

Les gènes PhoP dépendant à activation indirecte: les connecteurs du système
Caractérisation de l'hétérogénéité bactérienne chez la bactérie pathogène d'insectes *Photobacterium* - rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens

Annabelle Mouammine

► **To cite this version:**

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

HAL Id: tel-02794739

<https://hal.inrae.fr/tel-02794739>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

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

Spécialité : **Microbiologie-Parasitologie**

Présentée par **Annabelle MOUAMMINE**

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

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

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

Spécialité : **Microbiologie-Parasitologie**

Présentée par **Annabelle MOUAMMINE**

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

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

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

- Remerciements -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A tous ceux que j'aime

Sommaire

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

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

Rôle de <i>Photorhabdus</i> dans la croissance et le développement du nématode	38
Transmission de <i>Photorhabdus</i> à de nouveaux IJs	39
C-L'interaction pathogène bactérie-insecte	40
Objectifs de la thèse/introduction du sujet	42
Chapitre II : Analyse des sous populations	45
I- Introduction	46
II- Matériel et Méthode	47
III- Résultats et discussion	49
Mise en évidence de la sous population résistante	49
Persistance ou résistance ?	50
L'hétérogénéité phénotypique de la résistance chez <i>Photorhabdus</i>	50
L'hétérogénéité phénotypique de la résistance chez <i>Xenorhabdus</i>	51
Conclusion	52
Chapitre III : Le régulon PhoP	53
I- Introduction	54
II- Matériels et Méthodes	55
III- Résultats et discussion	56
Conservation des protéines PhoP-PhoQ	56
Caractérisation des gènes marqueurs appartenant au régulon PhoP	57
Les inducteurs du système PhoPQ chez <i>Photorhabdus</i>	59
Un exemple de régulation PhoP-dépendant : le cas de <i>ail1_{PI}</i> (Article 1)	59
Article 1	60
Conclusion	61
Chapitre IV : Rôle de PhoP dans l'hétérogénéité de la population	62
I- Introduction	63
II- Matériel et Méthode	63
III- Résultats	67
Article 2	68
IV- Données complémentaires sous forme de résultats-discussion	69

A-Introduction	69
B-Recherche du mécanisme responsable de l'hétérogénéité.....	69
L'hypothèse autour de la boucle de rétroaction positive de PhoP	69
L'hypothèse d'une déficience traductionnelle	70
L'hypothèse d'une déficience post-traductionnelle.....	70
L'émergence de la sous-population résistante nécessite la présence du site de Phosphorylation sur PhoP	71
PhoQ responsable de l'hétérogénéité ?	72
Hypothèse vraisemblable : un problème en cis dans la région en amont de <i>pbgPE</i> ..	72
L'hypothèse génétique de mutation ou variation de phase	73
L'hypothèse de la méthylation du promoteur <i>pbgPE</i>	74
Caractérisation de la région promotrice de <i>pbgPE</i>	76
Conclusion/perspectives	77
Références.....	81
Annexes	

Liste des figures et tableaux non intégrés aux articles.

Tableaux

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

Tableau 2: Hétérogénéité des populations au sein du genre *Xenorhabdus*

Figures

Figure 1 : Les différentes classes d'histidines kinases

Figure 2 : Les différentes classes de régulateurs transcriptionnels

Figure 3 : Les différents inducteurs du régulon PhoP décrits

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

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

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

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

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

Figure 9 : L'immunité chez les insectes

Figure 10 : Les PAMs d'insectes

Figure 11 : Les différents modes d'action des CAMPs

Figure 12 : Le système AcrAB/TolC

Figure 13 : Les différentes modifications du LPS et leur régulateur

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

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

Figure 16 : Le modèle ON-OFF des gènes *pap*

Figure 17 : Phylogénie des différentes espèces de *Photorhabdus*

Figure 18 : Cycle biologique de *Photorhabdus*

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

Figure 20: Hétérogénéité des populations au sein du genre *Photorhabdus*

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

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

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

Figure 24 : Recherche d'inducteurs du régulon PhoPQ

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

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

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

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

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

Figure 30 : *ail1_{PI}* est transcrit dans toutes les cellules de TT01

Figure 31 : Spotting des souches TT01 et *phoP* complétée par les constructions pBB-*Pail1_{PI}*-*pbgPE* en condition avec ou sans polymyxine B

