



**HAL**  
open science

# MECANISMES DE REGULATION IMPLIQUES DANS LA PATHOGENICITE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA : SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III, EPIGENESE ET QUORUM SENSING

Didier Filopon

► **To cite this version:**

Didier Filopon. MECANISMES DE REGULATION IMPLIQUES DANS LA PATHOGENICITE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA : SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III, EPIGENESE ET QUORUM SENSING. Autre [q-bio.OT]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011459

**HAL Id: tel-00011459**

**<https://theses.hal.science/tel-00011459>**

Submitted on 25 Jan 2006

**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.

*Université Joseph Fourier - Grenoble I*  
*Sciences et Géographie*

## **THESE**

Soutenue publiquement par

**Didier FILOPON**

le 21 décembre 2005

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I**

Discipline : Virologie, Microbiologie, Immunologie

-----

**Mécanismes de régulation impliqués dans la pathogénicité  
de *Pseudomonas aeruginosa* : Système de Sécrétion de  
Type III, Epigénèse et Quorum Sensing**

-----

Composition du Jury

|                              |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| Professeur D. Schneider      | Président             |
| Professeur B. Guery          | Rapporteur            |
| Docteur A. Filloux           | Rapporteur            |
| Professeur D. Haas           | Examineur             |
| Professeur J. Guespin-Michel | Co-directeur de thèse |
| Professeur B Polack          | Co-directeur de thèse |

*Thèse préparée au Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire - GREPI EA 2938 /  
CHU Grenoble et au Laboratoire de Microbiologie Du Froid – LMDF EA 2123 / Evreux*

*Université Joseph Fourier - Grenoble I*  
*Sciences et Géographie*

## **THESE**

Soutenue publiquement par

**Didier FILOPON**

le 21 décembre 2005

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I**

Discipline : Virologie, Microbiologie, Immunologie

-----

**Mécanismes de régulation impliqués dans la pathogénicité  
de *Pseudomonas aeruginosa* : Système de Sécrétion de  
Type III, Epigénèse et Quorum Sensing**

-----

Composition du Jury

|                              |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| Professeur D. Schneider      | Président             |
| Professeur B. Guery          | Rapporteur            |
| Docteur A. Filloux           | Rapporteur            |
| Professeur D. Haas           | Examineur             |
| Professeur J. Guespin-Michel | Co-directeur de thèse |
| Professeur B Polack          | Co-directeur de thèse |

*Thèse préparée au Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire - GREPI EA 2938 /  
CHU Grenoble et au Laboratoire de Microbiologie Du Froid – LMDF EA 2123 / Evreux*





à Andrée et Firmin



Je tiens tout d'abord à remercier Madame le professeur Françoise Morel et Madame le professeur Nicole Orange qui ont accepté de m'accueillir au sein de leur laboratoire respectif.

Un grand merci au professeur Benoît Polack pour son encadrement, sa patience et pour l'ensemble du savoir pratique et théorique qu'il m'a transmis. J'espère qu'il n'aura pas trop souffert de mon flegme légendaire et je n'oublierai pas « qu'à faire et à refaire on n'est jamais sans rien faire »...

Un grand merci également au professeur Janine Guespin pour sa patience, l'ensemble du savoir qu'elle m'a transmis et pour m'avoir fait découvrir et apprécier un nouvel aspect de la microbiologie.

Merci au docteur Annabelle Mérieau pour son encadrement, sa gentillesse, le partage de ses connaissances et pour m'avoir aidé à rapidement m'intégrer à l'équipe du LMDF.

Je tiens aussi à remercier Monsieur le professeur Dominique Schneider pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse.

J'adresse mes remerciements aux professeurs Dieter Haas et Benoît Guery ainsi qu'au docteur Alain Filloux pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Pour leurs conseils, leur soutien et les moments que nous avons partagés, j'adresse un grand merci aux membres du GREPI et du LMDF, en particulier à Lauriane, Danièle, Mariette, Nico, l'équipe Pet'Roll, Gaëlle R et surtout Gaëlle H.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire d'enzymologie et d'hématologie de m'avoir si rapidement intégré au sein de leur équipe.

Enfin et surtout, je voudrais adresser plus qu'un grand merci à mes parents qui ont toujours été là pour moi et sans qui tout cela n'aurait pas été possible.



## Abréviations

|       |  |
|-------|--|
| ADN   | Acide désoxyribonucléique  |
| ADP   | Adénosine diphosphate  |
| ApR   | Résistance à l'ampicilline   |
| ARN   | Acide ribonucléique  |
| ATP   | Adénosine triphosphate   |
| CatR  | Résistance au chloramphénicol  |
| CbR   | Résistance à la Carbénicilline   |
| CDO   | Catéchol Dioxygénase   |
| DMSO  | Diméthylsulfoxyde  |
| dNTP  | mélange de nucléotides triphosphates (ATP, GTP, CTP, TTP)                      |
| DO    | Densité Optique  |
| DR    | Double Recombinant   |
| EGTA  | Acide éthylène glycol-bis( $\beta$ -aminoéthyl éther) N,N,N',N'-tétra-acétique |
| EHEC  | Escherichia coli entérohémorragique  |
| EPEC  | Escherichia coli entéro-pathogène  |
| GFP   | Green Fluorescent Protein  |
| GmR   | Résistance à la Gentamicine  |
| GTP   | Guanosine triphosphate   |
| HBSm  | "Hepes Buffer Saline" modifié  |
| Hepes | Acide hydroxyéthyl-pipérazine-éthane-sulfonique                                |
| IPTG  | isopropyl-beta-D-thigalactopyranoside  |
| kDa   | KiloDaltons  |
| KmR   | Résistance à la kanamycine   |
| LB    | Milieu Luria Bertani   |
| LDH   | Lactate Déhydrogénase  |
| MOI   | Multiplicity of infection  |
| Pb    | Paires de bases  |
| PBS   | Tampon phosphate isotonique "Phosphate Buffer Saline"                          |
| PCA   | Acide perchlorique   |
| PCR   | "Polymérase chain reaction"  |
| PIA   | Pseudomonas isolation agar   |

|          |  |
|----------|--|
| PNN      | Polynucléaires neutrophiles                                |
| p/v      | Poids pour volume  |
| qsp      | Quantité suffisante pour                                   |
| RLU      | Unité de luminescence relative                             |
| rpm      | Rotations par minute                                       |
| SDS      | Sodium dodécyl sulfate                                     |
| SDS-PAGE | Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS |
| SR       | Simple Recombinant   |
| SSTT     | Système de sécrétion de type III                           |
| TAE      | Tampon "Tris-acétate-EDTA"                                 |
| TBE      | Tampon "Tris-borate-EDTA"                                  |
| TCA      | Acide trichloroacétique                                    |
| TcR      | Résistance à la Tétracycline                               |
| TE       | Tampon "Tris-EDTA"   |
| Tris     | Tris(hydroxyméthyl)aminométhane                            |
| U        | Unité enzymatique  |
| UV       | Ultraviolets   |
| v/v      | Volume pour volume   |
| VB       | Milieu Vogel Bonner  |

## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCTION .....   | 1  |
| I. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....   | 3  |
| I-A. Caractéristiques.....   | 3  |
| I-B. Un pathogène opportuniste.....  | 3  |
| I-C. Les facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                    | 5  |
| II. Le système de sécrétion de type III .....  | 12 |
| II-A. Le système de sécrétion de Type III de <i>P. aeruginosa</i> .....                  | 13 |
| II-B. La régulation du SSTT chez les autres bacilles pathogènes à Gram négatif.....      | 27 |
| III. Le Quorum Sensing .....   | 35 |
| III-A. Généralités.....  | 35 |
| III-B. Le quorum sensing chez <i>P. aeruginosa</i> .....                                 | 41 |
| IV. Epigénèse .....  | 48 |
| IV-A. L'épigénèse chez les bactéries : L'exemple de l'opéron lactose chez <i>E. coli</i> | 49 |
| IV-B. Pré requis pour l'épigénèse et utilité de la modélisation .....                    | 51 |
| MATERIELS ET METHODES .....  | 53 |
| I. Plasmides et Souches bactériennes.....  | 55 |
| I-A. La souche de référence du laboratoire : CHA.....                                    | 56 |
| I-B. Culture bactérienne .....   | 57 |
| I-C. Antibiotiques utilisés .....  | 58 |
| I-D. Suivi de croissance et densité bactérienne.....                                     | 58 |
| I-E. Conservation des souches.....   | 58 |
| II. Techniques de biologie moléculaire.....  | 59 |
| II-A. Purification des acides nucléiques.....  | 59 |
| II-B. Préparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> .....                              | 60 |
| II-C. Préparation d'ADN chromosomique de <i>P. aeruginosa</i> .....                      | 60 |
| II-D. Préparation d'ARN de <i>P. aeruginosa</i> .....                                    | 61 |
| II-E. Electrophorèse d'ADN .....   | 61 |
| II-F. Manipulation des fragments d'ADN .....   | 62 |
| II-G. Technique de retard sur gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA)          | 64 |
| II-H. Clonage .....  | 66 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| II-I.  | Transformation.....  | 67  |
| II-J.  | Mutagenèse par échange allélique chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                                | 68  |
| III.   | Culture cellulaire.....  | 71  |
| III-A. | Interaction des bactéries avec des polynucléaires neutrophiles.....                                      | 71  |
| IV.    | Expérimentation animale.....   | 72  |
| V.     | Techniques de biochimie.....   | 73  |
| V-A.   | Préparation des échantillons.....  | 73  |
| V-B.   | Dosage de l'activité enzymatique Catéchol Dioxygénase (CDO).....   | 74  |
| V-C.   | Electrophorèse SDS-PAGE.....   | 75  |
| V-D.   | Analyse des protéines.....   | 75  |
| V-E.   | Mesure de l'activation transcriptionnelle des gènes du SSTT.....   | 77  |
| V-F.   | Analyse du surnageant de culture bactérien.....  | 78  |
|        | PRESENTATION DU TRAVAIL.....   | 79  |
|        | RESULTATS.....   | 83  |
| I.     | Acquisition d'une cytotoxicité dépendante du SSTT par un mécanisme épigénétique.....                     | 85  |
| I-A.   | Modélisation de la régulation du SSTT.....   | 87  |
| I-B.   | Démonstration expérimentale de la modification épigénétique pour l'acquisition d'un SSTT inductible..... | 91  |
| II.    | Régulation de l'expression du Système de Sécrétion de Type III.....                                      | 103 |
| II-A.  | Rôle de la densité cellulaire.....   | 104 |
| II-B.  | Rôle du quorum sensing dans la régulation négative du SSTT.....  | 113 |
| II-C.  | Caractérisation du PARST.....  | 122 |
| II-D.  | Autres partenaires de la régulation du SSTT.....   | 124 |
|        | CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....   | 127 |
|        | BIBLIOGRAPHIE.....   | 137 |
|        | ANNEXES.....   | 155 |
|        | ARTICLE 1.....   | 157 |



# INTRODUCTION



## I. *Pseudomonas aeruginosa*

### I-A. Caractéristiques

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, mobile, capable de se développer dans un large spectre de températures (+4°C à +42°C). Aérobie, cette bactérie peut cependant utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons en croissance anaérobie. *P. aeruginosa* vit à l'état saprophyte dans l'eau, le sol et sur les plantes. Dans son environnement naturel, *P. aeruginosa* peut être trouvée sous sa forme planctonique, mobile ou dans un biofilm, attachée à une surface inerte ou une source de substrat.

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé en 2000. Il s'agit d'un des plus grand génome bactérien connu avec 6,3 méga bases codant 5570 cadres de lectures (Stover *et al.*, 2000). Cette bactérie possède un nombre important de gènes impliqués dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques. Cette diversité lui confère la capacité d'utiliser un grand nombre de composés organiques et ainsi de se développer dans de nombreuses niches écologiques même pauvres en nutriments.

### I-B. Un pathogène opportuniste

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes : hommes, animaux, plantes (D'Argenio *et al.*, 2001; Pukatzki, Kessin, et Mekalanos, 2002; Rahme *et al.*, 1995). Chez l'homme, cette bactérie affecte particulièrement les personnes immunodéprimées, les grands brûlés, les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose. Elle est capable de coloniser une grande diversité de tissus provoquant, entre autres, des bactériémies, ou des infections oculaires, intestinales, ou urinaires. *P. aeruginosa* est également capable de causer des méningites et ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses.

## I B-1. *Pseudomonas aeruginosa* et la mucoviscidose

*P. aeruginosa* est aussi une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Govan et Harris, 1986).

Cette maladie héréditaire autosomique récessive a pour origine la mutation d'une protéine membranaire, CFTR (Cystic Fibrosis Transconductance Regulator), qui joue un rôle dans la régulation des échanges ioniques des cellules avec le milieu extérieur. Sur le plan pulmonaire, l'absence ou le dysfonctionnement de cette protéine provoque un changement de la composition ionique et une diminution de l'hydratation du mucus bronchique. Ce mucus plus visqueux perturbe le phénomène de clairance ciliaire et constitue un terrain plus propice à la colonisation bactérienne (Lyczak, Cannon, et Pier, 2002; Ratjen et Döring, 2003).

Les patients atteints de mucoviscidose développent une infection pulmonaire chronique conduisant à une destruction des tissus pulmonaires par les toxines bactériennes et le relargage du contenu des granules des cellules phagocytaires. Un modèle de pathogénicité suggère deux phases d'infection : l'invasion puis la persistance. Lors de l'invasion initiale du poumon, *P. aeruginosa* exprime une grande quantité de facteurs de virulence neutralisant les défenses immunitaires innées de l'hôte. Ensuite, durant la seconde phase, une fois la zone colonisée, la bactérie adhérerait à l'épithélium et adopterait un phénotype mucoïde. Elle se développe alors sous forme de micro-colonies entourées d'un biofilm composé notamment d'un oligosaccharide, l'alginate. Sous cette forme, *P. aeruginosa* est plus résistante face aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques. La colonisation de la totalité des poumons se ferait ensuite de proche en proche par ressortie d'individus du biofilm et réactivation du cycle d'invasion-persistance avec expression de facteurs de virulence.

Aujourd'hui, à côté des thérapies consistant à diminuer l'inoculum bactérien par des cures d'antibiotiques répétitives, les traitements en développement s'orientent vers deux axes. Ils tentent de perturber ou de détruire le biofilm pour éliminer les colonies déjà installées. En parallèle, ils visent à diminuer la cytotoxicité de la bactérie lors des phases aiguës de l'infection. Cette dernière approche passe par la répression de l'expression des gènes codant les différents facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa* ou par l'inhibition de l'activité de ces facteurs.

## I-C. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* possède de nombreux facteurs de virulence lui permettant de survivre dans de nombreux environnements et de coloniser divers types d'hôtes (Lazdunski, 1998). Ces facteurs sont impliqués dans les diverses phases d'infection. On peut distinguer deux classes de facteurs de virulence : ceux associés à la bactérie, comme les adhésines et les pili, et ceux sécrétés, comme les toxines et les protéases. Ces facteurs associés à la bactérie sont principalement impliqués dans l'adhérence et la motilité. Le système de sécrétion de type III, qui constitue un facteur de virulence majeur, fait l'objet d'un chapitre séparé (Chapitre II).

