant. According to these results, it is likely that the resistant sub-population of P. luminescens requires expression of phoP and 350 pbgPE. 351

We next quantified the proportion of resistant and susceptible sub-populations in the wild-352 353 type strain during bacterial growth by spreading bacteria on nutrient agar plates supplemented or not with polymyxin B (figure 5). We observed that about 0.5% of the wild-type population 354 355 can resist to CAMPs overtime. When adding polymyxin B in the medium, the percentage of resistant sub-population increases to reach almost 50% in four hours, but if the selection 356 pressure is removed the percentage of resistant bacteria decreases from 50 % to 11% in less 357 than 24 hours and 5% after 38 hours. So the heterogeneity of the wild type population is 358 359 reversible in vitro.

360 PhoP-dependent genes are over-expressed in the polymyxin-resistant sub-population

361 The relative expression of PhoP-dependent genes between the resistant sub-population and the WT were analysed. RNA samples were collected from bacteria grown in LB medium (OD = 362 0.3) and after the polymyxin B treatment when they reach again an OD = 0.3. We observed a 363 pbgP, pbgE and ail1_{Pl} RNA increases by 4 to 5-fold following the antimicrobial treatment 364 compared to the wild type population (figure 6). Because pagC is PhoP-independent in 365 Photorhabdus (Mouammine et al. 2014) it is used as an internal negative control such as recA 366 and gyr. We also tested other genes previously described to be involved in resistance towards 367 368 CAMPs. galE and galU are two genes implicated respectively in biosynthesis of UDPgalactose and UDP-glucose two precursors of L-aminoarabinose biosynthesis (Easom, Joyce, 369 370 et Clarke 2010). Addition of L-aminoarabinose confers resistance towards CAMPs when 371 conjugated on LPS lipid A (Bennett et Clarke 2005). Expression of pagP, galE and galU is 372 not statistically dissimilar in resistant bacteria than in WT-population.

- 373 To confirm that the emergence of the resistant sub-population is correlated to a higher amount 374 of *pbgPE* expression at the single cell level, we constructed a transcriptionnal fusion between the promoter region of *pbgPE* operon and a destabilized GFP, the TT01/P_{*pbgPE*}-gfp[AAV] 375 reporter strain (figure 7A). Cytometer analysis allowed the quantification of cells expressing 376 377 *pbgPE* during growth without any CAMPs selection (figure 7B). The maximum of *pbgPE* expressing bacteria was observed during exponential growth phase with almost 15%. Next, 378 the same procedure was used to compare the fluorescence profile of bacterial population 379 during the selection of the resistant sub-population with polymyxin B (figure 7C). After 380 addition of polymyxin B (12 h post treatment), there are 32-fold more live bacterial cells 381 expressing GFP. It is noteworthy that the GFP intensity representative of *pbgPE* expression 382 per cell (X-axis) is not higher in LB than afer polymyxin treatment. Such data are consistent 383 with a selection mechanism of resistant sub-population by a representative of CAMPs, the 384 polymyxin B. 385
- 386

387 Resistant sub-population is the insect killer.

As the *pbgPE* expressing sub-population allows TT01 growth in presence of CAMPs *in vitro*, we studied the fate of resistant sub-population in insects by performing *in vivo* growth kinetic of TT01 strains (figure 8). At different post-injection time-points, resistant sub-population was quantified by plating extracts of crushed insect larvae (Figure 8A). As previously described (Jubelin *et al.* 2011), after few hours post-injection (hpi), there was a 3-log decrease of the number of alive TT01, this phase is called clearance. Obviously, at this time point (6 to

10 hpi), the alive population reached the number of resistant bacteria (Figure 8B). It is 394 noteworthy that AMPs are synthesized between 4 to 8 hours post infection (Bang et al. 2012) 395 which corresponds perfectly to our clearance phase. During the septicemia phase (between 24 396 and 48 hpi), almost all insects died. It is clear that during bacterial growth resistant sub-397 population over-competed susceptible population and that septicemia depends on resistant 398 bacteria multiplication. To support that resistant sub-population can kill the insect earlier, we 399 injected pre-selected resistant sub-population with polymyxin B in insects and monitored 400 insect death during time. When injected polymyxin resistant sub-population, the TL₅₀ were 401 observed 4 hours earlier compared to TT01 WT population (Figure S1 supplemental data). As 402 observed during in vitro cultures, we tested the reversibility of the resistant phenotype after 403 404 long-term incubation in insects. After 7 day post-injection in the insect cadaver, the wild-type population is back to the proportion observed in vitro without any selection, about 0.5% of 405 406 resistant bacteria in the total population (data not shown).

- 407
- 408

409 **Discussion**

410

P. luminescens TT01 is a heterogeneous population composed of two sub-populations: one 411 412 resistant and one susceptible to CAMPs. The resistant sub-population represents 0.5% of the wild type population. Its emergence requires the two-component system PhoP-PhoQ and 413 pbgPE genes. We demonstrated that PhoP can activate its own transcription though a positive 414 feedback loop as previously described (Derzelle et al. 2004.). Contrary to what have been 415 extensively described in S. Typhimurium or in E. coli, a direct binding of phospho-PhoP on 416 the promoter region of *pbgPE* operon occurs in *P. luminescens*. The architecture of the phoP 417 regulon is closer of Y. pseudotuberculosis where PhoP also directly bind pbgPE promoter 418 (Flamez et al. 2007). For S. Typhimurium the PhoP recognition pattern is a repeated 419 hexameric sequence (G/T)GTTTA-5pb-(G/T)GTTTA (Lejona et al. 2003). However this 420 conserved pattern is not found in *Photorhabdus*. Comparison of 5'UTR of the genes directly 421 regulated by PhoP such as phoP, pbgP and $ail1_{Pl}$ showed no conserved sequence pattern 422 (Figure 3). In contrast, induction of PhoP at low Mg²⁺ concentrations remains conserved 423 between different enterobacteria. There is a debate around Mg²⁺ as an inducer of PhoP-424 dependent genes. In S. Typhimurium Mg²⁺ induces PhoP-dependant genes in vitro in culture 425 medium but in macrophages the concentration of Mg^{2+} is from milimolar in concentration and 426

it has been clearly shown that *phoP* expression was not induced by Mg^{2+} in macrophages even 427 two hours after infection (Martin-Orozco et al. 2006). In insects few data are known 428 concerning Mg²⁺ concentrations in insect hemolymph. In fact, it has been suggested that 429 phytophagous insects have high levels of Mg^{2+} in their hemolymph (Whitcomb 2012). So 430 even if Mg²⁺ can promote resistance gene expression *in vitro*, it does not represent a stimulus 431 consistent with the bacterial lifestyle. In Salmonella and in Yersinia, acidic pH and CAMPs 432 are better candidates for in vivo signals inducing PhoP-dependent gene expression. In the 433 different Yersinia species, there are variations in resistance genes regulation, indeed PhoP is 434 indirectly involved in *pbgPE* expression (through PmrAB) in Y. pestis whereas in Y. 435 pseudotuberculosis PhoP directly regulate pbgPE expression as in P. luminescens. Few are 436 known about Y. enterocolitica concerning pbgPE expression but this strain is as sensitive 437 towards polymyxin B as the phoP mutant of Y. pestis. Also a phoP mutant of Y. pestis is 10-438 439 fold more sensitive to killing in macrophages than a phoP Y. pseudotuberculosis mutant (Grabenstein et al. 2004). Macrophages, like insect hemolymph, contains CAMPs such as 440 441 defensin or cathelicidin-related antimicrobial peptide (Zaiou et Gallo 2002; Selsted et al. 1983 ; Lehrer et al. 1983). Photorhabdus and Yersinia have therefore to face the similar host 442 443 defenses. However Photorhabdus and Y. pseudotuberculosis have different lifestyles (extracellular and intracellular respectively). A direct link between PhoP and *pbgPE* promoter 444 may be selected to give a better chance for the bacteria to face antimicrobial peptides in these 445 bacteria. 446

447 We have also demonstrated that only the resistant sub-population can grow and kill the insect. It is likely that the susceptible bacteria have a pbgE behavior that is avirulent in lepidopteran 448 insects ((Bennett et Clarke 2005), Pagès, unpublished data). The P. luminescens heterogeneity 449 is clearly essential for bacterial survival and the success of the parasitic life cycle. Somvanshi 450 and colleagues have also found two sub-populations of TT01 in nematodes H. bacteriophora, 451 the natural symbiotic partner for Photorhabdus. The two sub-populations allow the bacteria to 452 switch between its two hosts the nematode and the insect. The M-form is found in the 453 454 nematode partner whereas the P-form is present in insect prey (respectively for the mutualistic and pathogenic lifestyle of the bacteria). Here we demonstrate that the P-form of P. 455 luminescens TT01 described by Somvanshi et al 2012 is, in turn, subdivided in two sub-456 populations: the resistant and the susceptible one and only the resistant sub-population can 457 grow and develop in insects. Contrary to the M/P forms that allow the bacteria to switch 458 between the two hosts, we can propose a model in which the heterogeneity of the TT01 459 population permits bacterial survival in various insects. The nematode transmission of P. 460

luminescens to insects is not specific contrary to its mutualistic relationship (Clarke 2014). 461 Indeed, Photorhabdus have to kill a wide range of insect larvae mainly in Diptera, and 462 Lepidoptera and less in Coleoptera to endorse a complete life cycle of its nematode hosts 463 (Laumond, Mauléon, et Kermarrec 1979). Each insect family has its own way of defense with 464 different patterns of CAMPs produced. As an example the cecropines are more conserved in 465 Diptera than in Lepidoptera (Hetru, Hoffmann, et Hancock 2002). We therefore propose that 466 the preexisting resistant sub-population is required to successfully invade any insect. This 467 hypothesis is consistent with the reversibility of the resistance observed seven days after 468 469 insect injection. In addition, the modifications of LPS are pleiotropic allowing the resistance of different classes of antimicrobial peptides while they are cationic. This coping strategy is 470 471 called a Bet-Hedging strategy and it has been extensively studied in the case of persister cells 472 and sporulation (Lewis 2007; Veening, Smits, et Kuipers 2008). The observation of bacterial 473 colonies of *P. luminescens* next to the paper disc in antibiograms (Figure 4) implies that our resistant sub-population is not persister cells. Indeed persister cells enter in dormancy and 474 475 cannot multiply in presence of antibiotics (Moyed et Broderick 1986). In addition, we also confirmed this result by using ciprofloxacin as previously used in P. luminescens (Somvanshi 476 477 et al. 2012) to evaluate the proportion of persiter cells. One log less persisters (0.09%) than resistant cells were obtained (data not shown). As regarding mechanisms regulating phase 478 variation in bacteria, it has previously been shown that bacteria such as Neiserria spp and 479 Helicobacter pylori can present different populations with various LPS forms. The main 480 underlying mechanism is slipped-strand mispairing (Serino et Virji 2000; Wang et al. 2000). 481 Slipped strain mispairing occurs when repeated sequences between parental and daughter 482 strain of DNA are misaligned during replication or reparation process resulting in an 483 increasing or decreasing number of repeated sequences (Levinson et Gutman 1987; Van 484 Belkum et al. 1998). However, the comparison of promoter DNA sequences of phoP, pbgPE 485 and $aill_{Pl}$ as well as the phoP-phoQ operon from the wild type and the resistant sub-486 population did not show any mutation, insertion or deletion (data not shown). We also 487 488 compared the promoter region environment of *pbgPE* and *phoP* genes and no inverted repeated sequenced, responsible for sequence inversion for example, were identified. To 489 reinforce the hypothesis that the switch occurs at the level of *pbgPE* promoter and not at the 490 PhoPQ level, we showed that the PhoPQ-dependent ail1_{Pl} gene transcription occurs in all 491 bacterial cells (Mouammine, unpublished data), that is not observed with *pbgPE* (figure 8C). 492 As a conclusion it is likely that the underlying mechanism responsible for bacterial 493

- 494 heterogeneity in TT01 strain is original and probably epigenetic but remains to be identified
- and characterized.

496

References

498 499 500 501	Abi Khattar, Z. 2009. « Impact de la résistance aux peptides antimicrobiens et aux composés toxiques sur les interactions bactéries-insectes : cas des infections par <i>Photorhabdus luminescens</i> et <i>Bacillus cereus</i> ». PhD thesis, Université Montpellier 2.
502 503 504 505	Ausubel, FM, R Brent, RE Kingston, DD Moore, et JG Seidman. 1999. « Current Protocols in Molecular Biology ». In , New York: John Wiley and Sons. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al., editors.
506 507 508 509	Bader, Martin W, Sarah Sanowar, Margaret E Daley, Anna R Schneider, Uhnsoo Cho, Wenqing Xu, Rachel E Klevit, Hervé Le Moual, et Samuel I Miller. 2005. « Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase ». <i>Cell</i> 122 (3): 461-72. doi:10.1016/j.cell.2005.05.030.
510 511 512 513 514	Bang, Kyeongrin, Sujin Park, Ji Yeon Yoo, et Saeyoull Cho. 2012. « Characterization and expression of attacin, an antibacterial protein-encoding gene, from the beet armyworm, <i>Spodoptera</i> <i>exigua</i> (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) ». <i>Molecular biology reports</i> 39 (5): 5151-59. doi:10.1007/s11033-011-1311-3.
515 516 517 518	Bennett, H P J, et D J Clarke. 2005. « The <i>pbgPE</i> operon in <i>Photorhabdus luminescens</i> is required for pathogenicity and symbiosis ». <i>Journal of bacteriology</i> 187 (1): 77-84. doi:10.1128/JB.187.1.77-84.2005.
519 520 521 522	Brillard, Julien, Eric Duchaud, Noël Boemare, Frank Kunst, et Alain Givaudan. 2002. « The PhIA Hemolysin from the Entomopathogenic Bacterium <i>Photorhabdus luminescens</i> Belongs to the Two-Partner Secretion Family of Hemolysins ». <i>Journal of Bacteriology</i> 184 (14): 3871-78.
523 524 525 526	Brunel, B., A. Givaudan, A. Lanois, R. J. Akhurst, et N. Boemare. 1997. « Fast and Accurate Identification of <i>Xenorhabdus</i> and <i>Photorhabdus</i> Species by Restriction Analysis of PCR- Amplified 16S rRNA Genes ». <i>Applied and Environmental Microbiology</i> 63 (2): 574-80.
527 528 529	Bulet, Philippe, et Reto Stöcklin. 2005. « Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation ». <i>Protein and Peptide Letters</i> 12 (1): 3-11.
530 531 532 533	Clarke, David J. 2014. « The Genetic Basis of the Symbiosis between <i>Photorhabdus</i> and Its Invertebrate Hosts ». <i>Advances in Applied Microbiology</i> 88: 1-29. doi:10.1016/B978-0-12- 800260-5.00001-2.
534 535 536 537 538	Derzelle, Sylviane, Evelyne Turlin, Eric Duchaud, Sylvie Pages, Frank Kunst, Alain Givaudan, et Antoine Danchin. 2004. « The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of <i>Photorhabdus luminescens</i> is essential for virulence in insects ». <i>Journal of bacteriology</i> 186 (5): 1270-79.
- 539 Dubnau, David, et Richard Losick. 2006. « Bistability in Bacteria ». *Molecular Microbiology* 61 (3):
 564-72. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05249.x.
- 541
- 542 Duchaud, Eric, Christophe Rusniok, Lionel Frangeul, Carmen Buchrieser, Alain Givaudan, Séad
 543 Taourit, Stéphanie Bocs, et al. 2003. « The Genome Sequence of the Entomopathogenic
 544 Bacterium *Photorhabdus luminescens* ». *Nature Biotechnology* 21 (11): 1307-13.
 545 doi:10.1038/nbt886.
- 546
- Easom, Catherine A., Susan A. Joyce, et David J. Clarke. 2010. « Identification of Genes Involved in the Mutualistic Colonization of the Nematode *Heterorhabditis Bacteriophora* by the Bacterium *Photorhabdus luminescens* ». *BMC Microbiology* 10 (1): 45. doi:10.1186/1471-2180-10-45.
- 551

- Flamez, Claire, Michaël Marceau, Michel Simonet, Sonia Arafah, et Isabelle Ricard. 2007. « TwoComponent System Regulon Plasticity in Bacteria: A Concept Emerging from Phenotypic
 Analysis of *Yersinia Pseudotuberculosis* Response Regulator Mutants ». In *The Genus Yersinia*, édité par Robert D. Perry et Jacqueline D. Fetherston, 145-55. Advances In
 Experimental Medicine And Biology 603. Springer New York.
- 557 http://link.springer.com.gate1.inist.fr/chapter/10.1007/978-0-387-72124-8_12.
 558
- 559 García Véscovi, E, F C Soncini, et E A Groisman. 1996. «Mg2+ as an Extracellular Signal:
 560 Environmental Regulation of *Salmonella* Virulence ». *Cell* 84 (1): 165-74.
 561
- Grabenstein, Jens P., Michael Marceau, Celine Pujol, Michel Simonet, et James B. Bliska. 2004. « The
 Response Regulator PhoP of *Yersinia pseudotuberculosis* Is Important for Replication in
 Macrophages and for Virulence ». *Infection and Immunity* 72 (9): 4973-84.
 doi:10.1128/IAI.72.9.4973-4984.2004.
- Groisman, E A. 2001. « The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ ». *Journal of bacteriology* 183 (6): 1835-42. doi:10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001.
- Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, et S. I. Miller. 1998. « PmrA-PmrBRegulated Genes Necessary for 4-Aminoarabinose Lipid A Modification and Polymyxin
 Resistance ». *Molecular Microbiology* 27 (6): 1171-82.
- Gunn, J. S., et S. I. Miller. 1996. « PhoP-PhoQ Activates Transcription of *pmrAB*, Encoding a TwoComponent Regulatory System Involved in *Salmonella* Typhimurium Antimicrobial Peptide
 Resistance ». *Journal of Bacteriology* 178 (23): 6857-64.
- Guo, Lin, Kheng B Lim, Cristina M Poduje, Morad Daniel, John S Gunn, Murray Hackett, et Samuel I
 Miller. 1998. « Lipid A Acylation and Bacterial Resistance against Vertebrate Antimicrobial
 Peptides ». *Cell* 95 (2): 189-98. doi:10.1016/S0092-8674(00)81750-X.
 - Article 2

582 583 584 585	Haine, Eleanor R., Yannick Moret, Michael T. Siva-Jothy, et Jens Rolff. 2008. « Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects ». Science (New York, N.Y.) 322 (5905): 1257-59. doi:10.1126/science.1165265.
586 587 588 589	Helaine, Sophie, et David W. Holden. 2013. « Heterogeneity of Intracellular Replication of Bacterial Pathogens ». <i>Current Opinion in Microbiology</i> 16 (2): 184-91. doi:10.1016/j.mib.2012.12.004.
590 591 592 593	Hetru, C., et P. Bulet. 1997. « Strategies for the Isolation and Characterization of Antimicrobial Peptides of Invertebrates ». <i>Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)</i> 78: 35-49. doi:10.1385/0-89603-408-9:35.
594 595 596	Hetru, C, J.A Hoffmann, et R.E.W Hancock. 2002. <i>Peptide Antibiotics</i> . (Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.I.I. and Wax, R.G., Eds) pp117-144. Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
597 598 599 600 601	Jubelin, Grégory, Anne Lanois, Dany Severac, Stéphanie Rialle, Cyrille Longin, Sophie Gaudriault, et Alain Givaudan. 2013. « FliZ Is a Global Regulatory Protein Affecting the Expression of Flagellar and Virulence Genes in Individual Xenorhabdus Nematophila Bacterial Cells ». PLoS Genetics 9 (10): e1003915. doi:10.1371/journal.pgen.1003915.
602 603 604 605 606 607	Jubelin, Grégory, Sylvie Pagès, Anne Lanois, Marie-Hélène Boyer, Sophie Gaudriault, Jean-Baptiste Ferdy, et Alain Givaudan. 2011. « Studies of the Dynamic Expression of the <i>Xenorhabdus</i> FliAZ Regulon Reveal Atypical Iron-Dependent Regulation of the Flagellin and Haemolysin Genes during Insect Infection ». <i>Environmental Microbiology</i> 13 (5): 1271-84. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02427.x.
608 609 610 611	Kato, Akinori, Eduardo A Groisman, et Howard Hughes Medical Institute. 2008. « The PhoQ/PhoP Regulatory Network of Salmonella enterica ». Advances in Experimental Medicine and Biology 631: 7-21.
612 613 614 615 616	Kawasaki, Kiyoshi, Robert K. Ernst, et Samuel I. Miller. 2004. « Deacylation and Palmitoylation of Lipid A by Salmonellae Outer Membrane Enzymes Modulate Host Signaling through Toll- like Receptor 4 ». Journal of Endotoxin Research 10 (6): 439-44. doi:10.1179/096805104225006264.
617 618 619 620	Laumond, C., H. Mauléon, et A. Kermarrec. 1979. « Données nouvelles sur le spectre d'hôtes et le parasitisme du nématode entomophageNeoaplectana carpocapsae ». <i>Entomophaga</i> 24 (1): 13-27. doi:10.1007/BF02377505.
621 622 623 624	Lehrer, R. I., M. E. Selsted, D. Szklarek, et J. Fleischmann. 1983. « Antibacterial Activity of Microbicidal Cationic Proteins 1 and 2, Natural Peptide Antibiotics of Rabbit Lung Macrophages ». Infection and Immunity 42 (1): 10-14.

625 626 627 628 629	Lejona, Sergio, Andres Aguirre, Maria Laura Cabeza, Eleonora Garcia Vescovi, et Fernando C. Soncini. 2003. « Molecular Characterization of the Mg2+-Responsive PhoP-PhoQ Regulon in <i>Salmonella enterica</i> ». <i>Journal of Bacteriology</i> 185 (21): 6287-94. doi:10.1128/JB.185.21.6287-6294.2003.			
630 631 632	Levinson, G., et G. A. Gutman. 1987. « Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution ». <i>Molecular Biology and Evolution</i> 4 (3): 203-21.			
633 634 635	Lewis, Kim. 2007. « Persister Cells, Dormancy and Infectious Disease ». <i>Nature Reviews</i> . <i>Microbiology</i> 5 (1): 48-56. doi:10.1038/nrmicro1557.			
636 637 638 639 640	Martin-Orozco, Natalia, Nicolas Touret, Michael L. Zaharik, Edwin Park, Raoul Kopelman, Samuel Miller, B. Brett Finlay, Philippe Gros, et Sergio Grinstein. 2006. « Visualization of Vacuolar Acidification-Induced Transcription of Genes of Pathogens inside Macrophages ». <i>Molecular</i> <i>Biology of the Cell</i> 17 (1): 498-510. doi:10.1091/mbc.E04-12-1096.			
641 642 643 644	Mouammine, A., Lanois A., Pagès S., Lafay B., Molle V., Canova M., Girard PA., Duvic B., Givaudan A. et Gaudriault S. 2014. « Ail and PagC-related proteins in the entomopathogenic bacteria of <i>Photorhabdus</i> genus ». <i>PLoS ONE</i> .			
645 646 647 648	Moyed, H. S., et S. H. Broderick. 1986. « Molecular Cloning and Expression of <i>hipA</i> , a Gene of Escherichia Coli K-12 That Affects Frequency of Persistence after Inhibition of Murein Synthesis ». <i>Journal of Bacteriology</i> 166 (2): 399-403.			
649 650 651 652 653	Nielsen-LeRoux, Christina, Sophie Gaudriault, Nalini Ramarao, Didier Lereclus, et Alain Givaudan. 2012. « How the Insect Pathogen Bacteria <i>Bacillus Thuringiensis</i> and Xenorhabdus/ <i>Photorhabdus</i> Occupy Their Hosts ». <i>Current Opinion in Microbiology</i> 15 (3): 220-31. doi:10.1016/j.mib.2012.04.006.			
654 655 656 657	Pfaffl, Michael W, Graham W Horgan, et Leo Dempfle. 2002. « Relative Expression Software Tool (REST) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR ». <i>Nucleic Acids Research</i> 30 (9): e36.			
658 659 660 661	Rana, F. R., E. A. Macias, C. M. Sultany, M. C. Modzrakowski, et J. Blazyk. 1991. « Interactions between Magainin 2 and <i>Salmonella</i> Typhimurium Outer Membranes: Effect of Lipopolysaccharide Structure ». <i>Biochemistry</i> 30 (24): 5858-66.			
662 663 664 665	Selsted, M. E., D. M. Brown, R. J. DeLange, et R. I. Lehrer. 1983. « Primary Structures of MCP-1 and MCP-2, Natural Peptide Antibiotics of Rabbit Lung Macrophages ». <i>The Journal of Biological</i> <i>Chemistry</i> 258 (23): 14485-89.			
666 667 668	Serino, L., et M. Virji. 2000. « Phosphorylcholine Decoration of Lipopolysaccharide Differentiates Commensal Neisseriae from Pathogenic Strains: Identification of licA-Type Genes in Commensal Neisseriae ». Molecular Microbiology 35 (6): 1550-59.			