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

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

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

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

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

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

Figure 38 : Identification des sites d'initiation de la transcription pour les gènes *ailI_{PI}*, *pbgP*

Figure 39 : Schéma bilan de la thèse

Chapitre I :

Introduction

générale/introduction

du sujet

Introduction générale

I- Les Systèmes à deux composantes

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

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

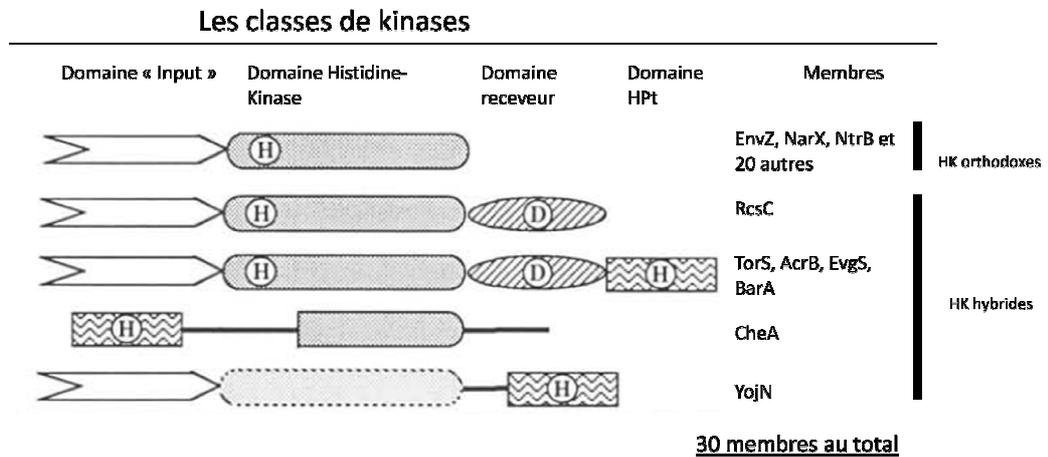
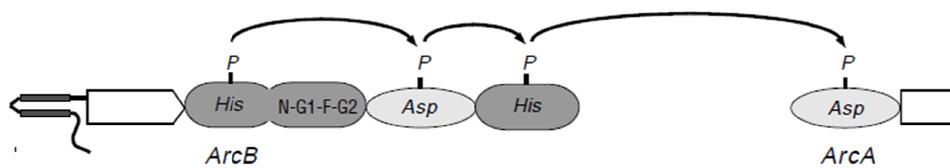
A**B**b) *E. coli* Anoxic Redox Control

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

A- Les Histidines kinases (HK)

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

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

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

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

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

Les Régulateurs Transcriptionnels

Familles	Domaine receveur	Domaine « Output »	Membres
CheY			CheY
OmpR			PhoB, f227, KdPD, TorR, PhoP, RstA, f239, BaeR, o219, ArcA, OmpR, CpxR, BasR, CreB
NarL			FimZ, NarL, UvrY, RcsB, EvgA, NarP, UhpA
NtrC			AtoC, f444, NtrC, HydH
Autres-A			o226, YidG
Autres-B			YehT, o244
Autres			CheB, RssB

32 membres au total

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

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

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

B- Les Régulateurs transcriptionnels (RR)

