

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-dépendant 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 Mg^{2+} 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

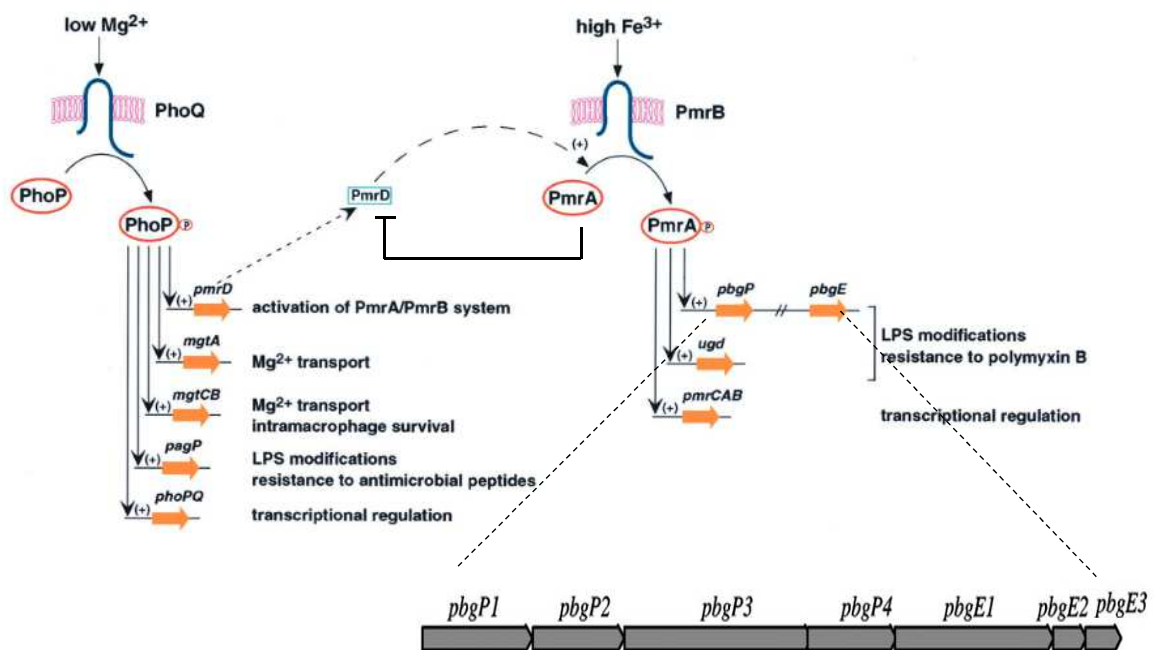


Figure 8 : Le connecteur PmrD et son rôle central dans la transmission du signal. L'opéron *pbgPE* responsable de la modification du LPS et objet d'étude de cette thèse est représenté dans son intégralité (7 gènes en tout). D'après Groisman 2001, avec modifications.

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 : *pbpPE*. 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 Fe^{3+} 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 Mg^{2+} et Fe^{3+} sont présents en même temps, PmrA peut se fixer sur le promoteur de *pmrD* pour en