Article 2

670 671	Silva, Carlos P., Nicholas R. Waterfield, Phillip J. Daborn, Paul Dean, Timothy Chilver, Candy P. Y.
671	Au, Sadiana Sharma, Ofsula Poller, Stuart E. Reynolds, et Richard H. Inferici-Constant. 2002.
672	« Bacterial infection of a Model insect. <i>Photomabaus luminescens</i> and <i>Manauca Sexia</i> ».
673	Cellular Microbiology 4 (6): 329-39.
674	
675	Smits, Wiep Klaas, Oscar P. Kuipers, et Jan-Willem Veening. 2006. « Phenotypic Variation in
676	Bacteria: The Role of Feedback Regulation ». <i>Nature Reviews. Microbiology</i> 4 (4): 259-71.
677	doi:10.1038/nrmicro1381.
678	
679	Somvanshi, Vishal S, Rudolph E Sloup, Jason M Crawford, Alexander R Martin, Anthony J Heidt,
680	Kwi-suk Kim, Jon Clardy, et Todd A Ciche. 2012. « A single promoter inversion switches
681	Photorhabdus between pathogenic and mutualistic states ». Science (New York, N.Y.) 337
682	(6090): 88-93. doi:10.1126/science.1216641.
683	
684	Srimal, S., N. Surolia, S. Balasubramanian, et A. Surolia, 1996, « Titration Calorimetric Studies to
685	Elucidate the Specificity of the Interactions of Polymyxin B with Lipopolysaccharides and
686	Lipid A ». The Biochemical Journal 315 (Pt 2) (avril): 679-86.
687	
688	Tossi A. I. Sandri et A. Giangaspero 2000 « Amphinathic Alpha-Helical Antimicropial
689	Pentides N <i>Bionolymers</i> 55 (1): 4-30 doi:10.1002/1097-0282(2000)55:1<4:: AID-
690	BIP30>3.0 CO·2-M
691	DH 50/ 5.0.00,2 III.
692	Van Belkum A. S. Scherer L. van Alphen et H. Verbrugh 1998 «Short-Sequence DNA Repeats in
693	Prokarvotic Genomes ». Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR 62 (2):
694	275-93
695	
606	Van der Woude, Marian W. 2011, "Phase Variation: How to Create and Coordinate Population
607	Diversity a Current Opinion in Microbiology 14 (2): 205-11 doi:10.1016/i.mib.2011.01.002
697	Diversity ». Current Opinion in Microbiology 14 (2): 205-11. doi:10.1010/j.iii0.2011.01.002.
698	
699	Veening, Jan-Willem, Wiep Klaas Smits, et Oscar P. Kuipers. 2008. « Bistability, Epigenetics, and
700	Bet-Hedging in Bacteria ». Annual Review of Microbiology 62 (1): 193-210.
701	doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.163002.
702	
703	Wang, G., Z. Ge, D. A. Rasko, et D. E. Taylor, 2000. « Lewis Antigens in <i>Helicobacter Pylori</i> :
704	Biosynthesis and Phase Variation » Molecular Microbiology 36 (6): 1187-96
705	Diosynthesis and Finase Variation ". Molecular Microbiology 56 (6). 1167-56.
706	Waterfield Nick R. Todd Ciche et David Clarke 2000 "Photophabdus and a Host of Hosts"
700	Annual Review of Microbiology 62: 557-74 doi:10.1146/onnurgy micro.001209.072507
707	Annual Review of Microbiology 05. 557^{-74} . doi:10.1140/annurev.nncr0.091208.075507.
108	
709	Whitcomb, R. 2012. The Mycoplasmas V5: Spiroplasmas, Acholeplasmas, and Mycoplasmas of Plants
710	and Arthropods. Elsevier.
/11	

- Zaiou, Mohamed, et Richard L. Gallo. 2002. « Cathelicidins, Essential Gene-Encoded Mammalian
 Antibiotics ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 80 (9): 549-61.
- 714 doi:10.1007/s00109-002-0350-6.

716 **Figure legends**

Table 1: **TT01 resists at high doses of CAMPs**. Bacterial strains were cultured with increasing concentrations of insect (Cecropin A) and non insect CAMPs (colistin and polymyxin B). All concentrations are indicated in μ g/mL

720

Figure 1: **PhoP directly binds the promoter region of** *phoP* and *pbgPE* genes. Electrophoretic mobility shift assay was carried out to test the binding of PhoP-His protein activated *in vitro* with ACP 10 mM (P-PhoP-His) or non activated PhoP-His (PhoP-His) on *phoP* and *pbgPE* promoter regions. The PhoP-His concentrations indicated are in micromolar. To ensure that the fixation is specific, we used BSA proteins and poly(dI-dC) in the binding buffer.

727

Figure 2: pbgP and $ail1_{Pl}$ expression increased at low concentrations of MgSO4. Total RNA from TT01 wild-type strain of *Photorhabdus luminescens* was used for RT-qPCR analysis with internal primers specific for the indicated genes. mRNA levels were normalized against those of a reference gene (*recA*). Data are presented as gene expression level for TT01 wild-type strain. The error bars indicate technical replicates. One representative experiment analyzed with ROCHE program.

734

Figure 3: No conserved PhoP box identified in PhoP-dependant genes. Transcriptionnal initiation start evaluated by RACE PCR in TT01 (*ail1*_{Pl} TT01, *pbgP* TT01) were aligned with those already identified in TT01 (*phoP* TT01) and in *Salmonella* (*phoP* salm, *pbgP* salm). In red are identified the -35 boxes and in purple the -10 boxes. The transcriptional start is in green. In the case of *phoP* and *pbgP* from *Salmonella* the identified PhoP box and PmrAB box respectively are underligned

741

Figure 4: **TT01 wild type strain population is heterogene**. TT01, *phoP* and *pbgE* mutant and their respective complementations *phoP*/P_{lac}phoPQ and *pbgE* /P_{lac}pbgPE were layed on Agar plates with paper discs at 500 μ g and 50 μ g of polymyxin B. Antibiogramms mesure the resistance or sensible profil of bacteria against antibiotics. By diffusion in plates polymyxin create a growth inhibitory halo visible except for *pbgE* /P_{lac}pbgPE where the strain is completely resistant.

Figure 5: **Only 0.5% of resistant bacteria can resist to polymyxin B in TT01**. By CFU on nutritive agar plates and nutritive agar plates supplemented with polymixin B we assessed the proportion of resistant bacteria during TT01 growth. In the boxes are indicated the percentage of resistant bacteria for each OD tested. The black line represents the growth curve of TT01 strain over time. This experiments were realised at least three times.

754

Figure 6: *pbgP*, *pbgE*, *phoP* and *ail*_{Pl} expression is increased in resistant sub population 755 compared to wild type population. Total RNA fromTT01 wild-type strain of Photorhabdus 756 757 luminescens cultured with or without polymyxin B was used for RT-qPCR analysis with 758 internal primers specific for the indicated genes. mRNA levels were normalized against those 759 of a reference gene (recA). Data are presented as a ratio of values for with polymyxin B 760 condition and without polymyxin B condition. The bars indicate standard errors calculated 761 using Taylor's series. Significant differences (p-value < 0.05) are indicated by asterisks (*). The relative quantification results were obtained from at least three independent experiments 762 763 with the REST 2009 program.

764

Figure 7: **32-fold more bacteria express their resistance gene after polymyxin B selection**. A: Representative scheme of P_{pbgPE} -gfp[AAV] the transcriptional fusion between pbgPE promoter and destabilized GFP, the picture represent a GFP-positive bacterium expressing its resistance genes.

B: TT01/ P_{*pbgPE-gfp*[AAV] was cultured in LB without polymyxin B selection and cytometry course time were assessed. Briefly samples were preleved during each bacterial growth phase, live and dead stained formaldehyde fixed and analyzed in FACS Canto II cytometer. Only live cells are analyzed. Results are presented as dot plots with the Side scatter relative to GFP intensity. Each dot represents one bacterium.}

C: TT01/ P_{pbgPE} -gfp[AAV] was cultured in LB two samples were collected, one before and one after adding polymyxin B in the culture medium. We use the same representation than in B pannel. All the experiments were performed at least 3 times.

777

778 Figure 8: Resistant sub-population.is the major population during septicemia.

A : Representative scheme of experimental procedure.

- 780 B : After CFU counting of 4 insects larvae crushing by condition at each time point post
- 781 injection. Black bars represent insect TT01 wild-type strain extracted from insects and spread

- on nutrient agar (black histogramm) or nutrient agar supplemented with polymyxin B (grey
 histogramm). One representative experiment of more than three.
- 784
- 785 Figure S1: Resistant sub-population kills quicker insects when compared to wild-type
- **strain**. The results represent the survival curve of TT01 (blue) and pre-selected resistant sub-
- 787 poplation with polymyxin B (green) over time in insects. More than seven independent
- experiments were analyzed with R software. Results are statistically different (WilcoxonTest).

Strains	MIC (µg/mL)			
	colistin	Cecropin A	Cecropin A	Polymyxin B
			(5. frugiperda)	
TT01	>10.000	>25	> 50	>250
phoP	20	0.8-1.6	6-12	1-3
P _{lac} PhoPQ	>10.000	>25		>250
pbgE	<20	7.8-15.5	6-12	1-2
P _{lac} pbgPE	ND	ND		>250

Figure 1





Figure 2



Genes

Figure 3

ail1	TT01	ACAATAAACGAGATTGAG	TTGTTT	TCTATTGA	ATTGTTGAT	AAA <mark>TAA</mark>	TCGCGCC
phoP	TT01	TATTTCCACTTAACGTCT	TGCTGT	TACAGATO	CCATGTATC	TAACAT	ACTCAGC <mark>/</mark>
pbgP	TT01	TCATACCTGTGTTTACGA	TTCGTT	CAAATATA	AGTCATCTA	ATATAT	CGTTATA
phoP	${\tt salm}$	ACTATTTGTCT <u>GGTTTA</u> T	TAAC <mark>T</mark> G	TTTATCCC	CCAAAGCAC	CATAAT	CAACGCT <mark></mark>
pbgP	salm	CTTCACCTTAATTTCTTA	ATGTT <mark>A</mark>	ΑΤΤΤΑΑΤ(CTTCATCCA	G <mark>TAGGG</mark>	TTCAGCT I



Figure 5



Figure 6



Figure 7





Figure S1



Strain or plasmid	Description	Source or reference	
P. luminescens strains			
TT01	Strain isolated from the nematode <i>Heterorhabditis</i> bacteriophora THO1 in Trinidad; wild-type form	Laboratory collection	
phoP	TT01 <i>phoP</i> ::cat ; <i>phoP</i> mutant	(Derzelle et al. 2004)	
pbgE	TT01 pbgE1::Kan ; pbgE mutant	(Bennett et Clarke 2005)	
TT01/ P _{pbgPE} -gfp[AAV]	TT01 carrying P_{pbgPE} -gfp[AAV] plasmid, Km ^R	This study	
TT01/ P _{lac} phoPQ	TT01 carrying P _{lac} phoPQ plasmid, Km ^R	(Abi Khattar 2009)	
TT01/ P _{lac} pbgPE	TT01 carrying P _{lac} pbgPE plasmid, Km ^R	(Abi Khattar 2009)	
E. coli strains			
XL1 blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ/M15 Tn10 (Tetr)]$	Stratagene	
WM3064	thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ Δ M15 RP4-1360 Δ (araBAD)567 Δ dapA1341::[erm pir (wt)]	(Paulick et al. 2009)	
BL21 (DE3) pLysS	$F^{-}dcm \ ompT \ hsdS(r_{B}^{-}m_{B}^{-}) \ gal \ \lambda(DE3) \ [pLysS \ Cam^{R}]$	Laboratory stock	
Plasmids			
pBBR1-MCS5	Broad host range vector, Gm ^R mob	(Kovach et al. 1995)	
P _{lac} phoPQ	2.5-kb fragment cloned into pBBR1-MCS5/XbaI- PstI (under P _{lac} promoter control)	this study	
P _{lac} pbgPE	7.5-kb fragment cloned into pBBR1-MCS5/PstI- SacI (under P _{lac} promoter control)	this study	
pPROBE-gfp[AAV]	Plasmid (pBBR1 replicon) containing <i>gfp</i> [AAV] gene downstream from a multiple cloning site, Kan ^R	(Miller, Leveau, et Lindow 2000)	
P_{pbgPE} -gfp[AAV]	pPROBE with $gfp[AAV]$ under the control of $pbgPE$ promoter, Kan ^R	PROBE with $gfp[AAV]$ under the control of $pbgPE$ this study romoter, Kan ^R	
pETPhos	pET28 replicon, Amp ^R	(Canova, Kremer, et Molle 2008)	
P _{T7} PhoP-His	pET28 with <i>phoP</i> (His-tag) in N-term under the control of T7 promoter; Amp ^R	(Mouammine 2014)	

Primer	Primer sequence (5' to 3')	Lice		
name		Use		
L-PhoPHis- <i>Nde</i> I	CGCGCGCCGCATATGCGGATATTGATCGTTGAAG ACAACATGTTACTGC	cloning of PhoP-His from		
L-PhoPHis- BamHI	GCGCGGATCCTTACACATCGAAGCGATAGCCTTG GCCCCG	Photorhabdus luminescens 1101		
L-ail1 _{Pl} -Eco	CGGAATTCAAAGCGGGTATCCAGGTTTA	cloning of <i>ail1</i> _{Pl} promoter from		
R-ail1 _{Pl} -Bam	CGGGATCCCCTACCGCTACCACTGAAGC	Photorhabdus luminescens T101		
L-P _{pbgPE} -XbaI	GCTCTAGATTACAGTCCAGGCTTATGTATGTGCC	aloning of the DE momentum from		
R-P _{pbgPE} - KpnI	CAGGTACCCTATGGAAGAAAGCTATCCATAAAAC ACAGTCC	Photorhabdus luminescens TT01		
L-P _{phoP} -XbaI	GCGCTCTAGAAAACATCCGTCTGTTGCTATCC	cloning of <i>phoP</i> promoter from		
R-P _{phoP} -KpnI	GCGCGGTACCCTCTCCAGCAGGCAGTTATTG	Photorhabdus luminescens TT01		
R-ail1Pl- RACE 1	GGCGTCATTAAATTTTGCGTA			
R-ail1Pl- RACE 2	TGCAGCACCAATCATACCAT	Race PCR amplification to find out <i>ail1</i> _{Pl} transcriptional start		
R-ail1Pl- RACE 3	ATTATCCAACTCGTAGCGGTATTTC			
R-pbgPE- RACE 1	GCGAATATTCATTGATTCCAATTTA			
R-pbgPE- RACE 2	CAAAAGCATCAATACCCAAT	Race PCR amplification to find out <i>pbgPE</i> transcriptional start		
R-pbgPE- RACE 3	CTGAGCAATTCCACGCAATA			
L-gyrB	ATACACGAAGAAGAAGGTGTTTCAG	qRT-PCR of an internal region within gyrB from Photorhabdus luminescens		
R-gyrB	TACCTGTCTGTTCAGTTTCTCCAAC	TT01		
L-ail1Pl	AGAACATTAGTGGCTTCAGTGGTAG	qRT-PCR of an internal region within <i>ail 1</i> from <i>Photorhabdus luminescens</i>		
R-ail1Pl	ATTATCCAACTCGTAGCGGTATTTC	TT01		

L-pagP	TGGTAAATATCGTTACGACGAAGAC	qRT-PCR of an internal region within <i>pagP</i> from <i>Photorhabdus</i>
R-pagP	AATAACGGTAATGGGAGTGGAATAG	luminescens TT01
L-pagC	GTATCTGCGATAACTTTACCTGCTC	qRT-PCR of an internal region within <i>pagC</i> from <i>Photorhabdus</i>
R-pagC	CATTATAGCTGTAGCCAAGATGGAC	luminescens TT01
L-phoP	ATTACTATCTGGTCGAGAGCGAAC	qRT-PCR of an internal region within <i>phoP</i> from <i>Photorhabdus</i>
R-phoP	TGGTAACATAATCATCTGCTCCTG	luminescens TT01
L-pbgP	GAATTCGATGTCTAAAGTTTCATGG	qRT-PCR of an internal region within <i>pbgP</i> from <i>Photorhabdus</i>
R-pbgP	GCGAATATTCATTGATTCCAATTTA	luminescens TT01
L-pbgE	TTGCCACTAGCCTTATCTACATCTC	qRT-PCR of an internal region within <i>pbgE</i> from <i>Photorhabdus</i>
R-pbgE	TTAGTCATAAAACCCATACCACAGC	luminescens TT01
L-galE	CAACTAACCCTTATGGCACTTCTAA	qRT-PCR of an internal region within galE from Photorhabdus luminescens
R-galE	GATAAACATTCCAGACGACCAATAG	TT01
L-galU	AGTTATGGTATTGTCGATTGTCAGG	qRT-PCR of an internal region within <i>galU</i> from <i>Photorhabdus</i>
R-galU	ACATAGCGATTGCATCAGTAAGTTG	luminescens TT01
L-recA	GTTCAATGGACGTTGAAACTATCTC	qRT-PCR of an internal region within <i>recA</i> from <i>Photorhabdus luminescens</i>
R-recA	ATCAACACCCAACTTCTTAGCATAG	TT01



Figure 25 : Schéma des différentes hypothèses pouvant expliquer l'hétérogénéité de la population chez TT01.

 \cap

IV- Données complémentaires sous forme de résultats -discussions

A-Introduction

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'hétérogénéité d'une population (cf. Chap I-IV introduction générale) comme des niveaux critiques de transcrits dans une cellule ou de protéine (ex : un faible nombre de transcrits associé à une forte traduction), ainsi que certaines modifications post traductionnelles de la protéine. Enfin, il reste une hypothèse qui est souvent associée à la bistabilité et qui n'a pas encore été testé dans les précédents chapitres : la méthylation.

Dans ce chapitre, nous nous sommes efforcé d'éliminer les hypothèses en partant de ce constat : dans la population sauvage on a une hétérogénéité, dans le mutant *phoP* on perd ce caractère, ainsi PhoP pourrait être la clé du switch. Aussi, nous avons testés si le niveau de transcription ou de traduction de PhoP était à l'origine du switch. En effet nous avons mis en évidence l'existence d'une boucle de rétroaction positive au niveau du promoteur de l'opéron PhoPQ (article 2) qui génère des phénomènes de bimodalité ou de bistabilité (cf Chap I-IV introduction générale). Il peut en être de même avec le niveau de transcription et de traduction de PhoP où il faudrait dépasser une valeur seuil pour déclencher l'apparition de la sous population résistante. De même, une mauvaise efficacité de phosphorylation de la protéine pourrait induire de la bistabilité. Enfin, si le switch n'a pas lieu au niveau de PhoP, c'est qu'il se produit au niveau de de la région promotrice de *pbgPE* Toutes ces hypothèses ont été résumées dans la figure 25.

B- Recherche du mécanisme responsable de l'hétérogénité

L'hypothèse autour de la boucle de rétroaction positive de PhoP

Dans un premier temps, nous avons recherché si l'hétérogénéité de TTO1 n'était pas due à un problème de transcription de *phoP* ou de sa faible intensité. Pour cela nous avons dérégulé le système en plaçant les gènes *phoPQ* sous le contrôle du promoteur *lac* (cf. article 2). Cette construction a ensuite été transférée dans les mutants *phoP* afin de regarder si on avait une



Figure 26 : La transcription de *phoP* n'est pas responsable de l'apparition de la sous population résistante. L'expression des gènes du régulon PhoP entre la souche sauvage et la souche dérégulée pour l'expression de *phoP* est analysée par RT-qPCR. Les écarts type indiquent une erreur standard calculée en utilisant les séries Taylor. Les résultats significatifs (p value <0.05) sont annotés avec un astérisque (*). Les résultats ont été traités par le logiciel REST 2009.



Figure 27. La protéine PhoP est détectée dans toutes les cellules de *P. luminescens* TT01. A : Western blot sur les souches TT01 et *phoP* avec un anticorps spécifique anti PhoP-His. B: Immunofluorescence assay, les cellules TT01 sont fixées sur lame poly-Lysine et perméabilisée pour rendre accessible les protéines intracellulaires à l'anticorps anti PhoP-His. Le signal GFP traduit la présence de la protéine PhoP dans les cellules de TT01.

complémentation de la résistance à 100%. Comme présenté dans l'article 2, les antibiogrammes réalisés sur cette souche ne restaurent pas complètement la résistance à la polymyxine B. En effet, le niveau de bactéries résistantes augmente (contrôlé par CFU) et passe de 0,5% à 6-7% mais on reste loin d'une restauration complète avec 100% de bactéries résistantes. Nous avons contrôlé nos constructions par RT-qPCR afin de s'assurer que les gènes *phoP* étaient bien transcrits à partir du plasmide. Nous avons 6 fois plus de transcrits *phoP* (figure 26), ce qui correspond finalement plus ou moins au nombre de copies du plasmide, pBBR1, alors que l'expression des gènes PhoP–dépendant n'est pas affectée. Nous avons réalisé les mêmes constructions mais cette fois en remplaçant le promoteur naturel de *phoP* chez *Salmonella*. Ces deux constructions ont ensuite été introduites dans le mutant *phoP*. Là encore, le profil hétérogène des deux constructions était semblable à la souche sauvage. Bien que chez *Salmonella* il ait clairement été montré que PhoP nécessitait une régulation spécifique (« surge » voir (Shin *et al.* 2006)), ces résultats nous ont amené à conclure que la transcription de *phoP* n'était pas à l'origine de l'hétérogénéité de la population sauvage.

L'hypothèse d'une déficience traductionnelle

Puis, nous avons contrôlé la traduction de PhoP dans les cellules. Afin de détecter PhoP, nous avons surproduit et purifié la protéine PhoP marquée histidine (également utilisée pour les EMSA des articles 1 et 2) et un anticorps a été produit. La spécificité des anticorps obtenus à partir des lapins a été contrôlée par western blot puis testée sur les souches TTO1 et *phoP* (figure 27). PhoP est bien présent dans la souche sauvage et absent dans le mutant *phoP* (figure 27A). Par immunofluorescence assay, nous avons vérifié si PhoP était traduit dans toutes les cellules bactériennes ou seulement dans 0.5% des cellules (figure 27B). Nous avons pu observer que PhoP était traduit dans 100% des cellules infirmant ainsi un problème de traduction de PhoP qui serait à l'origine de l'hétérogénéité de la population.

L'hypothèse d'une déficience post-traductionnelle

Enfin, la dernière étape a été de tester l'activation de PhoP. A savoir, est-ce que PhoP est capable de fixer le phosphate et est-ce que l'hétérogénéité est due à une activation de PhoP uniquement dans certaines cellules? Nous avons dans un premier temps pu démontrer que PhoP était capable de fixer le phosphate *in vitro*. Pour cela nous avons phosphoryler la protéine PhoP-His purifiée avec de l'ACP *in vitro* puis nous avons fait migrer l'échantillon sur un phosphogel. La particularité du phosphogel est qu'il possède des ions divalents Mn²⁺ ou Zn²⁺ (dans notre cas il s'agit de Mn²⁺) et un phostag. Le phostag est capable de fixer de façon non spécifiques les phosphates (et donc les formes



Figure 28 : Rôle de la phosphorylation dans la sous-population résistante. Les souches ont été cultivées en LB et testées par antibiogramme pour leur profil homogène ou hétérogène lorsque PhoP est muté sur son site de phosphorylation. Gauche : *phoP*/pBB-Plac-PhoPHA(D52A) forme non phosphorylable de PhoP. Droite: mutant *phoP*/pBB-Plac-PhoPHA(D52E).