### I C-1. Les facteurs de virulence associés à la bactérie

#### IC 1-a) Le biofilm

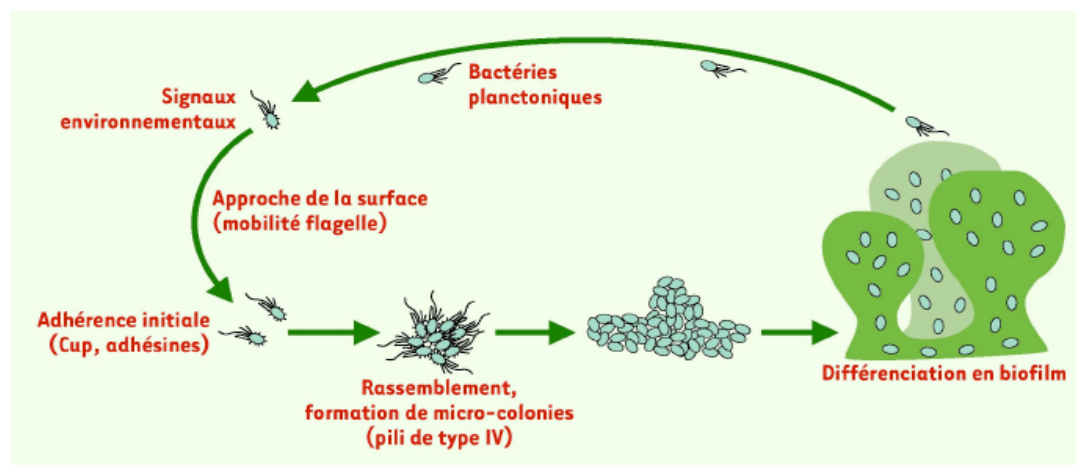


Figure 1 : Modèle de formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* (D'après Filloux et Vallet, 2003)

Outre la forme planctonique, *P. aeruginosa* est capable de se développer sous forme de biofilm. Dans ce mode de croissance, les bactéries adhèrent à une surface et sécrètent une matrice d'exopolysaccharides, dont l'alginate, dans laquelle elles sont insérées. La formation du biofilm nécessite plusieurs étapes et dépend de signaux environnementaux et bactériens dont ceux du quorum sensing (figure 1 et chapitre III-B) (Filloux et Vallet, 2003). Sous cette forme, *P. aeruginosa* présente une

résistance accrue aux défenses immunitaires et aux traitements antibiotiques notamment grâce à l'alginate qui joue le rôle de barrière physique contre les cellules immunitaires et piège les éléments de la réponse immune, anticorps et radicaux libres de l'oxygène provenant respectivement des lymphocytes B et des polynucléaires neutrophiles (Kobayashi, 2005; Reisner *et al.*, 2005).

### **IC 1-b) Le flagelle**

*P. aeruginosa* possède un seul flagelle polaire lui conférant la capacité de nager dans un environnement aqueux ou contenant une faible quantité d'agar (<0,4%) (mobilité de type « swimming »). Il intervient également dans la mobilité de type « swarming » pouvant être traduit par « essaimage » qui permet le déplacement sur des surfaces semi solides, comme un milieu entre 0,4 et 1% d'agar (Kohler *et al.*, 2000). Le flagelle est une structure rotative constituée de trois principales parties (figure 3) : le filament extra bactérien permettant le mouvement, le crochet et le corps basal ancrés dans les membranes bactériennes dont une partie en relation avec le crochet est rotative, permettant à l'ensemble de fonctionner comme une hélice. Des mutants dépourvus de flagelle ont une virulence atténuée (Feldman *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1996). Cette structure est aussi impliquée dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires et participe à la formation du biofilm *in vitro* (Feldman *et al.*, 1998; O'Toole et Kolter, 1998).

### **IC 1-c) Les pili de type IV**

Le pilus de type IV est la principale adhésine de *P. aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (Hahn, 1997). Situé sur la membrane externe, il est constitué de monomères de piline. La capacité de rétraction du pilus confère à la bactérie une mobilité de type « twitching » (déplacement sur des surfaces) et « swarming » (Kohler *et al.*, 2000). Lorsque cette structure est non fonctionnelle ou absente l'adhérence et les dommages de la bactérie sur les cellules épithéliales *in vitro* diminuent ainsi que la virulence *in vivo* (Comolli *et al.*, 1999; Hahn, 1997).

**IC 1-d) Facteur d'attachement de type *fimbriae***

Récemment mis en évidence chez *P. aeruginosa*, ce type de pilus est nécessaire pour l'adhérence à des surfaces inertes et dans la formation du biofilm (Vallet *et al.*, 2001).

**IC 1-e) Le lipopolysaccharide (LPS)**

Constituant lipidique majeur de la couche externe de la membrane, le LPS contient une région polysaccharidique ramifiée qui couvre la totalité de la surface de la bactérie et se trouve donc impliquée dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus de l'hôte. Cette région polysaccharidique, appelée antigène O, est variable et peut même être absente. Selon la présence et la composition de l'antigène O, les souches de *P. aeruginosa* sont plus ou moins résistantes à la phagocytose dirigée par le complément. La capacité d'interaction des différentes formes de LPS avec la protéine CFTR, joue aussi un rôle important dans la pathogénie de *P. aeruginosa* notamment chez les personnes atteintes de mucoviscidose. En effet, CFTR semble pouvoir jouer le rôle de récepteur de motif bactérien (PRM : pattern recognition molecule) activant la réponse inflammatoire. L'absence ou le dysfonctionnement de CFTR chez les patients atteints de mucoviscidose ainsi que les modifications du LPS au niveau de l'antigène O pourraient empêcher l'interaction LPS-CFTR, retarder la réponse immunitaire et empêcher l'élimination bactérienne facilitant ainsi l'installation et la persistance de la bactérie (Goldberg et Pier, 1996; Pier, 2002; Schroeder *et al.*, 2002).

**I C-2. Les facteurs de virulence sécrétés**

Les facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa* interviennent principalement dans la dissémination de la bactérie et la perturbation ou la destruction des défenses de l'hôte.

L'exotoxine A est la protéine la plus cytotoxique produite par *P. aeruginosa*. Sécrétée sous forme d'une pro-toxine inactive, elle est reconnue de façon spécifique par le

LRP (LDL related protein)(Herz *et al.*, 1990). Cette interaction produit le clivage de la pro-toxine et une internalisation de la partie active qui cible le facteur d'élongation E2 perturbant ainsi la synthèse protéique(Wick *et al.*, 1990).

Les élastases LasA et LasB, perturbent quant à elles certaines fonctions physiologiques en dégradant l'élastine nécessaire notamment à la contraction et l'extension du tissu pulmonaire. LasB est également capable d'inactiver d'autres protéines comme les IgA, les IgG et des composés du complément modulant ainsi la réponse immunitaire (Heck *et al.*, 1990;Hong et Ghebrehiwet, 1992).

*P. aeruginosa* sécrète également des phospholipases de type C (PLC) avec différentes spécificités de substrats (Stonehouse *et al.*, 2002). Certaines ont une activité hémolytique (PlcN et PlcH) et peuvent jouer un rôle dans la mobilité de type « twitching » comme PlcB (Barker *et al.*, 2004)

L'action des phospholipases est facilitée par les rhamnolipides produits par les bactéries. Ces biosurfactants sont des molécules amphiphiles, qui possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides membranaires facilitant leur accessibilité aux phospholipases. Les rhamnolipides participent également à la structuration du biofilm (Boles, Thoendel, et Singh, 2005;Davey, Caiazza, et O'Toole, 2003).

### **I C-3. Régulation des facteurs de virulence**

Les études sur la régulation des facteurs de virulence ont mis en évidence une grande variété de modes de contrôle de l'expression des toxines et des autres structures impliquées dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. La synthèse et la sécrétion de la plupart de ces facteurs sont modulées en fonction du stade de croissance bactérien (phase exponentielle ou stationnaire), du mode de développement (planctonique ou biofilm) et des conditions environnementales dans lesquelles se trouve la bactérie, notamment lors de l'infection d'un hôte. Les deux principaux mécanismes senseurs permettant de lier les changements d'état et d'environnement à une expression protéique adaptée sont les systèmes à deux composants et le quorum sensing.



Les systèmes de régulation à deux composants permettent, grâce à la détection et la transduction de signaux extérieurs, une réponse rapide de l'organisme face à des modifications de l'environnement. Dans la majorité des cas, le système est constitué de deux protéines et met en jeu un transfert de phosphate pour la transduction du signal. Il s'agit :

- d'une protéine kinase, généralement située dans une des membranes, appelée senseur. En réponse à un signal, cette protéine s'autophosphoryle.
- d'un régulateur de réponse sur lequel est transféré le groupe phosphate à partir du senseur qui régule son activité. Il possède un domaine de fixation à l'ADN et régule la transcription.

*P. aeruginosa* possède de nombreux systèmes de régulation à deux composants putatifs. 55 senseurs, 89 régulateurs de réponse et 14 systèmes hybrides senseur-régulateur de réponse ont été dénombrés (Rodrigue *et al.*, 2000; Stover *et al.*, 2000). Le nombre important de ces systèmes pourrait expliquer en partie l'extrême adaptabilité de *P. aeruginosa* à différents milieux.

Le second mécanisme global senseur/régulateur face aux changements d'environnement ou d'état est le « quorum sensing ». Il permet l'expression coordonnée de nombreux facteurs de virulence notamment en fonction de la densité cellulaire. L'étude de ce système faisant partie du travail effectué, un chapitre détaillé lui est consacré (Chapitre III).

#### **I C-4. Sécrétion des facteurs de virulence**

La sécrétion des facteurs de virulence est réalisée grâce à différents mécanismes qui permettent le transport actif de protéines à travers les membranes bactériennes. Les quatre systèmes de sécrétion, ubiquitaires chez les bactéries à Gram négatif, ont été décrits chez *P. aeruginosa*, et sont schématisés en figure 2. Le système de sécrétion de type IV, rencontré chez *Agrobacterium tumefaciens* n'a pas été mis en évidence chez *P. aeruginosa*.

### IC 4-a) Le système de sécrétion de type I

Ce système permet le transport de protéines directement du cytoplasme vers le milieu extra bactérien. Il est constitué de 3 complexes protéiques : une protéine de transport avec une activité ATPase dans la membrane interne (AprD), une protéine dans la membrane externe formant un pore (AprF), et enfin une protéine de fusion membranaire (AprE) située dans le périplasm et ancrée dans la membrane interne qui réalise la liaison entre les deux premières (Kostakioti *et al.*, 2005).

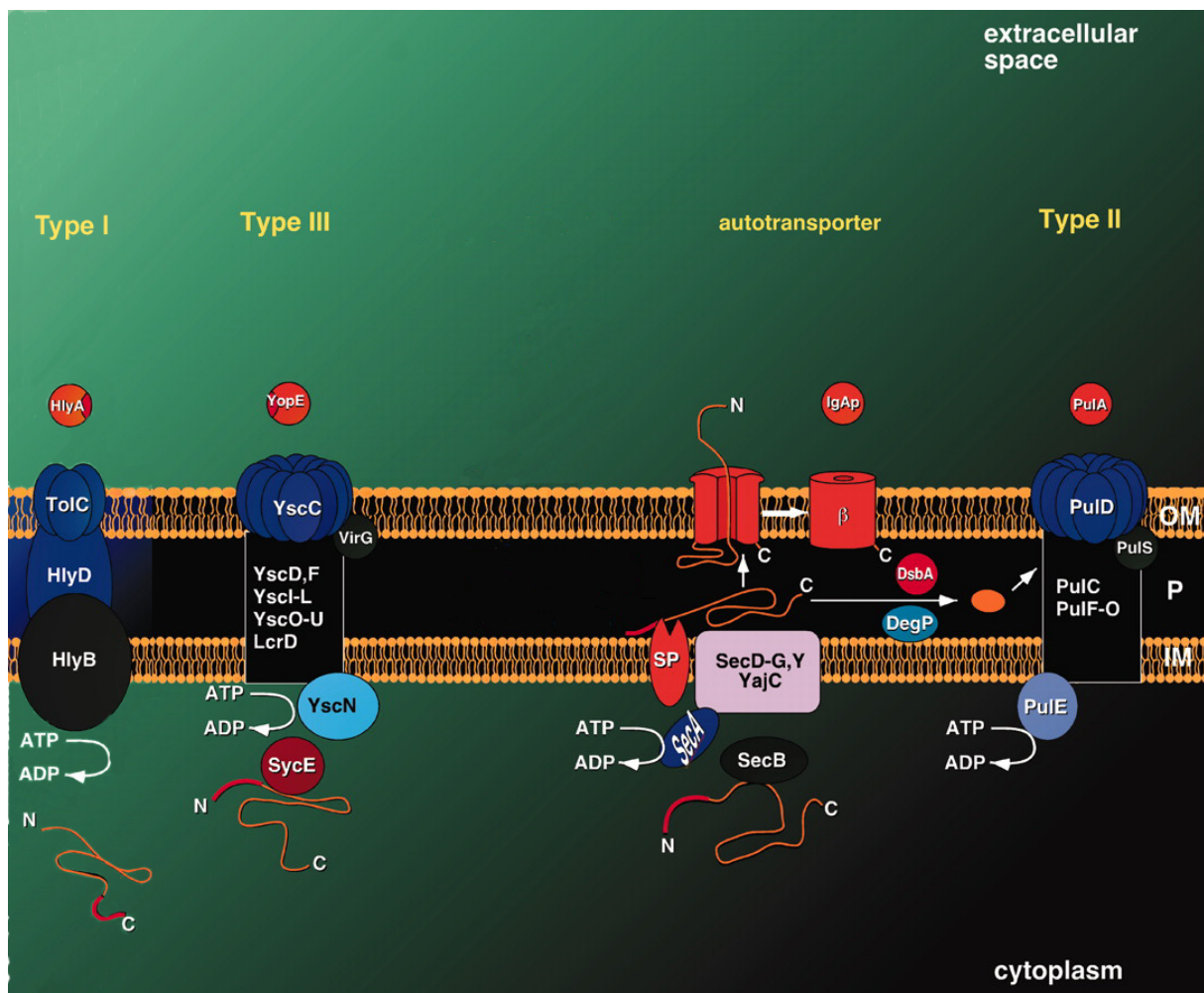


Figure 2 : Schéma des principaux systèmes de sécrétion de protéines connus chez les bactéries Gram négatives. La sécrétion de l'hémolysine (HlyA) d'*E.coli* est donnée en exemple pour le type I, la sécrétion de l'exotoxine (YopE) de *Y.pestis* pour le type III, la sécrétion de la protéase IgA1 (IgAp) de *Neisseria gonorrhoeae* pour le système autotransporteur, et la sécrétion de la pullulanase (PulA) de *Klebsiella oxytoca* (D'après Kostakioti).

**IC 4-b) Le système de sécrétion de type II**

La sécrétion de type II s'effectue en deux étapes. La première consiste en un transport des protéines à travers la membrane interne au moyen du système Sec ATP dépendant ou du système Tat ATP indépendant dirigé par un gradient de pH (Robinson, Thompson, et Woolhead, 2001). Ces deux types de transport nécessitent la présence d'une séquence signal spécifique. La seconde étape correspond à l'export à travers la membrane externe via les systèmes Xcp et HxC (homologous to *xcp*). Ce système de sécrétion permet notamment la sécrétion de LasA, LasB, et de l'exotoxine A.

**IC 4-c) Le système de sécrétion de type IV**

Le système de sécrétion de type IV est capable de transporter une grande variété de substrats par un mécanisme dépendant ou indépendant du contact cellulaire. La sécrétion de protéines ou de complexes nucléoprotéiques (fragment T du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*) est réalisée par un mécanisme indépendant de la machinerie Sec, excepté pour la toxine pertussique (*Bordetella pertussis*) (Kostakioti *et al.*, 2005). Aucun système de sécrétion de type IV n'a été mis en évidence chez *P. aeruginosa*.

**IC 4-d) Le système de sécrétion de type V**

Egalement appelé autotransporteur, ce système fait appel au complexe Sec pour le transport vers l'espace périplasmique. Les protéines réalisent ensuite elles-mêmes le pore nécessaire à leur passage à travers la membrane externe au moyen d'une séquence d'adressage spécifique (Kostakioti *et al.*, 2005).