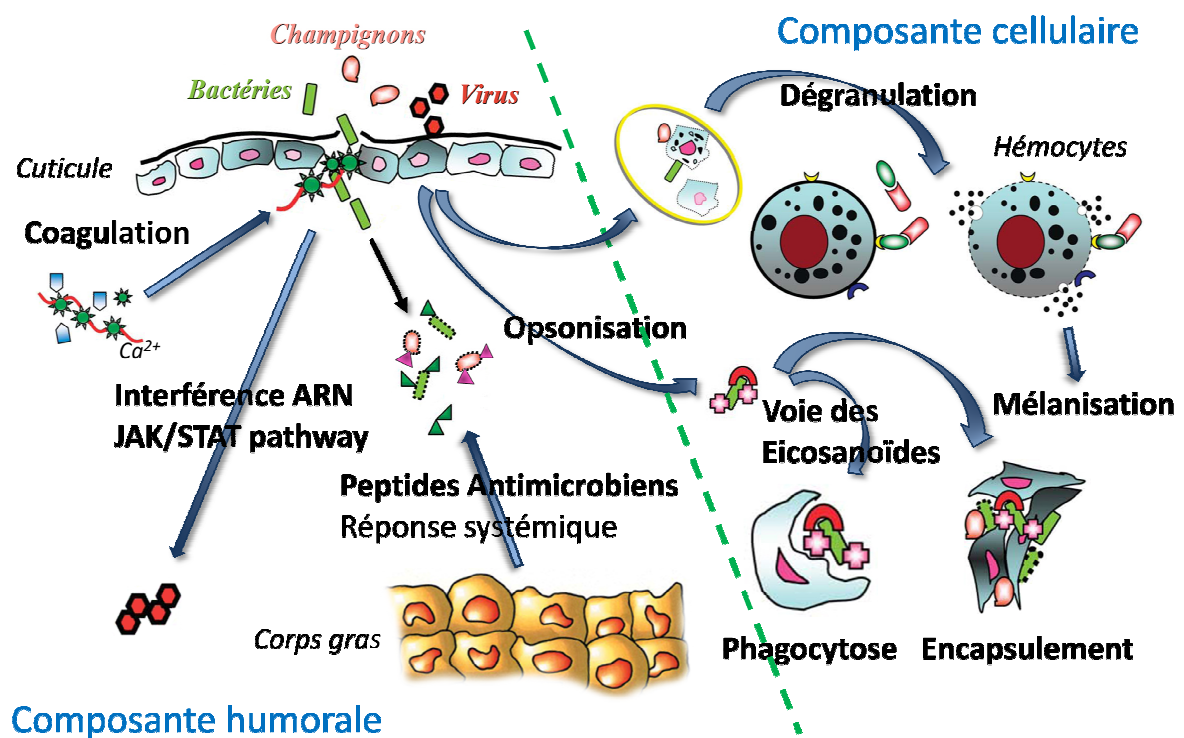


Figure 9 : L'immunité chez les insectes. Elle est caractérisée par deux composantes : une composante cellulaire (à droite) et une composante humorale (à gauche). D'après Duvic Bernard.

réprimer l'expression afin d'éviter une trop grande accumulation de PmrA-P et ainsi une modification du LPS aberrante voire coûteuse 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'encapsulation 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