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

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

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

La famille OmpR

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

La famille NarL

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

La famille NtrC

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

Conclusion

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

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

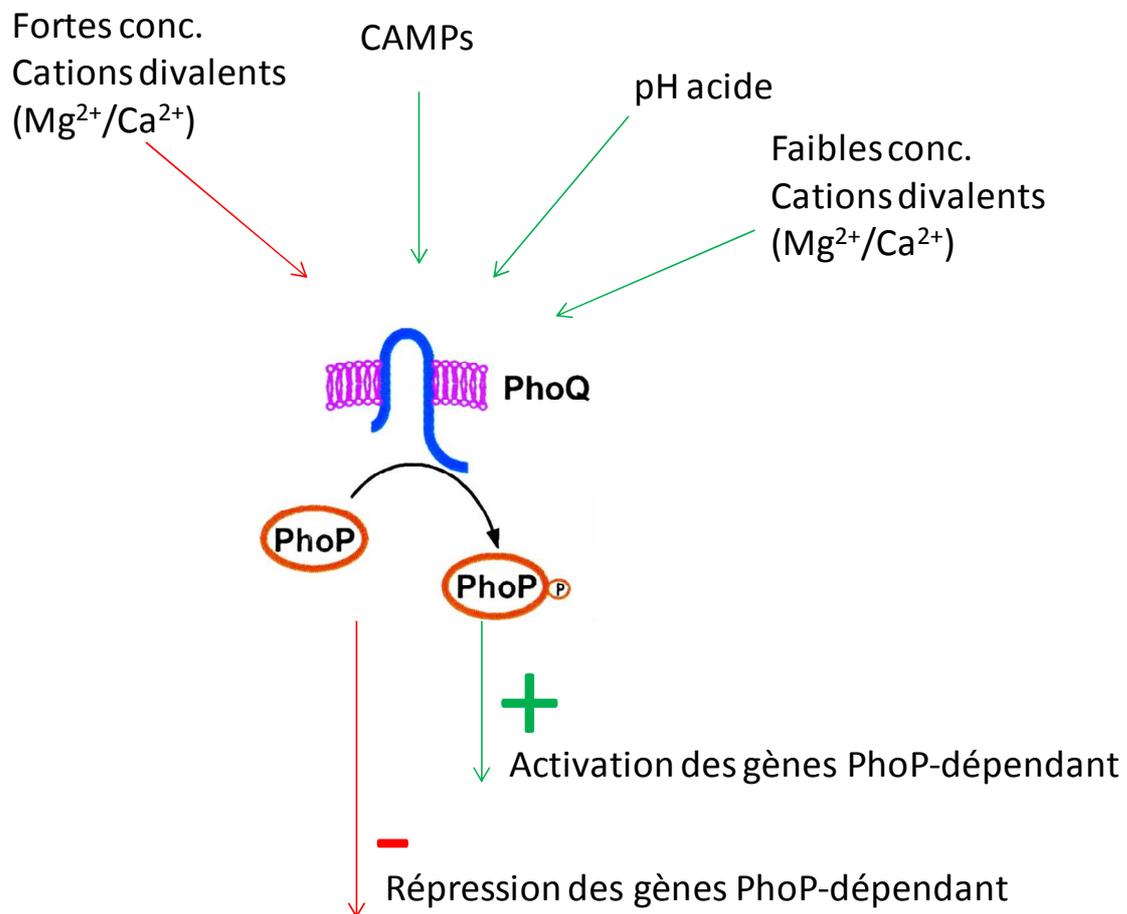


Figure 3 : Les différents inducteurs du régulon PhoP décrits : certains sont actifs *in vivo* (pH acide, CAMPs), d'autres *in vitro* (Mg^{2+}). Adapté de (Groisman 2001).