## II. Le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III est présent dans de nombreux genres de bacilles à Gram négatif dont *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* et les *Escherichia* entéropathogènes (EPEC, EHEC) (Hueck, 1998). Activé par le contact avec la cellule eucaryote, ce système est dédié à l'injection d'effecteurs directement du cytoplasme de la bactérie dans le cytosol de la cellule cible sans passage par le milieu extérieur. Ces effecteurs ont pour effets la mort cellulaire ou le dysfonctionnement de la cellule, en détruisant la membrane, en perturbant les cascades de transduction des signaux ou en désorganisant le cytosquelette (Hueck, 1998;Shaver et Hauser, 2004;Vance, Rietsch, et Mekalanos, 2005). Ils permettent aux bactéries pathogènes d'envahir les tissus de l'organisme infecté ou de circonscire ses défenses.

Souvent comparé à une aiguille, le SSTT est très conservé au niveau structural entre les bactéries à Gram négatif (Aizawa, 2001;Hueck, 1998;Plano, Day, et Ferracci, 2001;Tampakaki *et al.*, 2004). Le SSTT dont la partie basale présente de grandes similitudes avec le corps basal du flagelle est composé de deux structures (figure 3) :

- l'appareil de sécrétion est un complexe protéique enchâssé dans les membranes bactériennes. Il permet la sécrétion des effecteurs spécialisés du SSTT du cytoplasme de la bactérie à l'extérieur sans transiter par le périplasme.

- l'appareil de translocation, encore appelé « aiguille », qui est un second complexe au niveau extrabactérien en contact avec l'appareil de sécrétion, s'insère dans la membrane de la cellule cible et permet l'injection des effecteurs toxiques spécifiques du SSTT. C'est pourquoi on trouve souvent l'appellation de facteur de virulence pour désigner l'ensemble du SSTT.

Bien que la structure des différents SSTT soit similaire, ce facteur de virulence a évolué de façon particulière pour chaque espèce, affectant le mode d'interaction des bactéries avec la cellule cible et permettant différentes stratégies de pathogénicité, allant de l'échappement au système immunitaire pour *P. aeruginosa* et *Yersinia spp*, à l'invasion des cellules pour *Salmonella spp*. La diversité des rôles du SSTT et des environnements dans lesquels il s'exprime met en évidence l'importance qu'il joue dans les mécanismes de virulence de certains pathogènes à Gram négatif et laisse supposer un haut niveau de régulation.

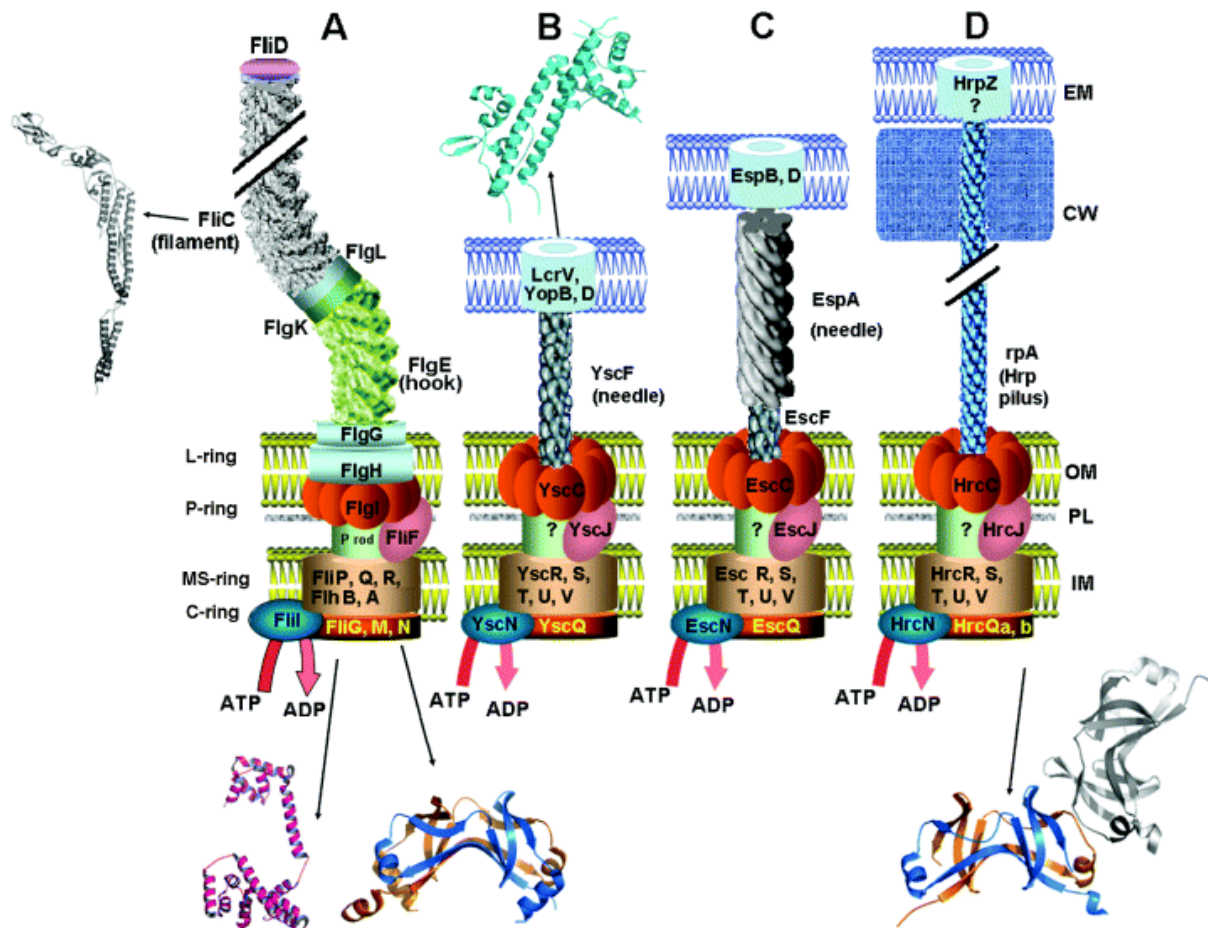


Figure 3 : Modélisation de la structure du flagelle et des systèmes de sécrétion de type III de différentes bactéries à Gram négatif. A, structure du flagelle ; B, C, D, SSTT de *Yersinia*, de *E. coli* et de *P. syringae* respectivement. Seules les protéines conservées entre les différents SSTT (et leurs homologues chez le flagelle) sont représentées et identifiées par des couleurs et des positions similaires. Le « P rod » du flagelle n'a pas de protéine homologue connue chez les SSTT. Le point d'interrogation signifie qu'une structure de type canal au niveau de la membrane interne n'a pas encore été identifiée. Le constituant majeur de l'aiguille (needle ou Hrp pilus) est YscF chez *Yersinia*, EspA chez *E. coli*, HrpA chez *P. syringae*. Les protéines formant le pore dans la membrane eucaryote (EM) sont LcrV, YopB, YopD chez *Yersinia* et EspB, D chez *E. coli*. Chez le pathogène des plantes, *P. syringae*, HrpZ est supposée être la protéine translocatrice. Les protéines dont la structure a été caractérisée sont représentées de façon schématisée. OM, membrane externe de la bactérie ; PL, peptidoglycane ; IM, membrane interne de la bactérie ; EM, membrane eucaryote ; CW, paroi cellulaire de la cellule végétale. (D'après Tampakak, 2004)

## II-A. Le système de sécrétion de Type III de *P. aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, le SSTT induit une mort cellulaire de type nécrose des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles et macrophages) et permet ainsi à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Sur les cellules épithéliales, le SSTT provoque une oncosé par une déstructuration du cytosquelette. Lors d'une infection

pulmonaire, notamment chez les personnes atteintes de mucoviscidose, le SSTT joue un rôle prépondérant dans la phase initiale de colonisation et probablement dans la progression de l'infection (Corech *et al.*, 2005; Dacheux *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2004).

### **II A-1. Organisation génétique et fonction principale des clusters de gènes du SSTT**

A l'exception des gènes codant les exotoxines, les gènes codant le système de sécrétion de type III chez *Pseudomonas aeruginosa* sont regroupés en clusters sur le chromosome contrairement au genre *Yersinia* pour lequel les SSTT est situé sur un plasmide. Ils sont organisés en plusieurs opérons. L'opéron *exsCEBA* code les principaux régulateurs du SSTT, les opérons *exsD-pscBL* et *pscNUpcrD* codent la structure de l'appareil de sécrétion, et l'opéron *pcrRGVH-popBD* code des protéines impliquées dans l'appareil de translocation.

### **II A-2. Les différentes toxines et leurs fonctions**

Quatre exotoxines sécrétées par le SSTT sont connues chez *P. aeruginosa* : ExoS, ExoT, ExoY et ExoU. Toutes les souches ne possèdent pas toutes les toxines. Il semble en effet que la prévalence de chaque toxine soit différente selon l'origine des souches (environnement, isolats cliniques de différentes parties du corps) (Feltman *et al.*, 2001). Ainsi dans l'étude de Feltman, incluant des souches environnementales et différents isolats cliniques non clonaux, la toxine ExoT est retrouvée chez la totalité des souches, la toxine ExoY est présente à 89%, et 72% des souches possèdent le gène *exoS*. La toxine ExoU a quant à elle une prévalence plus faible, 28% en moyenne, avec de fortes variations. En effet le gène *exoU* est retrouvé dans 40% des isolats sanguins et de plaies mais dans seulement 10% des isolats respiratoires de patients atteints de mucoviscidose.

De plus il semble que les gènes *exoS* et *exoU* soient très rarement retrouvés ensemble dans une même souche.

## IIA 2-a) Les Exotoxines ExoS et ExoT

Les toxines ExoT et ExoS sont des protéines bifonctionnelles qui partagent 76% d'identité. Elles possèdent une activité GAP spécifique des petites protéines G de la famille Rho (Goehring *et al.*, 1999; Krall *et al.*, 2000) et une activité ADP ribosyltransférase à l'extrémité C-terminal sur des substrats différents : respectivement les protéines de la famille Ras et Crkl / Il pour ExoS et ExoT (Barbieri et Sun, 2004; Coburn et Gill, 1991; Ganesan *et al.*, 1999; Sun et Barbieri, 2003). Leurs activités perturbent la transduction des signaux intracellulaires médiés par Ras et Crkl / Il et conduisent à la mort cellulaire ou au remodelage du cytosquelette d'actine, induisant ainsi une inhibition de la phagocytose ou un changement de morphologie des cellules (Henriksson *et al.*, 2002; Pederson et Barbieri, 1998; Sundin, Hallberg, et Forsberg, 2004). Le gène *orf1* en orientation inverse du gène *exoS* code une protéine qui possède d'une part les caractéristiques d'une protéine chaperonne selon la définition qu'en fait Parsot (Page et Parsot, 2002) et d'autre part des homologies de séquence avec SycE, chaperonne de l'homologue d'ExoS chez *Yersinia sp.* Codé en même temps que la toxine, ce gène semble être la chaperonne de la protéine ExoS et potentiellement celle d'ExoT (Thèse L. Quénée, UJF-Grenoble, 2004).

## IIA 2-b) L'exotoxine Y

ExoY est une adénylate cyclase qui présente des homologies avec les adénylates cyclases de *Bordetella pertussis* (CyaA) et *Bacillus anthracis* (EF) (Yahr *et al.*, 1998). Son activité nécessite un ou des facteurs eucaryotes inconnus. Cette toxine induit un « arrondissement » (rounding) des cellules CHO et une augmentation de la concentration en AMP cyclique corrélée avec une hyperperméabilité des cellules de la microcirculation pulmonaire secondaire à la formation de pores membranaires (Sayner *et al.*, 2004). Récemment, Cowell *et al.* ont montré qu'ExoY, en perturbant le cytosquelette d'actine, interviendrait en début d'infection en inhibant l'invasion des cellules épithéliales par *P. aeruginosa* (Cowell, Evans, et Fleiszig, 2005). Cependant, ExoY aurait seulement un rôle mineur dans la cytotoxicité de *P. aeruginosa* lors d'une infection pulmonaire aiguë (Lee *et al.*, 2005).

## IIA 2-c) L'exotoxine U

ExoU, l'effecteur le plus cytotoxique injecté par le SSTT de *P. aeruginosa*, possède une activité phospholipase de type PLA<sub>2</sub> (Sato *et al.*, 2003). Il est associé, *in vitro*, à une lyse rapide des cellules et à une forte pathogénicité en modèle animal (Hauser *et al.*, 1998; Sawa *et al.*, 1999).

### II A-3. Régulation de l'expression du SSTT

Il semble exister deux états possibles pour le SSTT de *P. aeruginosa*. En effet, comme le montrent les études de Dacheux *et al.* et de l'équipe d'Hauser, certaines souches de *P. aeruginosa* sont incapables d'activer le SSTT ou en ont perdu la capacité. Ceci, bien qu'elles possèdent les gènes nécessaires à cette activation et même si les bactéries se trouvent dans des conditions favorables à l'activation de ce facteur de virulence (Dacheux, Attree, et Toussaint, 2001; Feltman *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2004). Dans ces études, il s'agit principalement de souches issues de poumons de patients ayant développés une infection chronique à *P. aeruginosa*.

Ceci suggère qu'il existe deux états du SSTT chez *P. aeruginosa*. L'un est activable par des signaux *in vivo* ou *in vitro* qui permettent l'injection ou la sécrétion des toxines du SSTT, et nous le qualifieront d'inductible. L'autre n'est pas activable et ne permet pas la sécrétion des effecteurs toxiques, bien qu'aucune mutation des gènes du SSTT n'ait été mise en évidence dans ces souches, et nous le qualifierons de non inductible.

L'ensemble des données sur la régulation de l'expression du SSTT, présenté ci-dessous, provient de l'étude du passage de l'état inductible à l'état activé.

Le SSTT de *P. aeruginosa* est activé *in vivo* lors du contact de la bactérie avec la cellule cible. *In vitro*, le signal d'activation peut être remplacé par une déplétion du milieu en calcium (Hornef *et al.*, 2000; Vallis *et al.*, 1999). En l'absence d'induction, il existe une faible expression des gènes du SSTT, permettant la formation d'un pool de toxines préformées et d'une petite quantité de structures membranaires en place mais dans une conformation fermée empêchant la sécrétion (Thèse L. Quénée, UJF-Grenoble, 2004). Le ou les signaux d'activation, encore inconnus, induisent une



augmentation importante de la transcription de la plupart des gènes codant l'appareil de sécrétion/translocation et les toxines (Wolfgang *et al.*, 2003).

L'ensemble des gènes constituant le SSTT de *P. aeruginosa* est sous le contrôle d'un facteur de transcription de la famille AraC, ExsA. Cet activateur transcriptionnel, coordonnant l'expression des gènes de l'appareil de sécrétion/translocation et des toxines, est essentiel à l'activation du système. En effet, les souches mutées pour le gène *exsA* sont beaucoup moins virulentes dans des modèles d'infection pulmonaire (Ader *et al.*, 2005), ont une cytotoxicité réduite sur les cellules eucaryotes (Dacheux *et al.*, 1999; Fauvarque *et al.*, 2002) et sont incapables de sécréter les exotoxines lors d'une induction *in vitro*, excepté si un gène *exsA* exogène est exprimé de façon constitutive dans ces mutants.

Les réseaux de régulation contrôlant l'activation du SSTT agissent principalement sur l'expression ou l'activité d'ExsA de façon directe ou indirecte. On peut distinguer deux classes de régulateurs : ceux codés au niveau des opérons du SSTT, contrôlés par ExsA et ceux indépendants d'ExsA.