Figure 29 : PhoQ est-il responsable de l'hétérogénéité ?. Les souches ont été cultivées en LB et testées par antibiogramme pour leur profil homogène ou hétérogène lorsque l'on mime l'allèle *pho24* de *Salmonella* Typhimurium. Gauche : mutant *phoP*/pBB-P_{lac}-PhoPQ(T45I) modification mimant l'allèle *pho24* (PhoQ constitutif). Droite : *phoP*/pBB-P_{lac}-PhoPQ(A46T) mutant mimant le contexte génétique naturel de *Salmonella* Typhimurium.

phosphorylées) des protéines en présence de son co-facteur Mn²⁺. Cette fixation va entrainer un ralentissement de la forme phosphorylée de la protéine par rapport à la forme non phosphorylée. Nous avons pu démontrer (article 1, figure S1 sup data) qu'en présence d'acétyl phosphate PhoP était présent uniquement sous forme phosphorylée dans sa conformation monomérique et dimérique. PhoP est donc phosphorylable in vitro. Nous avons ensuite testé la phosphorylation par l'ACP sur des cultures bactériennes comme précédemment utilisés (Chamnongpol et Groisman 2000). Par CFU sur milieux polymyxine additionné de 50 mM d'ACP, 0,25% de bactéries résistantes ont été dénombrées, soit un résultat comparable à ce qui existe chez la souche sauvage. Les souches $TTO1/P_{pbePE^-}gfp[mut3]$ mises en culture en présence d'acétyl phosphate n'ont pas montré une augmentation significative de la fluorescence comparé aux souches témoins ce qui signifie que l'expression des gènes pbgPE n'a pas été modifié en présence d'acetyl phosphate (figure 24). Une question reste posée à savoir l'acétyl phosphate est-il dégradé dans le milieu de culture par Photorhabdus ou bien n'est-il tout simplement pas métabolisé et internalisé dans les bactéries ? A ce jour nous n'avons toujours pas répondu à cette question, bien que le plus probable soit que l'ACP n'est pas un inducteur et donc que la phosphorylation n'est pas responsable du switch. Cet argument est appuyé par le fait que l'ajout de phosphoramidate (un autre donneur de Phosphate appartenant à la voie de biosynthèse de l'ACP) dans le milieu n'a également aucun effet sur l'hétérogénéité de la population (données non montrées).

L'émergence de la sous-population résistante nécessite la présence du site de phosphorylation sur PhoP

La phosphorylation, bien que non responsable de l'hétérogénéité de la population a bien un rôle essentiel dans l'activation de PhoP. En alignant les protéines PhoP de plusieurs entérobactéries, on peut constater que le site de phosphorylation est conservé (figure 21). Ainsi deux mutants du site de phosphorylation ont été construits. Un plasmide portant le gène *phoP* taggée HA a été muté en remplaçant l'aspartate par une alanine et par un glutamate respectivement (pBB-P_{lac}-PhoPHA(D52A) et pBB-P_{lac}-PhoPHA(D52E)). Ces plasmides ont été ensuite été transféré dans le mutant *phoP* pour voir si les mutations complémentaient ou abolissaient la résistance aux CAMPs. Par antibiogramme, on voit clairement qu'avec le premier mutant *phoP*/pBB-Plac-PhoPHA(D52A) (Figure 28 gauche), la sous-population résistante a disparu et que la souche est complètement sensible aux CAMPs. Ceci montre le rôle essentiel de la phosphorylation et confirme que la forme phosphorylée de PhoP est la forme active ce qui avait précédemment été démontré par les EMSAs (article 1 et 2). Le deuxième mutant consistait à remplacer l'aspartate par un glutamate afin de mimer l'état constitutivement



Figure 30 : *ail1*_{Pl} est transcrit dans toutes les cellules de TT01. Les constructions pBB-P_{*ail1*Pl}-*gfp*[AAV] permettent de suivre l'expression du gène *ail1*_{Pl} dans TT01 et *phoP*. Les souches indiquées sur la figure ont été mises en culture jusqu'à une DO de 0,5 environ. Elles ont ensuite été lavées et fixées pour être analysée par cytométrie de flux (Canto II). Les analyses ont été réalisées sur cellules vivantes uniquement. Les résultats sont traités avec le logiciel flowJO et représentent le nombre de bactéries en fonction de l'intensité de fluorescence.

phosphorylé d'une protéine (Molle V, communication personnelle). D'autres mutants constitutifs capable de s'affranchir de l'environnement, ont déjà été construits chez *Salmonella* (Chamnongpol et Groisman 2000). Les antibiogrammes réalisés avec le mutant *phoP*/pBB-P_{lac}-PhoPHA(D52E) montrent une hétérogénéité de la population toujours présente et légèrement supérieure à celle de la souche sauvage (Figure 28 droite). Le nombre de bactéries résistantes a été quantifié par CFU et on a pu montrer qu'environ 7% de la population sauvage était résistante aux CAMPs.

Enfin, une autre possibilité de tester si la phosphorylation était responsable de l'apparition de la sous-population résistante, nous avons construit un plasmide avec uniquement le domaine HTH de *phoP* c'est à dire le domaine de liaison à l'ADN. En s'abstenant du domaine de fixation du phosphate on mime une conformation ouverte de la protéine ce qui reviendrait à une conformation active en absence de phosphorylation. Or nous n'avons pas réussi à surproduire cette construction soit à cause d'un problème de stabilité, le domaine seul n'est pas stable, soit à cause d'une demi-vie extrêmement courte.

En conclusion, toutes ces expériences nous ont permis de conclure que la phosphorylation n'était pas responsable du switch entre les deux sous-populations.

PhoQ responsable de l'hétérogénéité ?

Une autre hypothèse est que les cellules sensibles ne transduisent pas le signal ou ne reconnaisse pas le stimulus. Chez *Salmonella* l'allèle *pho24* ou PhoP^c a été décrit comme présentant la protéine PhoP constitutivement phosphorylée et grâce à une seule substitution dans sa séquence protéique : T48I. En comparant les protéines PhoQ (figure 22), on peut voir qu'excepté *Photorhabdus* toutes les souches comparées (*Salmonella, Yersinia* et *Erwinia*) présentent un T alors que seul *Photorhabdus* présente un A. Deux mutants ont été construits: A46T afin de ressembler aux autres protéines PhoQ chez les entérobactéries, T45I afin de mimer le mutant constitutif de *Salmonella*. Comme présenté sur les antibiogrammes (figure 29), le phénotype de résistantes des mutants est identique à la souche sauvage (figure 19) . Aussi PhoQ ne semble pas impliqué dans le switch.

Hypothèse vraisemblable : Un problème en cis dans la région en amont de pbgPE

Nous avons pu démontrer que l'apparition du switch n'était due ni à PhoP ni à PhoQ. L'hypothèse la plus probable est que le switch soit lié à *pbgPE*, or la seule connection entre PhoP (qui est essentiel puisque sans PhoP la bactérie devient sensible aux CAMPs et la complémentation du mutant *pbgE* restaure la résistance aux CAMPs avec un profil homogène résistant par antibiogramme) et *pbgPE* est



Figure 31 : Spotting des souches TT01et *phoP* complémentée par les constructions pBB-P_{ail1Pl}-pbgPE en condition avec ou sans polymyxine B. Les souches sont cultivées en LB et à une DO entre 0,6 et 0,8 et diluées. 10 μL de la dilution souhaitée sont déposés sur Gelose nutritive + Gm ou Gelose nutritive + Gm + polymyxine B 100 μg/mL. La dilution permettant la croissance des bactéries est évalué visuellement selon les conditions. %R indique le pourcentage de bactéries résistantes évaluées par CFU.

la région promotrice de *pbgPE*. Afin d'appuyer cette hypothèse, les gènes *pbgPE* ont été placés sous contrôle du promoteur *ail1*_{Pl} qui permet l'expression dans toutes les cellules bactériennes et est activé par PhoP (figure 30 et article 1). Ces analyses montrent que plus de 80% des cellules expriment le gène *ail1*_{Pl} chez TT01.

La figure 31 montre à la fois les résultats CFU et un spotting de ces souches sur milieu avec et sans polymyxine B. Cette dernière expérience, bien que non quantitative, permet néanmoins de visualiser qu'il y a un log de moins de croissance bactérienne pour la souche TT01/ pBB-P_{ail1PI}-pbgPE entre les conditions avec et sans polymyxine B, contre deux log pour le témoin plasmide vide (TT01/pBB-MCS5). Dans le mutant *phoP*, on n'a pas d'activation des gènes de résistance et par CFU on dénombre 0% de bactéries résistantes, en revanche dans la souche sauvage, la présence de la construction a fait passer le nombre de bactéries résistantes de 0,5% chez la sauvage à 25-50% dans la souche TT01/ pBB-P_{ail1PI}-pbgPE. Ceci suggère fortement que la région promotrice de *pbgPE* est à l'origine de l'apparition de la sous-population résistante. Nous aurions donc ciblé la zone responsable du switch mais nous n'avons toujours pas élucidé le mécanisme responsable de l'apparition de la sous population résistante.

L'hypothèse génétique de mutation ou variation de phase

Une altération de la séquence d'ADN peut être à l'origine de l'apparition de résistance chez les bactéries (cf IV- Introduction générale). L'exemple le plus répandu est l'acquisition de mutations qui vont permettre aux bactéries de modifier la cible de l'antibiotique. L'apparition de la sous-population résistante est-elle due à une mutation? Pour répondre à cette question nous avons extrait l'ADN de la souche sauvage TT01 cultivée en LB et en LB supplémenté de polymyxine B afin de ne sélectionner que la sous population résistante. Les ADNs ont ensuite été séquencés et nous avons pu comparer les gènes *phoP, phoQ* ainsi que les régions promotrices des opérons *phoPQ, pbgPE* et du gène *ail1*_{Pl}. Ni les gènes, ni les régions promotrices ne présentent de mutations dans leur séquence entre les conditions avec et sans polymyxine B (résultats non montrés) et les régions du génome de TT01 (Duchaud *et al.* 2003). La sous-population résistante est donc génétiquement identique à la sous-population sensible pour ce qui concerne les gènes contrôlant la résistance aux CAMPs. Le séquençage nous a également permis de rejeter l'hypothèse de la présence d'un glissement de brin ou d'un décalage de trame dû à une insertion ou à une excision d'un ou plusieurs nucléotides car les séquences sont absolument identiques.

La dernière hypothèse a été de vérifier la présence d'une inversion des régions promotrices (variation de phase) des gènes *phoP* et *pbgPE*. En effet, récemment chez *Photorhabdus luminescens,* le « madswitch » correspondant à l'inversion de la région promotrice des gènes *mad* codant pour des

TTACAGT**CCAGG**CTTATGTATGTGCCTGCCGTGAATCTGTACGTATCGTG**GATC**GATAGT AATTTCCACTTAATTTGCTAAATCATACCTGTGTTTACGATTCGTTCAAATATAGTCATC TAATATATCGTTATATTATGAATGAATTGGACTGTGTTTT<mark>ATG</mark>GATAGCTTTCCTTCCAT

Figure 32 : Identification des sites de méthylation sur la région promotrice de *pbgPE* (198 pb) utilisée dans les constructions P_{pbgPE} -*gfp*[AAV] et P_{pbgPE} -*gfp*[mut3]. GATC : site pour les Dam méthylases. CCAGG site pour les Dcm méthylases.

fimbriae, permet l'expression (état ON) ou la répression (état OFF) des gènes *mad* (Somvanshi *et al.* 2010). Ce madswitch est à l'origine de l'hétérogénéité de la souche sauvage chez le nématode (Somvanshi *et al.* 2012). Grâce à la plateforme d'analyse MAGE (Microbial genome annotation and analysis Platform, https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php) qui recense les génomes de nombreuses bactéries dont *Photorhabdus* et à des outils bioinformatiques spécifiques (http://molbiol-tools.ca/Repeats_secondary_structure_Tm.htm), nous pouvons vérifier la présence ou non de petites séquences inversées-répétées dans le génome à proximité des gènes d'intérêt. Aucune séquence inversée-répétée n'a été mise en évidence à proximité des régions promotrices de gènes *phoP* et *pbgPE*. De même aucune structure secondaire n'a été identifiée dans la région promotrice de *pbgPE*.

L'hypothèse de la méthylation du promoteur pbgPE

Un des mécanismes expliquant l'hétérogénéité au sein d'une population est la méthylation. Cela a notamment été démontré chez *E. coli* pour la régulation de l'opéron *pap* (Hernday, Braaten, et Low 2004). Chez *Photorhabdus,* aucune étude n'a montré un quelconque rôle des méthylations chez la bactérie que ce soit pour sa vie symbiotique avec le nématode ou son interaction pathogène avec l'insecte. Chez les bactéries, ce sont principalement les adénines qui sont méthylés (Fang *et al.* 2012). En revanche chez les eucaryotes ce sont principalement les méthylations sur les cytosines qui ont un rôle notamment dans les cancers (pour revue voir (Shaknovich, De, et Michor 2014)). Les principales méthylases des adénines et des cytosines sont respectivement les Dam méthylases (sites GATC) et les Dcm méthylases (sites CCAGG ou CCTGG). Chez *E. coli* ce sont près de 94% des sites GATC qui sont méthylés alors que seuls 0,34% des cytosines des sites reconnus par Dcm sont retrouvées méthylées (Fang *et al.* 2012). Nous avons donc testé si ces deux types de méthylation avaient un rôle dans l'apparition de la sous-population résistante.

En amont de l'opéron *pbgPE*, on trouve les deux sites à savoir GATC et CCTGG (figure 32). Nous avons donc transféré le plasmide P_{pbgPE} -gfp[AAV] dans des souches *E. coli* dam+/dcm+ (Xl1 blue) et dam-/dcm- (JM110) afin de tester de façon hétérologue si les Dam et Dcm méthylases avaient un effet sur l'expression du promoteur de l'opéron *pbgPE* (figure 33). La figure 33A montre que lorsque les bactéries sont cultivées en LB le niveau de fluorescence des souches dam-/dcm- est plus de 8 fois supérieur à celui obtenu dans les souches d'*E. coli* dam+/dcm+. En revanche lorsque ces souches sont cultivées en milieu minimum M9 supplémenté de MgSO4 à 10 μ M (figure 33B) la différence de fluorescence n'est plus observable et les souches dam+/dcm+ atteignent le niveau de fluorescence des doubles mutantes, ce qui pourrait signifier que l'activation de PhoP permettrait de passer outre la méthylation. Ces expériences ont également été réalisées dans les simples mutants d'*E. coli* dam-



Figure 33 : Evaluation de l'impact des Dam et Dcm méthylases par système d'étude hétérologue chez *E. coli*. A : Condition LB. B : Condition activatrice milieu M9 + MgSO4 10 μ M. C : Condition inhibitrice milieu M9 + 10 mM MgSO4. Les constructions P_{pbgPE}-gfp[AAV] ont été transférées dans les souches d'*E. coli* XL1 blue (dam+/dcm+) et JM110 (dam-/dcm-).



Temps (heures)

Figure 34 : Evaluation de l'impact des Dam méthylases par un système hétérologue chez *E. coli*. A : Condition LB, B : Condition activatrice milieu M9 + MgSO4 10 μ M. C : Condition inhibitrice milieu M9 + 10 mM MgSO4. Les constructions P_{pbgPE}-gfp[AAV] ont été transférées dans les souches d'E. coli XL1 blue (dam+/dcm+), dam16::Km (dam-/dcm+).

ou dcm- (figure 34 et 35), cependant quel que soit le milieu de culture, le profil de fluorescence est le même entre les souches parentale d'*E. coli* et les souches mutées sur une des deux méthylases. La limite de ce modèle est qu'il s'agit d'un système hétérologue et bien qu'il y ait des ressemblances entre les deux bactéries (forme active de PhoP est la forme phosphorylée, activation à bas MgSO4), il y a aussi des différences comme l'absence de PmrAB et PmrD chez *Photorhabdus* alors qu'ils sont présents chez *E. coli*. Enfin par EMSA nous avons pu montrer une fixation directe de PhoP (*Salmonella*) sur la région promotrice de *pbgPE* (*Photorhabdus*) pour des concentrations en PhoP-P de 1 µM. Ceci pourrait expliquer pourquoi *pbgPE* a pu être activé par le TCS PhoPQ d'*E. coli* dans les systèmes hétérologues. Il est possible que la région promotrice de *pbgPE* chez *Photorhabdus* soit plus « dégénérée » dans le sens ou elle accepte la fixation de protéines PhoP hétérologues. Cela pourrait également expliquer l'absence de PhoP box en amont de *pbgPE* (Article 2). Donc pour pouvoir conclure sur les méthylations, nous avons testé chacune des deux méthylations indépendamment chez *Photorhabdus*.

Tout d'abord nous avons testé si le site GATC était méthylé. Pour cela nous avons digéré l'ADN génomique extrait des souches TT01 et TT01 cultivée en présence de polymyxine B, ainsi que l'ADN plasmidique TT01/P_{pbaPE}-gfp[AAV] (plasmide qui a été décrit et utilisé au lecteur de fluorescence en microplaque et en cytométrie) de ces mêmes souches. Les ADNs ont été digérés par Sau3A, DpnI et EcoRI. Sau3A clive les sites GATC et est insensible à la méthylation, DpnI ne digère l'ADN que si celui ci est méthylé sur l'adénine du site GATC, enfin EcoRI est utilisé ici comme enzyme contrôle et ne clive pas les sites GATC. Ces ADN ont ensuite été utilisés pour réaliser un Southern Blot grâce à une sonde correspondant à la région promotrice et une partie du gène de pbgPE (229 pb en tout) marquée à la digoxygénine. Le profil de digestion (figure 36) entre la condition avec et sans polymyxine B est exactement le même donc le profil de méthylation du site GATC par la Dam méthylase n'est pas différentiel et ne permet pas d'expliquer le switch. Afin de confirmer ce résultat, nous avons muté le site GATC en GTTC dans la région promotrice de l'opéron pbgPE. Ces mutations ont été réalisées sur les plasmides utilisés pour la cytométrie, c'est à dire que la région promotrice mutée de pbgPE est en fusion transcritpionnelle avec la GFP déstabilisée. Ces plasmides ont été conjugués dans TT01 et observés en microscopie à fluorescence et on a pu constater qu'on avait moins de 1% de bactéries fluorescentes ce qui correspond aux valeurs obtenues avec la même construction non mutée. Ainsi, on a pu confirmer que la Dam méthylation n'était pas à l'origine du switch chez Photorhabdus.

Nous avons ensuite testé l'effet des Dcm méthylases. Pour regarder le profil de méthylation des cytosines de la région promotrice de *pbgPE*, nous avons utilisé une méthode largement employée chez les eucaryotes: le traitement des ADNs au bisulfite. En effet, le bisulfite transforme les cytosines non méthylées en uracile et après amplification par PCR une thymine viendra remplacer les cytosines


Figure 35 : Evaluation de l'impact des Dcm méthylases par un système hétérologue chez *E. coli*. A : Condition LB, B : Condition activatrice milieu M9 + MgSO4 10 μ M. C : Condition inhibitrice milieu M9 + 10 mM MgSO4. Les constructions P_{pbgPE}-gfp[AAV] ont été transférées dans les souches d'*E. coli* BW25113 (dam+/dcm+), JJW144-2 (dam+/dcm-).



Figure 36 : Le site GATC de *pbgPE* est méthylé. Southern blot sur 5 µg d'ADNg et 100 ng d'ADN plasmidique (TT01/P_{*pbgPE*}.*gfp*[AAV]). Après migration dans le gel d'agarose 1%, la sonde ADN *pbgPE* (229 pb) est marquée à la diogoxygénine et utilisée pour détecter les fragments de digestion. La révélation se fait par chimiluminescence sur film Kodak.

non méthylées, ces changement de séquence sont facilement détectés par séquençage. Comme montré figure 37, on peut voir que la cytosine du site CCTGG de fixation pour la Dcm méthylase est méthylé.

Enfin nous avons cloné une version raccourcie du promoteur de *pbgPE* ne contenant ni le site pour la Dam ni le site pour la Dcm méthylase en amont de la GFP puis transféré ces constructions dans la souche sauvage de *P. luminescens*. Au microscope nous, observons toujours seulement 1% de bactéries fluorescentes ce qui confirme que les Dam/Dcm ne régulent pas le switch chez *Photorhabdus*.

Il semblerait donc que ni les Dam ni les Dcm méthylases ne soient responsables de l'apparition de la sous population résistante.

Caractérisation de la région promotrice de pbgPE

Nous avons caractérisé le site d'initiation de la transcription des gènes pbgPE et ail1_{Pl} afin de mieux caractériser la région promotrice de pbgPE dans la sous population résistante (pour phoP voir Derzelle et al. 2004). Dans l'article 2 nous avons identifié le site d'initiation de la transcription de *pbgPE* et *ail1*_{Pl} à partir de la souche TT01 cultivée en condition activatrice à 10 μ M MgSO4. Nous avons réalisé la même expérience sur des cultures de TT01 cultivées en présence de polymyxine B et déterminé le site d'initiation de la transcription pour *pbqPE* uniquement (figure 38). Nous avons pu constater que les sites d'initiation de la transcription en condition MgSO4 ou polymyxine B sont différents. Le site d'initiation en condition polymyxine B est situé en aval de celui dépendant du MgSO4 et très proche de l'ATG. Aucun consensus conservé entre les conditions MgSO4 et polymyxine B n'a été retrouvé, en revanche de part et d'autre du site -35 obtenu en condition polymyxine B il semble y avoir un motif répété. Bien que ce motif ne corresponde pas à celui identifié chez Salmonella, il possède la même structure un motif répété séparé par plusieurs nucléotides. Cette découverte est inédite puisque cela signifierait que les sous-populations induites en condition MgSO4 ou en condition polymyxine B seraient différentes puisque selon la condition de culture les gènes de résistance ne sont pas transcrits selon le même mécanisme (+1 MgSO4 différent du +1 polymyxine B). Chez Salmonella, le Mg²⁺ comme étant un inducteur du système a déjà été remis en cause comme étant un inducteur non naturel ne fonctionnant probablement qu'in vitro (Martin-Orozco et al. 2006). Chez Photorhabdus, il est possible qu'en MgSO4 nous observions un artéfact du système en forçant l'expression des gènes de résistance. Quoiqu'il en soit cela ouvre la possibilité que les gènes de résistance soient régulés comme les gènes pap à savoir avec une expression dépendante de la méthylation qui génère des sites de fixation différents (proximales ou distales), (Chapitre I-IV Introduction générale).