II- Le TCS PhoP-PhoQ

PhoP-PhoQ régule de nombreuses activités cellulaires dans de nombreuses espèces de bactéries Gram négatives. Bien que PhoP régule l'adaptation aux milieux carencés en Mg^{2+} , il tire son nom « pho » du premier rôle identifié de ce locus chez *S. Typhimurium* dans la régulation d'une phosphatase acide non spécifique (Kier, Weppelman, et Ames 1979). De même, PhoP ne doit pas être confondu avec deux autres TCS, PhoB-PhoR et PhoP-PhoR, impliqués dans la régulation de l'adaptation aux milieux carencés en phosphate chez *E. coli* et *B. subtilis* respectivement (Wanner 1995 ; Hulett 1996). C'est dans la fin des années 1980 que PhoP-PhoQ a été pour la première fois décrit comme ayant un rôle dans la virulence chez *Salmonella sp.*, depuis il a été démontré que PhoP régule également la virulence chez d'autres bactéries Gram négatives comme *Yersinia sp* (Oyston *et al.* 2000), *Erwinia* (Flego *et al.* 2000), *Photobacterium luminescens* (Derzelle *et al.* 2004), et *Dickeya dadantii* (Costechareyre *et al.* 2013)

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

A- Les inducteurs du système

Plusieurs signaux sont capables de spécifiquement réguler le passage de PhoQ de sa forme kinase à sa forme phosphatase et inversement comme les cations divalents (Ca^{2+} , Mn^{2+} et surtout Mg^{2+}), le pH et les concentrations sub-optimales en peptides antimicrobiens (figure 3).

Le cas des cations divalents : l'exemple du Magnésium

Les cations divalents agissent généralement comme messagers secondaires ou co-facteurs. Par exemple, le Mg^{2+} est un stabilisateur de membranes et de ribosomes, et est essentiel pour les réactions nécessitant de l'ATP (Reinhart 1988). Or chez plusieurs bactéries, le Mg^{2+} a été trouvé comme étant le messenger principal de la cascade de transduction du signal PhoP-PhoQ, *S. Typhimurium* (García Véscovi, Soncini, et Groisman 1996), *Yersinia* (Flamez *et al.* 2007), *Erwinia* (Llama-Palacios *et al.* 2003), par exemple. PhoP-PhoQ répond à la présence de plusieurs cations dans l'environnement comme le Mn^{2+} , le Ca^{2+} et le Mg^{2+} (García Véscovi, Soncini, et Groisman 1996). Il a été démontré chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que de faibles concentrations en Mg^{2+} (de l'ordre du micromolaire) permettaient la transcription de gènes activés par PhoP alors que de fortes concentrations en Mg^{2+} (de l'ordre du millimolaire), réprimaient l'expression des gènes activés par PhoP à un niveau comparable à celui retrouvé dans les mutants *phoP* ou *phoQ* (García Véscovi, Soncini, et Groisman 1996 ; Kato, Tanabe, et Utsumi 1999 ; Soncini *et al.* 1996).

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

Le pH acide.