### **IIA 3-a) Régulation ExsA dépendante**

L'ensemble des gènes des régulateurs connus, contrôlés par ExsA (ExsA, ExsC, ExsB, ExsE, ExsD) sont regroupés au niveau des opérons *exsCEBA* et *exsD-pscBL*. L'ensemble des interactions entre ces protéines régule l'activité d'ExsA (figure 4).

#### *(i) ExsA*

ExsA est un membre de la famille des activateurs transcriptionnels de type AraC, homologue à VirF qui contrôle l'expression du SSTT chez *Yersinia*. Il possède une activité de fixation à l'ADN de type « hélice-tour-hélice » et se fixe sur les promoteurs des opérons codant les éléments du SSTT au niveau de la séquence consensus TXAAAAXA, à environ 50 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (Hovey et Frank, 1995; Yahr *et al.*, 1995). ExsA active sa propre synthèse en se fixant sur le promoteur de l'opéron *exsCEBA*, créant ainsi une boucle de rétroaction positive. Une mutation du gène *exsA* conduisant à un défaut d'expression ou à une protéine non fonctionnelle, abolit l'expression des gènes du SSTT et aboutit à une souche moins virulente.

*(ii) ExsB*

Le produit supposé du gène *exsB* est homologue à VirB qui est impliqué dans la régulation du SSTT chez *Yersinia enterocolitica*. Le produit ou l'ARN issu de ce gène est un activateur dans la régulation du SSTT puisqu'une délétion d'*exsB* provoque une diminution d'expression d'*exsA*. Cependant *exsB* ne semble pas coder une protéine comme l'ont montré les études de Goranson *et al.* (Goranson, Hovey, et Frank, 1997). Cette partie de l'opéron *exsCEBA* pourrait jouer un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle d'*exsA* en stabilisant l'ARN.

*(iii) ExsD*

Le gène *exsD*, premier gène de l'opéron *exsD-pscBL* sous le contrôle d'ExsA, code un anti-activateur du SSTT de *P aeruginosa*. En effet, McCaw *et al.* ont montré que cette protéine est capable de se fixer à ExsA et d'inhiber son activité. Une surexpression d'ExsD induit une inhibition du SSTT et son absence une dérèpression de l'opéron *exsCEBA* et par conséquent de l'ensemble des gènes du SSTT (McCaw *et al.*, 2002). Ceci se produit quelles que soient les conditions de culture (avec ou sans activation du SSTT par déplétion calcique ou contact cellulaire). Cependant, un mutant du gène *exsD* est toujours dépendant du signal d'activation (contact cellulaire ou déplétion calcique) pour sécréter les toxines du SSTT même si les gènes du système sont dérèprimés (McCaw *et al.*, 2002).

*(iv) ExsC*

ExsC est codée par l'opéron *exsCEBA* sous la dépendance d'ExsA. Cette protéine est un anti-anti-activateur de par sa capacité à fixer ExsD ce qui libère ExsA et permet l'activation de la boucle de rétroaction sur *exsA* et l'augmentation du taux de transcription des gènes du SSTT. Un mutant de ce gène voit la transcription des gènes du SSTT réprimée et une surexpression induit une dérèpression de ces gènes indépendamment de la concentration en calcium (Dasgupta *et al.*, 2004). De plus, d'après ses caractéristiques biochimiques (faible poids moléculaire, pl basique, hélice  $\alpha$  C-terminale amphiphatique) et les récents travaux réalisés par Urbanowski *et al.* et Rietsch *et al.*, ExsC pourrait être la protéine chaperonne d'ExsE (Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski, Lykken, et Yahr, 2005)

(v) *ExsE*

*ExsE* est le dernier partenaire du réseau de régulation du SSTT. Cette protéine est positionnée au sommet de la cascade de régulation centrée sur l'activité d'*ExsA* et sous sa dépendance. Cette petite protéine basique de 82 acides aminés (poids théorique de 8,7 kDa) possède une activité de fixation à *ExsC*. Elle est sécrétée *in vitro* par le système de sécrétion de type III lors d'une déplétion du milieu en calcium. L'injection d'*ExsE* et son éventuelle toxicité dans la cellule eucaryote restent à déterminer. Dans la bactérie *ExsE* serait liée à *ExsC* qui jouerait le rôle de chaperonne. En effet, la sécrétion d'*ExsE* lors de l'activation *in vitro*, est diminuée d'un facteur 16 en l'absence d'*ExsC* (Urbanowski, Lykken, et Yahr, 2005).

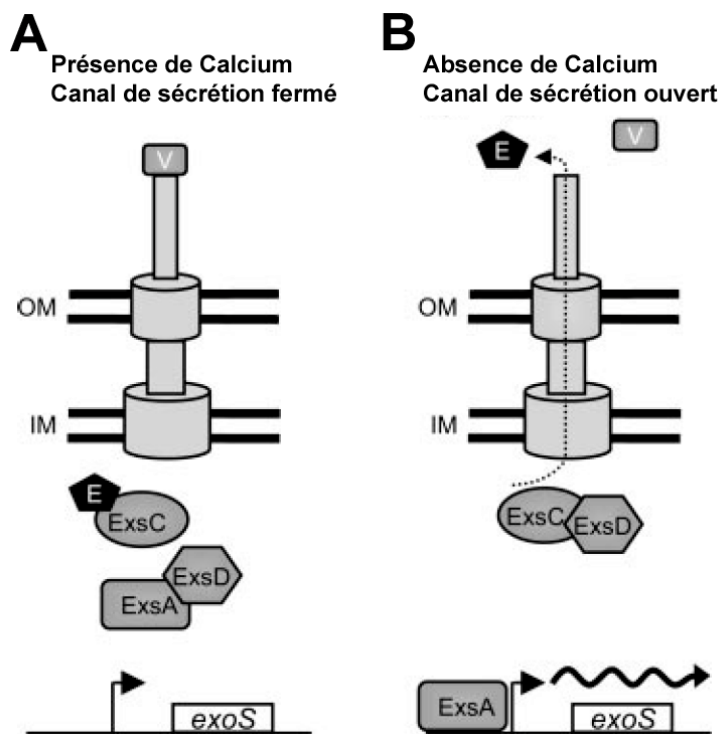


Figure 4 :

**Modèle d'induction *in vitro* du SSTT.** A, en présence de calcium le canal de sécrétion est fermé par PcrV (V), *ExsC* est séquestrée par *ExsE* (E) et le gène *exoS* est peu exprimé. B, lors de la déplétion calcique, *ExsE* est sécrétée libérant *ExsC* qui séquestre *ExsD*. *ExsA* libérée peut alors activer l'expression d'*exoS*. (D'après Rietch, 2005)

Les quatre protéines *ExsA*, *ExsD*, *ExsC* et *ExsE* forment ainsi une cascade de régulation sous la dépendance d'*ExsA*. *ExsE*, au sommet de cette cascade, couple la transcription des gènes du SSTT avec l'activation de la sécrétion. En l'absence d'activation, le canal de sécrétion est fermé, *ExsE* est fixée à *ExsC* laissant *ExsD* jouer son rôle d'inhibiteur en se fixant à *ExsA*. Lors de l'activation, *ExsE* est sécrétée, *ExsC* libérée fixe alors *ExsD* et permet à *ExsA* d'induire la transcription des gènes du

SSTT. Les évènements permettant la sécrétion d'ExsE lors de l'activation sont encore inconnus.

L'expression des gènes du SSTT doit dépendre d'un équilibre fin entre les concentrations des différents constituants de cette cascade. La double interaction (ExsC-ExsE, ExsC-ExsD) contrôlant l'expression d'ExsA et la présence d'une transcription constitutive à un faible taux qu'ont montrées des études au laboratoire et dans d'autres équipes (Wolfgang *et al.*, 2003), permet probablement au système de détecter et de répondre rapidement aux stimuli d'induction limitant ainsi les dépenses en énergie.

D'autres voies de régulation, exposées ci-dessous, ajoutent un niveau supplémentaire de contrôle et de flexibilité au système. Elles permettent de coupler efficacement la transcription à la sécrétion et une réponse rapide à une induction ou une répression dictée par les conditions du milieu.

### **IIA 3-b) Régulation ExsA indépendante**

D'autres acteurs, dont l'expression n'est pas connue pour être régulée par ExsA, modulent également l'expression du SSTT. L'ensemble des interactions est résumé sur la figure 5.

#### *(i) Effets du métabolisme*

Un nombre grandissant d'études tend à montrer que la richesse nutritive de l'environnement rencontré par les bactéries et les métabolismes mis en jeu dans l'adaptation à ce milieu influencent de façon spécifique l'expression des facteurs de virulence. Chez *P. aeruginosa*, plusieurs voies métaboliques ou protéines du métabolisme semblent impliquées directement dans la régulation du système de sécrétion de type III.

L'équipe de Rietsch a mis en évidence qu'une perturbation du métabolisme de l'histidine module l'expression du SSTT (Rietsch, Wolfgang, et Mekalanos, 2004). La surexpression du gène PA5097 (*hutT*) codant la perméase de l'histidine est corrélée avec une diminution de la transcription du gène codant la toxine ExoS et de la cytotoxicité SSTT dépendante sur des macrophages. Cette surexpression induit probablement un transport trop important de l'histidine. L'accumulation intracellulaire

de cet acide aminé provoquerait une accumulation de ses produits de dégradation et un déséquilibre entre les sources de carbone et d'azote délétère pour la croissance bactérienne et la cytotoxicité. Ce phénotype peut être partiellement corrigé par la mutation du système régulateur à deux composants, CbrAB. Ce système de senseur-régulateur semble impliqué dans le contrôle d'opérons du catabolisme en réponse à un déséquilibre dans l'apport en carbone et en azote, sa mutation permettrait de balancer les effets d'un import et d'un catabolisme excessif de l'histidine. Des études sur d'autres pathogènes ont également montré une régulation du SSTT dépendante du métabolisme des acides aminés chez *Yersinia* et des acides gras chez *Salmonella* (Lucas *et al.*, 2000; Ramamurthi et Schneewind, 2002).

D'autres protéines du métabolisme bactérien sont impliquées dans la régulation du SSTT. Ainsi, Dacheux *et al.* ont montré, dans la souche CHA issue d'un patient atteint de mucoviscidose, l'importance des gènes *ppX* codant une exopolyphosphatase et *dsbA* codant une thiol/disulfide oxidoréductase périplasmique. L'implication de la protéine DsbA dans la maturation des protéines membranaires du SSTT était déjà connu chez *Salmonella typhimurium* (Miki, Okada, et Danbara, 2004). Les auteurs ont également mis en évidence le rôle des sous unités E1 et E2 de la pyruvate déhydrogénase (PDH) codées par l'opéron *aceAB*. La mutation d'un de ces gènes entraîne une forte diminution de la sécrétion des toxines consécutive à une perte d'induction du SSTT *in vitro* et une diminution de presque 100% de la cytotoxicité dépendant du SSTT sur des polynucléaires neutrophiles (Dacheux *et al.*, 2002). Chez un mutant de l'opéron *aceAB*, bien que l'addition d'acétate au milieu permette de retrouver une croissance similaire à la souche parentale, elle ne permet pas une réversion de la répression de l'opéron *exsCEBA* et donc de l'activation du SSTT. Plus qu'un effet métabolique global comme c'est probablement le cas pour le métabolisme de l'histidine, la PDH de *P. aeruginosa* pourrait jouer un rôle direct de régulateur transcriptionnel. En réponse à un stress, elle pourrait coupler modification du métabolisme des acides tricarboxyliques et modulation de l'expression de facteurs notamment les facteurs de virulence comme c'est le cas chez *Bacillus thuringiensis* ou *Azotobacter vinelandii* (Regnstrom *et al.*, 1999; Walter et Aronson, 1999).

Cette modulation du SSTT par les voies métaboliques semble également intervenir via les modifications sur les ARNs de transfert (ARNt) nécessaires à la traduction d'ARNs spécifiques. De telles modifications sont impliquées dans la régulation de la virulence en réponse à une variation des conditions nutritionnelles du milieu (Durand et Bjork, 2003; Urbonavicius, Durand, et Bjork, 2002). Chez *S. flexneri* l'absence de modifications sur certains ARNs de transfert réduit la traduction du régulateur VirF (homologue d' ExsA) diminuant ainsi l'expression du SSTT (Durand *et al.*, 2000). Chez *P. aeruginosa*, la mutation du gène *truA* codant une ARNt pseudo-uridine synthase entraîne une absence d'expression des gènes du SSTT (Ahn *et al.*, 2004). La pseudo-uridine joue un rôle important dans la structure des ARNs structuraux (Harrington *et al.*, 1993). Cette modification doit donc être essentielle à la stabilité et/ou à la fonction d'un ou de plusieurs ARNt nécessaires à la traduction d'un ou des régulateurs du SSTT de *P. aeruginosa*.

Les pompes à efflux MexCD-OprJ et MexEF-OprN ont également un effet sur la transcription des gènes du SSTT. Ces pompes dont l'expression est généralement réprimée permettent un efflux de molécules dont les antibiotiques. Des mutants surexprimant ces complexes protéiques voient la transcription d'*exsA* diminuer et ainsi celle de l'ensemble des gènes du SSTT lors d'une activation *in vitro*. Ce phénotype peut être dû à une sécrétion du signal activant le SSTT, ou à une modification du métabolisme due à une sécrétion accrue de métabolites résultant de la surexpression des pompes à efflux. Il est intéressant de noter que la surexpression d'autres pompes que celles citées ci-dessus n'induit pas de répression du SSTT (Linares *et al.*, 2005) laissant supposer un rôle spécifique du ou des régulateurs de ces pompes sur le SSTT.

### (ii) Les régulateurs globaux

Le SSTT de *P. aeruginosa* est également sous le contrôle de régulateurs globaux de la virulence. Ainsi la protéine Vfr est essentielle à la transcription des gènes du SSTT. Son activité nécessite la présence d'AMPc synthétisé par deux adénylates cyclases CyaA et CyaB. Vfr, membre de la famille des protéines de type CRP, régule également des facteurs de virulence tels que le pili de type IV et le système de sécrétion de type II (Wolfgang *et al.*, 2003). La protéine CRP (cAMP receptor protein) d'*E. coli* interagit avec l'AMPc et joue le rôle de régulateur transcriptionnel en se fixant sur les promoteurs des gènes cibles. De précédentes études ont déjà montré

que l'AMPC et son récepteur sont impliqués dans la régulation du SSTT de *Yersinia enterocolitica* (Petersen et Young, 2002).

Les systèmes de régulateur à deux composants jouent également un rôle dans la modulation de l'expression des gènes du SSTT en réponse à une modification du milieu captée par le senseur.

Le système senseur-régulateur CopR-CopS, impliqué dans la résistance au stress induit par le  $\text{Cu}^{2+}$ , réprime l'expression des gènes du SSTT en présence de cuivre. Cette répression est effectuée par l'intermédiaire de la protéine PtrA dont l'expression est contrôlée par CopR-CopS. PtrA est capable de se fixer spécifiquement à ExsA et d'en réprimer l'activité conduisant à la répression des autres gènes du SSTT. Un mutant *ptrA* présente quant à lui une augmentation de la sécrétion des toxines ExoS et ExoT (Ha *et al.*, 2004). Lors de l'induction *in vitro* du SSTT, l'EGTA utilisé comme chélateur du  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait également l'être pour le  $\text{Cu}^{2+}$  induisant une diminution d'expression du gène *ptrA* et donc une augmentation d'ExsA libre.

