

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'hémolymphé. 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 ($> 250 \mu\text{g/ml}$ soit plus de 125 fois la dose inhibitrice, communément admise, de polymyxine B contre les entérobactéries ($2 \mu\text{g/mL}$)). 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 sous-populations 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 (Mg^{2+} , 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 *pmrFHIJKLM*) 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 du LPS chez *P. luminescens*. La régulation de *pbgPE* 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 vu 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 *Xenorhabdus/Photorhabdus*?

Chapitre II :

Analyse des sous- populations

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'hémolymphé (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 µL par puits. On dépose dans tous les puits 100 µL de LB, la polymyxine B est ajouté dans le premier puits (100 µL) à une concentration finale de 250 µg/mL, la colistine à 20 mg/mL, les cécropines A et B et la cécropine A isolée à partir de *Spodoptera frugiperda* à 50 µg/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 µL 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 Ca^{2+} sans Mg^{2+}) 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 Mg^{2+} sans Ca^{2+}) 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 1 μ g/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 μ L. 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 ($\mu\text{g/mL}$) (minimal inhibitory concentration)				
	colistin	Cecropin A	Cecropin B	Cecropin A (<i>S. frugiperda</i>)	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 entraînant 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 ($>125 \mu\text{g/mL}$) 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 $1-3 \mu\text{g/mL}$ 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 $0,5 \mu\text{g/mL}$ 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 $2 \mu\text{g/mL}$ (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 apparaît comme résistante, les mutants comme sensible (*pbgE*) 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

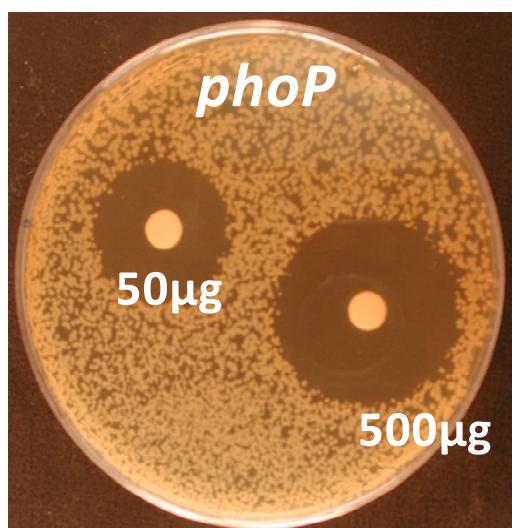
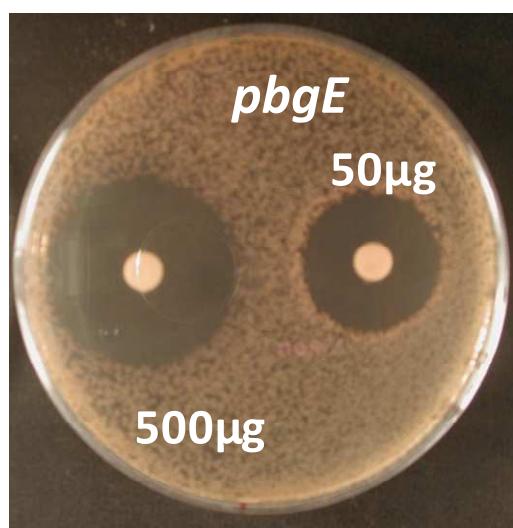
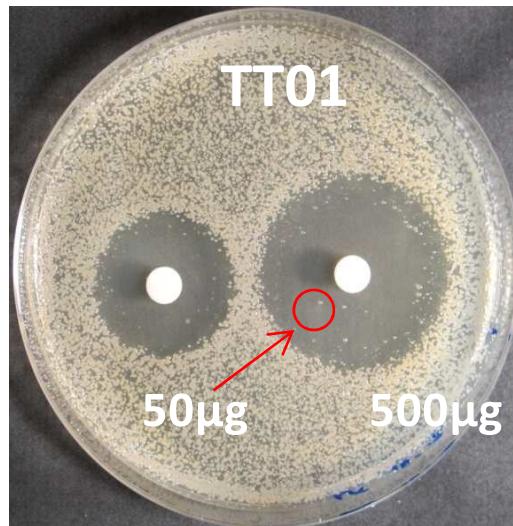


Figure 19 : Présence de deux sous-populations chez la souche sauvage TT01. Dans le cercle rouge : clone capable de pousser en présence de polymyxine B. Les quantités sur les figures correspondent à la dose de polymyxine B déposée sur le filtre au centre du halo.