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

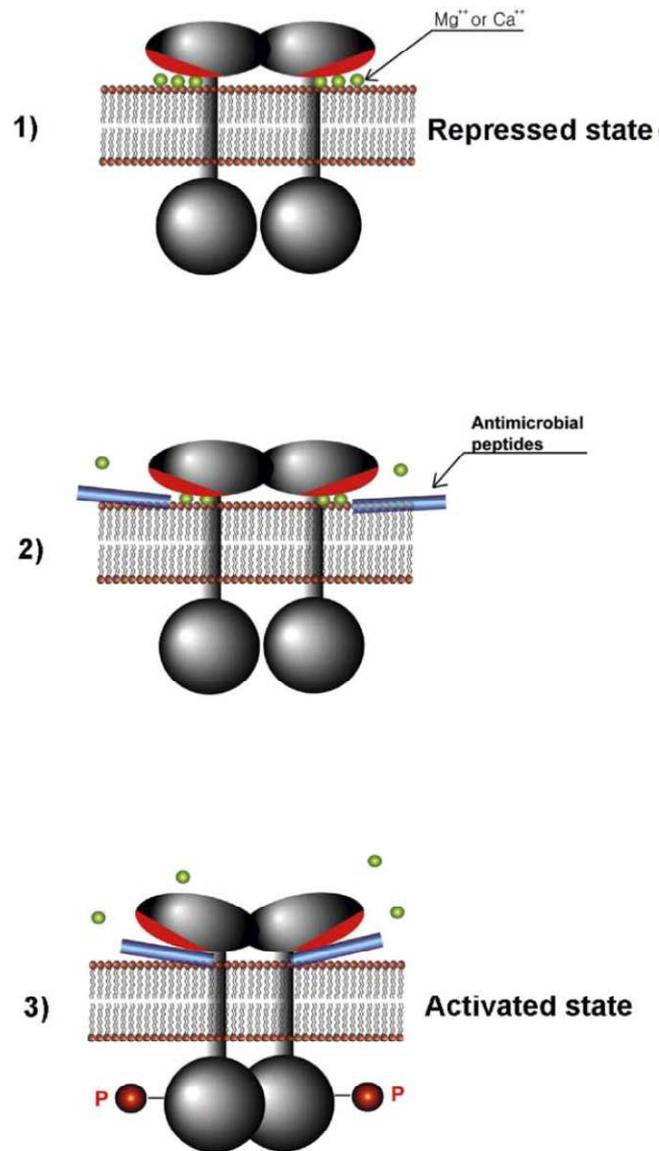


Figure 4 : L'activation de PhoQ par les CAMPs et la compétition avec les cations divalents. 1) les fortes concentrations en cations divalents stabilisent PhoQ dans sa conformation phosphatase. 2) Il y a une compétition entre les CAMPs et les cations divalents pour la fixation sur le domaine senseur de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

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

Le cas des concentrations sub-optimales en PAMs.

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

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

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

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

activateurs de PhoQ, comme le Mg^{2+} , se fixaient sur les mêmes sites que les CAMPs suggérant une compétition entre cations divalents et CAMPs pour activer ou réprimer PhoQ. De même, les CAMPs comme le C18G ou la polymyxine B se fixent sur la surface acide du domaine senseur de PhoQ et cette fixation est dépendante de la concentration avec une saturation pour des concentrations en CAMPs de l'ordre du micromolaire. Le modèle qu'ils proposent permettant d'expliquer comment PhoQ est réprimé par les cations divalents et activé par les CAMPs est le suivant.

De par sa présence proche de la surface cellulaire chargée négativement, PhoQ est à une place de choix pour sentir les CAMPs, surtout qu'il a été montré que de nombreux CAMPs réalisaient des liaisons électrostatique avec les groupements phosphates (négatifs) du lipide A avant de s'insérer dans la membrane (Piers et Hancock 1994). L'hypothèse est donc que le même type d'interactions, qui permet le déplacement du magnésium des groupements phosphates du lipide A, est utilisé par les CAMPs pour déplacer les cations divalents de PhoQ. La liaison des CAMPs sur PhoQ va alors entraîner un changement de conformation du dimère de PhoQ qui va se propager à travers la membrane et avoir pour conséquence le passage de PhoQ de sa forme inactive (phosphatase) à sa forme active (kinase). En effet, alors que la liaison des cations divalents sur PhoQ assurait une certaine stabilité de la région senseur, la fixation des CAMPs, au contraire, va entraîner une distorsion de toute la protéine PhoQ. Les CAMPs se fixant sur le domaine senseur de PhoQ puis sur la membrane environnante vont agir comme un levier pour exposer la surface acide du domaine senseur provoquant la distorsion de la protéine et ainsi les cations divalents qui bloquaient PhoQ dans sa conformation inactive sont relargués. Bien que ce modèle soit valable pour *S. Typhimurium*, on ne peut pas forcément l'appliquer à d'autres modèles bactériens étant donné la plus faible conservation des domaines senseurs des différents PhoQ, contrairement au domaine kinase qui apparaît plus conservé (nos travaux page 52-53). Cependant, il ouvre de nouvelles pistes pour trouver de nouveaux inducteurs de PhoQ chez d'autres modèles. C'est par exemple le cas chez *P. aeruginosa*, où un mutant du gène *phoQ* devient hyper résistant aux CAMPs, alors qu'un mutant du gène *phoP* est sensible aux CAMPs en haut Mg^{2+} et résistant en bas Mg^{2+} ce qui implique qu'en conditions haut Mg^{2+} un autre système intervient pour phosphoryler PhoP (Gooderham et Hancock 2009).