Figure 37 : Le site CCAGG de *pbgP* est méthylé. Alignement des séquences modifiées par le bisulfite par MultiAlign. Ref pbgP : séquence témoin sans traitement bisulfite (MAGE software). Tous les autres échantillons ont été traités au bisulfite sont représenté ici : 1 réplicat génomique dans les deux conditions avec et sans polymyxine B (ADNgTT01+/-poly) et 2 réplicats plasmidiques (ADNpTT01 et ADNp(2) +/- poly). La flèche et l'encadré noir indique le site de méthylation par les Dcm (deuxième cytosine).

ail1	TT01		ACAATAAACGAGATTGAG	TTGTTT	TCTATTGA	TTGTTGAT.	AAA <mark>TAA</mark> '	TCGCGCCT
phoP	TT01		TATTTCCACTTAACGTCT	TGCTGT	TACAGATC	CATGTATC	TAACAT.	ACTCAGC <mark>A</mark>
pbgP	Mg2+	TT01	TCATACCTGTGTTTACGA	TTCGTT	САААТАТА	GTCATCTA	ATATAT	CGTTATA <mark>T</mark>
pbgP	poly	TT01	ACGAT <u>TCGTT</u> CAAATATA	GTCATC	TAATATA	' <u>CGTT</u> A <mark>TAT'</mark>	<mark>tat</mark> gaa'	TGAATTG <mark>G</mark>
phoP	salm		ACTATTTGTCT <u>GGTTTA</u> T	TAACTG	TTTATCCC	CAAAGCAC	CATAAT	CAACGCT <mark>A</mark>
pbgP	salm		CTTCACCTTAATTTCTTA	ATGTTA	ATTTAATC	TTCATCCA	G <mark>TAGGG</mark>	<mark>T</mark> TCAGCT <mark>A</mark>

Figure 38 : Identification des sites d'initiation de la transcription pour les gènes *ail1*_{Pl}, *pbgP* (conditions Mg^{2+} et polyB) *phoP* (Derzelle, 2004) de *P. luminescens* et *phoP* et *pbgP* de *S.* Typhimurium ((Wösten et Groisman 1999), (Lejona et al. 2003)). Les ARNs ont été extraits de la souche sauvage cultivée dans différentes conditions. Ils ont été traités par le 5'/3' RACE kit (ROCHE) puis séquencés et analysés. Les motifs soulignés pour *phoP* et *pbgP* poly TT01 représentent respectivement la PhoP box et la PmrA box. Le motif souligné pour *pbgP* poly TT01 représente un motif répété de part et d'autre du -35 et donc une PhoP box putative. Surligné en rouge : le site -35, Surligné en violet : le site -10, surligné en vert : le site d'initiation de la transcription.

Conclusion Perspectives

Ces trois années ont permis de mettre en évidence et de caractériser l'hétérogénéité de la résistance aux CAMPS chez Photorhabdus et en particulier de caractériser moléculairement la sous-population résistante au CAMPS chez la souche TT01. Nous avons pu démontrer que seul 0,5% de la population sauvage bactérienne étaient responsables de la mort de l'insecte. Au sein du genre Photorhabdus, nous avons pu démontrer qu'il y avait une corrélation entre hétérogénéité de la population et virulence, en revanche chez Xenorhabdus aucune corrélation n'a pu être mise en évidence. De plus chez Xenorhabdus nematophila le mutant phoP est virulent (Heidi Goodrich-Blair communication personnelle). Nous proposons que la sous-population résistante de Photorhabdus ait un rôle dans l'adaptation à environnement changeant. Chaque insecte possédant son propre cocktail de CAMPs et Photorhabdus étant véhiculé par leur nématode entomopathogène dans plusieurs ordres d'insectes (lépidoptères, diptères et coléoptères), la pré-existence d'une sous-population bactérienne résistante permettrait à la bactérie une survie dans toutes les familles d'insectes. On peut imaginer que sans cette sous-population la bactérie devrait muter et s'adapter à chaque type de défense de l'hôte insecte ce qui d'une part aurait un fort coût et d'autre part ne garantirait le succès pathogène que si la mutation s'effectuait suffisamment rapidement, avant l'élimination de toutes les bactéries. En effet, un des rôles des CAMPs dans l'insecte est de s'assurer qu'aucune infection persistante ne puisse s'installer après l'action de l'immunité. L'existence de cette sous-population résistante chez TT01 pourrait ainsi être une stratégie d'adaptation de la bactérie à des changements environnementaux à moindre coût. Cet argument peut être appuyé par le fait que seule une faible part de la population sauvage est pré-adaptée et surtout que ce phénomène est complètement réversible in vitro et in vivo. De même, pourquoi toute la population bactérienne n'est pas résistante ? Cela pourrait s'expliquer par le fait que le coût pour la bactérie de maintenir son LPS modifié est plus important que le coût lorsqu'il n'est pas modifié. Ou alors, pour rappel, le nématode est colonisé par la forme M de Photorhabdus et transitoirement par la forme P (avant le « madswitch »). Il est possible que le nématode doive récupérer des formes P résistantes et sensibles et non juste une forme résistante avant l'émergence du cadavre et le « madswitch », cependant cette hypothèse n'a pas été explorée à l'heure actuelle. Quoiqu'il en soit, la bactérie ne maintient pas toute sa population résistante. Bien que tout ceci reste des hypothèses découlant principalement de l'observation et d'extrapolations, le rôle de cette sous-population résistante n'en reste pas moins essentiel pour le cycle biologique de cette bactérie.

Cette thèse s'est donc articulée autour de cette thématique, à savoir, caractériser cette souspopulation résistante aux CAMPs. Le système à deux composantes PhoPQ a un rôle central dans la régulation de la résistance aux CAMPs chez de nombreuses bactéries y compris *Photorhabdus* (Derzelle *et al.* 2004). Cependant son régulon n'était que peu étudié et caractérisé chez *Photorhabdus*. Nous avons pu démontrer que la forme active de PhoP était la forme phosphorylée et

que cette dernière pouvait se fixer de manière directe sur les régions promotrices des gènes ail1_{Pl}, phoP (boucle de rétro-action positive) et pbgPE ce qui en fait des marqueurs du régulon PhoP. Enfin, ces gènes sont surexprimés en condition MgSO4 10 μ M, confirmant que le Mg²⁺ est aussi un inducteur de Photorhabdus in vitro (comme chez Salmonella), et ces gènes sont retrouvés plus exprimés dans la sous-population résistante que dans la population totale. Aussi pbgPE est impliqué dans la modification du LPS modifiant la charge de la bactérie (Bennett et Clarke 2005) en conférant une résistance aux CAMPs, et il est directement régulé par PhoP (article 2). Les premiers résultats de cette thèse avaient permis de localiser le mécanisme responsable de l'apparition de cette souspopulation comme étant situé entre PhoP et pbgPE (antibiogrammes mutants et complémentations). Plusieurs hypothèses concernant le rôle de PhoQ et de PhoP ont été testées durant ces trois années afin de décrypter le mécanisme du switch qui pourrait nous permettre à terme d'obtenir une population 100% résistante. Nous avons pu constater que ni la transcription ni la traduction ni les mutations constitutives n'étaient à l'origine du switch entre bactéries sensibles et résistantes (figure 25). Nous nous sommes donc intéressés aux régions promotrices directement régulées par PhoP afin de savoir si elles n'avaient pas un rôle dans l'apparition de la sous-population résistante. Nous avons écarté l'hypothèse selon laquelle la variation de phase génétique était à l'origine du switch dans les régions étudiées. Il nous restait donc à étudier les phénomènes épigénétiques. Afin de confirmer que la région promotrice de *pbgPE* était bien responsable de l'hétérogénéité de la population nous avons construit une fusion entre le promoteur de $ail1_{Pl}$ constitutivement exprimé chez TTO1 (figure 30) et les gènes *pbqPE*. Nous avons pu observer une augmentation du nombre de bactéries résistantes in vitro (25-50%) corrélés avec le phénotype in vivo à savoir une mortalité précoce des insectes par rapport à la souche sauvage (données non montrées). La région promotrice de pbqPE est donc clé dans l'apparition de l'hétérogénéité. Nous avons pu cibler que seules 95 pb en amont de l'ATG étaient responsables de cette hétérogénité (Chapitre IV). Il été décrit chez les procaryotes que les méthylations dans les régions promotrices pouvaient influencer l'expression des gènes (ex : pap) (pour synthèse (Hernday, Braaten, et Low 2004) et Chapitre I-IV introduction générale). Il est important de noter que des parallèles entre PhoP et méthylation ont déjà été mis en évidence chez Salmonella. Notamment, Casadesus et coll. ont pu montrer que la Dam méthylase était capable de réprimer PmrB indépendamment de PhoP, or PmrB (Figure 8) appartient au système à deux composante régulant directement l'expression de pbqPE chez Salmonella (García-Del Portillo, Pucciarelli, et Casadesús 1999). De même, ils ont pu mettre en évidence que les profils de méthylation étaient différents entre la souche sauvage et le mutant phoP chez Salmonella et qu'il n'y avait pas d'interférence pour l'expression entre Dam et PhoP. Ils en ont donc conclut que PhoP ou un produit régulé par PhoP était capable de bloquer la méthylation Dam dépendante. Nous avons donc tout naturellement testé cette hypothèse de méthylation en système hétérologue (E. coli sauvage et



Figure 39 : Schéma bilan de la thèse.

mutées) et chez TT01. L'introduction des constructions P_{pbgPE} -gfp[AAV] chez les souches d'*E. coli* dam-/dcm- vs dam+/dcm+ ont montré un rôle probable des méthylations Dam et/ou Dcm dans l'apparition de l'hétérogénéité (augmentation de l'expression du promoteur de *pbgPE* dans les doubles mutants). En revanche, aucun des simples mutants *dam/dcm* chez *E. coli* n'a donné de résultats. De plus, on a pu démontrer chez TT01, que les sites reconnus par les Dcm et Dam méthylases de la région promotrice de *pbgPE* étaient méthylé dans les deux sous-populations.

Cependant, l'hypothèse d'une méthylation comme responsable du switch épigénétique n'est toujours pas exclue à l'heure actuelle. En effet, Chez *Salmonella*, l'hypothèse qu'un produit de PhoP puisse aussi modifier le profil de méthylation a été émise. Dans cette optique deux approches sont poursuivies au laboratoire et seront mise en œuvre après mon départ. La première est une approche globale de RNAseq entre les deux sous-populations afin d'identifier le régulon PhoP dans sa globalité et notamment rechercher un lien entre l'expression de *phoP* et des DNA méthylases. La seconde est une approche globale du méthylome. En effet, le laboratoire est en discussion avec Génome Québec afin qu'ils réalisent le méthylome de TT01 pour les deux sous-populations selon la technique de séquençage SMRT qui permet d'identifier les modifications spécifiques de chaque nucléotide lorsqu'elles sont présentes. Ces deux approches misent en parallèles pourraient confirmer ou réfuter l'hypothèse « méthylation » mais apporteraient, quoi qu'il en soit, de nouvelles données sur le régulon PhoP.

Enfin, il faut savoir que les résultats obtenus chez *E. coli* doivent être traités avec précaution. En effet les méthylases Dam, Dcm et EcoK1 sont les principales méthylases identifiées dans le génome de *E. coli*. Or chez *Photorhabdus*, on ne retrouve pas moins de 12 méthylases dont la moitié sont des méthylases orphelines (n'appartenant pas à un système de restriction-méthylation). Parmi ces méthylases orphelines, on retrouve par exemple un homologue de la Dam méthylase. Chez *Photorhabdus*, très peu de profils de méthylation ont pu être attribués à une méthylase précise, donc cela rend l'analyse plus difficile des régions promotrices. L'approche globale du méthylome pourrait permettre d'identifier de nouveaux sites de méthylations non définis à l'heure actuelle et la méthylase responsable de l'hétérogénéité n'a pas encore été décrite à ce jour. Cette thèse a été résumée en un schéma afin de faire ressortir tous les éléments importants à se rappeler (figure 39).

Références

- Abi Khattar, Z. 2009. « Impact de la résistance aux peptides antimicrobiens et aux composés toxiques sur les interactions bactéries-insectes : cas des infections par *Photorhabdus luminescens* et *Bacillus cereus* ». PhD thesis, Université Montpellier 2.
- Abraham, J. M., C. S. Freitag, J. R. Clements, et B. I. Eisenstein. 1985. « An Invertible Element of DNA Controls Phase Variation of Type 1 Fimbriae of *Escherichia coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (17): 5724-27.
- Akhurst, R. J., N. E. Boemare, P. H. Janssen, M. M. Peel, D. A. Alfredson, et C. E. Beard. 2004.
 « Taxonomy of Australian Clinical Isolates of the Genus *Photorhabdus* and Proposal of *Photorhabdus Asymbiotica* Subsp. Asymbiotica Subsp. Nov. and *P. Asymbiotica* Subsp. Australis Subsp. Nov ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (Pt 4): 1301-10. doi:10.1099/ijs.0.03005-0.
- Akhurst, R. J., R. G. Mourant, L. Baud, et N. E. Boemare. 1996. « Phenotypic and DNA Relatedness between Nematode Symbionts and Clinical Strains of the Genus *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae) ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (4): 1034-41.
- Alpuche Aranda, C. M., J. A. Swanson, W. P. Loomis, et S. I. Miller. 1992. « Salmonella Typhimurium Activates Virulence Gene Transcription within Acidified Macrophage Phagosomes ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89 (21): 10079-83.
- Austin, S, et R Dixon. 1992. « The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. » *The EMBO Journal* 11 (6): 2219-28.
- Bader, Martin W, William Wiley Navarre, Whitney Shiau, Hiroshi Nikaido, Jonathan G Frye, Michael McClelland, Ferric C Fang, et Samuel I Miller. 2003. « Regulation of Salmonella Typhimurium Virulence Gene Expression by Cationic Antimicrobial Peptides ». Molecular Microbiology 50 (1): 219-30.
- Bader, Martin W, Sarah Sanowar, Margaret E Daley, Anna R Schneider, Uhnsoo Cho, Wenqing Xu, Rachel E Klevit, Hervé Le Moual, et Samuel I Miller. 2005. « Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase ». *Cell* 122 (3): 461-72. doi:10.1016/j.cell.2005.05.030.
- Baikalov, Igor, Imke Schröder, Maria Kaczor-Grzeskowiak, Kazimierz Grzeskowiak, Robert P. Gunsalus, et Richard E. Dickerson. 1996. « Structure of the *Escherichia coli* Response Regulator NarL ». *Biochemistry* 35 (34): 11053-61. doi:10.1021/bi9609190.
- Balaban, Nathalie Q., Jack Merrin, Remy Chait, Lukasz Kowalik, et Stanislas Leibler. 2004. « Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5690): 1622-25. doi:10.1126/science.1099390.
- Baranova, Natalya, et Hiroshi Nikaido. 2002. « The *baeSR* Two-Component Regulatory System Activates Transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) Transporter Gene Cluster in *Escherichia coli* and Increases Its Resistance to Novobiocin and Deoxycholate ». *Journal of Bacteriology* 184 (15): 4168-76.
- Bearson, B. L., L. Wilson, et J. W. Foster. 1998. « A Low pH-Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects Salmonella Typhimurium against Inorganic Acid Stress ». Journal of Bacteriology 180 (9): 2409-17.
- Bedding, R. A., et A. S. Molyneux. 1982. « Penetration of Insect Cuticle By Infective Juveniles of *Heterorhabditis* Spp. (Heterorhabditidae: Nematoda) ». Nematologica 28 (3): 354-59. doi:10.1163/187529282X00402.
- Bennett, H P J, et D J Clarke. 2005. « The *pbgPE* operon in *Photorhabdus luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis ». *Journal of bacteriology* 187 (1): 77-84. doi:10.1128/JB.187.1.77-84.2005.
- Bigger, JW. 1944. « Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermitent sterilisation ». *Lancet*.
- Bijlsma, Jetta J. E., et Eduardo A. Groisman. 2005. « The PhoP/PhoQ System Controls the Intramacrophage Type Three Secretion System of Salmonella Enterica ». Molecular Microbiology 57 (1): 85-96. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04668.

- Bishop, R E, H S Gibbons, T Guina, M S Trent, S I Miller, et C R Raetz. 2000. « Transfer of Palmitate from Phospholipids to Lipid A in Outer Membranes of Gram-Negative Bacteria ». *The EMBO Journal* 19 (19): 5071-80. doi:10.1093/emboj/19.19.5071.
- Bishop, Russell E., Sang-Hyun Kim, et Ahmed El Zoeiby. 2005. « Role of Lipid A Palmitoylation in Bacterial Pathogenesis ». *Journal of Endotoxin Research* 11 (3): 174-80. doi:10.1179/096805105X35242.
- Blanco, Alexandre G., Maria Sola, F. Xavier Gomis-Rüth, et Miquel Coll. 2002. « Tandem DNA Recognition by PhoB, a Two-Component Signal Transduction Transcriptional Activator ». *Structure (London, England: 1993)* 10 (5): 701-13.
- Blyn, L. B., B. A. Braaten, et D. A. Low. 1990. « Regulation of Pap Pilin Phase Variation by a Mechanism Involving Differential Dam Methylation States ». *The EMBO Journal* 9 (12): 4045-54.
- Boemare, N. E., R. J. Akhurst, et R. G. Mourant. 1993. « DNA Relatedness between *Xenorhabdus* Spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a Proposal To Transfer *Xenorhabdus Luminescens* to a New Genus, *Photorhabdus* Gen. Nov. » *International Journal of Systematic Bacteriology* 43 (2): 249-55. doi:10.1099/00207713-43-2-249.
- Bond, Peter J., Daniel L. Parton, James F. Clark, et Mark S. P. Sansom. 2008. « Coarse-Grained Simulations of the Membrane-Active Antimicrobial Peptide Maculatin 1.1 ». *Biophysical Journal* 95 (8): 3802-15. doi:10.1529/biophysj.108.128686.
- Borges-Walmsley, M. Ines, Kenneth S. McKeegan, et Adrian R. Walmsley. 2003. « Structure and Function of Efflux Pumps That Confer Resistance to Drugs ». *The Biochemical Journal* 376 (Pt 2): 313-38. doi:10.1042/BJ20020957.
- Bougdour, Alexandre, Sue Wickner, et Susan Gottesman. 2006. « Modulating RssB Activity: IraP, a Novel Regulator of sigma(S) Stability in *Escherichia coli* ». *Genes & Development* 20 (7): 884-97. doi:10.1101/gad.1400306.
- Bowen, David, Thomas A. Rocheleau, Michael Blackburn, Olga Andreev, Elena Golubeva, Rohit Bhartia, et Richard H. ffrench-Constant. 1998. «Insecticidal Toxins from the Bacterium *Photorhabdus luminescens* ». *Science* 280 (5372): 2129-32. doi:10.1126/science.280.5372.2129.
- Broadbent, S E, M R Davies, et M W van der Woude. 2010. « Phase variation controls expression of *Salmonella* lipopolysaccharide modification genes by a DNA methylation-dependent mechanism ». *Molecular Microbiology* 77 (2): 337-53. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07203.x.
- Brogden, Kim A. 2005. « Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? ». *Nature Reviews. Microbiology* 3 (3): 238-50. doi:10.1038/nrmicro1098.
- Brozek, K. A., et C. R. Raetz. 1990. "Biosynthesis of Lipid A in Escherichia coli. Acyl Carrier Protein-Dependent Incorporation of Laurate and Myristate". The Journal of Biological Chemistry 265 (26): 15410-17.
- Buelow, Daelynn R., et Tracy L. Raivio. 2010. « Three (and More) Component Regulatory Systems -Auxiliary Regulators of Bacterial Histidine Kinases ». *Molecular Microbiology* 75 (3): 547-66. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06982.x.
- Bulet, P., C. Hetru, J. L. Dimarcq, et D. Hoffmann. 1999. « Antimicrobial Peptides in Insects; Structure and Function ». *Developmental and Comparative Immunology* 23 (4-5): 329-44.
- Bulet, Philippe, et Reto Stöcklin. 2005. « Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation ». *Protein and Peptide Letters* 12 (1): 3-11.
- Casadesús, Josep, et Richard D'Ari. 2002. « Memory in Bacteria and Phage ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 24 (6): 512-18. doi:10.1002/bies.10102.

- Chamnongpol, S, et E A Groisman. 2000. « Acetyl phosphate-dependent activation of a mutant PhoP response regulator that functions independently of its cognate sensor kinase ». *Journal of molecular biology* 300 (2): 291-305. doi:10.1006/jmbi.2000.3848.
- Chang, C, S F Kwok, A B Bleecker, et E M Meyerowitz. 1993. « Arabidopsis Ethylene-Response Gene ETR1: Similarity of Product to Two-Component Regulators ». *Science (New York, N.Y.)* 262 (5133): 539-44.
- Chaston, John M., Garret Suen, Sarah L. Tucker, Aaron W. Andersen, Archna Bhasin, Edna Bode, Helge B. Bode, et al. 2011. « The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes ». *PloS One* 6 (11): e27909. doi:10.1371/journal.pone.0027909.
- Chavez, Carolina Varela, Grégory Jubelin, Gabriel Courties, Aurélie Gomard, Nadège Ginibre, Sylvie Pages, Frédéric Taïeb, et al. 2010. « The cyclomodulin Cif of *Photorhabdus luminescens* inhibits insect cell proliferation and triggers host cell death by apoptosis ». *Microbes and Infection* 12 (14–15): 1208-18. doi:10.1016/j.micinf.2010.09.006.
- Chen, H. Y., S. F. Weng, et J. W. Lin. 2000. « Identification and Analysis of the Sap Genes from Vibrio Fischeri Belonging to the ATP-Binding Cassette Gene Family Required for Peptide Transport and Resistance to Antimicrobial Peptides ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269 (3): 743-48. doi:10.1006/bbrc.1999.1506.
- Christensen, Kenneth A., Jesse T. Myers, et Joel A. Swanson. 2002. « pH-Dependent Regulation of Lysosomal Calcium in Macrophages ». *Journal of Cell Science* 115 (Pt 3): 599-607.
- Ciche, Todd. 2007. « The Biology and Genome of Heterorhabditis Bacteriophora ». *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1-9. doi:10.1895/wormbook.1.135.1.
- Ciche, Todd A., et Jerald C. Ensign. 2003. « For the Insect Pathogen *Photorhabdus luminescens*, Which End of a Nematode Is Out? ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1890-97.
- Ciche, Todd A., Kwi-Suk Kim, Bettina Kaufmann-Daszczuk, Ken C. Q. Nguyen, et David H. Hall. 2008. « Cell Invasion and Matricide during *Photorhabdus luminescens* Transmission by Heterorhabditis Bacteriophora Nematodes ». *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8): 2275-87. doi:10.1128/AEM.02646-07.
- Clarke, David J. 2008. « *Photorhabdus*: A Model for the Analysis of Pathogenicity and Mutualism ». *Cellular Microbiology* 10 (11): 2159-67. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x.
- Clarke, David J. 2014. «The Genetic Basis of the Symbiosis between *Photorhabdus* and Its Invertebrate Hosts ». *Advances in Applied Microbiology* 88: 1-29. doi:10.1016/B978-0-12-800260-5.00001-2.
- Clarke, David J, et Barbara C. A Dowds. 1995. « Virulence Mechanisms of *Photorhabdus* sp. Strain K122 toward Wax Moth Larvae ». *Journal of Invertebrate Pathology* 66 (2): 149-55. doi:10.1006/jipa.1995.1078.
- Clementz, T., J. J. Bednarski, et C. R. Raetz. 1996. «Function of the *htrB* High Temperature Requirement Gene of *Escherchia Coli* in the Acylation of Lipid A: HtrB Catalyzed Incorporation of Laurate ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (20): 12095-102.
- Cohen, Dan. 1966. « Optimizing reproduction in a randomly varying environment ». *Journal of Theoretical Biology* 12 (1): 119-29. doi:10.1016/0022-5193(66)90188-3.
- Coornaert, Audrey, Alisa Lu, Pierre Mandin, Mathias Springer, Susan Gottesman, et Maude Guillier. 2010. « MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress ». *Molecular microbiology* 76 (2): 467-79. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07115.x.
- Costechareyre, Denis, Jean-François Chich, Jean-Marc Strub, Yvan Rahbé, et Guy Condemine. 2013. « Transcriptome of *Dickeya Dadantii* Infecting Acyrthosiphon Pisum Reveals a Strong Defense against Antimicrobial Peptides ». *PloS One* 8 (1): e54118. doi:10.1371/journal.pone.0054118.
- Cota, Ignacio, Anne Béatrice Blanc-Potard, et Josep Casadesús. 2012. « STM2209-STM2208 (opvAB): A Phase Variation Locus of *Salmonella Enterica* Involved in Control of O-Antigen Chain Length ». *PloS One* 7 (5): e36863. doi:10.1371/journal.pone.0036863.