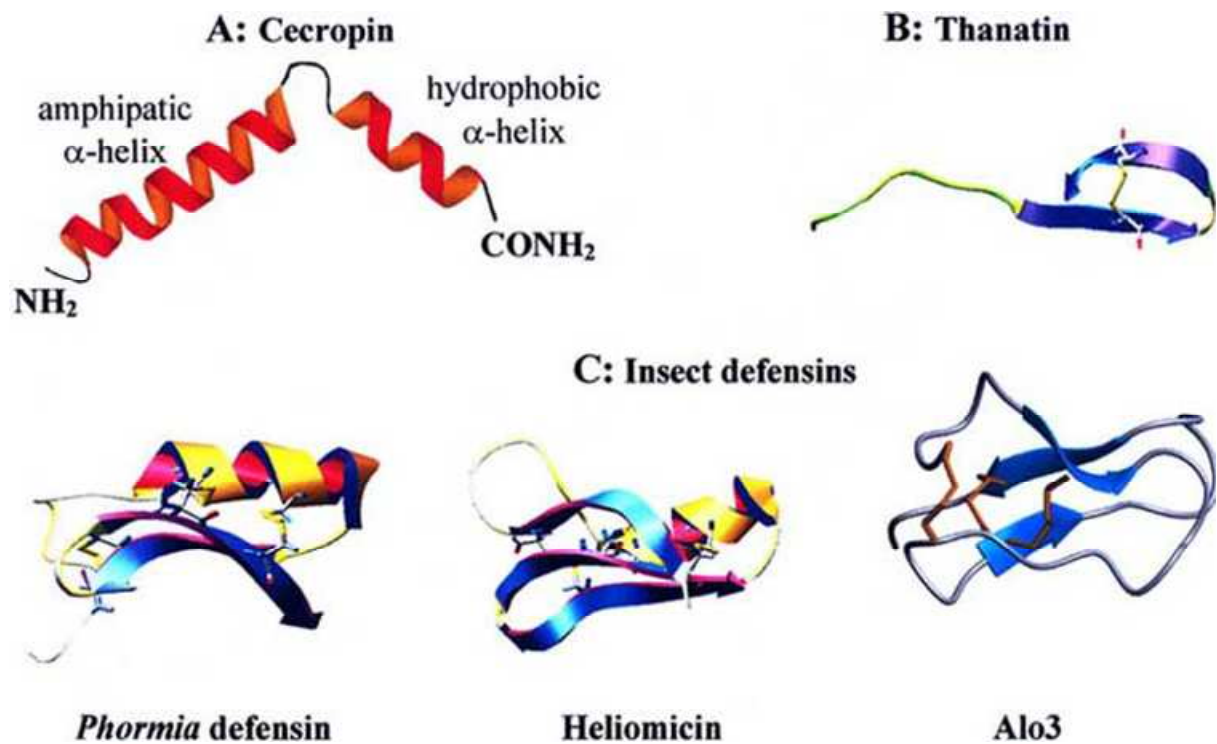


Figure 10 : Les PAMs d'insectes. A : classe des PAMs à motifs hélice alpha. B : Les PAMs à motifs alpha-bêta. C : les PAMs où la glycine et la proline sont surreprésentés. (Bulet et Stöcklin 2005)

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'hémolymph, 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'hémolymph 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 (Schitteck *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 ; (Sun, Eccleston, et Fallon 1999) 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

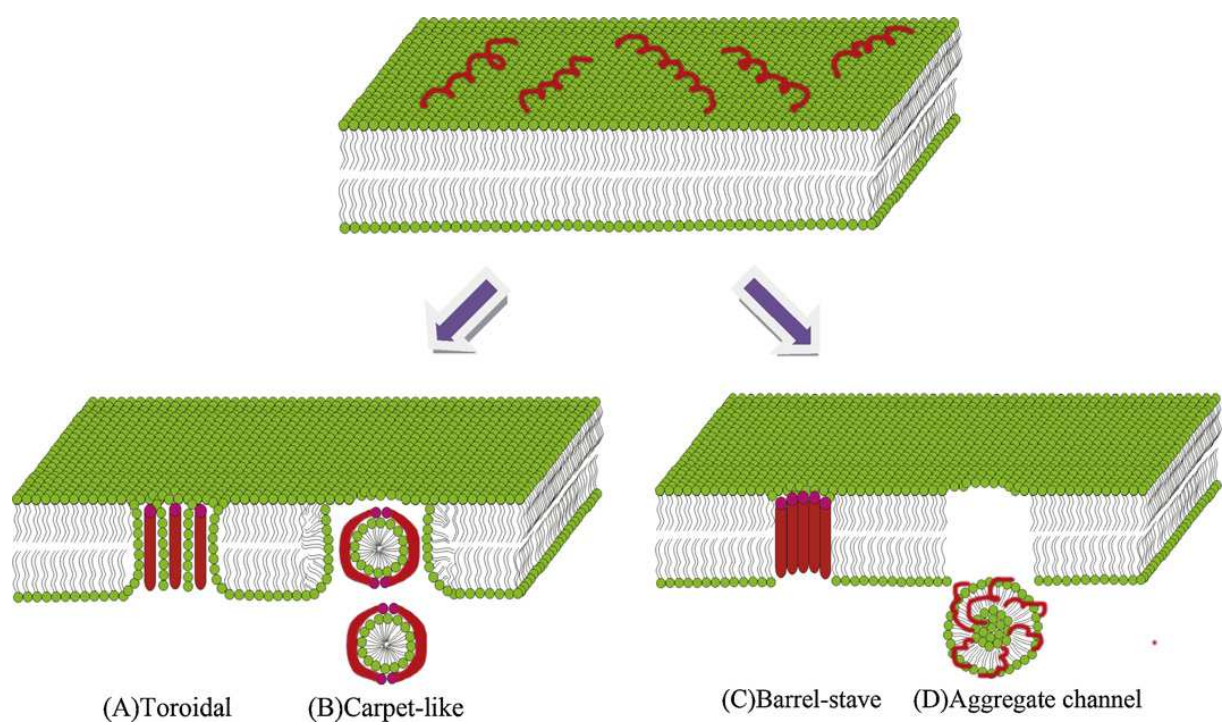


Figure 11 : Les différents modes d'action des CAMPs. Les CAMPs se fixent à la membrane bactérienne principalement par des interactions électrostatiques puis peuvent former différentes structures A : les pores thoroïdaux. B : le modèle Tapis. C : le modèle des pores transmembranaires. D : Les agrégats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

stabilisée par deux ponts disulfures 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 chaîne (<20 aa) et les peptides à longue chaîne (>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 chaîne ont une forte activité contre les bactéries Gram négatives appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* uniquement (Otvos 2002), les peptides à longue chaîne 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 entraînant 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 entraînant 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 humaine du LL-37, les défensines et les cécropines sont capables 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 (Mg^{2+} et Ca^{2+}) 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 *Photobacterium*, 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 (Streptococcal 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