Les mutants indépendants de l'environnement

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

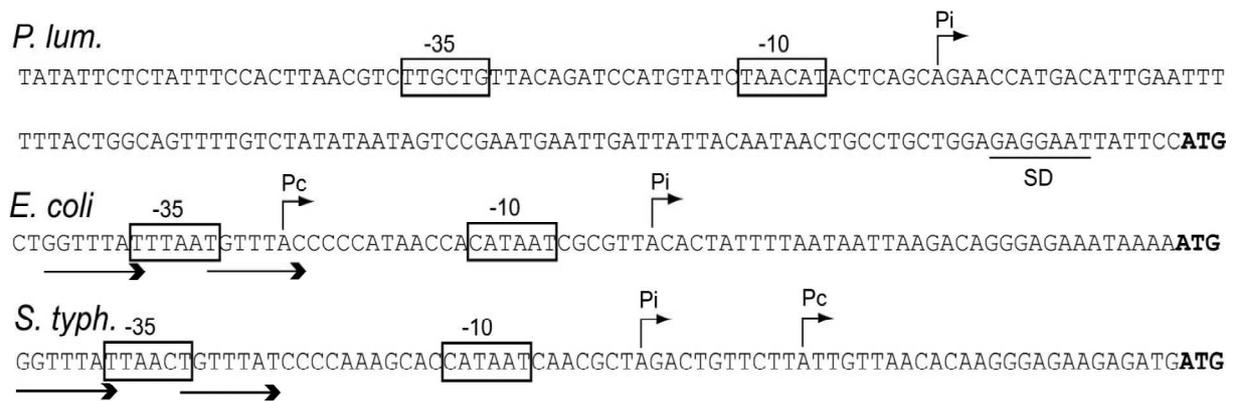


Figure 5 : Séquence des régions promotrice de *phoP* chez 3 entérobactéries modèles. En encadré sont représenté les sites -10 et -35 pour la fixation de l'ARN polymérase. Pi signifie promoteur inductible (Mg^{2+}). Pc : promoteur constitutif permet d'avoir un niveau de base de transcription de *phoP*. SD : séquence shine dalgarno pour la traduction de l'ARNm en protéine. Les flèches représentent les PhoP box identifiées. (Derzelle *et al.* 2004)

Miller 1996). Bien que cet allèle réponde toujours au Mg^{2+} (García Vescovi, Soncini, et Groisman 1996), il est aussi atténué en virulence qu'un mutant *phoQ* (Miller et Mekalanos 1990) ce qui montre la nécessité d'une régulation fine des gènes PhoPQ dépendants. D'autre part il existe un allèle *phoP* désigné PhoP* avec une substitution d'un acide aminé en partie N-terminale. Cette substitution permet la transcription des gènes PhoP-dépendants indépendamment de la kinase PhoQ. En effet, PhoP* va s'autophosphoryler à partir de l'ACP *in vivo* (Chamngpol et Groisman 2000).

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

B- La régulation de PhoP-PhoQ

Régulation temporelle et boucle de rétroaction positive.