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 persistantes 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*

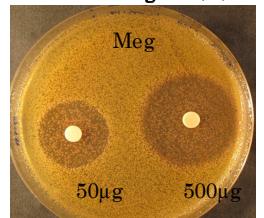
Le tableau figure 20 regroupe toutes les données sur différentes souches de *Photorhabdus* prises au sein des 3 espèces les plus décrites. Plusieurs profils sont retrouvés au sein du genre *Photorhabdus*. Nous avons nommé 3 profils d'état bactérien (voir photos figure 20): le profil homogène sensible (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

SOUCHE		Nématode associé	CMI	Antibiogramme	CFU	TL ₅₀ (heures)
			Conc. µg/mL	500 µg	%R	<i>S. littoralis</i>
XLNach	<i>P.t.temperata</i>	<i>H. megidis</i>	62.5-125 µg/mL	R	ND	175 h
Meg	<i>P.t.khanii</i>	<i>H. megidis</i>	> 125 µg/mL	H	6.15%	42 h
T327t	<i>P.t.tasmaniensis</i>	<i>H. zealandica</i>	> 125 µg/mL	H	3.7%	ND
CIP108428t	<i>P.l.khayaii</i>	<i>H. bacteriophora</i>	> 125 µg/mL	H	0.04%	40 h
FRG04t	<i>P.l.akhurstii</i>	<i>H. indica</i>	> 125 µg/mL	H	0.73%	37 h
Hbt	<i>P.l.luminescens</i>	<i>H. bacteriophora</i>	> 125 µg/mL	H	0.19%	28 h
Au9802892t	<i>P.as.australis</i>	Patients humains	> 125 µg/mL	R	74.62%	49 h
US3105/77	<i>P.as.asymbiotica</i>	Patients humains	1 µg/mL	S	0%	120 h
AU9802336	<i>P.as.australis</i>	Patients humains	> 250 µg/mL	H	ND	49 h
AUSN98-1	<i>P.as.australis</i>	Patients humains	> 250 µg/mL	R	ND	ND
AU 9802397	<i>P.as.australis</i>	Patients humains	> 250 µg/mL	R	ND	26 h
US 1216/79	<i>P.as.asymbiotica</i>	Patients humains	> 250 µg/mL	H	ND	ND
US 2407/88	<i>P.as.asymbiotica</i>	Patients humains	> 250 µg/mL	H	ND	ND
US 3265/86t	<i>P.as.asymbiotica</i>	Patients humains	> 125 µg/mL	H	ND	33 h
JP 163	<i>P.as.asymbiotica?</i>	Non identifié	> 250 µg/mL	H	ND	ND
JP 40	<i>P.as.asymbiotica?</i>	Non identifié	62.5-125 µg/mL	H	ND	ND

Profil homogène sensible (S)



Profil hétérogène (H)



Profil homogène résistant (R)



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 >125 μ g/mL. La souche XLNach en revanche a un profil R avec une CMI entre 62.5 et 125 μ g/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 apparaît 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 homogène 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* CS03 est avirulente pour l'insecte avec une CMI <1 μ g/mL et 0% de sa population résistante aux CAMPs. En revanche, la souche *X. hominickii* KR01 a une CMI >125 μ g/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 μ g/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 virulents 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.

			CMI	Antibiogramme	CFU	TL ₅₀ (heures)
SOUCHE		Nématode associé	Conc. µg/mL	500 µg	%R	<i>S. littoralis</i>
KRO1	<i>X.hominickii</i>	<i>S. sarii</i>	> 125 µg/mL	H	34.76%	175
Q58t	<i>X.beddingii</i>	<i>Steinernema sp</i>	> 125 µg/mL	H	0.94%	175 h
VN01	<i>Xenorhabdus sp.</i>	<i>S. sangi</i>	> 125 µg/mL	H	0.04%	50 h
DSM16342	<i>X.budapestensis</i>	<i>S. bicornutum</i>	> 125 µg/mL	S	0%	90 h
Si	<i>X.bovienii</i>	<i>S. intermedium</i>	> 125 µg/mL	H	0.18%	27 h
Q1	<i>X.miraniensis</i>	<i>Steinernema sp</i>	> 125 µg/mL	H	0.02%	175 h
PR06-A	<i>X.romanii</i>	<i>S. puertoricense</i>	0.98 µg/mL	S	0%	175 h
CS03	<i>X.bovienii</i>	<i>S. weiserii</i>	0.98 µg/mL	S	0%	175 h
VC01	<i>X.mauleonii</i>	<i>Steinernema sp</i>	> 125 µg/mL	H	6.81%	175 h
DSM17382	<i>X.indica</i>	<i>S. thermophilum</i>	> 125 µg/mL	H	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 apparaît 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 difféntiellement 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_{PI}* semble avoir un rôle dans la résistance au sérum chez *Photorhabdus* alors que les rôles de *ail1_{PI}* 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.