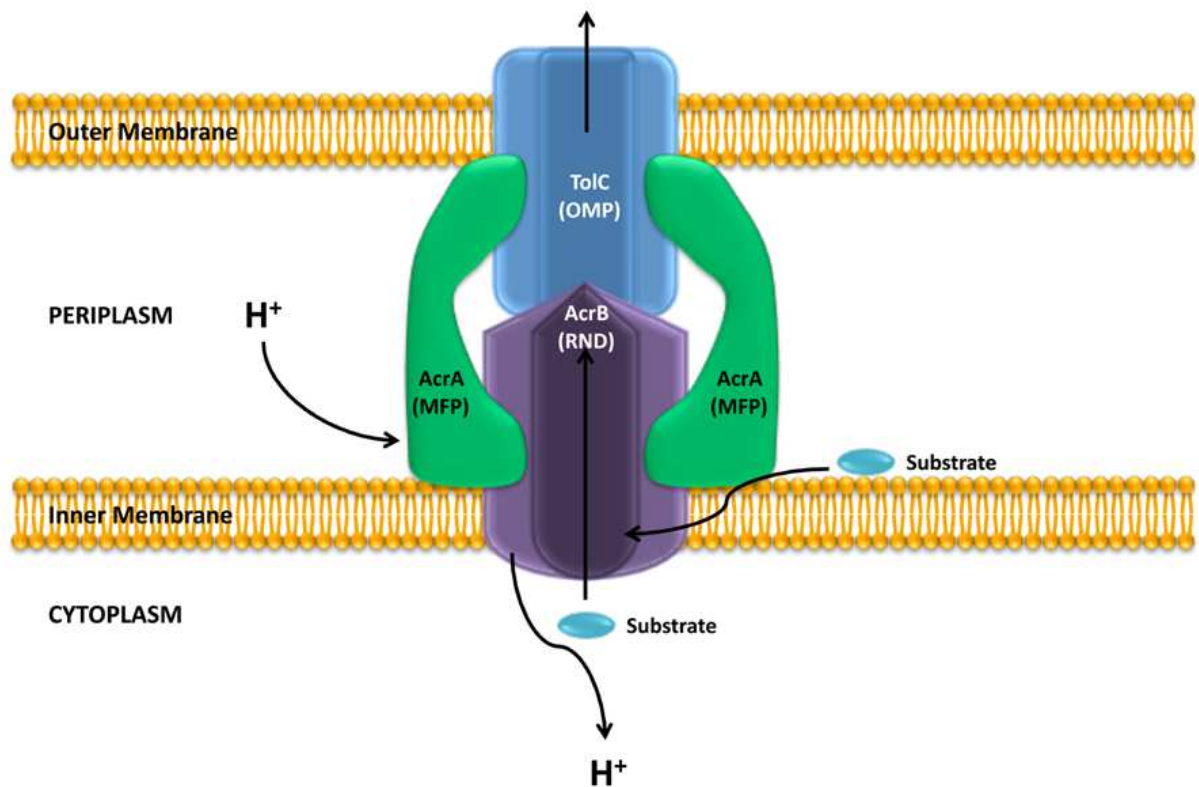


Figure 12 : Le système AcrAB/TolC. AcrAB forment un même opéron dans lequel TolC n'est pas inclus. AcrB est une protéine de transport dans la membrane cytoplasmique, AcrA est une protéine de fusion membranaire du périplasme formant un canal entre les deux membranes. TolC est une protéine de membrane 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 dermécidine (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 *Neisseria 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 déficient 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 fischeri* (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 chaînes d'acides gras saturés.
- Un core oligosaccharidique 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'unités 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 teichoïques anioniques chez les bactéries Gram positives, est de modifier la charge de la surface bactérienne par ajout de l'acide aminé 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 lysyl-phosphatidylglycerol 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'aminarabinose 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), *Photobacterium* (Bennett et Clarke 2005) et *P. aeruginosa* (McPhee, Lewenza, et Hancock 2003). Ces modifications sont toutes sous le