Une autre protéine, RetS, aussi nommée RtsM, possédant des homologies avec les protéines constituant les systèmes de type senseur-régulateur, régule l'expression du SSTT. RetS est une protéine hybride possédant à la fois un domaine senseur avec une possible activité kinase et deux domaines régulateur de réponse en tandem. Cependant, elle ne possède pas de domaine de fixation à l'ADN comme la plupart des régulateurs de réponse connus. RetS régule de façon positive l'expression des gènes impliqués dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*, notamment la transcription d'*exsA*. Les essais de complémentation d'un mutant  $\Delta retS$  avec le régulateur Vfr ont montré qu'il agit en aval de RetS (Goodman *et al.*, 2004; Laskowski, Osborn, et Kazmierczak, 2004; Zolfaghar *et al.*, 2005). La déplétion calcique lors de l'activation du SSTT n'a pas d'effet sur la transcription de RetS. Cependant, il n'est pas exclu que des modifications post-traductionnelles lors du changement de concentration en calcium active ce régulateur.

### (iii) Rôle du « quorum sensing » et du phénotype mucoïde

L'expression des gènes du système de sécrétion de type III semble également régulée par des systèmes modulés par la densité bactérienne. Il s'agit d'une part du facteur sigma alternatif de réponse au stress et à la densité cellulaire, RpoS et d'autre part d'au moins un des systèmes de quorum sensing (QS) de *P. aeruginosa*,

RhII/R (voir chapitre III pour les systèmes de quorum sensing). Hogardt *et al.* ont montré que la transcription d'*exoS* lors d'une déplétion calcique est supérieure chez un mutant d'une de ces protéines par rapport à la souche parentale. Dans le cas du mutant *rhII*, la supplémentation du milieu en C4-homosérine lactone, produite normalement par RhII, permet de rétablir un niveau de transcription similaire à la souche parentale (Hogardt *et al.*, 2004). Le facteur de transcription RpoS et la synthase RhII sont donc impliqués dans un mécanisme de répression de l'expression de la toxine ExoS lors d'une activation du SSTT *in vitro*. Il a été montré que l'expression de RpoS se trouve en partie sous le contrôle du système de quorum sensing RhII/R (voir chapitre III-B). La répression exercée par ces protéines pourrait donc se dérouler en cascade, RhII agissant en amont de RpoS. Récemment, Bleves *et al.* ont confirmé le rôle répresseur de RhII et du signal C4-HSL sur l'expression d'ExoS (Bleves *et al.*, 2005). Cependant, il est intéressant de noter que l'expression du gène *ExoU* ne semble pas déréprimée par une mutation du gène *rpoS* (Hogardt *et al.*, 2004) et que l'expression du régulateur *exsA* n'est pas non plus influencée par une mutation du gène *rhII* (Bleves *et al.*, 2005). Ces données indiqueraient que RhII et RpoS ont une influence différente selon les gènes du SSTT ou les souches de *P. aeruginosa*.

Hogardt *et al.* ont également montré que l'expression d'ExoS est réprimée lors d'une croissance en biofilm, dont la formation est contrôlée par le quorum sensing et RpoS. L'hypothèse d'une répression du SSTT, pour les bactéries se développant sous forme de biofilm, est appuyée par deux autres études. La première montre l'implication du gène *algR* dans la répression du SSTT (Wu *et al.*, 2004). AlgR est un régulateur nécessaire à la synthèse de l'alginate, un des composants du biofilm chez *P. aeruginosa* sous le contrôle d'AlgU (Deretic *et al.*, 1994; Wozniak et Ohman, 1994). La seconde met en évidence qu'un système de régulation à trois composants, codé par l'opéron *sadRS* et le gène *sadA*, intervient dans la formation du biofilm et dans l'expression du SSTT. En effet un mutant *sadRS* est déficient dans la formation d'un biofilm mature et montre une dérépression du SSTT lors de la croissance en biofilm. De plus, une surexpression de *sadRS* entraîne une répression du SSTT en mode de croissance planctonique. De façon surprenante, des mutants de sécrétion du SSTT testés pour leur capacité à former des biofilms montrent une augmentation de cette formation de biofilm (Kuchma, Connolly, et O'Toole, 2005). La relative protection contre les défenses immunitaires conférée par le biofilm rend le SSTT



« inutile » dans cet environnement. Il semble donc que la bactérie ait développé un système permettant de coordonner production des composants du biofilm et extinction du SSTT. Ces observations sont en accord avec d'autres études montrant que les bactéries mucoïdes, isolées de patients atteints de mucoviscidose, possèdent un SSTT non inductible par un signal *in vitro* ou *in vivo* (Dacheux, Attree, et Toussaint, 2001; Jain *et al.*, 2004).

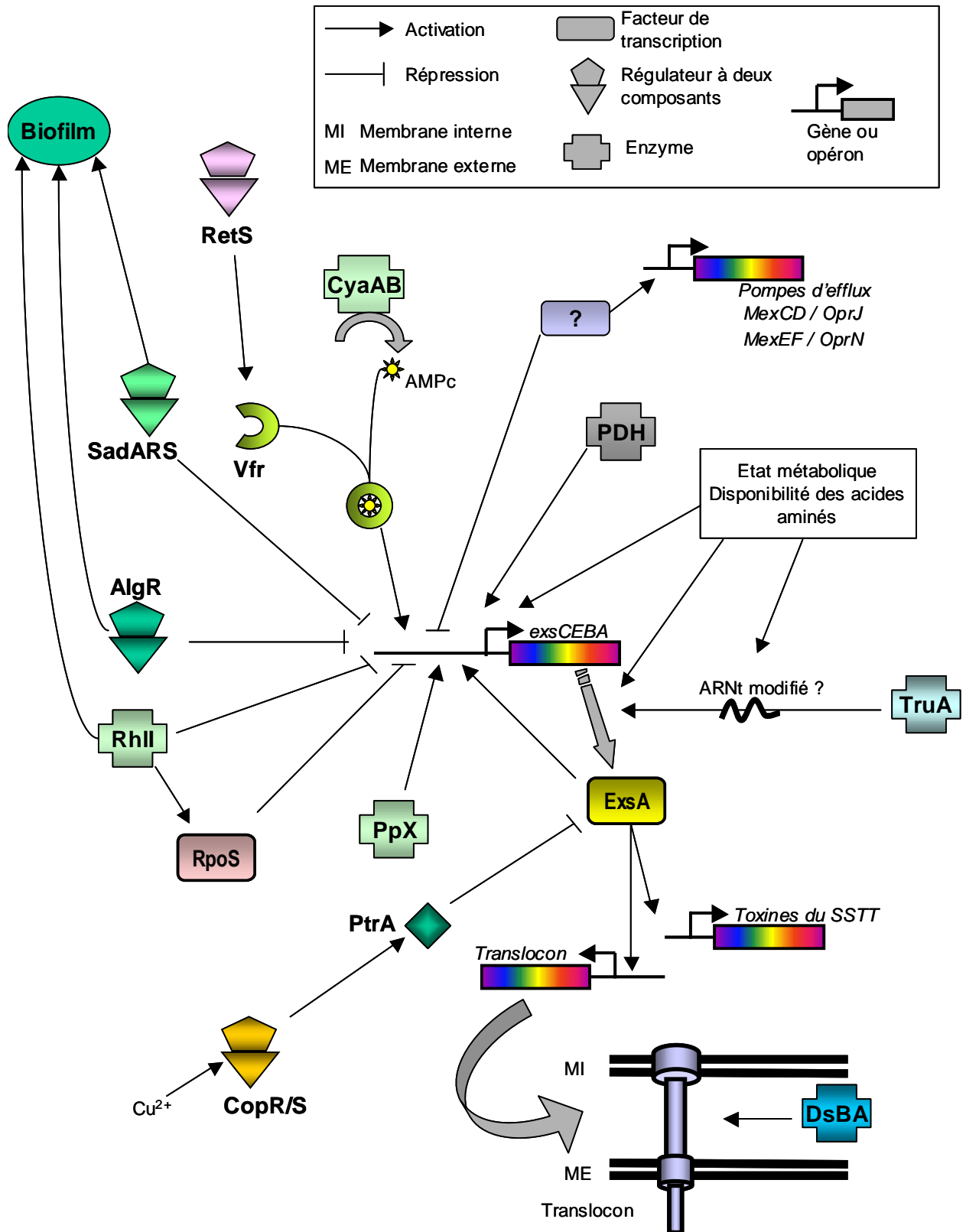


Figure 5 : Régulation transcriptionnelle du SSTT indépendante d'ExsA chez *P. aeruginosa*. Les interactions des protéines entre elles ou avec le promoteur des gènes ne sont pas forcément directes. Les protéines avec une fonction similaire sont représentées par la même forme.

## II-B. La régulation du SSTT chez les autres bacilles pathogènes à Gram négatif

### II B-1. Les *Yersinia*

Il existe trois espèces de *Yersinia* pathogènes. Elles infectent les rongeurs et peuvent être transmises à l'homme par l'intermédiaire des ectoparasites comme les puces. L'espèce la plus connue est *Yersinia pestis*, l'agent de la peste. Les deux autres espèces, *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis*, provoquent chez l'homme des gastro-entérites plus ou moins sévères (Cornelis et Wolf-Watz, 1997). Le SSTT de ces trois espèces de *Yersinia* pathogènes est celui qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études avec celui des *Salmonellae*. Chez ces bactéries, il est également activé par le contact avec une cellule hôte. *In vitro*, comme *P. aeruginosa*, il répond à la déplétion du milieu en calcium mais nécessite aussi une température de 37°C. L'expression des opérons du SSTT chez *Yersinia* dans ces conditions requiert les protéines VirF et YmoA. VirF, un régulateur de type AraC comme ExsA, est transcrit essentiellement à 37°C et active les opérons *yop* (*Yersinia* outer protein) codant les substrats du SSTT et l'opéron *virC* codant les composants du système. YmoA est une histone bactérienne qui intervient dans la modification de la structure de l'ADN et réprime l'expression des gènes du SSTT. L'activation des opérons *yop* par VirF nécessite d'abord un changement de conformation de l'ADN favorable à la transcription (Lambert, Sluiter, et Cornelis, 1992). Cette modification intervient lorsque la dégradation de YmoA par les protéases ClpXP et Lon est augmentée à 37°C (Jackson, Silva-Herzog, et Plano, 2004). Chez *P. aeruginosa*, on peut également penser que la conformation de l'ADN est importante pour la régulation du SSTT puisque la protéine Vfr joue un rôle important. En effet, l'homologue de Vfr chez *E. coli*, CRP, influence la conformation de l'ADN lorsqu'elle interagit avec celui-ci et joue le rôle d'activateur notamment dans la régulation de l'opéron arabinose.

D'autres protéines interviennent dans la régulation du SSTT chez les trois espèces de *Yersinia* pathogènes. LcrQ chez *Y. pseudotuberculosis*, et ses homologues YscM1 et 2 chez *Y. enterocolitica* sont des protéines sécrétées par le SSTT qui ont une activité inhibitrice sur ce système (Ramamurthi et Schneewind, 2002). Les

mutants LcrQ ou YscM1-2 expriment les gènes du SSTT même dans des conditions défavorables (forte concentration en calcium). La régulation réalisée par ces protéines se déroulerait au niveau post-transcriptionnel par action sur les parties non traduites des ARN messagers (Cambronne et Schneewind, 2002). L'interaction entre les protéines YscM1 et 2 et la chaperonne SycH lèverait cette répression (Cambronne, Sorg, et Schneewind, 2004).

Contrairement aux protéines LcrQ/YscM, dont l'activité inhibitrice dans le cytoplasme est levée lors de leur liaison à SycH puis leur sécrétion, la protéine LcrH est un répresseur qui reste exclusivement cytoplasmique. Fixée à YopD, un constituant du SSTT dont elle permet la stabilisation et une sécrétion efficace, elle réprime l'expression des Yops par un mécanisme post-transcriptionnel. Bien que ne possédant pas d'activité ribonucléase, ce complexe induit indirectement une dégradation des ARNs des Yop (Anderson *et al.*, 2002).

Il existe également une régulation de la sécrétion exercée par le couple LcrG/LcrV. LcrV est une protéine sécrétée par le SSTT qui a comme chaperonne de type Syc LcrG. La mutation du gène *lcrV* induit une absence de sécrétion des Yops. Celle du gène *lcrG* induit un phénotype dit de perte de spécificité qui se caractérise par une sécrétion des toxines dans le milieu lors d'une infection cellulaire alors que les Yops sont normalement exclusivement injectées et par une sécrétion indépendante de la concentration en calcium *in vitro* (Lee, Tam, et Schneewind, 2000; Matson et Nilles, 2001).

## II B-2. *Salmonella typhimurium*

Actuellement, *Salmonella* est le seul genre bactérien à posséder deux SSTT (Shea *et al.*, 1996). Ces deux systèmes jouent des rôles différents dans les phases d'invasion de la bactérie. Le premier cluster de gènes, SPI.1 (*Salmonella* Pathogenicity Island 1), permet aux pathogènes de passer la barrière de la muqueuse intestinale. Le deuxième cluster de gènes, SPI.2 (*Salmonella* Pathogenicity Island 2), est nécessaire à la bactérie pour la phase d'invasion systémique. Ces deux systèmes sont donc activés à différents stades de l'infection (Galán, 2001). Le SSTT codé par les gènes du SPI.1 (SSTT.1) est exprimé par *Salmonella* dans la lumière du tractus intestinal, alors que le SSTT codé par les

gènes du SPI.2 (SSTT.2) est exprimé seulement quand les bactéries ont pénétré dans les cellules eucaryotes.

L'activation *in vitro* du SSTT.1 de *S. typhimurium* nécessite des conditions environnementales extrêmement particulières. En effet, il faut simultanément un faible taux d'oxygène, une forte osmolarité, et un pH voisin de 8 (Bajaj *et al.*, 1996). Ces conditions sont celles de la lumière du tractus intestinal et permettent donc aux gènes du SSTT d'être activés uniquement quand les bactéries se trouvent sur le site d'invasion. La température n'est pas un facteur environnemental déterminant pour l'activation du SSTT.1, cependant comme pour *Yersinia*, la protéine H-NS apparentée aux histones et jouant un rôle dans la structure de l'ADN, est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes du SPI.1, mais son activité n'a pas été montrée influencée par la température (Schechter *et al.*, 2003).

Il existe deux facteurs de transcription codés dans le SPI.1. HilA est nécessaire à l'expression de tous les gènes du SPI.1 (Bajaj, Hwang, et Lee, 1995). Ce facteur de transcription, dont le gène n'est pas autorégulé, est impliqué dans la perception des conditions environnementales activant le SSTT.1 et se fixe aux promoteurs des gènes *invF* et *prgH* (Bajaj *et al.*, 1996). InvF est le deuxième facteur de transcription dont le gène se localise dans le SPI.1 et il contrôle l'expression des promoteurs du cluster *inv-spa* (Darwin et Miller, 1999; Kaniga, Bossio, et Galan, 1994). L'activité d'InvF est conditionnée par sa liaison avec SicA. SicA est la chaperonne des toxines du SPI.1, SipB et SipC. Lors de l'activation de la sécrétion, SicA se retrouve libre et peut lier InvF pour activer la transcription (Miller, 2002).

Deux autres facteurs de transcription régulent l'activation du SSTT.1 mais ne sont pas codés dans le SPI.1 : SirA et PhoP. SirA est l'élément de réponse du système à deux composants BarA/SirA. Ce système permet l'augmentation de l'expression des gènes de virulence pendant que l'expression des gènes de mobilité diminue. SirA active la virulence directement en augmentant l'expression de HilA pendant que l'activité du flagelle est réprimée indirectement via l'activation de l'expression du gène *csrB* (Teplitski, Goodier, et Ahmer, 2003).

PhoP semble être un régulateur négatif du SSTT.1. En effet, il entraîne une répression de l'expression de *hilA* (Garcia, Soncini, et Groisman, 1996). PhoP est activée après avoir été phosphorylée par PhoQ, en réponse à un changement de la concentration d'ions divalents dans le milieu. Il est donc possible que la faible concentration en calcium dans les vacuoles de phagocytose soit un signal réprimant

l'expression du SSTT.1 après l'internalisation des bactéries. Une étude récente a décrit une interaction spécifique entre les protéines HilE et HilD, intervenant dans la régulation de l'expression du SSTT.1 (Baxter *et al.*, 2003). En effet, HilD est un activateur du promoteur de *hilA*, la fixation de HilE sur HilD agit comme anti-activateur de cette protéine.