Chez *S. Typhimurium*, la régulation temporelle ainsi que les boucles de rétroaction ont été très étudié depuis une dizaine d'années. Par exemple Shin et coll. (Shin *et al.* 2006) ont montré que l'activation du système PhoPQ entraîne une augmentation du niveau d'ARNm des gènes PhoP-dépendants et (i) que cette induction était indépendante du gène étudié ainsi que du signal environnemental (Mg^{2+} , PAMs), (ii) que cette augmentation de l'activité du système PhoPQ était due à une boucle de rétroaction positive : PhoP-Phosphorylé (ou PhoP-P) active sa propre transcription de l'opéron *phoPQ* (Soncini, Vescovi, et Groisman 1995). Chez *Salmonella* et *E.coli*, *phoPQ* est un opéron bicistronique transcrit à partir de deux promoteurs : un promoteur constitutif P_c qui permet un niveau basal de transcription de l'opéron *phoPQ* pour la détection du signal, et un promoteur inductible P_i répondant au bas Mg^{2+} (García Vescovi, Soncini, et Groisman 1996 ; Kato, Tanabe, et Utsumi 1999) (figure 5). En réponse aux stimuli, la quantité de PhoP-P augmente très rapidement (dizaine de minutes) puis diminue pour atteindre un état stable (environ 20-25% du pic). Il a également été montré que cette nette augmentation de l'activité dépendant d'une boucle d'auto-régulation était nécessaire pour la virulence de la bactérie dans le modèle souris. En effet, la capacité de la bactérie à créer une infection létale nécessite qu'elle puisse induire l'expression rapide des gènes activés par PhoP et/ou une inhibition rapide des gènes réprimés par PhoP. La régulation de l'expression du TCS PhoPQ nécessite donc une augmentation rapide et brève dans le temps.

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

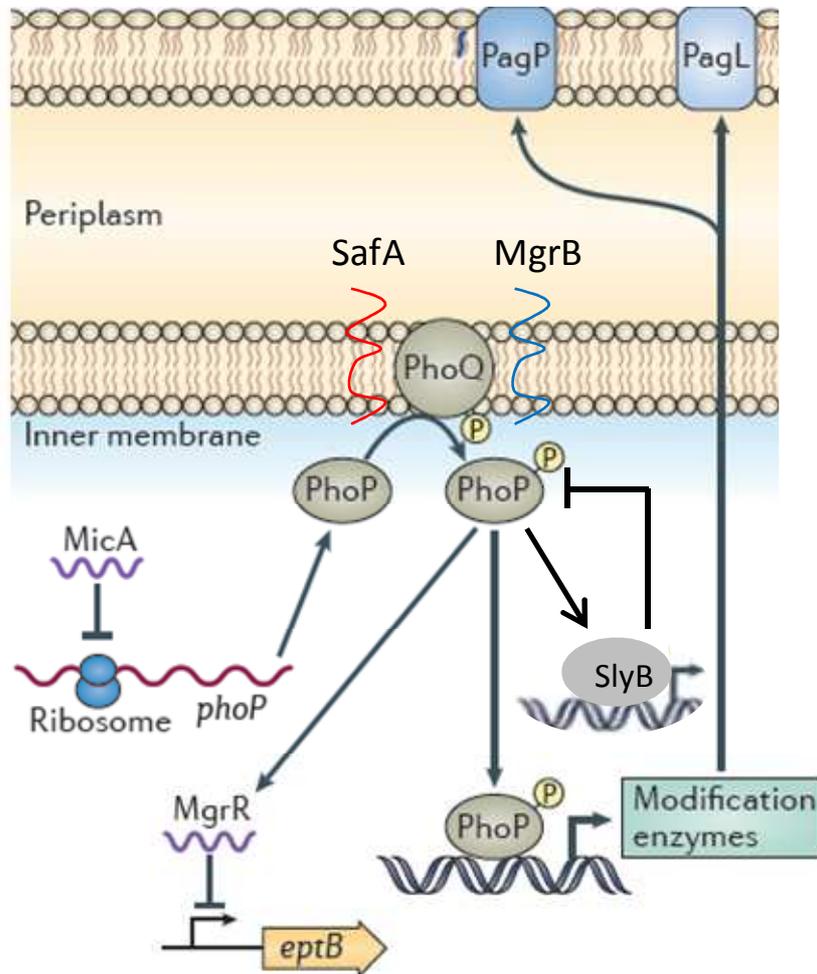


Figure 6 : Représentation schématique de la régulation post transcriptionnelle et post traductionnelle du régulon PhoPQ. De petits ARN (MicA, MgrR) et de petits peptides (SafA, MgrB et SlyB) peuvent réguler la transcription et la traduction de PhoP. D'après Needham et Trent 2013 avec modifications.