- Crawford, Jason M., Renee Kontnik, et Jon Clardy. 2010. « Regulating Alternative Lifestyles in Entomopathogenic Bacteria ». *Current Biology* 20 (1): 69-74. doi:10.1016/j.cub.2009.10.059.
- Crawford, Jason M., Cyril Portmann, Xu Zhang, Maarten B. J. Roeffaers, et Jon Clardy. 2012. « Small Molecule Perimeter Defense in Entomopathogenic Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (27): 10821-26. doi:10.1073/pnas.1201160109.
- Dalebroux, Zachary D, et Samuel I Miller. 2014. «*Salmonellae* PhoPQ Regulation of the Outer Membrane to Resist Innate Immunity ». *Current Opinion in Microbiology* 17C (février): 106-13. doi:10.1016/j.mib.2013.12.005.
- David, M., M. L. Daveran, J. Batut, A. Dedieu, O. Domergue, J. Ghai, C. Hertig, P. Boistard, et D. Kahn. 1988. « Cascade Regulation of *nif* Gene Expression in *Rhizobium Meliloti* ». *Cell* 54 (5): 671-83.
- De Bolle, X., C. D. Bayliss, D. Field, T. van de Ven, N. J. Saunders, D. W. Hood, et E. R. Moxon. 2000. « The Length of a Tetranucleotide Repeat Tract in *Haemophilus Influenzae* Determines the Phase Variation Rate of a Gene with Homology to Type III DNA Methyltransferases ». *Molecular Microbiology* 35 (1): 211-22.
- Depardieu, Florence, Patrice Courvalin, et Annie Kolb. 2005. « Binding Sites of VanRB and sigma70 RNA Polymerase in the *vanB* Vancomycin Resistance Operon of *Enterococcus Faecium* BM4524 ». *Molecular Microbiology* 57 (2): 550-64. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04706.x.
- Derzelle, Sylviane, Evelyne Turlin, Eric Duchaud, Sylvie Pages, Frank Kunst, Alain Givaudan, et Antoine Danchin. 2004. « The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photorhabdus luminescens* is essential for virulence in insects ». *Journal of bacteriology* 186 (5): 1270-79.
- Dinulos, James G. H., Laurel Mentele, L. Page Fredericks, Beverly A. Dale, et Gary L. Darmstadt. 2003. « Keratinocyte Expression of Human Beta Defensin 2 Following Bacterial Infection: Role in Cutaneous Host Defense ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10 (1): 161-66.
- Djordjevic, Snezana, Paul N. Goudreau, Qingping Xu, Ann M. Stock, et Ann H. West. 1998. « Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (4): 1381-86.
- Dubnau, David, et Richard Losick. 2006. « Bistability in Bacteria ». *Molecular Microbiology* 61 (3): 564-72. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05249.x.
- Duchaud, Eric, Christophe Rusniok, Lionel Frangeul, Carmen Buchrieser, Alain Givaudan, Séad Taourit, Stéphanie Bocs, et al. 2003. « The Genome Sequence of the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens* ». *Nature Biotechnology* 21 (11): 1307-13. doi:10.1038/nbt886.
- Duperthuy, Marylise, Johan Binesse, Frédérique Le Roux, Bernard Romestand, Audrey Caro, Patrice Got, Alain Givaudan, Didier Mazel, Evelyne Bachère, et Delphine Destoumieux-Garzón. 2010. « The Major Outer Membrane Protein OmpU of *Vibrio Splendidus* Contributes to Host Antimicrobial Peptide Resistance and Is Required for Virulence in the Oyster *Crassostrea Gigas* ». *Environmental Microbiology* 12 (4): 951-63. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02138.x.
- Duvic, B., V. Jouan, N. Essa, P.-A. Girard, S. Pagès, Z. Abi Khattar, N.-A. Volkoff, A. Givaudan, D. Destoumieux-Garzon, et J.-M. Escoubas. 2012. « Cecropins as a Marker of Spodoptera Frugiperda Immunosuppression during Entomopathogenic Bacterial Challenge ». Journal of Insect Physiology 58 (6): 881-88. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.04.001.
- Eguchi, Yoko, Eiji Ishii, Kensuke Hata, et Ryutaro Utsumi. 2011. « Regulation of Acid Resistance by Connectors of Two-Component Signal Transduction Systems in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 193 (5): 1222-28. doi:10.1128/JB.01124-10.
- Eguchi, Yoko, Eiji Ishii, Masatake Yamane, et Ryutaro Utsumi. 2012. « The Connector SafA Interacts with the Multi-Sensing Domain of PhoQ in *Escherichia coli* ». *Molecular Microbiology* 85 (2): 299-313. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08114.x.
- Eguchi, Yoko, Junji Itou, Masatake Yamane, Ryo Demizu, Fumiyuki Yamato, Ario Okada, Hirotada Mori, Akinori Kato, et Ryutaro Utsumi. 2007. « B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli* ». *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (47): 18712-17. doi:10.1073/pnas.0705768104.

- Ehlers, R. U. 2003. « Entomopathogenic Nematodes in the European Biocontrol Market ». *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 68 (4 Pt A): 3-16.
- Ellison, Damon W., Matthew B. Lawrenz, et Virginia L. Miller. 2004. « Invasin and beyond: Regulation of *Yersinia* Virulence by RovA ». *Trends in Microbiology* 12 (6): 296-300. doi:10.1016/j.tim.2004.04.006.
- Ernst, Christoph M., Petra Staubitz, Nagendra N. Mishra, Soo-Jin Yang, Gabriele Hornig, Hubert Kalbacher, Arnold S. Bayer, Dirk Kraus, et Andreas Peschel. 2009. « The Bacterial Defensin Resistance Protein MprF Consists of Separable Domains for Lipid Lysinylation and Antimicrobial Peptide Repulsion ». *PLoS Pathogens* 5 (11): e1000660. doi:10.1371/journal.ppat.1000660.
- Fabret, Celine, Victoria A. Feher, et James A. Hoch. 1999. «Two-Component Signal Transduction in *Bacillus subtilis*: How One Organism Sees Its World ». *Journal of Bacteriology* 181 (7): 1975-83.
- Fang, Gang, Diana Munera, David I Friedman, Anjali Mandlik, Michael C Chao, Onureena Banerjee, Zhixing Feng, et al. 2012. « Genome-Wide Mapping of Methylated Adenine Residues in Pathogenic *Escherichia coli* Using Single-Molecule Real-Time Sequencing ». *Nature Biotechnology* 30 (12): 1232-39. doi:10.1038/nbt.2432.
- Farizano, Juan V., María de las Mercedes Pescaretti, Fabián E. López, Fong-Fu Hsu, et Mónica A. Delgado. 2012. « The PmrAB System-Inducing Conditions Control Both Lipid A Remodeling and O-Antigen Length Distribution, Influencing the Salmonella Typhimurium-Host Interactions ». The Journal of Biological Chemistry 287 (46): 38778-89. doi:10.1074/jbc.M112.397414.
- Feng, Xiuhong, Ricardo Oropeza, et Linda J. Kenney. 2003. « Dual Regulation by Phospho-OmpR of ssrA/B Gene Expression in Salmonella Pathogenicity Island 2 ». Molecular Microbiology 48 (4): 1131-43.
- Fernández, Lucía, W. James Gooderham, Manjeet Bains, Joseph B. McPhee, Irith Wiegand, et Robert
 E. W. Hancock. 2010. « Adaptive Resistance to the "Last Hope" Antibiotics Polymyxin B and
 Colistin in *Pseudomonas Aeruginosa* Is Mediated by the Novel Two-Component Regulatory
 System ParR-ParS ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (8): 3372-82.
 doi:10.1128/AAC.00242-10.
- Fernández, Lucía, Håvard Jenssen, Manjeet Bains, Irith Wiegand, W. James Gooderham, et Robert E.
 W. Hancock. 2012. « The Two-Component System CprRS Senses Cationic Peptides and Triggers Adaptive Resistance in Pseudomonas Aeruginosa Independently of ParRS ». Antimicrobial Agents and Chemotherapy 56 (12): 6212-22. doi:10.1128/AAC.01530-12.
- Ferreira, Tiarin, Carol A. van Reenen, Akihito Endo, Patrick Tailliez, Sylvie Pagès, Cathrin Spröer, Antoinette P. Malan, et Leon M. T. Dicks. 2014. « *Photorhabdus Heterorhabditis* Sp. Nov., a Symbiont of the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis Zealandica* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 5): 1540-45. doi:10.1099/ijs.0.059840-0.
- Ferrell, James E. 2002. « Self-Perpetuating States in Signal Transduction: Positive Feedback, Double-Negative Feedback and Bistability ». *Current Opinion in Cell Biology* 14 (2): 140-48.
- Fiedler, U, et V Weiss. 1995. « A Common Switch in Activation of the Response Regulators NtrC and PhoB: Phosphorylation Induces Dimerization of the Receiver Modules ». *The EMBO Journal* 14 (15): 3696-3705.
- Flamez, Claire, Michaël Marceau, Michel Simonet, Sonia Arafah, et Isabelle Ricard. 2007. « Two-Component System Regulon Plasticity in Bacteria: A Concept Emerging from Phenotypic Analysis of *Yersinia Pseudotuberculosis* Response Regulator Mutants ». In *The Genus Yersinia*, édité par Robert D. Perry et Jacqueline D. Fetherston, 145-55. Advances In Experimental

Medicine And Biology 603. Springer New York.

http://link.springer.com.gate1.inist.fr/chapter/10.1007/978-0-387-72124-8_12.

- Flego, D., R. Marits, A. R. Eriksson, V. Kõiv, M. B. Karlsson, R. Heikinheimo, et E. T. Palva. 2000. « A Two-Component Regulatory System, *pehR-pehS*, Controls Endopolygalacturonase Production and Virulence in the Plant Pathogen *Erwinia Carotovora* Subsp. Carotovora ». *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 13 (4): 447-55. doi:10.1094/MPMI.2000.13.4.447.
- Forst, S, B Dowds, N Boemare, et E Stackebrandt. 1997. «*Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Spp.: Bugs That Kill Bugs ». *Annual Review of Microbiology* 51: 47-72. doi:10.1146/annurev.micro.51.1.47.
- Frick, Inga-Maria, Per Akesson, Magnus Rasmussen, Artur Schmidtchen, et Lars Björck. 2003. « SIC, a Secreted Protein of Streptococcus Pyogenes That Inactivates Antibacterial Peptides ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 16561-66. doi:10.1074/jbc.M301995200.
- Galinier, A., A. M. Garnerone, J. M. Reyrat, D. Kahn, J. Batut, et P. Boistard. 1994. « Phosphorylation of the *Rhizobium Meliloti* FixJ Protein Induces Its Binding to a Compound Regulatory Region at the fixK Promoter. » *Journal of Biological Chemistry* 269 (38): 23784-89.
- Ganz, Tomas. 2003. « Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (9): 710-20. doi:10.1038/nri1180.
- Gao, Rong, et Ann M. Stock. 2009. « Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins ». Annual Review of Microbiology 63: 133-54. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073214.
- García-Del Portillo, F., M. G. Pucciarelli, et J. Casadesús. 1999. « DNA Adenine Methylase Mutants of *Salmonella* Typhimurium Show Defects in Protein Secretion, Cell Invasion, and M Cell Cytotoxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20): 11578-83.
- García Véscovi, E, F C Soncini, et E A Groisman. 1996. «Mg2+ as an Extracellular Signal: Environmental Regulation of *Salmonella* Virulence ». *Cell* 84 (1): 165-74.
- Garrett, S, et T J Silhavy. 1987. « Isolation of mutations in the alpha operon of *Escherichia coli* that suppress the transcriptional defect conferred by a mutation in the porin regulatory gene *envZ*. » *Journal of Bacteriology* 169 (4): 1379-85.
- Gaudriault, S., E. Duchaud, A. Lanois, A.-S. Canoy, S. Bourot, R. Derose, F. Kunst, N. Boemare, et A. Givaudan. 2006. « Whole-Genome Comparison between *Photorhabdus* Strains to Identify Genomic Regions Involved in the Specificity of Nematode Interaction ». *Journal of Bacteriology* 188 (2): 809-14. doi:10.1128/JB.188.2.809-814.2006.
- Gefen, Orit, Chana Gabay, Michael Mumcuoglu, Giora Engel, et Nathalie Q Balaban. 2008. « Single-Cell Protein Induction Dynamics Reveals a Period of Vulnerability to Antibiotics in Persister Bacteria ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 (16): 6145-49. doi:10.1073/pnas.0711712105.
- Gerrard, John G., Susan A. Joyce, David J. Clarke, Richard H. ffrench-Constant, Graeme R. Nimmo, David F. M. Looke, Edward J. Feil, Lucy Pearce, et Nick R. Waterfield. 2006. « Nematode Symbiont for *Photorhabdus Asymbiotica* ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (10): 1562-64. doi:10.3201/eid1210.060464.
- Gibbons, H. S., S. Lin, R. J. Cotter, et C. R. Raetz. 2000. « Oxygen Requirement for the Biosynthesis of the S-2-Hydroxymyristate Moiety in *Salmonella* Typhimurium Lipid A. Function of LpxO, A New Fe2+/alpha-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase Homologue ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 32940-49. doi:10.1074/jbc.M005779200.
- Givaudan, A., A. Lanois, et N. Boemare. 1996. « Cloning and Nucleotide Sequence of a Flagellin Encoding Genetic Locus from *Xenorhabdus* Nematophilus: Phase Variation Leads to Differential Transcription of Two Flagellar Genes (*fliCD*) ». *Gene* 183 (1-2): 243-53.
- Gooderham, W James, et Robert E W Hancock. 2009. «Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance by Two-Component Regulatory Systems in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *FEMS Microbiology Reviews* 33 (2): 279-94. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00135.x.

- Gordon, Alasdair J. E., Jennifer A. Halliday, Matthew D. Blankschien, Philip A. Burns, Fumio Yatagai, et Christophe Herman. 2009. « Transcriptional Infidelity Promotes Heritable Phenotypic Change in a Bistable Gene Network ». *PLoS Biology* 7 (2): e44. doi:10.1371/journal.pbio.1000044.
- Grewal, P. S., X. D. Bai, et G. B. Jagdale. 2011. « Longevity and Stress Tolerance of Entomopathogenic Nematodes. » In *Molecular and Physiological Basis of Nematode Survival*, édité par R. N.
 Perry et D. A. Wharton, 157-81. Wallingford: CABI.
 - http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20113096897.
- Groisman, E A. 2001. « The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ ». *Journal of bacteriology* 183 (6): 1835-42. doi:10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001.
- Gross, R., B. Aricò, et R. Rappuoli. 1989. « Families of Bacterial Signal-Transducing Proteins ». *Molecular Microbiology* 3 (11): 1661-67.
- Guina, T., E. C. Yi, H. Wang, M. Hackett, et S. I. Miller. 2000. « A PhoP-Regulated Outer Membrane Protease of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Promotes Resistance to Alpha-Helical Antimicrobial Peptides ». *Journal of Bacteriology* 182 (14): 4077-86.
- Gunn, John S., Sara S. Ryan, Jennifer C. Van Velkinburgh, Robert K. Ernst, et Samuel I. Miller. 2000.
 « Genetic and Functional Analysis of a PmrA-PmrB-Regulated Locus Necessary for Lipopolysaccharide Modification, Antimicrobial Peptide Resistance, and Oral Virulence of Salmonella enterica Serovar Typhimurium ». Infection and Immunity 68 (11): 6139-46.
- Gunn, J. S., E. L. Hohmann, et S. I. Miller. 1996. « Transcriptional Regulation of *Salmonella* Virulence: A PhoQ Periplasmic Domain Mutation Results in Increased Net Phosphotransfer to PhoP ». *Journal of Bacteriology* 178 (21): 6369-73.
- Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, et S. I. Miller. 1998. « PmrA-PmrB-Regulated Genes Necessary for 4-Aminoarabinose Lipid A Modification and Polymyxin Resistance ». *Molecular Microbiology* 27 (6): 1171-82.
- Gunn, J. S., et S. I. Miller. 1996. « PhoP-PhoQ Activates Transcription of *pmrAB*, Encoding a Two-Component Regulatory System Involved in *Salmonella* Typhimurium Antimicrobial Peptide Resistance ». *Journal of Bacteriology* 178 (23): 6857-64.
- Guo, Lin, Kheng B Lim, Cristina M Poduje, Morad Daniel, John S Gunn, Murray Hackett, et Samuel I Miller. 1998. « Lipid A Acylation and Bacterial Resistance against Vertebrate Antimicrobial Peptides ». *Cell* 95 (2): 189-98. doi:10.1016/S0092-8674(00)81750-X.
- Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett, et S. I. Miller. 1997.
 « Regulation of Lipid A Modifications by *Salmonella* Typhimurium Virulence Genes *phoP*-*phoQ* ». *Science (New York, N.Y.)* 276 (5310): 250-53.
- Haine, Eleanor R., Yannick Moret, Michael T. Siva-Jothy, et Jens Rolff. 2008. « Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects ». *Science (New York, N.Y.)* 322 (5905): 1257-59. doi:10.1126/science.1165265.
- Hakenbeck, R., et J. B. Stock. 1996. « Analysis of Two-Component Signal Transduction Systems Involved in Transcriptional Regulation ». *Methods in Enzymology* 273: 281-300.
- Hallet, B., et D. J. Sherratt. 1997. « Transposition and Site-Specific Recombination: Adapting DNA Cutand-Paste Mechanisms to a Variety of Genetic Rearrangements ». *FEMS Microbiology Reviews* 21 (2): 157-78.
- Hancock, R. E., et G. Diamond. 2000. « The Role of Cationic Antimicrobial Peptides in Innate Host Defences ». *Trends in Microbiology* 8 (9): 402-10.
- Han, R., et R. U. Ehlers. 2000. « Pathogenicity, Development, and Reproduction of *Heterorhabditis* Bacteriophora and Steinernema Carpocapsae under Axenic in Vivo Conditions ». Journal of Invertebrate Pathology 75 (1): 55-58. doi:10.1006/jipa.1999.4900.
- Helaine, Sophie, et David W. Holden. 2013. « Heterogeneity of Intracellular Replication of Bacterial Pathogens ». *Current Opinion in Microbiology* 16 (2): 184-91. doi:10.1016/j.mib.2012.12.004.
- Henner, D J, M Yang, et E Ferrari. 1988. « Localization of Bacillus subtilis *sacU*(Hy) mutations to two linked genes with similarities to the conserved procaryotic family of two-component signalling systems. » *Journal of Bacteriology* 170 (11): 5102-9.

- Hernday, Aaron, Bruce Braaten, et David Low. 2004. « The Intricate Workings of a Bacterial Epigenetic Switch ». Advances in Experimental Medicine and Biology 547: 83-89.
- Hernday, Aaron D., Bruce A. Braaten, Gina Broitman-Maduro, Patrick Engelberts, et David A. Low.
 2004. « Regulation of the Pap Epigenetic Switch by CpxAR: Phosphorylated CpxR Inhibits
 Transition to the Phase ON State by Competition with Lrp ». *Molecular Cell* 16 (4): 537-47.
 doi:10.1016/j.molcel.2004.10.020.
- Hernday, Aaron D., Bruce A. Braaten, et David A. Low. 2003. « The Mechanism by Which DNA Adenine Methylase and PapI Activate the Pap Epigenetic Switch ». *Molecular Cell* 12 (4): 947-57.
- Hernday, Aaron, Margareta Krabbe, Bruce Braaten, et David Low. 2002. « Self-Perpetuating Epigenetic Pili Switches in Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 Suppl 4 (décembre): 16470-76. doi:10.1073/pnas.182427199.
- Herrera, Carmen M., Jessica V. Hankins, et M. Stephen Trent. 2010. « Activation of PmrA Inhibits LpxT-Dependent Phosphorylation of Lipid A Promoting Resistance to Antimicrobial Peptides ». *Molecular Microbiology* 76 (6): 1444-60. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07150.x.
- Hess, J. Fred, Kenji Oosawa, Nachum Kaplan, et M. I. Simon. 1988. « Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis ». *Cell* 53 (1): 79-87. doi:10.1016/0092-8674(88)90489-8.
- Hetru, C, J.A Hoffmann, et R.E.W Hancock. 2002. In *Peptide Antibiotics* (Dutton, C.J., Haxell, M.A., McArthur, H.I.I. and Wax, R.G., Eds) pp117-144. Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
- Hochschild, A., et S. L. Dove. 1998. « Protein-Protein Contacts That Activate and Repress Prokaryotic Transcription ». *Cell* 92 (5): 597-600.
- Hoffmann, Jules A., et Jean-Marc Reichhart. 2002. « Drosophila Innate Immunity: An Evolutionary Perspective ». *Nature Immunology* 3 (2): 121-26. doi:10.1038/ni0202-121.
- Honarvar, Shaya, Byung-Kwon Choi, et Dieter M. Schifferli. 2003. « Phase Variation of the 987P-like CS18 Fimbriae of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Is Regulated by Site-Specific Recombinases ». *Molecular Microbiology* 48 (1): 157-71.
- Hui, Chang-Ye, Yan Guo, Qiu-Shan He, Liang Peng, Shu-Chi Wu, Hong Cao, et Sheng-He Huang. 2010.
 « Escherichia coli Outer Membrane Protease OmpT Confers Resistance to Urinary Cationic Peptides ». *Microbiology and Immunology* 54 (8): 452-59. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00238.x.
- Hu, K., et J. M. Webster. 2000. « Antibiotic Production in Relation to Bacterial Growth and Nematode Development in *Photorhabdus--Heterorhabditis* Infected *Galleria Mellonella* Larvae ». *FEMS Microbiology Letters* 189 (2): 219-23.
- Hulett, F. M. 1996. « The Signal-Transduction Network for Pho Regulation in *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 19 (5): 933-39.
- Hwang, Jae-Sam, Juneyoung Lee, Yeon-Ju Kim, Hea-Son Bang, Eun-Young Yun, Seong-Ryul Kim, Hwa-Jin Suh, et al. 2009. « Isolation and Characterization of a Defensin-Like Peptide (Coprisin) from the Dung Beetle, *Copris Tripartitus* ». *International Journal of Peptides* 2009 (octobre): e136284. doi:10.1155/2009/136284.
- Islam, D., L. Bandholtz, J. Nilsson, H. Wigzell, B. Christensson, B. Agerberth, et G. Gudmundsson. 2001. « Downregulation of Bactericidal Peptides in Enteric Infections: A Novel Immune Escape Mechanism with Bacterial DNA as a Potential Regulator ». *Nature Medicine* 7 (2): 180-85. doi:10.1038/84627.
- Island, M D, B Y Wei, et R J Kadner. 1992. « Structure and function of the uhp genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. » *Journal of Bacteriology* 174 (9): 2754-62.
- Jean-François, Frantz, Juan Elezgaray, Pascal Berson, Pierre Vacher, et Erick J. Dufourc. 2008. « Pore Formation Induced by an Antimicrobial Peptide: Electrostatic Effects ». *Biophysical Journal* 95 (12): 5748-56. doi:10.1529/biophysj.108.136655.