Les mécanismes de la régulation de l'expression du SSTT.2 commencent à être décryptés. Garmendia *et al.* ont montré que le système à deux composants SsrA/SsrB contrôle l'expression des gènes de l'appareil de sécrétion et des gènes codant pour les effecteurs, en réponse à différents signaux environnementaux de type faible osmolarité, pH acide ou encore faible concentration en calcium (Garmendia *et al.*, 2003).

### II B-3. *Escherichia coli* enteropathogènes

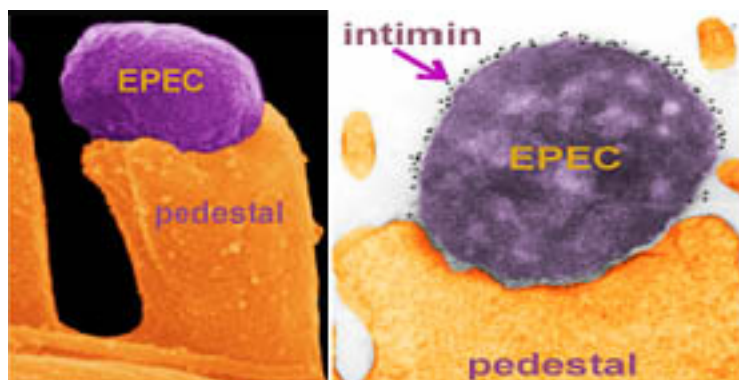


Figure 6 : Interaction entre EPEC et une cellule épithéliale.

Le SSTT permet d'induire la formation d'un renflement (pedestal) sur la membrane de la cellule cible favorisant l'attachement de la bactérie via l'interaction intimine-récepteur Tir. (Frankel *et al*)

Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) sont des bactéries responsables d'infections intestinales sévères. Elles diffèrent des autres souches d'*E. coli* par leur capacité à former des microcolonies sur la surface de ces cellules. Les EPEC sont responsables de la plupart des diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement. Après être entré en contact avec l'épithélium intestinal, les EPEC s'attachent de façon plus intime aux cellules épithéliales et entraînent la disparition des microvillosités et la formation d'un renflement de la cellule sur lequel la bactérie peut se développer (figure 6). Ce processus de colonisation nécessite la présence d'une adhésine bactérienne, l'intimine, et du SSTT (Scaletsky, Silva, et Trabulsi, 1984). L'intimine se fixe de façon spécifique sur le récepteur Tir (translocated intimin

receptor), localisé dans la membrane de la cellule épithéliale à proximité directe de la zone d'attachement initiale de la bactérie sur la cellule. Ce récepteur d'origine bactérienne est injecté dans la cellule par l'intermédiaire du SSTT des EPEC puis exposé sur la membrane de la cellule cible ce qui permet l'interaction avec l'intimine. Le SSTT des EPEC est porté par un locus de 35.5 kb sur l'ADN chromosomique de la bactérie, appelé LEE (Locus of Enterocyte Effacement) composé de 5 opérons. Ce locus est aussi retrouvé chez d'autres souches, telles que les souches d'*E. coli* entérohémorragiques (EHEC). L'expression du SSTT chez les EPEC dépend de la température. Des bactéries cultivées à 28°C ne présentent pas de phénotype de sécrétion. La virulence maximale est observée à 37°C en début de phase exponentielle de croissance (Umanski, Rosenshine, et Friedberg, 2002). *In vivo*, le SSTT des EPEC est un système contact dépendant. *In vitro*, la croissance en milieu de culture eucaryote (RPMI, DMEM) est nécessaire à la sécrétion des protéines Esp (Kenny *et al.*, 1997). En effet, les protéines de type III des EPEC ne sont pas sécrétées dans les milieux de culture bactérien du type milieu LB.

Comme dans la plupart des autres SSTT, l'activation de la virulence chez les EPEC nécessite un activateur transcriptionnel de type AraC, PerA. Cette protéine est codée au niveau de l'opéron *perABC*, localisé sur un plasmide de virulence nommé « EPEC adherence factor (EAF) plasmid ». PerA active sa propre expression et celle du régulateur Ler, codé par le premier gène de l'opéron LEE1. Cette protéine est essentielle pour l'expression de la majorité des opérons LEE chez les EPEC. Le plasmide EAF n'est pas retrouvé chez les EHEC mais il existe des homologues à l'activateur PerC, codés par l'opéron *pchABC* situé sur le chromosome (Iyoda et Watanabe, 2004).

D'autres gènes codés au niveau du LEE1 régulent également l'activation du SSTT. Il s'agit de GrIR et GrIA, qui sont respectivement inhibiteur et activateur du gène *ler*. D'autres régulateurs, non codés au niveau du LEE, interviennent dans la régulation du SSTT chez les EPEC, notamment des protéines associées à la chromatine telle que H-NS, Fis ou IHF (Bustamante *et al.*, 2001; Goldberg *et al.*, 2001; Umanski, Rosenshine, et Friedberg, 2002) dont un homologue, YmoA, est également impliqué dans la régulation du SSTT chez *Yersinia*. Des gènes reliés au quorum sensing sont aussi importants pour la régulation de l'expression du LEE chez les EHEC et les EPEC. L'opéron LEE1 est stimulé par le régulateur QseA, qui est activé via une cascade de transductions impliquant les signaux AI2 et AI3. Il a également été

montré que le facteur sigma RpoS, contrôlé par le quorum sensing, inhibe l'expression de l'opéron *pchABC* contrôlant le SSTT tout comme chez *P. aeruginosa* pour laquelle RpoS inhibe l'expression d'*exsA* (Iyoda et Watanabe, 2005; Sircili *et al.*, 2004; Sperandio *et al.*, 2003) (figure 7).

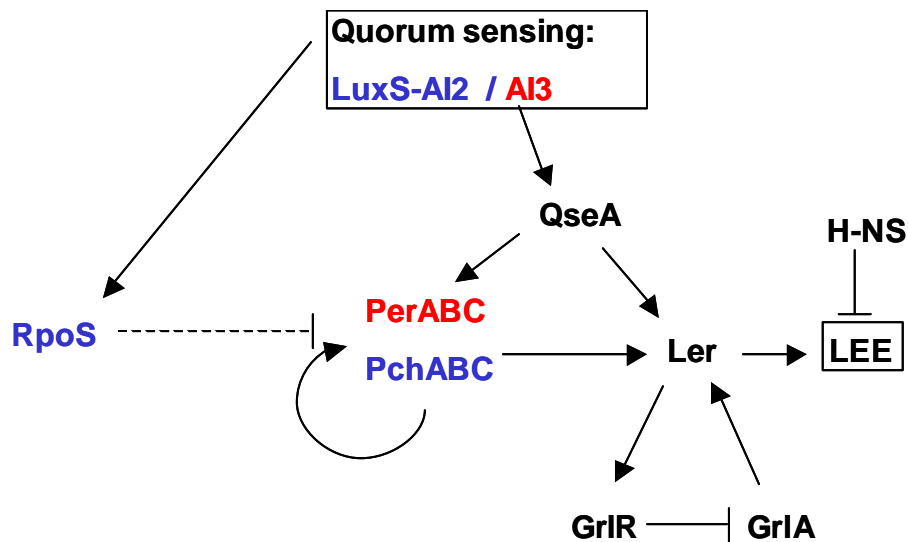


Figure 7 : Régulation du SSTT (cluster LEE) chez les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC). Les protéines, molécules et interactions retrouvées chez les EPEC sont symbolisées en rouge, chez les EHEC en bleu et chez les deux types d'*E. coli* pathogènes en noir. Comme pour *P. aeruginosa*, on voit qu'il existe des boucles de rétrocontrôle positives et négatives pour la régulation du SSTT et que RpoS réprime le SSTT en agissant sur le régulateur clé du système.

#### II B-4. Un schéma de régulation commun

Bien qu'ils présentent des réseaux de régulation différents, les SSTT de ces différents bacilles à Gram négatif possèdent le même principe de régulation. L'activateur principal est un membre de la famille AraC et son activité dépend de ses interactions avec une autre protéine. Au sommet de la cascade se trouve un régulateur négatif, codé par l'un des opérons du SSTT, qui est une protéine sécrétée par le SSTT. Les divergences se rencontrent au niveau des détails de régulation et d'interaction avec cet inhibiteur (figure 8). Chez *Salmonella* et *Shigella*, la protéine qui lie le régulateur principal (InvF et MxiE) est une chaperonne des toxines du SSTT (SicA et IpgC) qui agit comme un co-activateur. Chez *Yersinia*, le complexe



chaperonne-substrat (YopD-LcrH) et l'inhibiteur sécrété (LcrQ/YscM) lient les ARNm pour empêcher leur traduction. Chez *P. aeruginosa*, c'est l'anti-activateur (ExsD) qui est régulé par une chaperonne du SSTT (ExsC). Il semble également que la topologie de l'ADN, contrôlée par des protéines de type histone, ait un rôle dans la répression du SSTT. Tous les acteurs de cette régulation ne sont pas connus chez toutes les bactéries. Ainsi, aucun répresseur sécrété n'a encore été mis en évidence chez les *E. coli* pathogènes et le mécanisme de répression par modification de la structure de l'ADN n'a pas été démontré chez *P. aeruginosa*.

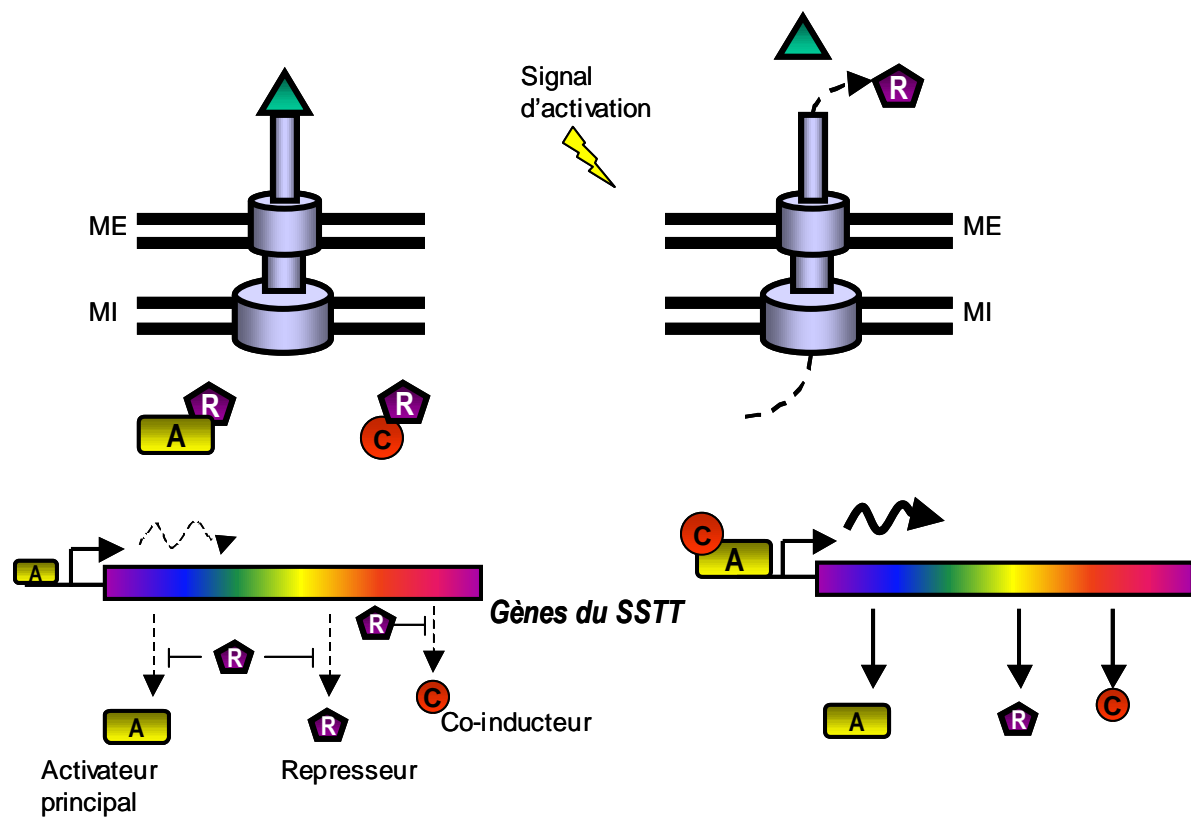


Figure 8 : Principe de base de la régulation des SSTT avec ou sans activation de la sécrétion. L'expression des gènes par l'activateur principal, de type AraC (A), est bloquée par un répresseur (R) qui est sécrété par le SSTT lors de l'activation. Les différents types d'actions possibles du répresseur sont représentés mais ne sont pas retrouvés dans toutes les bactéries.

L'ensemble des réseaux de régulation montre également que l'activation du SSTT chez les bacilles à Gram négatif et notamment chez *P. aeruginosa*, nécessite l'intégration de conditions environnementales, en plus d'être dépendante du contact avec son hôte. Ces systèmes permettent ainsi l'expression de plus d'une vingtaine de protéines en un lieu et un moment précis où elles sont vraiment nécessaires.

## II B-5. SSTT et mucoïdie

Dans le cas d'une infection chronique à *P. aeruginosa*, le SSTT et la capacité à former un biofilm jouent un rôle important. Le SSTT facilite la colonisation lors de la première infection et la dissémination de la bactérie dans l'hôte une fois l'infection installée. Le phénotype mucoïde avec formation du biofilm, permet la persistance de la bactérie. Cependant, la cytotoxicité dépendante du SSTT peut être difficilement associée au développement sous forme de biofilm puisque le SSTT est réprimé sous ce mode de croissance. Le développement de nouvelles thérapies contre *P. aeruginosa*, en particulier lors d'une infection pulmonaire chronique, bénéficierait grandement de la compréhension des mécanismes conduisant à cette répression. Dans cette optique, nous avons voulu déterminer quels sont les mécanismes mis en jeu pour le passage d'une bactérie mobile, non mucoïde, avec un SSTT actif à une bactérie mucoïde avec un SSTT réprimé ?

Le quorum sensing qui joue un rôle important dans la formation du biofilm et la régulation de nombreux facteurs de virulence pourrait être un des mécanismes impliqués (Kuchma, Connolly, et O'Toole, 2005).

### III. Le Quorum Sensing

#### III-A. Généralités

Face à une modification de leur environnement, les bactéries ont besoin de coordonner la réponse dans l'ensemble de la population en modifiant un grand nombre de gènes. Cette régulation est notamment permise par une communication intercellulaire, que l'on pensait jusqu'il y a peu de temps réservée aux organismes pluricellulaires.

Les bactéries produisent en effet des molécules de signalisation diffusibles qui s'accumulent dans l'environnement au cours de la croissance. Ces phéromones bactériennes permettent à chaque cellule de « sentir » lorsqu'une unité de population ou quorum bactérien (ou densité de population) est atteint et d'initier un comportement concerté de toute la population bactérienne. Lorsque la densité de population devient suffisante, ce mécanisme de régulation globale, défini par le terme de « quorum sensing », permet aux bactéries de coordonner rapidement au sein de la population, l'expression de gènes spécifiques.

Décrit pour la première fois chez *Vibrio fischeri* pour le phénomène de bioluminescence, ce mécanisme a été aujourd'hui identifié chez de nombreuses bactéries (à Gram-négatif et à Gram-positif). Il est connu pour réguler, en fonction de la densité de population, des processus impliqués dans l'adaptation métabolique et la virulence : production de facteurs de virulence, développement de la compétence génique, formation du biofilm et mobilité (de Kievit et Iglewski, 2000; Kleerebezem *et al.*, 1997; Withers, Swift, et Williams, 2001). Récemment, il a été montré que ce mécanisme de régulation globale semble pouvoir intervenir aux différents stades de la croissance bactérienne et durant les phénomènes de stress (Van Delden, Comte, et Bally, 2001).