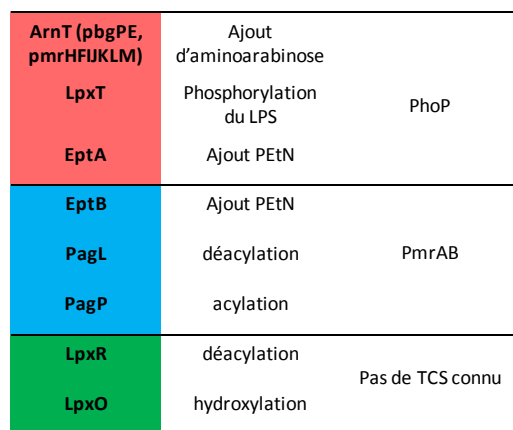


Figure 13 : Les différentes modifications du LPS et leur régulateur. A noter que chez *Salmonella*, *E. coli* et *Y. pestis* PmrAB est sous le contrôle de PhoPQ ce qui n'est pas vrai chez *Y. pseudotuberculosis* et *P. luminescens* (Flamez *et al.* 2007 ; Needham et Trent 2013 ; cette thèse)

contrôle direct ou indirect de PhoPQ (cf II- introduction générale). Chez *Salmonella*, une augmentation de la concentration extracellulaire en Fe^{3+} 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'autres modifications sur le LPS (par exemple aminoarabinose) pour rendre la surface cellulaire moins négative et ainsi résister aux 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 *pagP* qui code 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 entraîner 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.*

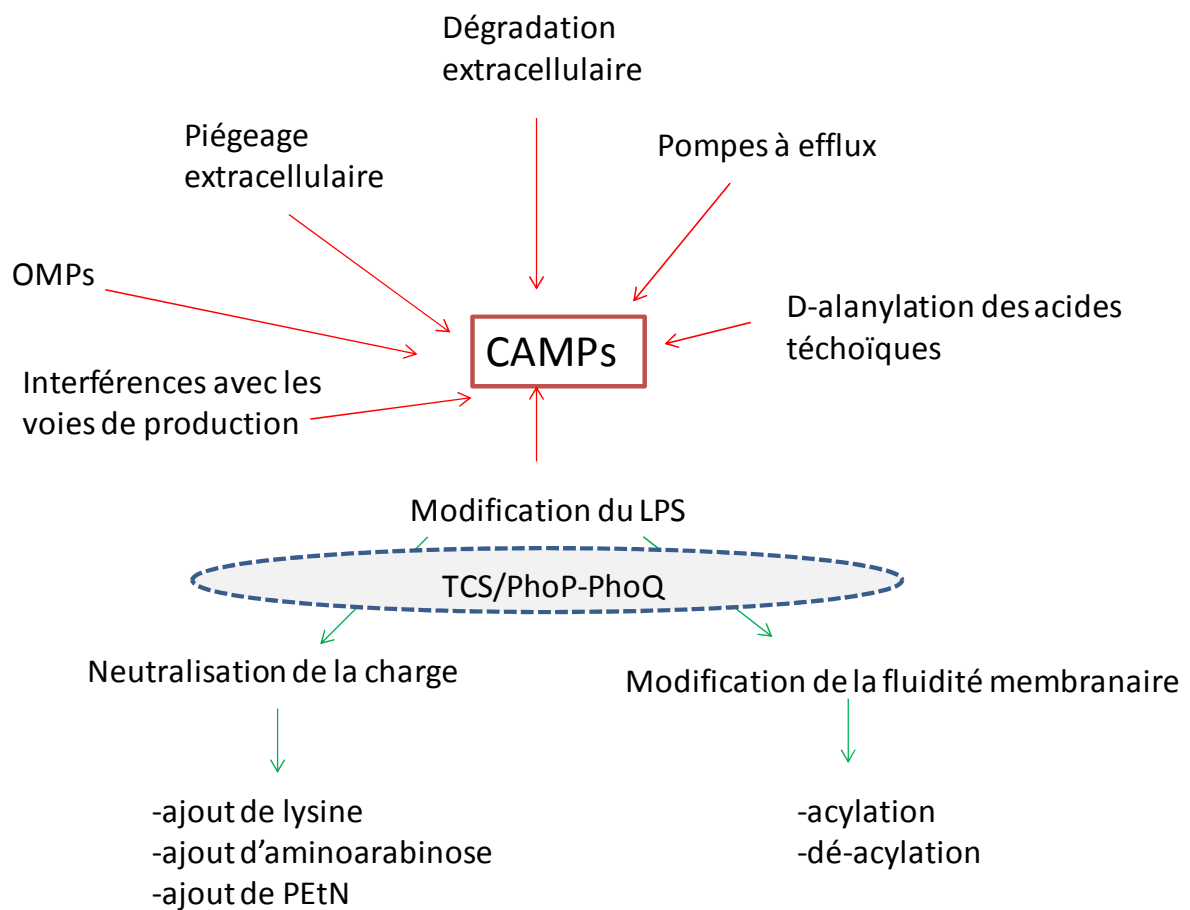


Figure 14 : Les différents modes de résistance aux CAMPs développés par les bactéries. A noter le rôle central de PhoPQ dans les modifications du LPS.