1	50	
Photo	.MRILIVEDN MLLRHHLTVQ LRDGTGHLVDA AANAKEADYY LVESEPDIAI	
Ypestis	.MRVLVVEDN ALLRHHLTVQ MREMGHQVDA AEDAKEADYF LQEHPDIAI	
Yenterocolitica	.MRVLVVEDN ALLRHHLTVQ MREMGHQVDA AEDAKEADYF LQEHPDIAI	
Erwinia	.MRVLIVEDN PLLRHHLAVQ LREMGHQVDA AEDAKEADYF LNEHTPDITL	
STyphimurium	MMRVLVVEDN ALLRHHLKVQ LDQDSGHQVDA AEDAREADYY LNEHLPDIAI	site actif de REC
Sindica	.MRVLVVEDN ALLRHHLKVQ LDQDSGHQVDA AEDAREADYY LNEHLPDIAI	
Consensus	.MR!L!VEDN aLLRHHL.VQ \$r#.GHqVDA Ae#AkEADY% LnEh.PDIai	
51	100	
Photo	VDLG IPGEDG LSLIRRWRQK DEKLPILVLT ARESWQEKT VLDAGADDYV	
Ypestis	IDLG IPGEDG LSLIRRWRSH QENLPILVLT ARESWQDKVA VLEAGADDYV	
Yenterocolitica	IDLG IPGEDG LSLIRRWRSH QTNLPILVLT ARESWQDKVA VLEAGADDYV	
Erwinia	VDLG IPGEDG MTLIRRWRQ EVRQPILVLT ARDGWQAKVE ALEAGADDYV	
STyphimurium	VELGIPGEDG LSLIRRWRSS DVSLPVLVLT AREGWQDKVE VLSSGADDYV	phosphorylation site D52
Sindica	VELGIPGEDG LSLIRRWRSS DVSLPVLVLT AREGWQDKVE VLSSGADDYV	recon. intermoleculaire
Consensus	!DLGLPdEDG \$eLIRRWRs. #v.lP!LVLT AR#gWQdkVe vL.aGADDYV	
101	150	
Photo	TKF FHLEEEII ARMOALLRRN NGLVSQIIIF PPFKIDLSRK EFTVYGESVK	
Ypestis	TKF FHLEEVVI ARMOALMRRN IGLASQIIEL PPFQIDLSRR ELCVNQQI	
Yenterocolitica	TKF FHLEEVVI ARIQALMRRN IGLASQIIIF PPFQIDLSRR ELCVNQQI	
Erwinia	TKF FHIEEVV ARLQALMRRN CGLASQIITL QPFQVDSLRR ELTINDRQIK	
STyphimurium	TKF FHIEEVVM ARMOALMRRN SGLASQVINI PPFQVDSLRR ELSVNEEVIK	interface de dimérisation
Sindica	TKF FHIEEVVM ARMOALMRRN SGLASQVINI PPFQVDSLRR ELSVNEEVIK	
Consensus	TKPFH!EE!. AR\$QAL\$RRN .GLaSQ!I.. pPFg!DSLrR El.!n.e.!K	
151	200	
Photo	LTAFFEYRIIE ILMCNSDKVV TKESLMRQLY PDAELREGHS IDVLI	
Ypestis	AFFEYRIIE TLIRNAGKVV SKDTLMLQLY PDAELRESHT IDVLM	
Yenterocolitica	LTAFFEYIIIE TLIRNAGKVV SKDTLMLQLY PDAELRESHT IDVLM	
Erwinia	LTAFFEYIIIE TLIRNAGKVV SKDSLMLQLY PDAELRESHT IDVLM	
STyphimurium	LTAFFEYTIME TLIRNNGKVV SKDSLMLQLY PDAELRESHT IDVLM	
Sindica	L.....	domaine de liaison ADN
Consensus	Ltafey.iie .l...n..kvv .k..lm.qly pdaelre.h. idvl.grlrk	
201	224	
Photo	KILDIWPYEA IVTVRGQGYR FDV.	
Ypestis	KLLAEHQEV ITTIRSQGYR FDVN	
Yenterocolitica	KLLAEHEGEV ITTIRQGYR FDAN	
Erwinia	KIQAEEHAQEV ITTVRGQGYR FDL.	
STyphimurium	KIQAQYPHDV ITTVRGQGYL FELR	Q Mutation PhoP constitutif
Sindica	
Consensus	k.....e. i.t.rgggyr fd..	

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.

Construction des fusions P_{pbgPE} - gfp [AAV] et P_{pbgPE} - gfp [mut3]

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 amores listées en annexe Table 2 contenant les amores *KpnI* et *XbaI* 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_{pbgPE} - 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' dipyridyl 0.2 mM, EDTA 50 μ M et glucose 1%). Soit en milieu minimum M9 supplémenté de Kanamycine et de MgSO4 à différentes concentrations (10 μ M et 10 mM). Puis, la plaque est mise à incuber à 28°C pour 45 heures avec agitation dans un lecteur de microplaques Infinite (TECAN). L'absorbance à 600 nm et l'intensité de la fluorescence de la GFP (excitation à 485 \pm 4.5 nm; émission à 520 \pm 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 dipyridyl 0,2 mM et sur milieux nutritif avec ACP 50 mM ou 2'-2 dipyridyl 0,2 mM + polymyxine B 100 μ g/mL. Le même protocole a été réalisé sur des milieux minimum M9 supplémentés avec différentes concentrations en MgSO4 (inductrices 10 μ M 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