La régulation via le quorum sensing s'effectue toujours selon le même modèle avec des variations spécifiques à chaque organisme. Le quorum sensing fait intervenir trois acteurs principaux : un signal également appelé autoinducteur, un mécanisme permettant la synthèse de ce signal et un régulateur transcriptionnel. Bien que le

mécanisme de quorum sensing soit retrouvé chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, les acteurs sont très différents et peuvent être classés en trois groupes : le système LuxI/R chez les bactéries à Gram négatif qui utilise généralement des homosérines lactones comme signal, le système des bactéries à Gram positif avec des oligopeptides modifiés comme autoinducteur, et les systèmes hybrides (Henke et Bassler, 2004). La figure 9 résume ces trois systèmes et présente des exemples de différents autoinducteurs et systèmes régulés par le quorum sensing.

### **III A-1. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram positif : Oligopeptides et Régulateurs à deux composants**

Chez les bactéries à Gram positif le signal est un oligopeptide, obtenu à partir d'un précurseur protéique et sécrété via un transporteur ABC. Lorsque la concentration de ce peptide dans le milieu atteint le seuil de stimulation, il est détecté par un système de signalisation à deux composants (senseur-régulateur). L'interaction du peptide avec le senseur provoque l'autophosphorylation et l'activation de celui-ci qui transfère alors un groupement phosphate sur le régulateur. Le régulateur phosphorylé active alors la transcription de gènes cibles (Surette et Bassler, 1998). Le quorum sensing chez les bactéries à Gram positif est notamment impliqué dans l'acquisition de la compétence génétique chez *Bacillus subtilis* et la virulence chez *Staphylococcus aureus* (Kleerebezem *et al.*, 1997; Yarwood et Schlievert, 2003).

|                              | Gram-negative: LuxI/R   | Gram-positive: oligopeptide   | Hybride  |
|------------------------------|---|---|--|
| Organisation du système      |   |   |  |
| Structure des autoinducteurs | <p>3-O-C12-HSL/LasI<br/><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>C4-HSL/RhlI<br/><i>P. aeruginosa</i></p> <p>C8-HSL/TraI<br/><i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> <p>C6-HSL/LuxI<br/><i>Vibrio fischeri</i></p>   | <p>ERGMT</p> <p>CSF/<i>phrC</i><br/><i>Bacillus subtilis</i></p> <p>ADPITRQWGD</p> <p><i>comX</i><br/><i>B. subtilis</i></p> <p>YSTCDFIM      GVNACSSLF</p> <p>INCDFLL      YSTCYFIM</p> <p>AIP I-IV<br/><i>Staphylococcus aureus</i></p> | <p>3-OH-C4-HSL/LuxM<br/><i>Vibrio harveyi</i></p> <p>AI-2/LuxS<br/><i>V. harveyi</i></p> <p>AI-2/LuxS<br/><i>Salmonella typhimurium</i></p>  |
| Systèmes régulés             | <p><i>P. aeruginosa</i>:<br/>Elastase, rhamnolipid<br/>Facteur de virulence</p> <p><i>V. fischeri</i>:<br/>Bioluminescence</p> <p><i>Erwinia carotovora</i>:<br/>Exoenzyme (virulence),<br/>Production d'antibiotique</p> <p><i>A. tumefaciens</i>:<br/>Conjugation (Plasmide Ti)</p> | <p><i>B. subtilis</i>:<br/>Compétence, sporulation</p> <p><i>S. aureus</i>:<br/>Virulence, biofilms</p>   | <p><i>V. harveyi</i>:<br/>Luminescence, type III</p> <p><i>Vibrio cholerae</i>:<br/>Virulence, biofilm</p> <p><i>Vibrio anguillarum</i>:<br/>Protease production</p> <p><i>S. typhimurium</i>:<br/>Lsr transporter</p> |

Figure 9 : Les trois principaux groupes de quorum sensing : LuxI/R , Oligopeptides et système à deux composants, et le système hybride. Les pentagones rouge représentent les acyl homosérines lactones (AHLs) ; les lignes bleues les oligopeptides et les triangles oranges l'autoinducteur 2 (AI-2). Les principaux autoinducteurs et systèmes, contrôlés par le quorum sensing, les plus étudiés sont exposés sous chaque groupe. Hpt, histidine phosphotransférase ; P, phosphate ; RR, régulateur de réponse ; SHK, senseur histidine kinase (Henke et Bassler 2004).

### III A-2. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif : le système LuxI/LuxR

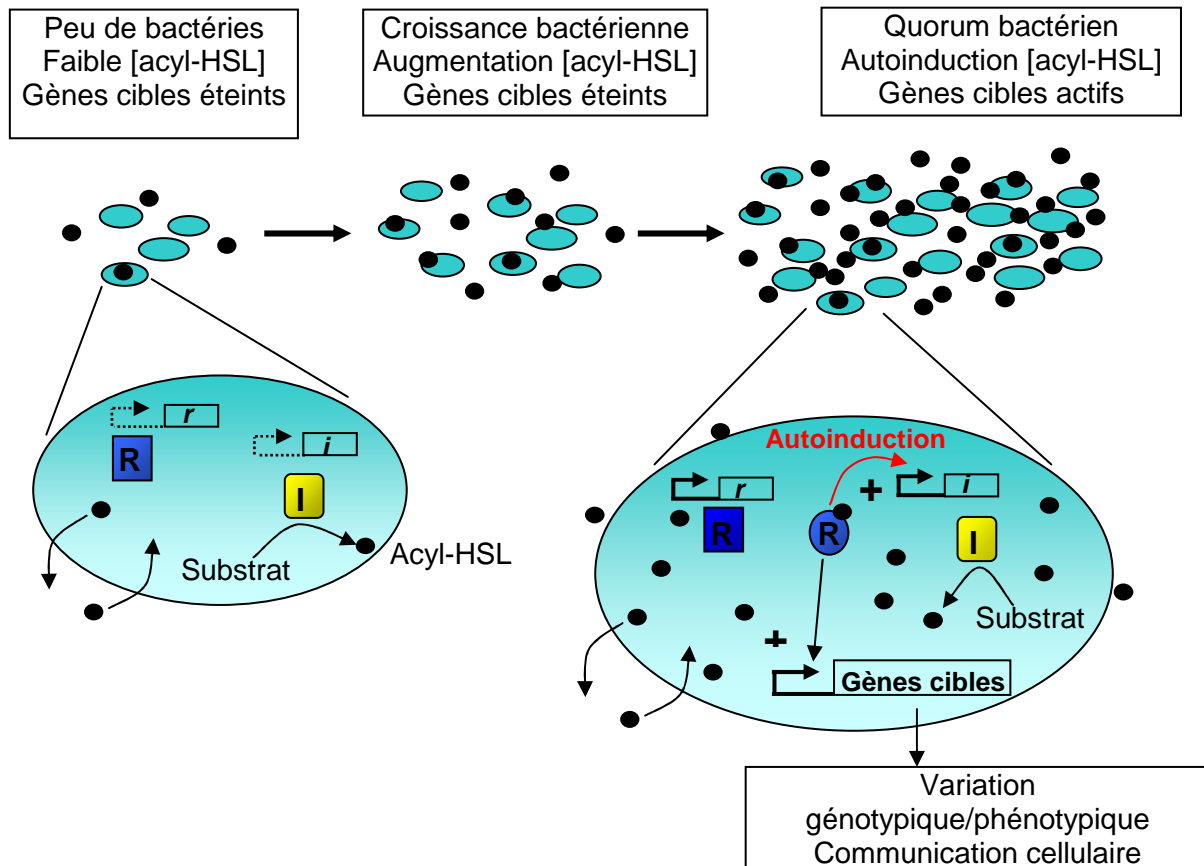


Figure 10 : Mécanisme du quorum sensing médié par les homosérines lactones. *r*/*R* : régulateur (gène/protéine) ; *i*/*I* : synthase (gène/protéine), [acyl-HSL] : concentration en acyl-HSL.

Ce système de quorum sensing est médié par des acyl-homosérines lactones (acyl-HSLs) produites par une synthase nommée *I* et reconnues par un régulateur *R* (figure 10). A faible densité cellulaire, le niveau basal d'expression de la synthase est faible. Les acyl-HSLs diffusent dans le milieu et s'accumulent au cours de la croissance. Lorsque la concentration atteint un seuil, l'acyl-HSL interagit avec son récepteur spécifique. La formation de ce complexe entraîne la modulation de l'expression des gènes cibles dont le gène de la synthase *I*, d'où l'appellation d'autoinducteur pour les acyl-HSLs. Du fait de la diffusion du signal et de cette boucle d'auto-induction, l'induction d'une bactérie induit celle des bactéries voisines aboutissant ainsi à une réponse coordonnée de l'ensemble de la population.

### IIIA 2-a) Les acyl-homosérines lactones

De nombreuses acyl-HSLs sont produites par les bactéries. Elles se différencient par leur chaîne acyl. Ces molécules diffusent librement à travers la paroi bactérienne dans le cas du signal C4-HSL de *P. aeruginosa* ou font l'objet d'un transport actif par le biais de pompes d'efflux pour le signal 3-oxo-C12-HSL de la même bactérie (Pearson, Van Delden, et Iglewski, 1999). La longueur de la chaîne carbonée du groupe acyl, influençant l'hydrophobicité de la molécule, déterminerait son mode de transport.

### IIIA 2-b) Les synthases I

Trois familles de synthases d'acyl-HSLs ont été décrites et groupées selon leurs homologies de séquences. Chaque classe ne partage aucune homologie avec les autres. La classe I regroupe les enzymes possédant une similarité avec LuxI (*V. fischeri*) (Fuqua et Greenberg, 1998). La classe II regroupe aujourd'hui les enzymes LuxM (*V. harveyi*), AinS (*V. fischeri*) et VanM (*V. anguillarum*) (Gilson, Kuo, et Dunlap, 1995; Milton *et al.*, 2001). La dernière classe (III) possède actuellement un seul membre, HdtS, isolé chez *P. fluorescens* (Laue *et al.*, 2000).

Bien que ces enzymes soient différentes, le mécanisme de synthèse des acyl-HSLs reste identique. Ces synthases catalysent la liaison de la S-adénosyl-méthionine (SAM) avec la chaîne d'acide gras d'une acyl-acyl-carrier protein (acyl-ACP), suggérant une convergence au cours de l'évolution dans le mécanisme de synthèse des autoinducteurs.

### IIIA 2-c) Les régulateurs R

Deux classes de régulateurs ont été décrites.

Les régulateurs dits de classe I, de la famille LuxR (*V. fischeri*) agissent sous forme dimérique et sont constitués de deux modules fonctionnels :

- un domaine de liaison à l'homosérine lactone en partie N-terminale.
- un domaine régulateur de la transcription avec un motif hélice-tour-hélice de fixation à l'ADN.

La liaison de l'autoinducteur avec le régulateur induit une modification de structure rendant le domaine régulateur accessible et fonctionnel.

La seconde classe de régulateurs n'a pour l'instant été mise en évidence que chez le genre *Vibrio*. Il s'agit de protéines homologues aux senseur-régulateur hybrides intervenant dans les systèmes de régulation à deux composants. Ils nécessitent l'intervention d'autres partenaires pour répondre aux autoinducteurs.

Ces systèmes de type LuxI/R semblent exclusivement réservés à la communication au sein d'une espèce. Chacune produit un signal qui diffère de celui produit par la plupart des autres bactéries et les régulateurs sont très sensibles à la structure de l'autoinducteur. Une petite modification de la molécule induit une absence de reconnaissance par le senseur voire une inhibition du système. Les bactéries semblent cependant avoir développé un mécanisme de communication entre espèces différentes toujours basé sur le mode quorum sensing.

### **III A-3. La communication inter espèces : le cas du signal AI2 et de la synthase LuxS**

La première communication inter-espèces, via un mécanisme de quorum sensing différent de celui médié par les acyl-HSLs ou les oligopeptides, a été mise en évidence par Bassler en 1999 entre *E. coli*, *S. typhimurium* et *V. harveyi* (Surette, Miller, et Bassler, 1999). D'abord découvert chez *V. harveyi*, le signal nommé AI2, est produit par un grand nombre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif et nécessite la présence de la protéine LuxS. Contrairement aux autres signaux quorum sensing, la voie de synthèse et les intermédiaires pour la production de l'AI2 sont identiques dans toutes les bactéries étudiées produisant l'AI2.

Chez la plupart des bactéries répondant au signal AI2, celui-ci est impliqué dans la formation de biofilm regroupant plusieurs espèces et dans la régulation de facteurs de virulence entre espèces (Fong *et al.*, 2001; McNab et Lamont, 2003). Cependant le mécanisme de reconnaissance et de transmission du signal n'a été mis à jour que chez trois espèces (*V. harveyi*, *V. cholerae*, *S. typhimurium*).

Ce type de quorum sensing pourrait être un signal supplémentaire pour l'adaptation à un nouvel environnement multi bactérien. Dans le cas de bactéries pathogènes, la



détection de ce signal permettrait l'expression de systèmes en adéquation avec l'environnement. C'est ce que suggèrent les résultats obtenus par Duan *et al.* En effet, lors d'infections pulmonaires chez le rat par *P. aeruginosa* en présence de flore oropharyngée, les lésions causées par le pathogène sur le tissu sont plus importantes (Duan *et al.*, 2003).

### III-B. Le quorum sensing chez *P. aeruginosa*

La régulation via le quorum sensing est essentielle dans la pathogénie de *P. aeruginosa* notamment lors des infections pulmonaires chroniques. Elle contrôle entre autres l'adhésion, la formation de biofilm, et l'expression d'une batterie de facteurs de virulence permettant à la fois la progression de l'infection et la persistance des bactéries dans les poumons (Imamura *et al.*, 2005; Smith et Iglewski, 2003).

*P. aeruginosa* possède deux systèmes complets de quorum sensing basés sur les homosérines lactones nommés LasI/R et RhII/R (figure 11). LasI, appartenant à la famille des synthases de type LuxI, synthétise la molécule signal 3-oxo-C12-HSL. Ce premier autoinducteur appelé PAI1 (*Pseudomonas* AutoInducer 1) se lie au régulateur LasR, homologue à LuxR (Gambello et Iglewski, 1991; Pearson *et al.*, 1994). Le couple LasR-PAI1 régule l'expression d'une variété de gènes cibles. Il active notamment l'expression de facteurs de virulence tels que les élastases LasA et LasB et l'exotoxine A (ToxA). Ce premier système de QS régule aussi de façon positive certains gènes constituant l'appareil de sécrétion de type II en activant l'opéron *xcp* (Smith et Iglewski, 2003) couplant ainsi la synthèse des toxines et des constituants du système permettant leur export. Une fois activé par la 3-oxo-C12-HSL, LasR active également le gène *lasI* créant ainsi une boucle d'auto-induction (Seed, Passador, et Iglewski, 1995).