- Jia, Wenyi, Ahmed El Zoeiby, Tania N. Petruzziello, Bamini Jayabalasingham, Seyedreza Seyedirashti, et Russell E. Bishop. 2004. « Lipid Trafficking Controls Endotoxin Acylation in Outer Membranes of *Escherichia coli* ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (43): 44966-75. doi:10.1074/jbc.M404963200.
- Jin, Tao, Maria Bokarewa, Timothy Foster, Jennifer Mitchell, Judy Higgins, et Andrej Tarkowski. 2004. « *Staphylococcus Aureus* Resists Human Defensins by Production of Staphylokinase, a Novel Bacterial Evasion Mechanism ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (2): 1169-76.
- Johnigk, S.-A., F. Ecke, M. Poehling, et R.-U. Ehlers. 2004. « Liquid Culture Mass Production of Biocontrol Nematodes, *Heterorhabditis Bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): Improved Timing of Dauer Juvenile Inoculation ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (5): 651-58. doi:10.1007/s00253-003-1519-9.
- Johnson, A. D., A. R. Poteete, G. Lauer, R. T. Sauer, G. K. Ackers, et M. Ptashne. 1981. « Lambda Repressor and Cro--Components of an Efficient Molecular Switch ». *Nature* 294 (5838): 217-23.
- Joyce, Susan A., Alexander O. Brachmann, Itamar Glazer, Lea Lango, Gertrud Schwär, David J. Clarke, et Helge B. Bode. 2008. « Bacterial Biosynthesis of a Multipotent Stilbene ». *Angewandte Chemie International Edition* 47 (10): 1942-45. doi:10.1002/anie.200705148.
- Jubelin, Grégory, Carolina Varela Chavez, Frédéric Taieb, Mark J. Banfield, Ascel Samba-Louaka, Rika Nobe, Jean-Philippe Nougayrède, et al. 2009. « Cycle Inhibiting Factors (CIFs) Are a Growing Family of Functional Cyclomodulins Present in Invertebrate and Mammal Bacterial Pathogens ». *PLoS ONE* 4 (3): e4855. doi:10.1371/journal.pone.0004855.
- Jubelin, Grégory, Anne Lanois, Dany Severac, Stéphanie Rialle, Cyrille Longin, Sophie Gaudriault, et Alain Givaudan. 2013. « FliZ Is a Global Regulatory Protein Affecting the Expression of Flagellar and Virulence Genes in Individual *Xenorhabdus Nematophila* Bacterial Cells ». *PLoS Genetics* 9 (10): e1003915. doi:10.1371/journal.pgen.1003915.
- Kato, Akinori, H Deborah Chen, Tammy Latifi, et Eduardo A Groisman. 2012. « Reciprocal control between a bacterium's regulatory system and the modification status of its lipopolysaccharide ». *Molecular cell* 47 (6): 897-908. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.017.
- Kato, Akinori, et Eduardo A Groisman. 2004. « Connecting Two-Component Regulatory Systems by a Protein That Protects a Response Regulator from Dephosphorylation by Its Cognate Sensor ». *Genes & Development* 18 (18): 2302-13. doi:10.1101/gad.1230804.
- Kato, Akinori, Tammy Latifi, et Eduardo A. Groisman. 2003. « Closing the Loop: The PmrA/PmrB Two-Component System Negatively Controls Expression of Its Posttranscriptional Activator PmrD ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (8): 4706-11. doi:10.1073/pnas.0836837100.
- Kato, A., H. Tanabe, et R. Utsumi. 1999. « Molecular Characterization of the PhoP-PhoQ Two-Component System in *Escherichia coli* K-12: Identification of Extracellular Mg2+-Responsive Promoters ». *Journal of Bacteriology* 181 (17): 5516-20.
- Kawasaki, Kiyoshi, Kotaro China, et Masahiro Nishijima. 2007. « Release of the Lipopolysaccharide Deacylase PagL from Latency Compensates for a Lack of Lipopolysaccharide Aminoarabinose Modification-Dependent Resistance to the Antimicrobial Peptide Polymyxin B in *Salmonella Enterica* ». *Journal of Bacteriology* 189 (13): 4911-19. doi:10.1128/JB.00451-07.
- Kawasaki, Kiyoshi, Robert K. Ernst, et Samuel I. Miller. 2004. « Deacylation and Palmitoylation of Lipid A by Salmonellae Outer Membrane Enzymes Modulate Host Signaling through Toll-like Receptor 4 ». Journal of Endotoxin Research 10 (6): 439-44. doi:10.1179/096805104225006264.
- Kearns, Daniel B., et Richard Losick. 2005. « Cell Population Heterogeneity during Growth of *Bacillus Subtilis* ». *Genes & Development* 19 (24): 3083-94. doi:10.1101/gad.1373905.

- Keren, Iris, Devang Shah, Amy Spoering, Niilo Kaldalu, et Kim Lewis. 2004. « Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 186 (24): 8172-80. doi:10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004.
- Kier, L. D., R. M. Weppelman, et B. N. Ames. 1979. « Regulation of Nonspecific Acid Phosphatase in *Salmonella: phoN* and *phoP* Genes ». *Journal of Bacteriology* 138 (1): 155-61.
- Kim, Chul, Justin Spano, Eun-Kyung Park, et Sungsool Wi. 2009. « Evidence of Pores and Thinned Lipid Bilayers Induced in Oriented Lipid Membranes Interacting with the Antimicrobial Peptides, Magainin-2 and Aurein-3.3 ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1788 (7): 1482-96. doi:10.1016/j.bbamem.2009.04.017.
- Komano, T. 1999. « Shufflons: Multiple Inversion Systems and Integrons ». *Annual Review of Genetics* 33: 171-91. doi:10.1146/annurev.genet.33.1.171.
- Kong, Wei, Natasha Weatherspoon, et Yixin Shi. 2008. « Molecular Mechanism for Establishment of Signal-Dependent Regulation in the PhoP/PhoQ System ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (24): 16612-21. doi:10.1074/jbc.M800547200.
- Koprivnjak, Tomaz, et Andreas Peschel. 2011. « Bacterial Resistance Mechanisms against Host Defense Peptides ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (13): 2243-54. doi:10.1007/s00018-011-0716-4.
- Koprivnjak, Tomaz, Andreas Peschel, Michael H. Gelb, Ning S. Liang, et Jerrold P. Weiss. 2002. « Role of Charge Properties of Bacterial Envelope in Bactericidal Action of Human Group IIA Phospholipase A2 against Staphylococcus Aureus ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (49): 47636-44. doi:10.1074/jbc.M205104200.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, et K. M. Peterson. 1995.
 « Four New Derivatives of the Broad-Host-Range Cloning Vector pBBR1MCS, Carrying Different Antibiotic-Resistance Cassettes ». *Gene* 166 (1): 175-76.
- Kox, L. F., M. M. Wösten, et E. A. Groisman. 2000. « A Small Protein That Mediates the Activation of a Two-Component System by Another Two-Component System ». *The EMBO Journal* 19 (8): 1861-72. doi:10.1093/emboj/19.8.1861.
- Kroger, Carsten, Shane C. Dillon, Andrew D. S. Cameron, Kai Papenfort, Sathesh K. Sivasankaran, Karsten Hokamp, Yanjie Chao, et al. 2012. « The transcriptional landscape and small RNAs of Salmonella enterica serovar Typhimurium ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109 (20): E1277-86. doi:10.1073/pnas.1201061109.
- Kumar, Ashok, Brenda Grimes, Nobuyuki Fujita, Kozo Makino, Richard A. Malloch, Richard S. Hayward, et Akira Ishihama. 1994. « Role of the Sigma70 Subunit of *Escherichia coli* RNA Polymerase in Transcription Activation ». *Journal of Molecular Biology* 235 (2): 405-13. doi:10.1006/jmbi.1994.1001.
- Kustu, S, A K North, et D S Weiss. 1991. « Prokaryotic Transcriptional Enhancers and Enhancer-Binding Proteins ». *Trends in Biochemical Sciences* 16 (11): 397-402.
- Kustu, S, E Santero, J Keener, D Popham, et D Weiss. 1989. « Expression of sigma 54 (ntrA)dependent genes is probably united by a common mechanism. » *Microbiological Reviews* 53 (3): 367-76.
- Lango-Scholey, Lea, Alexander O. Brachmann, Helge B. Bode, et David J. Clarke. 2013. « The Expression of *stlA* in *Photorhabdus luminescens* Is Controlled by Nutrient Limitation ». *PloS One* 8 (11): e82152. doi:10.1371/journal.pone.0082152.
- Lau, P C, Y Wang, A Patel, D Labbé, H Bergeron, R Brousseau, Y Konishi, et M Rawlings. 1997. « A Bacterial Basic Region Leucine Zipper Histidine Kinase Regulating Toluene Degradation ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 (4): 1453-58.
- Laurent, M., G. Charvin, et J. Guespin-Michel. 2005. «Bistability and Hysteresis in Epigenetic Regulation of the Lactose Operon. Since Delbrück, a Long Series of Ignored Models ». *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 51 (7): 583-94.

- Lee, A. K., C. S. Detweiler, et S. Falkow. 2000. « OmpR Regulates the Two-Component System SsrAssrB in *Salmonella* Pathogenicity Island 2 ». *Journal of Bacteriology* 182 (3): 771-81.
- Lee, Hyunwoo, Fong-Fu Hsu, John Turk, et Eduardo A. Groisman. 2004. « The PmrA-Regulated *pmrC* Gene Mediates Phosphoethanolamine Modification of Lipid A and Polymyxin Resistance in *Salmonella* Enterica ». *Journal of Bacteriology* 186 (13): 4124-33. doi:10.1128/JB.186.13.4124-4133.2004.
- Levin, Bruce R., et Daniel E. Rozen. 2006. « Non-Inherited Antibiotic Resistance ». *Nature Reviews. Microbiology* 4 (7): 556-62. doi:10.1038/nrmicro1445.
- Levinson, G., et G. A. Gutman. 1987. « Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution ». *Molecular Biology and Evolution* 4 (3): 203-21.
- Levy, S. B. 2002. « Active Efflux, a Common Mechanism for Biocide and Antibiotic Resistance ». *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, n° 31: 655 - 71S.
- Lewis, Kim. 2007. « Persister Cells, Dormancy and Infectious Disease ». *Nature Reviews. Microbiology* 5 (1): 48-56. doi:10.1038/nrmicro1557.
- Li, J., G. Chen, H. Wu, et J. M. Webster. 1995. « Identification of Two Pigments and a Hydroxystilbene Antibiotic from *Photorhabdus luminescens* ». *Applied and Environmental Microbiology* 61 (12): 4329-33.
- Li, Min, David J. Cha, Yuping Lai, Amer E. Villaruz, Daniel E. Sturdevant, et Michael Otto. 2007. « The Antimicrobial Peptide-Sensing System Aps of *Staphylococcus Aureus* ». *Molecular Microbiology* 66 (5): 1136-47. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05986.x.
- Lippa, Andrew M., et Mark Goulian. 2009. « Feedback Inhibition in the PhoQ/PhoP Signaling System by a Membrane Peptide ». *PLoS Genetics* 5 (12). doi:10.1371/journal.pgen.1000788.
- Li, Xin, C. Virginia Lockatell, David E. Johnson, et Harry L. T. Mobley. 2002. « Identification of MrpI as the Sole Recombinase That Regulates the Phase Variation of MR/P Fimbria, a Bladder Colonization Factor of Uropathogenic Proteus Mirabilis ». *Molecular Microbiology* 45 (3): 865-74.
- Li, Yanmei, Qi Xiang, Qihao Zhang, Yadong Huang, et Zhijian Su. 2012. « Overview on the Recent Study of Antimicrobial Peptides: Origins, Functions, Relative Mechanisms and Application ». *Peptides* 37 (2): 207-15. doi:10.1016/j.peptides.2012.07.001.
- Li, Yingli, He Gao, Long Qin, Bei Li, Yanping Han, Zhaobiao Guo, Yajun Song, et al. 2008. « Identification and Characterization of PhoP Regulon Members in *Yersinia Pestis* Biovar Microtus ». *BMC Genomics* 9: 143. doi:10.1186/1471-2164-9-143.
- Llama-Palacios, Arancha, Emilia López-Solanilla, César Poza-Carrión, Francisco García-Olmedo, et Pablo Rodríguez-Palenzuela. 2003. « The *Erwinia Chrysanthemi* phoP-phoQ Operon Plays an Important Role in Growth at Low pH, Virulence and Bacterial Survival in Plant Tissue ». *Molecular Microbiology* 49 (2): 347-57.
- Llobet, Enrique, Catalina March, Paloma Giménez, et José A. Bengoechea. 2009. «*Klebsiella Pneumoniae* OmpA Confers Resistance to Antimicrobial Peptides ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (1): 298-302. doi:10.1128/AAC.00657-08.
- Lois, A F, G S Ditta, et D R Helinski. 1993. «The Oxygen Sensor FixL of *Rhizobium Meliloti* Is a Membrane Protein Containing Four Possible Transmembrane Segments ». *Journal of Bacteriology* 175 (4): 1103-9.
- López-Solanilla, E., F. García-Olmedo, et P. Rodríguez-Palenzuela. 1998. « Inactivation of the *sapA* to *sapF* Locus of *Erwinia Chrysanthemi* Reveals Common Features in Plant and Animal Bacterial Pathogenesis ». *The Plant Cell* 10 (6): 917-24.
- Lukat, G S, W R McCleary, A M Stock, et J B Stock. 1992. «Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (2): 718-22.
- MacFarlane, S A, et M Merrick. 1985. « The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. » *Nucleic Acids Research* 13 (21): 7591-7606.

- Maeda, T, S M Wurgler-Murphy, et H Saito. 1994. « A Two-Component System That Regulates an Osmosensing MAP Kinase Cascade in Yeast ». *Nature* 369 (6477): 242-45. doi:10.1038/369242a0.
- Makino, K., M. Amemura, S. K. Kim, A. Nakata, et H. Shinagawa. 1993. « Role of the Sigma 70 Subunit of RNA Polymerase in Transcriptional Activation by Activator Protein PhoB in *Escherichia coli*. » *Genes & Development* 7 (1): 149-60. doi:10.1101/gad.7.1.149.
- Martin-Orozco, Natalia, Nicolas Touret, Michael L. Zaharik, Edwin Park, Raoul Kopelman, Samuel Miller, B. Brett Finlay, Philippe Gros, et Sergio Grinstein. 2006. « Visualization of Vacuolar Acidification-Induced Transcription of Genes of Pathogens inside Macrophages ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (1): 498-510. doi:10.1091/mbc.E04-12-1096.
- Martin, P., T. van de Ven, N. Mouchel, A. C. Jeffries, D. W. Hood, et E. R. Moxon. 2003. « Experimentally Revised Repertoire of Putative Contingency Loci in *Neisseria Meningitidis* Strain MC58: Evidence for a Novel Mechanism of Phase Variation ». *Molecular Microbiology* 50 (1): 245-57.
- Mathur, Jyoti, et Matthew K. Waldor. 2004. « The *Vibrio Cholerae* ToxR-Regulated Porin OmpU Confers Resistance to Antimicrobial Peptides ». *Infection and Immunity* 72 (6): 3577-83. doi:10.1128/IAI.72.6.3577-3583.2004.
- Matsuyama, S, et S Mizushima. 1987. « Novel *rpoA* Mutation That Interferes with the Function of OmpR and EnvZ, Positive Regulators of the *ompF* and *ompC* Genes That Code for Outer-Membrane Proteins in *Escherichia coli* K12 ». *Journal of Molecular Biology* 195 (4): 847-53.
- McCleary, W. R. 1996. « The Activation of PhoB by Acetylphosphate ». *Molecular Microbiology* 20 (6): 1155-63. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02636.x.
- McPhee, Joseph B., Shawn Lewenza, et Robert E. W. Hancock. 2003. « Cationic Antimicrobial Peptides Activate a Two-Component Regulatory System, PmrA-PmrB, That Regulates Resistance to Polymyxin B and Cationic Antimicrobial Peptides in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Molecular Microbiology* 50 (1): 205-17.
- Meehl, Michael, Silvia Herbert, Friedrich Götz, et Ambrose Cheung. 2007. « Interaction of the GraRS Two-Component System with the VraFG ABC Transporter to Support Vancomycin-Intermediate Resistance in *Staphylococcus Aureus* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (8): 2679-89. doi:10.1128/AAC.00209-07.
- Mehr, I. J., et H. S. Seifert. 1998. « Differential Roles of Homologous Recombination Pathways in Neisseria Gonorrhoeae Pilin Antigenic Variation, DNA Transformation and DNA Repair ». Molecular Microbiology 30 (4): 697-710.
- Mihajlovic, Maja, et Themis Lazaridis. 2010. « Antimicrobial Peptides Bind More Strongly to Membrane Pores ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1798 (8): 1494-1502. doi:10.1016/j.bbamem.2010.02.023.
- Miller, S I, A M Kukral, et J J Mekalanos. 1989. « A Two-Component Regulatory System (*phoP phoQ*) Controls Salmonella Typhimurium Virulence ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86 (13): 5054-58.
- Miller, S. I., et J. J. Mekalanos. 1990. « Constitutive Expression of the *phoP* Regulon Attenuates *Salmonella* Virulence and Survival within Macrophages ». *Journal of Bacteriology* 172 (5): 2485-90.
- Mizuno, Takeshi. 1997. « Compilation of All Genes Encoding Two-Component Phosphotransfer Signal Transducers in the Genome of *Escherichia coli* ». *DNA Research* 4 (2): 161-68. doi:10.1093/dnares/4.2.161.
- Mizuno, Takeshi, Takakazu Kaneko, et Satoshi Tabata. 1996. « Compilation of All Genes Encoding Bacterial Two-Component Signal Transducers in the Genome of the Cyanobacterium, *Synechocystis* Sp. Strain PCC 6803 ». *DNA Research* 3 (6): 407-14. doi:10.1093/dnares/3.6.407.

- Moon, Kyung, et Susan Gottesman. 2009. « A PhoQ/P-Regulated small RNA Regulates Sensitivity of *Escherichia coli* to Antimicrobial Peptides ». *Molecular microbiology* 74 (6): 1314-30. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06944.x.
- Morett, E, et L Segovia. 1993. « The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. » *Journal of Bacteriology* 175 (19): 6067-74.
- Mouammine, A., Lanois A., Pagès S., Lafay B., Molle V., Canova M., Girard PA., Duvic B., Givaudan A. et Gaudriault S., 2014. « Ail and PagC-related proteins in the entomopathogenic bacteria of *Photorhabdus* genus ». *PLoS ONE*.
- Mouslim, Chakib, et Eduardo A. Groisman. 2003. « Control of the *Salmonella Ugd* Gene by Three Two-Component Regulatory Systems ». *Molecular Microbiology* 47 (2): 335-44.
- Moyed, H. S., et K. P. Bertrand. 1983. « *hipA*, a Newly Recognized Gene of *Escherichia coli* K-12 That Affects Frequency of Persistence after Inhibition of Murein Synthesis ». *Journal of Bacteriology* 155 (2): 768-75.
- Moyed, H. S., et S. H. Broderick. 1986. « Molecular Cloning and Expression of hipA, a Gene of *Escherichia coli* K-12 That Affects Frequency of Persistence after Inhibition of Murein Synthesis ». *Journal of Bacteriology* 166 (2): 399-403.
- Msadek, T, F Kunst, D Henner, A Klier, G Rapoport, et R Dedonder. 1990. « Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. » *Journal of Bacteriology* 172 (2): 824-34.
- Munsky, B., et M. Khammash. 2010. « Identification from Stochastic Cell-to-Cell Variation: A Genetic Switch Case Study ». *IET Systems Biology* 4 (6): 356-66. doi:10.1049/iet-syb.2010.0013.
- Murata, Takeshi, Will Tseng, Tina Guina, Samuel I. Miller, et Hiroshi Nikaido. 2007. « PhoPQ-Mediated Regulation Produces a More Robust Permeability Barrier in the Outer Membrane of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium ». *Journal of Bacteriology* 189 (20): 7213-22. doi:10.1128/JB.00973-07.
- Mutoh, N., et M. I. Simon. 1986. « Nucleotide Sequence Corresponding to Five Chemotaxis Genes in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 165 (1): 161-66.
- Nagahashi, Shigehisa, Toshiyuki Mio, Naomi Ono, Toshiko Yamada-Okabe, Mikio Arisawa, Howard Bussey, et Hisafumi Yamada-Okabe. 1998. « Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the Genes for Osmosensing Histidine Kinase Homologues, from the Pathogenic Fungus *Candida Albicans* ». *Microbiology* 144 (2): 425-32. doi:10.1099/00221287-144-2-425.
- Nagakubo, Satoshi, Kunihiko Nishino, Takahiro Hirata, et Akihito Yamaguchi. 2002. « The Putative Response Regulator BaeR Stimulates Multidrug Resistance of *Escherichia coli* via a Novel Multidrug Exporter System, MdtABC ». *Journal of Bacteriology* 184 (15): 4161-67.
- Navarre, William Wiley, Thomas A Halsey, Don Walthers, Jonathan Frye, Michael McClelland, Jennifer L Potter, Linda J Kenney, John S Gunn, Ferric C Fang, et Stephen J Libby. 2005. « Co-Regulation of *Salmonella* Enterica Genes Required for Virulence and Resistance to Antimicrobial Peptides by SlyA and PhoP/PhoQ ». *Molecular Microbiology* 56 (2): 492-508. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04553.x.
- Nguyen, Leonard T, Evan F Haney, et Hans J Vogel. 2011. « The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action ». *Trends in Biotechnology* 29 (9): 464-72. doi:10.1016/j.tibtech.2011.05.001.
- Nielsen-LeRoux, Christina, Sophie Gaudriault, Nalini Ramarao, Didier Lereclus, et Alain Givaudan. 2012. « How the Insect Pathogen Bacteria *Bacillus Thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* Occupy Their Hosts ». *Current Opinion in Microbiology* 15 (3): 220-31. doi:10.1016/j.mib.2012.04.006.
- Nikaido, Hiroshi, et Yumiko Takatsuka. 2009. « Mechanisms of RND Multidrug Efflux Pumps ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1794 (5): 769-81. doi:10.1016/j.bbapap.2008.10.004.

- Ninfa, E G, M R Atkinson, E S Kamberov, et A J Ninfa. 1993. « Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. » *Journal of Bacteriology* 175 (21): 7024-32.
- Nishino, Kunihiko, Eiji Nikaido, et Akihito Yamaguchi. 2007. « Regulation of Multidrug Efflux Systems Involved in Multidrug and Metal Resistance of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium ». *Journal of Bacteriology* 189 (24): 9066-75. doi:10.1128/JB.01045-07.
- Nishio, Miki, Nobuhiko Okada, Tsuyoshi Miki, Takeshi Haneda, et Hirofumi Danbara. 2005. « Identification of the Outer-Membrane Protein PagC Required for the Serum Resistance Phenotype in *Salmonella Enterica* Serovar Choleraesuis ». *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 3): 863-73. doi:10.1099/mic.0.27654-0.
- Nizet, Victor. 2006. « Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Human Bacterial Pathogens ». *Current Issues in Molecular Biology* 8 (1): 11-26.
- Nou, X., B. Braaten, L. Kaltenbach, et D. A. Low. 1995. « Differential Binding of Lrp to Two Sets of Pap DNA Binding Sites Mediated by Pap I Regulates Pap Phase Variation in *Escherichia coli* ». *The EMBO Journal* 14 (23): 5785-97.
- Novick, A., et M. Weiner. 1957. « ENZYME INDUCTION AS AN ALL-OR-NONE PHENOMENON ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 43 (7): 553-66.
- Nuss, Aaron M., Franziska Schuster, Ann Kathrin Heroven, Wiebke Heine, Fabio Pisano, et Petra Dersch. 2014. « A Direct Link between the Global Regulator PhoP and the Csr Regulon in Y. *Pseudotuberculosis* through the Small Regulatory RNA CsrC ». *RNA Biology* 11 (5).
- Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon, et E. A. Groisman. 1996. « Identification of a Pathogenicity Island Required for *Salmonella* Survival in Host Cells ». *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America 93 (15): 7800-7804.
- Osuna, J., X. Soberon, et E. Morett. 1997. « A proposed architecture for the central domain of the bacterial enhancer-binding proteins based on secondary structure prediction and fold recognition. » *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 6 (3): 543-55.
- Otvos, L. 2002. « The Short Proline-Rich Antibacterial Peptide Family ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 59 (7): 1138-50.
- Owen, P., M. Meehan, H. de Loughry-Doherty, et I. Henderson. 1996. « Phase-Variable Outer Membrane Proteins in *Escherichia coli* ». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 16 (2): 63-76.
- Oyston, P. C., N. Dorrell, K. Williams, S. R. Li, M. Green, R. W. Titball, et B. W. Wren. 2000. « The Response Regulator PhoP Is Important for Survival under Conditions of Macrophage-Induced Stress and Virulence in *Yersinia Pestis* ». *Infection and Immunity* 68 (6): 3419-25.
- Pan, S Q, T Charles, S Jin, Z L Wu, et E W Nester. 1993. « Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant--*Agrobacterium* signal transduction. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (21): 9939-43.
- Parkinson, J S, et E C Kofoid. 1992. « Communication Modules in Bacterial Signaling Proteins ». Annual Review of Genetics 26 (1): 71-112. doi:10.1146/annurev.ge.26.120192.000443.
- Park, P. W., G. B. Pier, M. J. Preston, O. Goldberger, M. L. Fitzgerald, et M. Bernfield. 2000.
 « Syndecan-1 Shedding Is Enhanced by LasA, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas* Aeruginosa ». The Journal of Biological Chemistry 275 (5): 3057-64.
- Park, Sun-Yang, et Eduardo A. Groisman. 2013. « Signal-Specific Temporal Response by the Salmonella PhoP/PhoQ Regulatory System ». Molecular Microbiology, n/a - n/a. doi:10.1111/mmi.12449.
- Parra-Lopez, C., R. Lin, A. Aspedon, et E. A. Groisman. 1994. « A Salmonella Protein That Is Required for Resistance to Antimicrobial Peptides and Transport of Potassium ». The EMBO Journal 13 (17): 3964-72.
- Paulsson, Johan. 2004. « Summing up the Noise in Gene Networks ». *Nature* 427 (6973): 415-18. doi:10.1038/nature02257.