	1		50			
Salmonella	.MNKFARHFL	PLSLRVRFL	ATAGVVLVLS	LAYGIVALVG	YSVSDKTTF	T Mutation const.
Photorhabdus	...MLKHKKQ	PFSLRTRFLM	ATAAVILALT	MSYGIVAIVG	YLVSDKTKAY	PhoQ senseur
Yp	...MLRKNNK	PFSLRARFLM	ATAGVILALS	LSYGMVAVVG	YIVSFDKSTF	
Ye	...MFRNTNSK	PFSLRARFLM	ATAGVILALS	LSYGMVAVVG	YIVSFDKNTF	
Yep	VAMVVG	YIVSFDKNTF
Erwinia	MINFSSRRKK	PFSLRIRFL	ATAAVVLTMS	LSYGMVAVVG	YVVSFDKNTY	
Consensus	pfslr.rfl	ata.v.l.ls	lsyg.vavVG	Y.VSFDK.t%	
	51		100			
Salmonella	RLLRGESENLF	YTIAKWWNNK	ISVELPENLD	MQSPTMTLIY	DETGKLLWTQ	
Photorhabdus	TLLRSQSNLF	FSLAQWNNNQ	LDISVPPNFT	LNNPSLVLIIY	NNKGAILWRQ	
Yp	RAHRGESNLF	FSLAQWHHNK	LSISVPPELE	LNVPSLVLIIY	DKDGNILWRQ	
Ye	SAHRGESNLF	FSLAQWHDNK	LSISVPPELE	LNIPTLVLIY	DKDGNILWRQ	
Yep	SAHRGESNLF	FSLAQWHDNK	LSISVPPELE	LNIPTLVLIY	DKDGNILWRQ	
Erwinia	RVLRSESNLF	FTIAKQWDDE	LTIVQPEHMT	LNFPALVFIY	DDSGKLIWQQ	
Consensus	r.1Rg#SNLF	%sLAqW.##k	ls!svPp.1.	\$.#.P.\$vliY	#..G.ilWrQ	
	101		150			
Salmonella	RNPWLKISI	QPEWLKTNGF	HEIETNVDAT	STLLSEDHSA	QEKLKEV..	
Photorhabdus	HHIPKVENSI	PSEWLKDGL	YELDTDLKSS	RDLLKNSANT	QGQLGKLNSL	
Yp	RHVPELESHI	EKSWLQKPGF	YELDTGTHIS	RMMGDNPKA	QDQLKKY...	
Ye	RHVPELESHI	EKSWLQKPGF	YELDTGTHIS	SMMLGDNPKA	QDQLKKY...	
Yep	RHVPELESHI	EKSWLQKPGF	YELDTGTHIS	SMMLGDNPKA	QDQLKKY...	
Erwinia	RDVDIRSKI	QREWLLKKSDF	YEINTNNHTS	REVLGNDRDA	QKKLSDY...	
Consensus	rh!P.les.I	..eWLkk.gf	yEl#T..h.s	r..\$g#...a	Q.qLkky...	
	151		200			
Salmonella	EDDDDAEMTH	SVAVNIYPAT	ARMPQLTIVV	VDTIPIELKR	SYMVWSWFVY	
Photorhabdus	DENEDNELTH	SVSVNRYSAT	AHLPALTIVV	IDTIPQDLQK	TVLWWEWF <color>GY</color>	HAMP
Yp	DDTDSALTH	SVSVNTYAA	SRLPQLTIVV	VDTIPQELQR	TDLVWNWFSY	
Ye	DDTDSALTH	SVSVNTYPAT	SRLPQLTIVV	VDTIPQELQR	SDLVWNWFSY	
Yep	DDTDSALTH	SVSVNTYPAT	SRLPQLTIVV	VDTIPQELQR	SDLVWNWFSY	
Erwinia	DDDGNDFTH	SVAVNRYDAT	LTLPKLTIVV	VDSIPQELQH	SDVVWSWFSY	
Consensus	##.d#..1TH	SVsVN.Y.AT	.r\$PqLTIVV	!DtIPq#Lqr	sdlVW.WFsY	
	201		250			