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 chaîne 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* entraîne 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 poser 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 entraînant 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 messenger et entraîner 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 entraîne 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 « switches » bistables sont épigénétiques ce qui signifie qu'ils ne proviennent pas de changement au niveau de leur séquence ADN (voir ci-dessus) (Dubnau et Losick 2006). Plusieurs mécanismes régissent les switches 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 entraînant 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 ont 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 entraîner 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 sous-populations 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 entraîner 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 *Photobacterium* 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 *ci* chacun capable de réprimer l'expression de l'autre. Cro régule le cycle lytique et *ci* 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 *ci* de la synthèse de Cro équivaut à une auto-régulation positive de *ci* 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

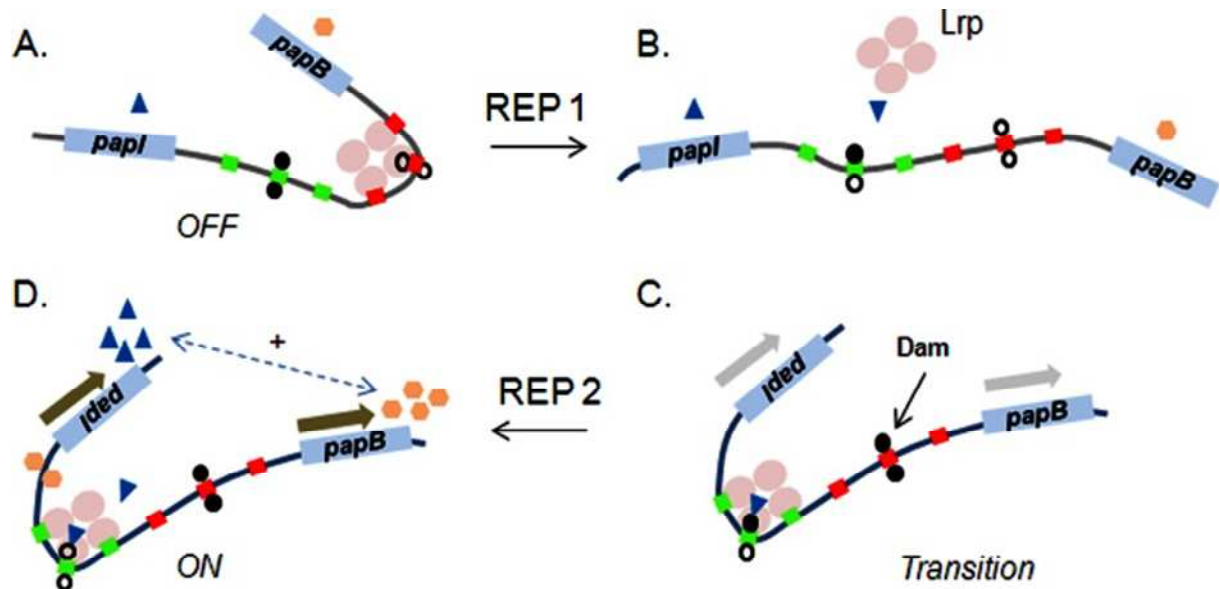


Figure 16 : Le modèle ON-OFF des gènes *pap*. A : Etat OFF un octamère (tétramère de dimères) de Lrp (ici n'est représenté qu'un seul tétramère) se fixe sur le promoteur proximal (sites 1-3 : carrés rouge). La fixation de Lrp sur les sites 1-3 inhibe la fixation sur les sites 4-6 (carrés verts) par exclusion 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 sites $GATC^{prox}$ réduit l'affinité de PapI/Lrp pour les sites 1-3 et est nécessaire au 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 entraîner 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 et ainsi survivre. Les cellules persistantes reflètent à la fois la capacité pour une bactérie de résister aux antibiotiques mais également un état transitoire d'arrêt de la croissance bactérienne (Moyed et Broderick 1986). Le switch entre bactéries « normales » et bactéries 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 entraîner 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).