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

La régulation post transcriptionnelle/traductionnelle de PhoP

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

De petits peptides transmembranaires sont également capables de réguler l'activité de PhoP (figure 6). Ils peuvent avoir un rôle activateur ou au contraire inhibiteur de l'activité du régulon PhoPQ.

Par exemple, SafA (sensor associating factor A), chez *E. coli*, est un petit peptide dont la région transmembranaire est capable d'interagir avec la région transmembranaire de PhoQ (Eguchi *et al.*

2012). Comme décrit précédemment de fortes concentrations en Mg^{2+} sont capable d'inhiber l'activité kinase de PhoQ pour le garder dans sa conformation phosphatase. Pourtant SafA est capable d'activer PhoQ même en présence de fortes concentrations en Mg^{2+} (Eguchi *et al.* 2012). MgrB peut également agir avec le domaine périplasmique de PhoQ et inhiber son activité kinase (contrairement à SafA) et/ou activer sa fonction phosphatase. Des homologues de MgrB sont retrouvés chez *S. Typhimurium* et *Y. pestis* (Lippa et Goulian 2009). YneN (ou B1500) membre du régulon EvgS/EvgA agit comme connecteur entre ce système à deux composantes et PhoPQ en stimulant l'activité kinase de PhoQ chez *E. coli* (Eguchi *et al.* 2007). Enfin, SlyB est capable de réprimer l'activité de PhoPQ chez *S. Typhimurium* ((Perez *et al.* 2009). Tous ces exemples confirment que l'activité de PhoPQ nécessite une régulation fine et complexe.

C- Le régulon PhoPQ

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

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

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

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

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

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

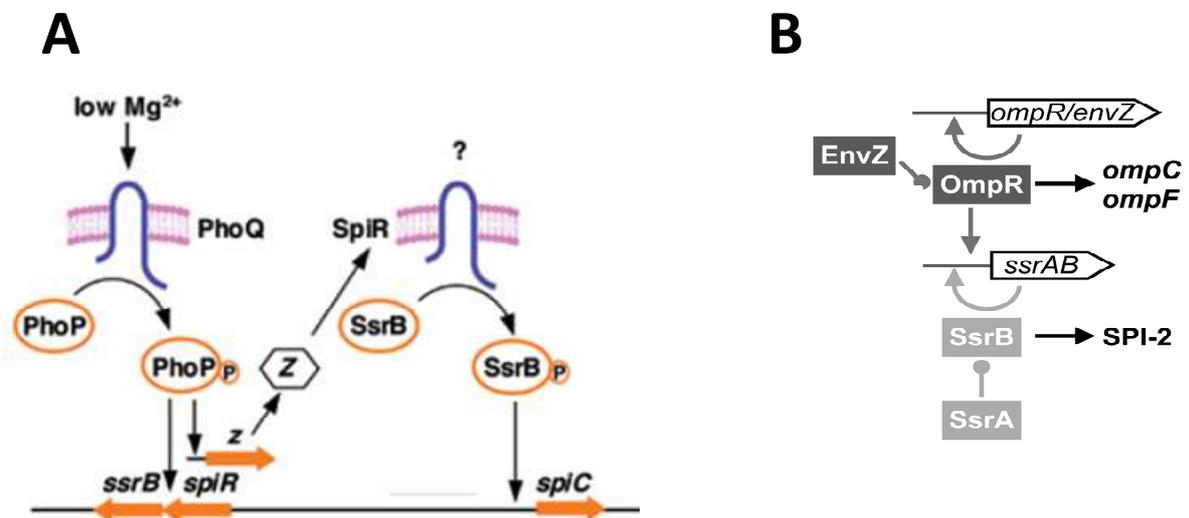


Figure 7 : Un exemple de régulation de gènes PhoP-dépendant de manière indirecte : Les modèles « boolean AND/OR gate ». A : Le modèle « boolean AND gate » l'exemple du système à deux composantes SpiR/SsrB (Kato, Groisman, et Howard Hughes Medical Institute 2008). B : Schéma représentant la régulation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

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

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