Salmonella	VLAANLLLVI	PLLWIAAWWS	LRPIEALARE	VRELEDHHRE	MLNPETTREL	
Photorhabdus	VLIANLILVI	PLIWLAAHWS	LRPIKSLIHQ	ISSLEKGERE	KLDENPPTEL	
Yp	VLLANLLLVI	PLLWLAAYWS	LRPIKALASQ	ISQLEKGERE	QLDENPPREL	
Ye	VLLANLLLVV	PLLWLAAYWS	LRPIKALVSQ	ISQLEKGERD	QLDENPPREL	
Yep	VLLANLLLVV	PLLWLAAYWS	LRPIKALVSQ	ISQLEKGERD	QLDENPPREL	
Erwinia	VLLANLLLII	PLLWLAAHWS	LRPIGSLAAQ	VRELEGGSR	TLDPSTPQEL	
Consensus	VLLANLLL!!	PLLWLA.A.WS	LRPIkala.#	!s.LEkgeR#	.L#enpprEL	
	251		300			
Salmonella	TSLVRNLNQL	LKSERERYNK	YRTTLTDLTH	SLKTPLAVALQ	STLRSLRNEK	
Photorhabdus	RGLVRNLNVL	LNNEPNRYTK	YRTTLADLTH	SLKTPLAVALQ	STLRSLRDSK	
Yp	QSLVRNLNIL	LMNERNQRTYTK	YRTTLADLTH	SLKTPLAVALQ	TTLRSLSRTGK	
Ye	QSLVRNLNLT	LTNERQRTYTK	YRTTLSDLTH	SLKTPLAVALQ	TTLRSLSRTGK	
Yep	QSLVRNLNLT	LTNERQRTYTK	YRTTLSDLTH	SLKTPLAVALQ	TTLRSLSRTGK	
Erwinia	KGLVRNLNLL	LDNERQRTYTR	YRTTLSDLAH	SLKTPLAVALQ	STLRSLRGGR	
Consensus	.sLVRNLN.L	L.nER#RYtk	YRTTL.DLTH	SLKTPLAVALQ	STLRSLR.GK	
	301		350			
Salmonella	.MSVSKAEPV	MLEQISRISQ	QIGYYLHRAS	MRGSGVLLSR	ELHPVAPILLD	
Photorhabdus	QMTIQQAEPI	MLEQIGRISQ	QIGYYLHRAS	MRSEHSTIMR	KVSSVPALLD	
Yp	QTTEEEVEPI	MLEQISRISQ	QIGYYLHRAS	MRSEHNVLIR	EIHSVPALLD	
Ye	QTTEEEVEPI	MLEQISRISQ	QIGYYLHRAS	MRSEHNVLIR	EIHSVPALLD	
Yep	QTTEEEVEPI	MLEQISRISQ	QIGYYLHRAS	MRSEHNVLIR	EIHSVPALLD	
Erwinia	NLSIQQAEPI	MLEQISRISQ	QIGYYLHRAS	MQADHHALKR	DLHSVPALLD	
Consensus	q.t!..aEP!	MLEQIsRISQ	QIGYYLHRAS	Mrseh..l.R	e.hsVpaLLD	
	351		400			
Salmonella	NLISALNKVY	QRKGVNISM	ISPEISFVG	QNDFVEVMGN	VLDNACKYCL	
Photorhabdus	SLCSALTKVY	QRKSVSLTL	VSPEITWLGE	KNDFMEVMGN	VLENACKYCL	
Yp	SLYSALNKVY	QRKGITALTL	ISPEVTFGL	KNDFMEVMGN	VLENACKYCL	
Ye	SLCSALNKVY	QRKGVVTL	ISPEVTFGL	RNDFMEVMGN	VLENACKYCL	
Yep	SLCSALNKVY	QRKGVVTL	ISPEVTFGL	RNDFMEVMGN	VLENACKYCL	
Erwinia	SLGSALNKVY	QRKGVVTL	ISPEVIFVG	QNDFMEVMGN	VLDNACKYCL	
Consensus	sL.SALnKVVY	QRKg!.lt\$D	!SPE!tflGE	NDPfEMVMGN	VL#NACKYCL	