- Perez, J. Christian, et Eduardo A. Groisman. 2009. « Transcription Factor Function and Promoter Architecture Govern the Evolution of Bacterial Regulons ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106 (11): 4319-24. doi:10.1073/pnas.0810343106.
- Perez, J Christian, Tammy Latifi, et Eduardo A Groisman. 2008. « Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in Salmonella enterica ». The Journal of biological chemistry 283 (16): 10773-83. doi:10.1074/jbc.M709843200.
- Perez, J. Christian, Dongwoo Shin, Igor Zwir, Tammy Latifi, Tricia J. Hadley, et Eduardo A. Groisman. 2009. « Evolution of a Bacterial Regulon Controlling Virulence and Mg(2+) Homeostasis ». *PLoS Genetics* 5 (3): e1000428. doi:10.1371/journal.pgen.1000428.
- Peschel, A., R. W. Jack, M. Otto, L. V. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, H. Kalbacher, et al. 2001. « *Staphylococcus Aureus* Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing via the Novel Virulence Factor MprF Is Based on Modification of Membrane Lipids with L-Lysine ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (9): 1067-76.
- Piers, K. L., et R. E. Hancock. 1994. « The Interaction of a Recombinant Cecropin/melittin Hybrid Peptide with the Outer Membrane of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Molecular Microbiology* 12 (6): 951-58.
- Podgornaia, Anna I, et Michael T Laub. 2013. « Determinants of specificity in two-component signal transduction ». *Current opinion in microbiology*, janvier. doi:10.1016/j.mib.2013.01.004.
- Posas, Francesc, Susannah M Wurgler-Murphy, Tatsuya Maeda, Elizabeth A Witten, Tran Cam Thai, et Haruo Saito. 1996. « Yeast HOG1 MAP Kinase Cascade Is Regulated by a Multistep Phosphorelay Mechanism in the SLN1–YPD1–SSK1 "Two-Component" Osmosensor ». *Cell* 86 (6): 865-75. doi:10.1016/S0092-8674(00)80162-2.
- Posas, F, et H Saito. 1998. « Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 twocomponent response regulator. » *The EMBO Journal* 17 (5): 1385-94. doi:10.1093/emboj/17.5.1385.
- Preston, Andrew, Elizabeth Maxim, Elinor Toland, E. Jane Pishko, Eric T. Harvill, Martine Caroff, et Duncan J. Maskell. 2003. « *Bordetella Bronchiseptica* PagP Is a Bvg-Regulated Lipid A Palmitoyl Transferase That Is Required for Persistent Colonization of the Mouse Respiratory Tract ». *Molecular Microbiology* 48 (3): 725-36.
- Raetz, Christian R. H., C. Michael Reynolds, M. Stephen Trent, et Russell E. Bishop. 2007. « Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria ». *Annual Review of Biochemistry* 76: 295-329. doi:10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803.
- Raetz, C. R., et W. Dowhan. 1990. « Biosynthesis and Function of Phospholipids in *Escherichia coli* ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (3): 1235-38.
- Raivio, Tracy L. 2005. « Envelope Stress Responses and Gram-Negative Bacterial Pathogenesis ». *Molecular Microbiology* 56 (5): 1119-28. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04625.x.
- Rebeil, Roberto, Robert K. Ernst, Brian B. Gowen, Samuel I. Miller, et B. Joseph Hinnebusch. 2004.
 « Variation in Lipid A Structure in the Pathogenic Yersiniae ». Molecular Microbiology 52 (5): 1363-73. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04059.x.
- Reinés, Mar, Enrique Llobet, Käthe M. Dahlström, Camino Pérez-Gutiérrez, Catalina M. Llompart, Nuria Torrecabota, Tiina A. Salminen, et José A. Bengoechea. 2012. « Deciphering the Acylation Pattern of *Yersinia Enterocolitica* Lipid A ». *PLoS Pathogens* 8 (10): e1002978. doi:10.1371/journal.ppat.1002978.
- Reinhart, R. A. 1988. « Magnesium Metabolism. A Review with Special Reference to the Relationship between Intracellular Content and Serum Levels ». *Archives of Internal Medicine* 148 (11): 2415-20.
- Reynolds, C. Michael, Anthony A. Ribeiro, Sara C. McGrath, Robert J. Cotter, Christian R. H. Raetz, et M. Stephen Trent. 2006. « An Outer Membrane Enzyme Encoded by *Salmonella*

Typhimurium lpxR That Removes the 3'-Acyloxyacyl Moiety of Lipid A ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (31): 21974-87. doi:10.1074/jbc.M603527200.

- Richardson, W. H., T. M. Schmidt, et K. H. Nealson. 1988. « Identification of an Anthraquinone Pigment and a Hydroxystilbene Antibiotic from *Xenorhabdus Luminescens* ». *Applied and Environmental Microbiology* 54 (6): 1602-5.
- Ringquist, S., et C. L. Smith. 1992. «The *Escherichia coli* Chromosome Contains Specific, Unmethylated Dam and Dcm Sites ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (10): 4539-43.
- Ritz, D., J. Lim, C. M. Reynolds, L. B. Poole, et J. Beckwith. 2001. « Conversion of a Peroxiredoxin into a Disulfide Reductase by a Triplet Repeat Expansion ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5540): 158-60. doi:10.1126/science.1063143.
- Robey, M., W. O'Connell, et N. P. Cianciotto. 2001. « Identification of *Legionella Pneumophila* Rcp, a *pagP*-like Gene That Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and Promotes Intracellular Infection ». *Infection and Immunity* 69 (7): 4276-86. doi:10.1128/IAI.69.7.4276-4286.2001.
- Russo, F. D., et T. J. Silhavy. 1991. « EnvZ Controls the Concentration of Phosphorylated OmpR to Mediate Osmoregulation of the Porin Genes ». *Journal of Molecular Biology* 222 (3): 567-80.
- Sanowar, Sarah, Alexandre Martel, et Hervé Le Moual. 2003. « Mutational analysis of the residue at position 48 in the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium PhoQ sensor kinase ». *Journal of bacteriology* 185 (6): 1935-41.
- Satory, Dominik, Alasdair J. E. Gordon, Jennifer A. Halliday, et Christophe Herman. 2011. « Epigenetic Switches: Can Infidelity Govern Fate in Microbes? ». *Current Opinion in Microbiology* 14 (2): 212-17. doi:10.1016/j.mib.2010.12.004.
- Schittek, B., R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, et al. 2001. « Dermcidin: A Novel Human Antibiotic Peptide Secreted by Sweat Glands ». *Nature Immunology* 2 (12): 1133-37. doi:10.1038/ni732.
- Schmidtchen, A., I. M. Frick, et L. Björck. 2001. « Dermatan Sulphate Is Released by Proteinases of Common Pathogenic Bacteria and Inactivates Antibacterial Alpha-Defensin ». *Molecular Microbiology* 39 (3): 708-13.
- Schmidtchen, Artur, Inga-Maria Frick, Emma Andersson, Hans Tapper, et Lars Björck. 2002. « Proteinases of Common Pathogenic Bacteria Degrade and Inactivate the Antibacterial Peptide LL-37 ». *Molecular Microbiology* 46 (1): 157-68.
- Schröder, I., C. D. Wolin, R. Cavicchioli, et R. P. Gunsalus. 1994. « Phosphorylation and Dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL Proteins of the Nitrate-Dependent Two-Component Regulatory System of *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 176 (16): 4985-92.
- Seifert, H. S. 1996. « Questions about Gonococcal Pilus Phase- and Antigenic Variation ». *Molecular Microbiology* 21 (3): 433-40.
- Shafer, W. M., X. Qu, A. J. Waring, et R. I. Lehrer. 1998. «Modulation of *Neisseria Gonorrhoeae* Susceptibility to Vertebrate Antibacterial Peptides due to a Member of the Resistance/nodulation/division Efflux Pump Family ». *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America 95 (4): 1829-33.
- Shaknovich, Rita, Subhajyoti De, et Franziska Michor. 2014. « Epigenetic Diversity in Hematopoietic Neoplasms ». *Biochimica Et Biophysica Acta*, septembre. doi:10.1016/j.bbcan.2014.09.003.
- Shaper, Mirza, Susan K. Hollingshead, William H. Benjamin, et David E. Briles. 2004. « PspA Protects Streptococcus Pneumoniae from Killing by Apolactoferrin, and Antibody to PspA Enhances Killing of Pneumococci by Apolactoferrin [corrected] ». Infection and Immunity 72 (9): 5031-40. doi:10.1128/IAI.72.9.5031-5040.2004.
- Shen, Tao, Xiao-Ning Wang, et Hong-Xiang Lou. 2009. « Natural Stilbenes: An Overview ». *Natural Product Reports* 26 (7): 916-35. doi:10.1039/B905960A.

- Shin, Dongwoo, et Eduardo A Groisman. 2005. « Signal-dependent binding of the response regulators PhoP and PmrA to their target promoters in vivo ». *The Journal of biological chemistry* 280 (6): 4089-94. doi:10.1074/jbc.M412741200.
- Shin, Dongwoo, Eun-Jin Lee, Henry Huang, et Eduardo A Groisman. 2006. « A Positive Feedback Loop Promotes Transcription Surge That Jump-Starts Salmonella Virulence Circuit ». Science (New York, N.Y.) 314 (5805): 1607-9. doi:10.1126/science.1134930.
- Shi, Yixin, Tammy Latifi, Michael J. Cromie, et Eduardo A. Groisman. 2004. « Transcriptional Control of the Antimicrobial Peptide Resistance ugtL Gene by the Salmonella PhoP and SlyA Regulatory Proteins ». The Journal of Biological Chemistry 279 (37): 38618-25. doi:10.1074/jbc.M406149200.
- Sieprawska-Lupa, Magdalena, Piotr Mydel, Katarzyna Krawczyk, Kinga Wójcik, Magdalena Puklo, Boguslaw Lupa, Piotr Suder, et al. 2004. « Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus Aureus*-Derived Proteinases ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (12): 4673-79. doi:10.1128/AAC.48.12.4673-4679.2004.
- Somvanshi, Vishal S., Bettina Kaufmann-Daszczuk, Kwi-Suk Kim, Shane Mallon, et Todd A. Ciche. 2010. «*Photorhabdus* Phase Variants Express a Novel Fimbrial Locus, Mad, Essential for Symbiosis ». *Molecular Microbiology*, juillet. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07270.x.
- Somvanshi, Vishal S, Rudolph E Sloup, Jason M Crawford, Alexander R Martin, Anthony J Heidt, Kwisuk Kim, Jon Clardy, et Todd A Ciche. 2012. « A single promoter inversion switches *Photorhabdus* between pathogenic and mutualistic states ». *Science (New York, N.Y.)* 337 (6090): 88-93. doi:10.1126/science.1216641.
- Soncini, F. C., E. García Véscovi, F. Solomon, et E. A. Groisman. 1996. « Molecular Basis of the Magnesium Deprivation Response in *Salmonella* Typhimurium: Identification of PhoP-Regulated Genes ». *Journal of Bacteriology* 178 (17): 5092-99.
- Soncini, F C, E G Vescovi, et E A Groisman. 1995. « Transcriptional autoregulation of the *Salmonella* typhimurium *phoPQ* operon. » *Journal of Bacteriology* 177 (15): 4364-71.
- Spinner, Justin L., Aaron B. Carmody, Clayton O. Jarrett, et B. Joseph Hinnebusch. 2013. « Role of *Yersinia pestis* Toxin Complex Family Proteins in Resistance to Phagocytosis by Polymorphonuclear Leukocytes ». *Infection and Immunity* 81 (11): 4041-52. doi:10.1128/IAI.00648-13.
- Staubitz, Petra, Heinz Neumann, Tanja Schneider, Imke Wiedemann, et Andreas Peschel. 2004. « MprF-Mediated Biosynthesis of Lysylphosphatidylglycerol, an Important Determinant in Staphylococcal Defensin Resistance ». *FEMS Microbiology Letters* 231 (1): 67-71. doi:10.1016/S0378-1097(03)00921-2.
- Steiner, H., D. Hultmark, A. Engström, H. Bennich, et H. G. Boman. 1981. « Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect Immunity ». *Nature* 292 (5820): 246-48.
- Stewart, Valley. 1993. « Nitrate Regulation of Anaerobic Respiratory Gene Expression in *Escherichia coli* ». *Molecular Microbiology* 9 (3): 425-34. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01704.x.
- Stock, A, T Chen, D Welsh, et J Stock. 1988. « CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. » Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85 (5): 1403-7.
- Stock, A M, V L Robinson, et P N Goudreau. 2000. « Two-Component Signal Transduction ». *Annual Review of Biochemistry* 69: 183-215. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.183.
- Strauch, O., et R.-U. Ehlers. 1998. « Food Signal Production of *Photorhabdus luminescens* Inducing the Recovery of Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis* Spp. in Liquid Culture ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (3): 369-74. doi:10.1007/s002530051306.
- Sun, D., E. D. Eccleston, et A. M. Fallon. 1998. « Peptide Sequence of an Antibiotic Cecropin from the Vector Mosquito, Aedes Albopictus ». Biochemical and Biophysical Research Communications 249 (2): 410-15. doi:10.1006/bbrc.1998.9150.

- ———. 1999. « Cloning and Expression of Three Cecropin cDNAs from a Mosquito Cell Line ». FEBS Letters 454 (1-2): 147-51.
- Sureka, Kamakshi, Bhaswar Ghosh, Arunava Dasgupta, Joyoti Basu, Manikuntala Kundu, et Indrani Bose. 2008. « Positive Feedback and Noise Activate the Stringent Response Regulator Rel in *Mycobacteria* ». *PloS One* 3 (3): e1771. doi:10.1371/journal.pone.0001771.
- Surette, Michael G., Mikhail Levit, Yi Liu, Gudrun Lukat, Elizabeth G. Ninfa, Alexander Ninfa, et Jeffry B. Stock. 1996. « Dimerization Is Required for the Activity of the Protein Histidine Kinase CheA That Mediates Signal Transduction in Bacterial Chemotaxis ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (2): 939-45. doi:10.1074/jbc.271.2.939.
- Swanson, Ronald V., Robert B. Bourret, et Melvjn I. Simon. 1993. « Intermolecular Complementation of the Kinase Activity of CheA ». *Molecular Microbiology* 8 (3): 435-41. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01588.x.
- Tailliez, Patrick, Christine Laroui, Nadège Ginibre, Armelle Paule, Sylvie Pagès, et Noël Boemare.
 2010. « Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Based on Universally Conserved Protein-Coding Sequences and Implications for the Taxonomy of These Two Genera. Proposal of New Taxa: *X. Vietnamensis* Sp. Nov., *P. Luminescens* Subsp. Caribbeanensis Subsp. Nov., *P. Luminescens* Subsp. Rainanensis Subsp. Nov., *P. Temperata* Subsp. Khanii Subsp. Nov., *P. Temperata* Subsp. Tasmaniensis Subsp. Nov., and the Reclassification of *P. Luminescens* Subsp. Thracensis as *P. Temperata* Subsp. Thracensis Comb. Nov. » International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60 (8): 1921-37. doi:10.1099/ijs.0.014308-0.
- Torres-Cruz, Joshua, et Marjan W. van der Woude. 2003. « Slipped-Strand Mispairing Can Function as a Phase Variation Mechanism in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 185 (23): 6990-94.
- Tossi, A., L. Sandri, et A. Giangaspero. 2000. « Amphipathic, Alpha-Helical Antimicrobial Peptides ». *Biopolymers* 55 (1): 4-30. doi:10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M.
- Trent, M. S., W. Pabich, C. R. Raetz, et S. I. Miller. 2001. « A PhoP/PhoQ-Induced Lipase (PagL) That Catalyzes 3-O-Deacylation of Lipid A Precursors in Membranes of *Salmonella* Typhimurium ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (12): 9083-92. doi:10.1074/jbc.M010730200.
- Tu, Xuanlin, Tammy Latifi, Alexandre Bougdour, Susan Gottesman, et Eduardo A. Groisman. 2006. « The PhoP/PhoQ Two-Component System Stabilizes the Alternative Sigma Factor RpoS in *Salmonella Enterica* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (36): 13503-8. doi:10.1073/pnas.0606026103.
- Tyson, K. L., A. I. Bell, J. A. Cole, et S. J. W. Busby. 1993. « Definition of Nitrite and Nitrate Response Elements at the Anaerobically Inducible *Escherichia coli nirB* Promoter: Interactions between FNR and NarL ». *Molecular Microbiology* 7 (1): 151-57. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01106.x.
- Van Belkum, A., S. Scherer, L. van Alphen, et H. Verbrugh. 1998. « Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 62 (2): 275-93.
- Van Belkum, A., W. van Leeuwen, S. Scherer, et H. Verbrugh. 1999. « Occurrence and Structure-Function Relationship of Pentameric Short Sequence Repeats in Microbial Genomes ». *Research in Microbiology* 150 (9-10): 617-26.
- Van der Woude, Marjan W. 2011. « Phase Variation: How to Create and Coordinate Population Diversity ». *Current Opinion in Microbiology* 14 (2): 205-11. doi:10.1016/j.mib.2011.01.002.
- Van der Woude, Marjan W., et Ian R. Henderson. 2008. « Regulation and Function of Ag43 (flu) ». Annual Review of Microbiology 62: 153-69. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162938.
- Van der Woude, M., W. B. Hale, et D. A. Low. 1998. « Formation of DNA Methylation Patterns: Nonmethylated GATC Sequences in Gut and Pap Operons ». *Journal of Bacteriology* 180 (22): 5913-20.
- Van der Woude, M. W., B. A. Braaten, et D. A. Low. 1992. « Evidence for Global Regulatory Control of Pilus Expression in *Escherichia coli* by Lrp and DNA Methylation: Model Building Based on Analysis of Pap ». *Molecular Microbiology* 6 (17): 2429-35.

- Van Ham, S. M., L. van Alphen, F. R. Mooi, et J. P. van Putten. 1993. « Phase Variation of *H. Influenzae* Fimbriae: Transcriptional Control of Two Divergent Genes through a Variable Combined Promoter Region ». *Cell* 73 (6): 1187-96.
- Veening, Jan-Willem, Eric J. Stewart, Thomas W. Berngruber, François Taddei, Oscar P. Kuipers, et Leendert W. Hamoen. 2008. « Bet-Hedging and Epigenetic Inheritance in Bacterial Cell Development ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 (11): 4393-98. doi:10.1073/pnas.0700463105.
- Véscovi, E. G., Y. M. Ayala, E. Di Cera, et E. A. Groisman. 1997. « Characterization of the Bacterial Sensor Protein PhoQ. Evidence for Distinct Binding Sites for Mg2+ and Ca2+ ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (3): 1440-43.
- Vizioli, J., P. Bulet, M. Charlet, C. Lowenberger, C. Blass, H. M. Müller, G. Dimopoulos, J. Hoffmann, F.
 C. Kafatos, et A. Richman. 2000. « Cloning and Analysis of a Cecropin Gene from the Malaria Vector Mosquito, *Anopheles Gambiae* ». *Insect Molecular Biology* 9 (1): 75-84.
- Vuong, Cuong, Jovanka M. Voyich, Elizabeth R. Fischer, Kevin R. Braughton, Adeline R. Whitney, Frank
 R. DeLeo, et Michael Otto. 2004. « Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) Protects
 Staphylococcus Epidermidis against Major Components of the Human Innate Immune
 System ». Cellular Microbiology 6 (3): 269-75.
- Wakamoto, Yuichi, Neeraj Dhar, Remy Chait, Katrin Schneider, François Signorino-Gelo, Stanislas Leibler, et John D. McKinney. 2013. « Dynamic Persistence of Antibiotic-Stressed *Mycobacteria* ». Science (New York, N.Y.) 339 (6115): 91-95. doi:10.1126/science.1229858.
- Waldburger, C. D., et R. T. Sauer. 1996. « Signal Detection by the PhoQ Sensor-Transmitter. Characterization of the Sensor Domain and a Response-Impaired Mutant That Identifies Ligand-Binding Determinants ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (43): 26630-36.
- Waldron, Denise E, Peter Owen, et Charles J Dorman. 2002. « Competitive Interaction of the OxyR DNA-Binding Protein and the Dam Methylase at the Antigen 43 Gene Regulatory Region in *Escherichia coli* ». *Molecular Microbiology* 44 (2): 509-20.
- Wang, M. X., et G. M. Church. 1992. « A Whole Genome Approach to in Vivo DNA-Protein Interactions in *E. coli* ». *Nature* 360 (6404): 606-10. doi:10.1038/360606a0.
- Wanner, B.L. 1995. « Signal transduction and cross regulation in the *Escherichia coli* phosphate regulon by PhoR, CreC, and acetyl phosphate »,. In *wo-component signal transduc- tion*, American Society for Microbiology, Washington, D.C, 203-21. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.),.
- Watson, Robert J., Susan A. Joyce, Georgette V. Spencer, et David J. Clarke. 2005. « The *exbD* Gene of *Photorhabdus Temperata* Is Required for Full Virulence in Insects and Symbiosis with the Nematode *Heterorhabditis* ». *Molecular Microbiology* 56 (3): 763-73. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04574.x.
- Webber, Carol A., et Robert J. Kadner. 1997. « Involvement of the Amino-Terminal Phosphorylation Module of UhpA in Activation of uhpT Transcription in *Escherichia coli* ». *Molecular Microbiology* 24 (5): 1039-48. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.4021765.x.
- Wedel, A., et S. Kustu. 1995. « The Bacterial Enhancer-Binding Protein NTRC Is a Molecular Machine: ATP Hydrolysis Is Coupled to Transcriptional Activation. » *Genes & Development* 9 (16): 2042-52. doi:10.1101/gad.9.16.2042.
- Weidenmaier, Christopher, Andreas Peschel, Volkhard A. J. Kempf, Natalie Lucindo, Michael R. Yeaman, et Arnold S. Bayer. 2005. « DItABCD- and MprF-Mediated Cell Envelope Modifications of Staphylococcus Aureus Confer Resistance to Platelet Microbicidal Proteins and Contribute to Virulence in a Rabbit Endocarditis Model ». *Infection and Immunity* 73 (12): 8033-38. doi:10.1128/IAI.73.12.8033-8038.2005.
- Weiss, David S., Jacques Batut, Karl E. Klose, John Keener, et Sydney Kustu. 1991. «The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription ». *Cell* 67 (1): 155-67. doi:10.1016/0092-8674(91)90579-N.