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 nématode-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. bacteriophora* 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 considérerait que le passage des nématodes au stade IJ nécessiterait des signaux analogues à ceux de *C. elegans*.

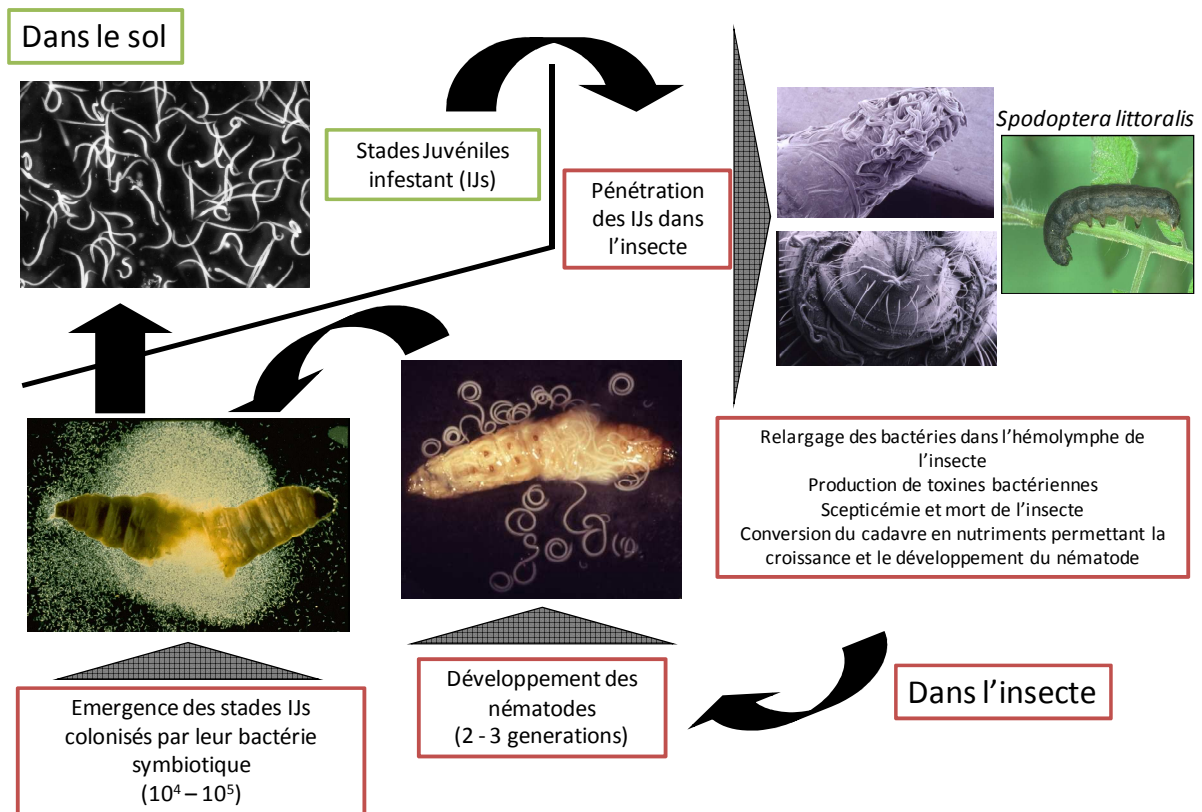


Figure 18 : Cycle biologique de *Photorhabdus*. En encadré rouge sont représentés les parties du cycle ayant lieu dans l'insecte et en encadré vert, celles ayant lieu dans le sol.

Cependant aucun signal précis n'a été trouvé excepté une petite protéine de l'hémolymph (<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'hémocoel (compartiment contenant l'hémolymph équivalent du sang chez les mammifères) et régurgitent leur symbionte *Photorhabdus* directement dans l'hémolymph (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 (environ 14 jours, données laboratoire). Chaque IJ donnera un adulte hermaphrodite capable de s'auto-reproduire. La croissance de la bactérie dans l'hémolymph 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'hémolymph 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 fournit 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-bactérien 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 *stlA* 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 apparaît 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 nématode-bactérie 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, entraîne 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'hémolymph de l'insecte, *Photorhabdus* se retrouve en contact avec les composants immunitaires de l'hémolymph (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'hémolymph 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'aminarabinose 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.