Figure 22 : Alignement des protéines PhoQ de plusieurs entérobactéries des genres *Salmonella*, *Typhimurium*, *Yersinia* (*pestis*, *enterocolitica*, *enterocolitica* subsp *paleartica*), *Erwinia* et *Photobacterium*. 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_{PI}* et *ail2_{PI}* sont respectivement 5 fois moins, 15 fois moins et équivalent dans leur expression. Nous confirmons que *pbgP*, *pbgE* (Derzelle *et al.* 2004) et *ail1_{PI}* (Mouammine *et al.* 2014) sont bien des gènes PhoP-dépendant. Il apparaît que l'expression de *pbgE* est certes réduite mais cela semble négligeable en comparaison de l'expression de *pbgP*. Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat

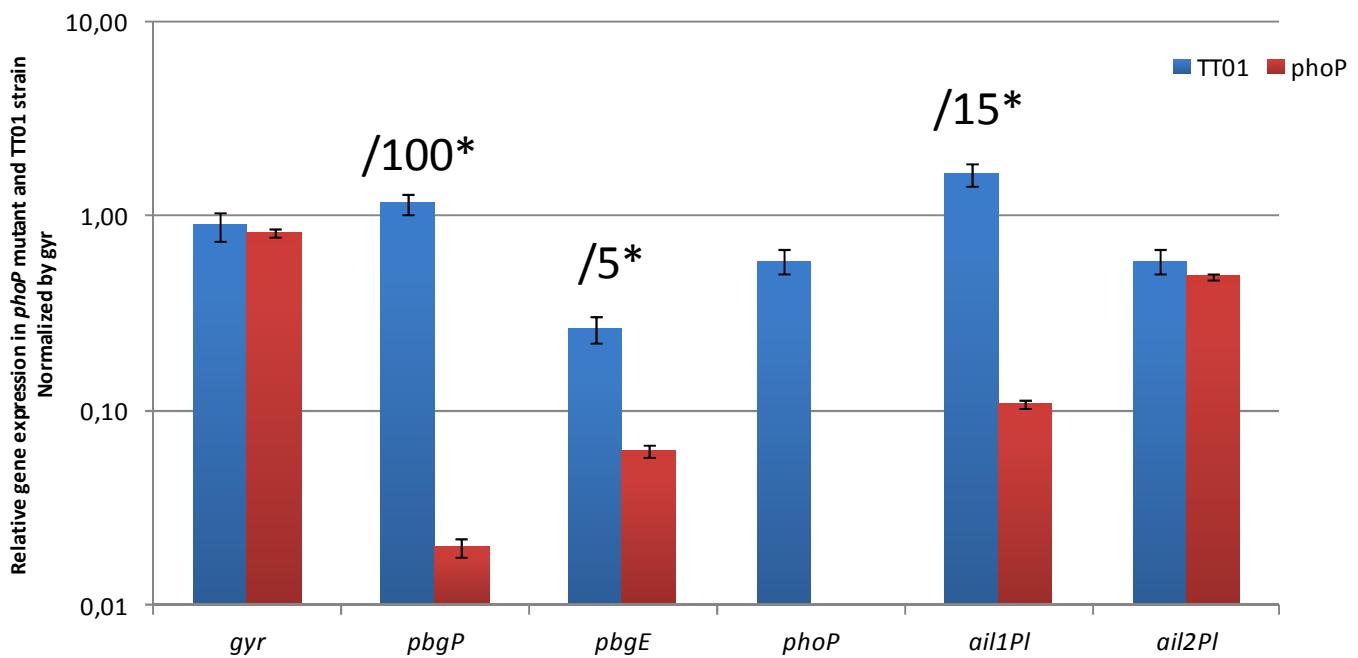


Figure 23 : Identification des gènes PhoP-dépendants par RT-qPCR. Les données présentent l'expression des gènes dans le mutant *phoP* et dans la souche sauvage. Les écarts types représentent les triplicats techniques. Les résultats significatifs (*p* value <0.05) sont annotés avec un astérisque (*). 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 PhoP-dépendante 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_{PI}* en revanche semble indépendante de PhoP chez TT01. Aussi, *ail1_{PI}* 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 *pbgP* 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 dipyridyl 0,2 mM et le MgSO₄ 10 µM. 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