- Weiss, V, F Claverie-Martin, et B Magasanik. 1992. « Phosphorylation of nitrogen regulator I of Escherichia coli induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. » Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89 (11): 5088-92.
- White-Ziegler, C. A., M. L. Angus Hill, B. A. Braaten, M. W. van der Woude, et D. A. Low. 1998.
 « Thermoregulation of *Escherichia coli* Pap Transcription: H-NS Is a Temperature-Dependent DNA Methylation Blocking Factor ». *Molecular Microbiology* 28 (6): 1121-37.
- White-Ziegler, Christine A., Alia M. Black, Stacie H. Eliades, Sarah Young, et Kimberly Porter. 2002. « The N-Acetyltransferase RimJ Responds to Environmental Stimuli to Repress Pap Fimbrial Transcription in *Escherichia coli* ». *Journal of Bacteriology* 184 (16): 4334-42.
- Willems, R., A. Paul, H. G. van der Heide, A. R. ter Avest, et F. R. Mooi. 1990. « Fimbrial Phase Variation in *Bordetella Pertussis*: A Novel Mechanism for Transcriptional Regulation ». *The EMBO Journal* 9 (9): 2803-9.
- Williams, Jane S., Marie Thomas, et David J. Clarke. 2005. « The Gene *stlA* Encodes a Phenylalanine Ammonia-Lyase That Is Involved in the Production of a Stilbene Antibiotic in *Photorhabdus luminescens* TT01 ». *Microbiology* 151 (8): 2543-50. doi:10.1099/mic.0.28136-0.
- Wolfe, A J, et R C Stewart. 1993. « The short form of the CheA protein restores kinase activity and chemotactic ability to kinase-deficient mutants. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (4): 1518-22.
- Woude, Marjan W. van der, et Andreas J. Bäumler. 2004. « Phase and Antigenic Variation in Bacteria ». *Clinical Microbiology Reviews* 17 (3): 581-611. doi:10.1128/CMR.17.3.581-611.2004.
- Wyman, Claire, Irene Rombel, Anne K. North, Carlos Bustamante, et Sydney Kustu. 1997. « Unusual Oligomerization Required for Activity of NtrC, a Bacterial Enhancer-Binding Protein ». *Science* 275 (5306): 1658-61. doi:10.1126/science.275.5306.1658.
- Yamamoto, Kaneyoshi, Hiroshi Ogasawara, Nobuyuki Fujita, Ryutaro Utsumi, et Akira Ishihama. 2002. « Novel Mode of Transcription Regulation of Divergently Overlapping Promoters by PhoP, the Regulator of Two-Component System Sensing External Magnesium Availability ». *Molecular Microbiology* 45 (2): 423-38.
- Yang, Guowei, Carmen Sara Hernández-Rodríguez, Michael L. Beeton, Paul Wilkinson, Richard H. ffrench-Constant, et Nicholas R. Waterfield. 2012. « Pdl1 Is a Putative Lipase that Enhances *Photorhabdus* Toxin Complex Secretion ». *PLoS Pathog* 8 (5): e1002692. doi:10.1371/journal.ppat.1002692.
- Yang, Yang, Heiyoung Park, et Masayori Inouye. 1993. « Ligand Binding Induces an Asymmetrical Transmembrane Signal through a Receptor Dimer ». *Journal of Molecular Biology* 232 (2): 493-98. doi:10.1006/jmbi.1993.1405.
- Yeo, Won-Sik, Igor Zwir, Henry V Huang, Dongwoo Shin, Akinori Kato, et Eduardo A Groisman. 2012. « Intrinsic negative feedback governs activation surge in two-component regulatory systems ». *Molecular cell* 45 (3): 409-21. doi:10.1016/j.molcel.2011.12.027.
- Zgurskaya, Helen I. 2002. « Molecular Analysis of Efflux Pump-Based Antibiotic Resistance ». International Journal of Medical Microbiology: IJMM 292 (2): 95-105. doi:10.1078/1438-4221-00195.
- Zhang, J. R., J. M. Hardham, A. G. Barbour, et S. J. Norris. 1997. « Antigenic Variation in Lyme Disease *Borreliae* by Promiscuous Recombination of VMP-like Sequence Cassettes ». *Cell* 89 (2): 275-85.
- Zieg, J., M. Silverman, M. Hilmen, et M. Simon. 1977. «Recombinational Switch for Gene Expression ». *Science (New York, N.Y.)* 196 (4286): 170-72.
- Zwir, Igor, Tammy Latifi, J. Christian Perez, Henry Huang, et Eduardo A. Groisman. 2012. « The Promoter Architectural Landscape of the Salmonella PhoP Regulon ». Molecular Microbiology 84 (3): 463-85. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08036.x.

Annexes

Souches ou plasmides	Génotype ou caractéristiques descriptives	Source ou références
P. luminescens strains		
TT01 <i>phoP</i> TT01/ P _{ail1Pl} -gfp[AAV]	Wild type isolated from <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> nematode TT01 <i>phop</i> ::cat ; <i>phop</i> mutant Transconjugant, TT01 contenant le plasmide P _{ailIPl} -gfp[AAV], Km ^R	Collection du laboratoire (Derzelle et al. 2004) (Mouammine <i>et al.</i> 2014)
$phoP / P_{ailIPl} - gfp[AAV]$	Transconjugant, <i>phoP</i> contenant le plasmide P _{ail1Pl} - <i>gfp</i> [AAV], Km ^R	(Mouammine et al. 2014)
TT01/ P _{pbgPE} -gfp[AAV] TT01/ P _{pbgPE} -gfp[mut3] TT01/ P _{lac} -gfp[AAV] phoP/ P _{pbgPE} -gfp[mut3] TT01/ P _{lac} PhoPQ phoP/ pBB-P _{lac} -PhoPHA(D52A)	Transconjugant, TT01 contenant le plasmide P_{pbgPE} -gfp[AAV], Km ^R Transconjugant, TT01 contenant le plasmide P_{pbgPE} -gfp[mut3], Km ^R Transconjugant, TT01 contenant le plasmide P_{lac} -gfp[AAV], Km ^R Transconjugant, phoP contenant le plasmide P_{pbgPE} -gfp[AAV], Km ^R Transconjugant, TT01 contenant le plasmide P_{lac} PhoPQ, Gm ^R Transconjugant, phoP contenant le plasmide pBB-P _{lac} -PhoPHA(D52A),	cette thèse Cette thèse (Abi Khattar 2009) cette thèse (Derzelle <i>et al.</i> 2004) cette thèse
<i>phoP</i> / pBB-P _{lac} -PhoPHA(D52E)	Km ^R Transconjugant, <i>phoP</i> contenant le plasmide pBB-P _{lac} -PhoPHA(D52E), Km ^R	cette thèse
<i>phoP</i> / pBB-P _{lac} -PhoPQ(A46T)	Transconjugant, <i>phoP</i> contenant le plasmide pBB-P _{lac} -PhoPQ(A46T), Km ^R	cette thèse
<i>phoP</i> / pBB-P _{lac} -PhoPQ(T45I)	Transconjugant, <i>phoP</i> contenant le plasmide pBB-P _{lac} -PhoPQ(T45I), Km ^R	cette thèse
TT01/ pBB-P _{ail/Pl} -PbgPE phoP/ pBB-P _{ail/Pl} -PbgPE TT01/ pBB-MCS5	Transconjugant, TT01 contenant le plasmide pBB-P _{ailIPl} -PbgPE, Gm ^R Transconjugant, <i>phoP</i> contenant le plasmide pBB-P _{ailIPl} -PbgPE, Gm ^R Transconjugant, TT01 contenant le plasmide pBB-MCS5, Gm ^R	cette thèse cette thèse cette thèse
E. coli strains		
XL1 blue MRF'	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z/M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagène
WM3064	thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ Δ M15 RP4-1360 Δ (araBAD)567 Δ danA1341[erm pir (wt)]	(Paulick et al. 2009)
BL21 (DE3) pLysS	$F dcm ompT hsdS(r_B m_B) gal \lambda(DE3) [pLysS Cam^R]$	Stock de laboratoire

Table 1 : Liste des plasmides et souches non listées dans les articles
JM110	rpsL (Str ^r)thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 $\Delta(lac-proAB)$ [F' traD36 proAB lacl ⁹ Z Δ M15]	Stratagène
Dam16::Km	F-, λ , rph-1, dam16::Km	(Løbner-Olesen et von Freiesleben 1996)
JW144-2	F-, Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ ⁻ , ydcZ739::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	(Baba et al. 2006)
BW25113	F, $\Delta(araD-araB)$ 567, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ^{-} , rph-1, $\Delta(rhaD-rhaB)$ 568, $hsdR514$	(Baba et al. 2006)
Plasmids		
P _{lac} PhoPQ	Un fragment de 2,5kb a été cloné dans le plasmide pBBR1-MCS5/XbaI-PstI (sous le contrôle du promoteur p _{lac})	(Derzelle et al. 2004)
P _{lac} pbgPE	Un fragment de 7,5kb a été clone dans le plasmide pBBR1-MCS5/PstI- BamHI (sous le contrôle du promoteur p _{lac})	(Abi Khattar 2009)
pPROBE-gfp[AAV]	Plasmide (pBBR1 replicon) contenant le gène $gfp[AAV]$ en aval d'un site de multi clonage. Km^{R}	(Miller, Leveau, et Lindow 2000)
P_{pbgPE} -gfp[AAV] P_{+} = p_{-} = gfp[mut3]	pPROBE avec la gfp [AAV] sous le contrôle du promoteur p _{<i>pbgPE</i>} , Km^R pPROBE avec la gfp [mut3] sous le contrôle du promoteur p _{<i>pbgPE</i>} , Km^R	cette thèse
$P_{ailIPl} - gfp[AAV]$	pPROBE avec la gfp [AAV] sous le contrôle du promoteur p_{pbgPE} , Km^{R}	cette thèse
$P_{pbgPE(GTTC)}$ - gfp[AAV]	pPROBE avec la $gfp[AAV]$ sous le contrôle du promoteur p_{pbgPE} muté sur le site GATC en GTTC), Km^{R}	cette thèse
P_{lac} -gfp[AAV]	pPROBE avec la $gfp[AAV]$ sous le contrôle du promoteur p_{lac} , Km^R	(Abi Khattar 2009)
pBB-MCS5	Plasmide à large spectre Gm ^R mob	(Kovach et al. 1995)
pBB-P _{ail1Pl} -pbgPE	pBBR1-MCS5 contenant l'opéron <i>pbgPE</i> sous contrôle du promoteur	cette thèse
pBB-P _{lac} -PhoPQ(A46T)	p_{ail1Pl} pBBR1-MCS5 (Gm ^R) contenant l'opéron <i>phoPQ</i> avec la mutation PhoQ(A46T) sous contrôle du promoteur p_{lac}	Cette thèse
pBB-P _{lac} -PhoPQ(T45I)	pBBR1-MCS5 (Gm ^R) contenant l'opéron <i>phoPQ</i> avec la mutation PhoQ(T45I) sous contrôle du promoteur p _{lac}	Cette thèse

pBB-MCS2	Plasmide à large spectre <i>Km^R mob</i>	(Kovach et al. 1995)
pBB-P _{lac} PhoP-HA	pBBR1-MCS2 (<i>Km^R</i>) contenant la protéine PhoP-HA	Cette thèse
pBB-P _{lac} -PhoPHA(D52E)	pBBR1-MCS2 (Km ^R) contenant la protéine PhoP-HA avec la mutation	Cette thèse
	PhoP (D52E) sous contrôle du promoteur p _{lac}	
pBB-P _{lac} -PhoPHA(D52A)	pBBR1-MCS2 (Km ^R) contenant la protéine PhoP-HA avec la mutation	Cette thèse
	PhoP (D52A) sous contrôle du promoteur p _{lac}	
pBB-P _{lac} -PhoP(HTH)-HA	pBBR1-MCS2 (Km ^R) contenant la protéine le domaine HTH-HA de	cette thèse
	PhoP sous contrôle du promoteur p _{lac}	

Liste des références du souchier

- Abi Khattar, Z. 2009. « Impact de la résistance aux peptides antimicrobiens et aux composés toxiques sur les interactions bactéries-insectes : cas des infections par *Photorhabdus luminescens* et *Bacillus cereus* ». PhD thesis, Université Montpellier 2.
- Baba, Tomoya, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A. Datsenko, Masaru Tomita, Barry L. Wanner, et Hirotada Mori.
 2006. « Construction of *Escherichia Coli K-12* in-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection ». *Molecular Systems Biology* 2:
 2006.0008. doi:10.1038/msb4100050.
- Derzelle, Sylviane, Evelyne Turlin, Eric Duchaud, Sylvie Pages, Frank Kunst, Alain Givaudan, et Antoine Danchin. 2004. « The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photorhabdus luminescens* is essential for virulence in insects ». *Journal of bacteriology* 186 (5): 1270-79.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, et K. M. Peterson. 1995. « Four New Derivatives of the Broad-Host-Range Cloning Vector pBBR1MCS, Carrying Different Antibiotic-Resistance Cassettes ». *Gene* 166 (1): 175-76.
- Løbner-Olesen, A., et U. von Freiesleben. 1996. « Chromosomal Replication Incompatibility in Dam Methyltransferase Deficient *Escherichia Coli* Cells ». *The EMBO Journal* 15 (21): 5999-6008.
- Miller, W. G., J. H. Leveau, et S. E. Lindow. 2000. « Improved Gfp and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors ». *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 13 (11): 1243-50. doi:10.1094/MPMI.2000.13.11.1243.
- Mouammine, A., Lanois A., Pagès S., Lafay B., Molle V., Canova M., Girard PA., Duvic B., Givaudan A. et Gaudriault S., 2014. « Ail and PagC-related proteins in the entomopathogenic bacteria of *Photorhabdus* genus ». *PLoS ONE*.
- Paulick, Anja, Andrea Koerdt, Jürgen Lassak, Stuart Huntley, Ina Wilms, Franz Narberhaus, et Kai M. Thormann. 2009. « Two Different Stator Systems Drive a Single Polar Flagellum in Shewanella Oneidensis MR-1 ». Molecular Microbiology 71 (4): 836-50. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06570.x.

Table 2 : Liste des primers non cités dans les articles

Nom	Séquence (5' vers 3')	Localisation
L-P _{pbgPE} -XbaI	GCTCTAGATTACAGTCCAGGCTTATGTATGTGCC	Utilisé pour amplifier la région promotrice de <i>pbgPE</i>
R-P _{pbgPE} -KpnI	CAGGTACCCTATGGAAGAAAGCTATCCATAAAACACAGTCC	
L-P _{ailIPI} -NcoI	CTCGAGAAAGCGGGTATCCAGGTTTA	Utilisé pour amplifier la région promotrice de <i>ail1</i> _{Pl}
R-P _{ail1Pl} -XhoI	GCGGTACCCCTACCGCTACCACTGAAGC	
L-P _{phoP} -XbaI	GCGCTCTAGAAAACATCCGTCTGTTGCTATCC	Utilisé pour amplifier la région promotrice de phoP
R-P _{phoP} -KpnI	GCGCGGTACCCTCTCCAGCAGGCAGTTATTG	
L-PhoPHA- BamHI	GCGCGGATCCCTGGA GAGGAA TTATTCCATGCGGATATTGA TCGTTGAAGACAACATGTTACTGCGTCACCATCTAACG	Utilisé pour construire la protéine PhoP taguée HA
R-PhoPHA- XbaI	GCGCTCTAGATTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACA CATCGAAGCGATAGCCTTGGCCCCGGACAGTCACGATAGCT TCATA	
L-PhoP(HTH)- HA-BamHI	GCGCGGATCCCTGGA GAGGAA TTATTCCATGTTTCATCTTGA GGAAATTATTGCCCGTATGCAGGC	Pour construire la protéine PhoP tronquée taggué HA
R-PhoP(HTH)- HA-XbaI	GCGCTCTAGATTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACA CATCGAAGCGATAGCCTTGGC	
L-PhoPHis- NdeI	CGCGCGCCGCATATGCGGATATTGATCGTTGAAGACAACAT GTTACTGC	Pour construire la protéine PhoP tagguée histidine
R-PhoPhis- BamHI	GCGCGGATCCTTACACATCGAAGCGATAGCCTTGGCCCCG	
L-PhoQ(T45I)	GTTACCTGGTCAGTTTTGATAAA ATT GCTTATACACTGCTAC G	Pour introduire la mutation T45I dans PhoQ
R-PhoQ(T45I)	CGTAGCAGTGTATAAGC AAT TTTATCAAAACTGACCAGGTA AC	
L-PhoQ(A46T)	GGTCAGTTTTGATAAAACT ACT TATACACTGCTACGTAGTCA G	Pour introduire la mutation A46T dans PhoQ
R-PhoQ(A46T)	CTGACTACGTAGCAGTGTATA AGT AGTTTTATCAAAACTGAC C	

L-PhoP(D52A)	GAACCCGATATTGCCATTGTT GCT CTTGGTTTGCCCGGAGAA G	Pour introduire la mutation D52A dans PhoP	
R-PhoP(D52A)	CTTCTCCGGGCAAACCAA GAGC AACAATGGCAATATCGGGT TC		
L-PhoP(D52E)	GAACCCGATATTGCCATTGTT GAA CTTGGTTTGCCCGGAGAA G	Pour introduire la mutation D52E dans PhoP	
R-PhoP(D52E)	CTTCTCCGGGCAAACCAAG TTC AACAATGGCAATATCGGGT TC		
L- pbgPE(GTTC)	CGTGAATCTGTACGTATCGTGGTTCGATAGTAATTTCCACTT AATTTGC	Pour remplacer l'alanine du site GATC par une thymine	
R- pbgPE(GTTC)	GCAAATTAAGTGGAAATTACTATCGAACCACGATACGTACA GATTCACG		
L- bisulfitepbgPE	TAGTTTAGGTTTATGTATGTGT	Amplifier la région promotrice de <i>pbgPE</i> modifié au bisulfite à partir de l'ADN génomique	
R- bisulfitepbgPE	TAAATTTCTTCATCACCAATTA	PCR1	
L- bisulfitepbgPE(nested)	TTGTGAATTTGTATGTATTGTG	Amplifier la région promotrice de <i>pbgPE</i> modifié au bisulfite à partir de l'ADN génomique nested PCR	
R- bisulfitepbgPE(nested)	CTTCATCACCAATTACAAAAC		
L- bisulfitepbgPE plasm	TAGTTTAGGTTTATGTATGTGT	Amplifier la région promotrice de <i>pbgPE</i> modifié au bisulfite à partir de l'ADN plasmidique	
R- bisulfitepbgPE plasm	AAACAACTCCAATAAAAAATTCT		
L- bisulfitepbgPE plasm(nested)	TAGTTTAGGTTTATGTATGTGT	Amplifier la région promotrice de <i>pbgPE</i> modifié au bisulfite à partir de l'ADN plasmidique	
R- bisulfitepbgPE plasm(nested)	AAATTCAAACTCAATACCCTAT	nested PCR	
L-south-pbgP	TGGCGGGTTTTCTTACCATA	Pour réaliser une sonde <i>pbgPE</i> marquée pour les southern blot	
R-south-pbgP	TTCTTCATCACCGATTGCAG		
L-petitpbgPE- SbfI	GCGCCCTGCAGGCCACTTAATTTGCTAAATCATACCTG	Utilisé pour amplifier une version raccourcie de la région promotrice de <i>pbgPE</i>	
R-petitpbgPE- SalI	GCGCGTCGACGACGAGAAAATGGAAGAAAGC		

Résumé

Photorhabdus luminescens est une entérobactérie bioluminescente portée comme symbiote dans l'intestin de nématodes *Heterorhabditis bacteriophora* au stade juvénile infestant. Ce complexe nématobactérien peut infester et tuer une large gamme d'insectes et est utilisé en lutte biologique contre des ravageurs de cultures. Lorsque la bactérie est relarguée dans le sang (hémolymphe) des insectes, les peptides antimicrobiens cationiques (PAMs) sont produits en réponse à l'infection. Cependant, au final la bactérie résiste et tue l'insecte en une trentaine d'heures. Des antibiogrammes et des étalements de la souche sauvage en présence de polymyxine B, ont montré que la majeure partie de la population est sensible et qu'une faible proportion de bactérie (0.5%) est résistante à la polymyxine B. Afin de mieux comprendre le mécanisme de résistance aux **PAMs cationique l'objectif de cette thèse a été de décrire la sous-population résistante chez Photorhabdus.**

Tout d'abord, les deux populations (sensibles et résistantes) retrouvées chez notre modèle d'étude *P. luminescens* TT01 ont été décrites, et nous avons pu conclure que ce phénomène était abondamment retrouvé dans les différentes espèces au sein du genre *Photorhabdus*.

Le mécanisme de résistance aux PAMs chez *Photorhabdus* est connu et contrôlé par le système à deux composantes PhoP-PhoQ initialement décrit chez *Salmonella sp.* PhoP est directement impliqué dans la régulation de l'expression de l'opéron *pbgPE* responsable de la modification du LPS. L'incorporation de molécules chargées positivement entraine une diminution de la charge membranaire globale produisant ainsi des bactéries plus résistantes aux PAMs cationiques. Nous avons donc dans un second temps partiellement caractérisé le régulon PhoP essentiel à l'expression des gènes de résistance. Nous avons pu ainsi identifier des marqueurs du régulon PhoP comme les gènes *ail, phoP*, et *pbgPE*. Enfin, la construction d'une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron *pbgPE* et une GFP conjuguée à l'utilisation de la cytométrie en flux nous a permis de suivre l'expression du gène de résistance. La proportion de cellules qui expriment la GFP est d'environ 0.3%. En présence de polymyxine B, nous constatons que le nombre de bactéries GFP positives croît d'un facteur 65. De même, on dénombre en RT-qPCR environ 4 fois plus de transcrits du gène *pbgP* dans la sous-population résistante à la polymyxine B. Enfin, *in vivo* nous avons pu démontrer que cette sous-population résistante était responsable de la mort de l'insecte. Plusieurs mécanismes pouvant expliquer l'apparition de cette sous-population résistante ont été testés dans cette thèse. *Photorhabdus* présente donc une population hétérogène séparée en bactéries résistantes et sensibles avec un rôle essentiel de la sous-population résistante pour l'infection de l'insecte.

Mots clés : hétérogénéité PAMs résistance pathogène insecte

Summary

Photorhabdus luminescens is a bioluminescent enterobacterium carried as a symbiont in the intestine of infective juvenile stage of *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. The nematode -bacterium complex can infect and kill a wide range of insect larvae and is used as biological control agents against crop pests. When the bacteria are released into the insect hemolymph, cationic anti-microbial peptides (CAMPs) are produced in response to infection. However the bacteria can resist and kill the insect in about 35 hours. Antibiograms and spreading on plates of *P. luminescens* TT01 wild type strain with polymyxin B revealed that the major part of population was susceptible and only about 0.5% of bacteria can resist to polymyxin B. **To have a better understanding of resistance mechanism toward CAMP, the aim of this PhD thesis was to characterize the resistant sub-population in** *Photorhabdus***.**

We first described the two sub-populations found in *P. luminescens* wild type strain TT01 (sensible and resistant) and concluded that this phenomenon was mostly found the different species in the *Photorhabdus* genus.

The resistance mechanism against CAMPs in *Photorhabdus* is well known and required the two-component system PhoP-PhoQ initially described in *Salmonella sp*. In *Photorhabdus*, PhoP directly regulates the expression of *pbgPE* operon required for LPS modification. The incorporation of positively charged substituents results in a net loss of negative surface charges, producing bacterial membrane more resistant to CAMPs. We partially investigated the PhoP network necessary for resistance gene expression and we therefore described some PhoP-dependent genes such as *ail1*, *phoP*, *pbgPE*. Finally, transcriptional fusion between the *pbgPE* promoter and a destabilized GFP associated with flow cytometry allowed us to monitor the expression of resistance gene. About 0.3% of bacteria are GFP-positive bacteria. We observed that the number of GFP-positive bacteria increased by 65-fold in presence of polymixin B. Also, a 4-fold increase of *pbgP* transcripts in the population selected with polymixin B was quantified. In vivo we demonstrated that only the resistant sub-population was responsible for insect death. Several underlying mechanisms that could explain the emergence in *Photorhabdus* of a mixing population relative to CAMP resistance were assessed during this PhD.

Photorhabdus population is heterogenic and separated in sensible and resistant sub-population with the major role for the latest in the *in vivo* phenotype.

Key words: heterogeneity, AMPs résistance, entomopathogenic bacteria