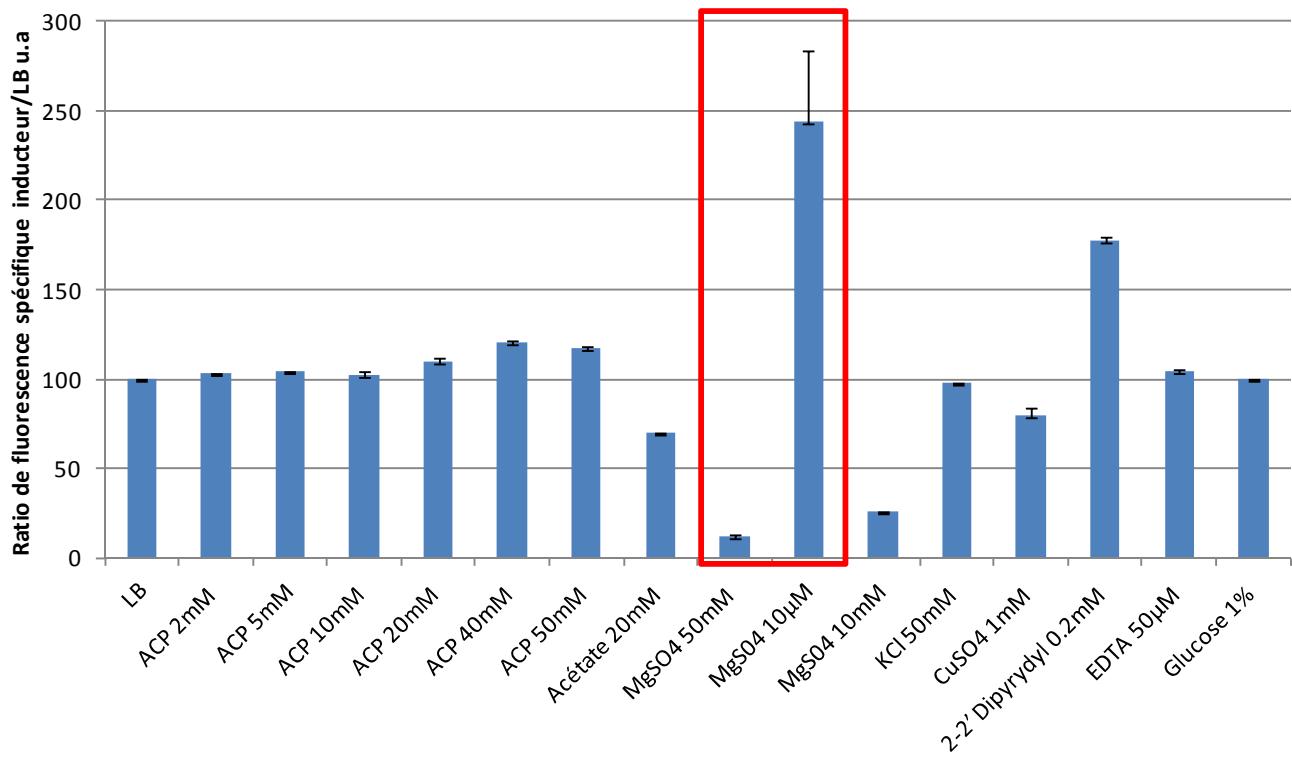


Figure 24 : Recherche d'inducteurs du régulon PhoPQ. L'expression du promoteur *pbgPE* fusionné à la GFP dans la souche TT01 a été mesurée en présence de différents inducteurs dans le milieu LB (sauf pour l'encadré rouge où le milieu utilisé est le milieu minimal M9). Les résultats présentent un ratio 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- dipyradyl n'a pas donné de résultat car il a un effet négatif sur la croissance bactérienne sur boîte 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 µM 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 *Photobacterium* 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

Ail and PagC-related proteins in the entomopathogenic bacteria of *Photobrhabdus* 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 <i>Photobrhabdus</i> genus
Short Title:	Ail/PagC proteins in <i>Photobrhabdus</i>
Corresponding Author:	Sophie Gaudriault Institut National de la Recherche Agronomique, Université Montpellier 2 Montpellier Cedex 05, FRANCE
Keywords:	Ail; PagC; PhoPQ; serum resistance; duplication; <i>Photobrhabdus</i>
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 <i>Photobrhabdus</i> genus. The <i>Photobrhabdus</i> bacteria form symbiotic complexes with nematodes of <i>Heterorhabditis</i> species, associations which are pathogenic to insect larvae. Our phylogenetic analysis indicated that in <i>Photobrhabdus asymbiotica</i> and <i>Photobrhabdus luminescens</i> only Ail and PagC proteins are encoded. The genomic analysis revealed that the <i>Photobrhabdus</i> ail and pagC genes were present in a unique copy, except two ail paralogs from <i>P. luminescens</i> . These genes, referred to as ail1PI and ail2PI, probably resulted from a recent tandem duplication. Surprisingly, only ail1PI expression was directly controlled by PhoPQ and low external Mg ²⁺ conditions. In <i>P. luminescens</i> , 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 <i>Photobrhabdus</i> , we showed that only ail1PI and pagCPI had the ability, when expressed into <i>Escherichia coli</i> , to confer resistance to complement in human serum. However no effect in resistance to antimicrobial peptides was found. Thus, the role of Ail and PagC proteins in <i>Photobrhabdus</i> life cycle is discussed.
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 <i>Photobrhabdus</i> 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

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

2

3 Annabelle Mouammine^{1,2}, Anne Lanois^{1,2}, Sylvie Pages^{1,2}, Bénédicte Lafay^{3,4}, Virginie
4 Molle⁵, Marc Canova⁵, Pierre-Alain Girard^{1,2}, Bernard Duvic^{1,2}, Alain Givaudan^{1,2}, Sophie
5 Gaudriault^{1,2}#

6

7 ¹ INRA, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI),
8 Montpellier, France

9 ² Université Montpellier 2, UMR Diversité, Génomes et Interactions Microorganismes-
10 Insectes (DGIMI), Montpellier, France

11 ³ Université de Lyon, Écully, France

12 ⁴ CNRS, UMR5005 - Laboratoire Ampère, École Centrale de Lyon, Écully, France

13 ⁵ Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques,
14 Universités de Montpellier 2 et 1, CNRS, UMR 5235, Montpellier, France

15

16 **Short title:** Ail/PagC proteins in *Photorhabdus*

17

18 **Key words:** Ail; PagC; PhoPQ; serum resistance; duplication; *Photorhabdus*

19

20 **#Corresponding Author:** Sophie Gaudriault, INRA, UMR Diversité, Génomes et
21 Interactions Microorganismes-Insectes (DGIMI), Université Montpellier 2, CC 54, 34095
22 Montpellier Cedex 05, France; tel: +33 4 67 14 48 12, fax: +33 4 67 14 42 99; e-mail:
23 sgaudriault@univ-montp2.fr

24

25 **Abstract**

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

44

45

46 **Introduction**

47

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

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

70 family is not obvious. Indeed, Ail from *Y. enterocolitica* [5,6,11] and from *Yersinia pestis*
71 [12], Rck from *S. Typhimurium* [6], PagC from *S. enterica* serovar Cholerasuis [13] are
72 responsible for conferring resistance to complemented-mediated killing, but this property is
73 not shared by PagC from *S. Typhimurium*, OmpX from *E. cloacae* or Lom from *E. coli* [6].
74 This discrepancy is probably due to gene annotation, which does not rely on an exhaustive
75 phylogenetic analysis.

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

93

94 *Photobacteriaceae* is an insect pathogen living in a symbiotic association

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

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

120

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

132

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

134 Ail, PagC or OmpX annotated proteins in *Photorhabdus luminescens* TT01 (plu1967,
135 plu2480, plu2481) and *Photorhabdus asymbiotica* ATCC43949 (PAU_02047 and
136 PAU_02601) were identified and retrieved using the protein family analysis tool PipeAlign
137 [38]. Outputs were pooled and resulting dataset were curated for protein multiple occurrences.
138 The sequences were aligned using ClustalW [38] followed by manual curation. The sequence
139 alignment was generated by Gblocks [39] and unambiguously aligned amino acid sites were
140 retained for phylogeny inference using the maximum likelihood method implemented in
141 PhyML [40]. Analyses were engendred under the LG model of amino acid replacement [41]

142 with a gamma distribution of evolutionary rates across sites [42]. Internal branch supports
143 were evaluated using the approximate Likelihood Ratio Test [43].

144

145 **Molecular techniques and RNA preparation**

146

147 DNA manipulations were carried out as previously described [44]. Plasmids were introduced
148 into *E. coli* WM3064 (Table 1) by transformation and transferred to *P. luminescens* TT01 by
149 filter mating [45]. All constructs were sequenced by Eurofins MWG Operon (Ebersberg,
150 Germany). Total RNA was extracted with TRIzol reagent according to manufacturer's
151 instructions (Invitrogen) and purified using RNeasy miniprep kit (Qiagen), including a DNase
152 I treatment step. For each RNA preparation, we assessed DNA contamination by carrying out
153 a control PCR. The quantity and quality of RNA were assessed with a NanoDrop 2000
154 spectrophotometer (Thermo Scientific) and an Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000
155 Nano LabChip kit (Agilent), respectively. Material for real-time quantitative polymerase
156 chain reaction (RT-qPCR) analysis was prepared by extracting total RNA from the
157 *P. luminescens* wild-type strain and the *phoP* mutant grown in Luria broth (OD₅₄₀=0.5-0.8).
158 The gene expression level was evaluated during the growth phase.

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/μl) (Applied Biosystems). We then carried out qPCR in triplicate with the
165 LightCycler 480 SYBR Green I Master kit from Roche Diagnostics, with 1 μl of cDNA

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

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

191 incubated during 45 min with shaking at 4°C. The fraction was centrifuged at 500 x g during
192 2 min at 4°C and wash 5 times with wash buffer. Protein was eluted twice in 1 ml elution
193 buffer (Tris 5 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, glycerol 10%, Imidazole 200 mM). Concentration
194 of recombinant protein was assessed by Bradford assay and controlled by SDS-PAGE gel.
195 Recombinant proteins were conserved at -80°C until use.

196

197 **Electrophoretic mobility-shift assays**

198

199 The promoter of *ail1_{Pl}* was PCR-amplified from the genomic DNA of TT01 strain using
200 specific primers (Supplemental Table 1) and purified using the High Pure PCR Product
201 Purification kit (ROCHE). The 5' ends of DNA fragment were labeled using [γ -³²P] ATP and
202 T4 polynucleotide kinase (Promega). Radioactive DNA probe (2000 cpm/ml), 200 ng of
203 poly(dI-dC)-poly(dI-dC) (SIGMA) and different amounts of PhoP-His were mixed with
204 binding buffer (50 mM tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 50 μ g/ml BSA) in a total 20 μ l volume
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
207 (Tris-Borate-EDTA) buffer for 1 h at 100 V. Radioactive species were detected by
208 autoradiography. PhoP-His was activated by *in vitro* phosphorylation with acetyl phosphate
209 as previously described [49].

210

211 **Construction of plasmids expressing *gfp*[AAV] under the control of *ail1_{Pl}* or *ail2_{Pl}*
212 promoters**

213

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

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

223

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

226

227 Wild-type strains carrying either P_{ail1} _{Pl}-*gfp*[AAV], P_{ail2} _{Pl}-*gfp*[AAV] or P_{lac} -*gfp*[AAV]
228 constructs were cultured in black-sided, clear-bottomed 96-well plates (Greiner). For each
229 well, a 1:20 dilution of an overnight culture was added to the M9 minimal medium
230 supplemented with kanamycin and different concentrations of MgSO₄ or to LB medium
231 supplemented with kanamycin. Then, the plates were incubated at 28°C for 45 h with shaking
232 on an orbital shaker, in an Infinite M200 microplate reader (Tecan). Absorbance at 600 nm
233 and GFP fluorescence intensity (excitation at 485 ± 4.5 nm; emission at 520 ± 10 nm) were
234 measured every 30 min. Specific fluorescence was obtained by dividing fluorescence units (at
235 the maximum level of expression) by the absorbance value.

236

237 **Serum-killing assay**

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