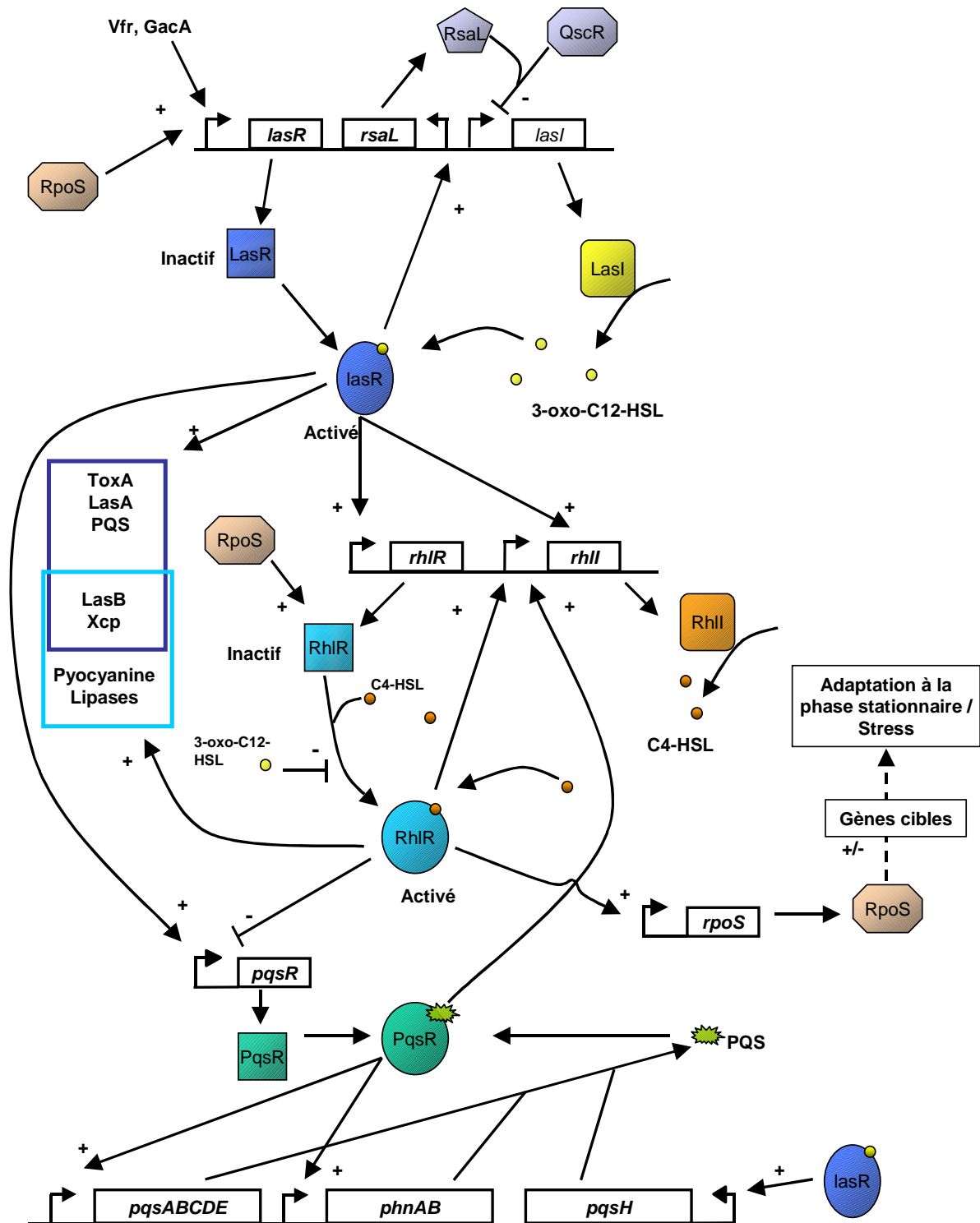


Figure 11 : Principales protéines et réseaux d'interactions impliqués dans le mécanisme de quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*. (-) inhibition, (+) activation

Le second système de régulation par quorum sensing chez *P. aeruginosa* est codé par les gènes *rhII* et *rhIR*. RhII catalyse la synthèse d'une HSL, la C4-HSL (Ochsner et Reiser, 1995). Ce second autoinducteur, nommé PAI2, se lie au régulateur RhIR pour l'activer. Le complexe RhIR-C4-HSL régule notamment l'expression des gènes

*lasB*, *xcp* et *rhlAB* (nécessaire à la production des rhamnolipides) et la production de métabolites secondaires tels que la pyocyanine et le cyanure (opéron *hcnAB*).

Les deux systèmes de régulation par quorum sensing chez *P. aeruginosa* sont organisés en cascade. Le système LasI/R exerce une régulation à deux niveaux sur le système RhII/R. Au niveau transcriptionnel, Latifi *et al.* et Pesci *et al.* ont montré que RhIR est activée par le couple LasR-PAI1 (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997). Au niveau post-transcriptionnel, la 3-oxo-C12-HSL entre en compétition avec la C4-HSL pour la liaison au régulateur RhIR, résultant en un complexe inactif (Pesci *et al.*, 1997). Les synthèses LasI et RhII produisent également d'autres homosérines que les PAI1 et PAI2 qui pourraient également jouer le rôle de compétiteur et moduler les interactions autoinducteur-récepteur (Pearson *et al.*, 1994; Winson *et al.*, 1995).

Bien que ces deux systèmes soient imbriqués, ils ne contrôlent pas les mêmes ensembles de gènes. Plusieurs études d'analyse de transcriptome et de protéome ont mis en évidence que les gènes régulés par le quorum sensing peuvent être regroupés en trois classes : ceux régulés exclusivement par un des autoinducteurs (le gène *toxA*, les gènes pour la production de pyocyanine) et ceux nécessitant les deux autoinducteurs simultanément pour voir leur expression modifiée (l'opéron *xcp*). De plus, ces classes de gènes sont exprimées à des stades différents de la croissance bactérienne (Arevalo-Ferro *et al.*, 2003; Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Wagner, Gillis, et Iglewski, 2004). Ces études indiquent que l'architecture en cascade des deux systèmes de quorum sensing induit une expression de gènes séquentielle permettant probablement la mise en place des processus précoces et tardifs lors d'une infection.

En plus des deux homosérines majoritaires, *P. aeruginosa* produit une 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS, *Pseudomonas* Quinolone Signal) (Pesci *et al.*, 1999). Contrairement aux PAI1 et PAI2 dont la concentration est maximale lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance, la concentration du PQS dans le surnageant de culture est maximale à forte densité cellulaire ce qui correspond à une fin de phase stationnaire de croissance en milieu riche (après 30 à 42 heures post inoculation) (McKnight, Iglewski, et Pesci, 2000). La synthèse du PQS nécessite l'expression des protéines codées par les opérons *pqsABCDE*, *phnAB* et *pqsH* (D'Argenio *et al.*, 2002; Gallagher *et al.*, 2002). La transcription de ces gènes nécessite la présence du régulateur PqsR (aussi nommé

MvfR) (Cao *et al.*, 2001;Deziel *et al.*, 2005;Gallagher *et al.*, 2002). D'après les études réalisées par les équipes de Deziel *et al.* et Wade *et al.*, ce régulateur contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la virulence dont ceux des opérons *phnAB*, et *pqsABCDE* (Deziel *et al.*, 2005;Wade *et al.*, 2005).

Ce signal PQS est imbriqué dans les mécanismes de quorum sensing. En effet la synthèse du PQS est sous la dépendance des systèmes LasI/R et RhII/R qui contrôlent l'expression du gène *pqsR* (Wade *et al.*, 2005). Le complexe LasR-PAI1 a un effet positif sur la transcription de *pqsR* tandis que le couple RhIR-PAI2 a un effet négatif. L'expression de PqsR induit la production de PQS qui peut alors se lier à PqsR et facilite sa liaison au promoteur de l'opéron *pqsABCDE*. Cette boucle de rétroaction positive dans la production du PQS en fait un co-inducteur. Le complexe PqsR-PQS active également la transcription de *rhII*, formant cette fois une rétroaction négative. Cet effet n'est visible que chez un mutant *lasR* ce qui suggère que cela se produit lorsque *lasR* n'est pas exprimé (Gallagher *et al.*, 2002).

Ces trois systèmes de communication intercellulaire sont fortement impliqués dans la pathogénicité de la bactérie. Les différents mutants des régulateurs ou des voies de synthèse des signaux possèdent une cytotoxicité moins élevée que les souches parentales.

Jusqu'à présent, il n'a pas été mis en évidence que *P. aeruginosa* est capable de produire le signal de communication inter espèces AI2, synthétisé par les homologues de la synthase LuxS (voir chapitre III A-3). Le surnageant de culture de *P. aeruginosa* n'induit pas d'activation des biodétecteurs pour ce signal et il n'existe pas d'homologue à LuxS dans le génome de *P. aeruginosa*. Cependant, les éléments pour répondre au signal AI2 sont présents comme l'ont montré Duan *et al.* L'addition d'AI2 dans le milieu de culture active l'expression de facteurs de virulence, notamment LasB et l'exotoxine T (Duan *et al.*, 2003).

Les études utilisant une approche globale à l'aide de puces à ADN, pour définir les régulateurs des systèmes LasI/R et RhII/R, ont montré qu'environ 40% des gènes contrôlés par le quorum sensing, le sont aussi par le facteur sigma alternatif RpoS. Ce facteur de transcription régule un ensemble de gènes en réponse à l'entrée en phase stationnaire de croissance et à différents stress dont la chaleur, l'augmentation d'osmolarité, un pH bas ou la présence de peroxyde d'hydrogène. Le rôle de RpoS

dans la régulation par le quorum sensing a été longtemps controversé. Deux travaux ont montré, à l'aide d'une analyse de transcriptome et par une fusion entre le promoteur du gène *rpoS* et le gène *lacZ*, que le complexe RhIR-PAI2 active la transcription de *rpoS* (Latifi *et al.*, 1996;Wagner *et al.*, 2003). A l'inverse Whiteley *et al.* démontrent que la transcription de *rpoS* n'est pas régulée par le quorum mais que RpoS réprime l'expression des gènes de biosynthèse du cyanure (*hcnABC*), probablement en inhibant la transcription de *rhII*. Ces résultats ont été récemment complétés et unifiés par Schuster *et al.* RpoS est activée par RhIR couplée à la C4-HSL et stimule en retour la transcription de LasR et RhIR (Schuster *et al.*, 2004). La régulation des gènes contrôlés par le quorum sensing (activation ou répression) en phase stationnaire est probablement dirigée en partie par RpoS.

Un autre facteur sigma alternatif régule le quorum sensing, RpoN. Ce régulateur est responsable de l'adaptation du métabolisme lors d'une carence en azote. Il contrôle également l'expression de certains gènes impliqués dans des processus de virulence tels que ceux permettant la production d'alginate ou la formation des pili (Ishimoto et Lory, 1989;Kimbara et Chakrabarty, 1989). Thompson *et al.* en 2003 ont montré qu'une bactérie mutée dans le gène *rpoN* possède une transcription réduite de *rhII* ainsi qu'une production moins importante de C4-HSL lors d'une culture en milieu pauvre en nutriments (milieu M9) par rapport à la souche parentale. Dans les mêmes conditions de culture, ce mutant montre également une diminution de l'expression de certains systèmes contrôlés par le quorum sensing (production de pyocyanine, formation du biofilm) (Thompson *et al.*, 2003). Ainsi *rhII* est sous le contrôle positif de RpoN et cette régulation est dépendante de l'environnement nutritionnel. Un autre système impliqué dans la réponse stringente provoquée par une carence en acides aminés, chez les bactéries, est un activateur du quorum sensing, la signalisation par les polyphosphoguanosines (ppGpp) synthétisées par la protéine RelA. Ce mécanisme s'active lors d'une carence en nutriments. L'expression de la synthase RelA d'*E. coli*, dans une culture en phase exponentielle, induit une expression précoce de facteurs impliqués dans le QS dont les autoinducteurs (Van Delden, Comte, et Bally, 2001).

L'analyse de la séquence génique entre *lasI* et *lasR* a permis d'identifier une protéine de 80 acides aminés nommé RsaL. La transcription de *rsaL* est activée par le complexe LasR-PAI1 et RsaL réprime l'expression de *lasI* (de Kievit *et al.*,

1999;Fagerlind *et al.*, 2003). RsaL est un compétiteur du complexe LasR-PAI1 pour la fixation sur le promoteur de *lasI*. Cette compétition serait en faveur de LasR seulement lorsque le niveau de PAI1 aurait atteint la concentration seuil pour activer la régulation par quorum sensing. Par ce mécanisme, la bactérie contrôlerait de façon fine le taux de production du signal 3-oxo-C12-HSL en phase exponentielle de croissance.

Un autre régulateur, QscR, homologue à RhIR et LasR réprime l'expression des gènes quorum sensing dépendant en phase exponentielle de croissance (Chugani *et al.*, 2001). Les bactéries mutées pour le gène *qscR* expriment de façon précoce *lasI* et *rhII* en conservant cependant la hiérarchie entre *lasI* et *rhII*. Ledgham *et al.* ont montré que QscR est capable de former des hétérodimères avec LasR et RhIR (Ledgham *et al.*, 2003). Cette interaction pourrait inhiber l'activité des régulateurs LasR et RhIR en empêchant la formation des complexes activés avec les homosérines. Ces complexes ne pouvant plus activer l'expression des synthases, il en résulterait une inhibition de la régulation par le quorum sensing.

Comme *qscR*, *lasR* est contrôlé par GacA, le régulateur de réponse fonctionnant en partenariat avec le senseur GacS (Reimann *et al.*, 1997). Ce système à deux composants active l'expression du quorum sensing en réponse à des signaux environnementaux non connus.

Le régulateur global, Vfr, homologue de la protéine CRP impliquée dans la répression catabolique chez *E. coli*, module également l'expression de *lasR*. En effet, en présence d'AMPc il active la transcription de *lasR* (Albus *et al.*, 1997).

D'autres acteurs influent sur l'expression des gènes de la régulation par le quorum sensing. Il s'agit principalement de mécanismes influant sur la disponibilité des signaux du quorum. Ainsi des perturbations des membranes bactériennes ou des pompes d'efflux vont perturber la diffusion des homosérines et du PQS (Aendekerk *et al.*, 2005;Kohler *et al.*, 2001). Certaines bactéries sont également capables de sécréter des lactonases qui vont dégrader les HSLs et diminuer la concentration des signaux dans l'environnement.

### III B-1. Effets des homosérines lactones sur les cellules eucaryotes

Bien que le quorum sensing ait été découvert et étudié comme système de communication chez les bactéries, des études récentes indiquent que les autoinducteurs peuvent également moduler l'expression de gènes de l'organisme hôte. Par exemple, les autoinducteurs de *P. aeruginosa* pénètrent et sont actifs dans les cellules eucaryotes dans lesquelles ils altèrent la réponse immunitaire (Williams *et al.*, 2004). Une fois entré dans la cellule, le signal 3-xo-C12-HSL stimule la production d'IL8 dans les cellules épithéliales pulmonaires (Smith *et al.*, 2001). Il influence également le processus d'apoptose dans les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (Tateda *et al.*, 2003). Ainsi, les homosérines lactones de *P. aeruginosa* induisent les facteurs de virulence en relation avec le quorum sensing et modulent aussi la réponse immune durant l'infection.

Principalement activé en fonction de la densité cellulaire et coordonnant les réponses au changement d'état de la culture bactérienne, le QS pourrait donc être un des mécanismes impliqués dans la modification du phénotype du SSTT lors de l'infection, et notamment lors du développement en biofilm. Cependant, il n'explique pas l'apparente dualité des phénotypes du SSTT qui a pu être observée parmi les souches issues des poumons de malades. La présence d'un phénomène d'épigénèse associé au SSTT est l'une des hypothèses qui peut être avancée pour expliquer l'existence de ces deux phénotypes.

## IV. Epigénèse

Le terme épigénèse a été créé par Harvey (1651), pour décrire la formation progressive des différentes parties d'un embryon. Mais une nouvelle signification a émergé lorsque la génétique a développé les notions de génotype et de phénotype. Aujourd'hui, l'épigénèse définit une modification du phénotype, héritable bien que réversible, qui intervient sans modification du génotype (mutation ou remaniement). Une telle modification épigénétique affecte tout ou partie d'une population et peut apparaître à la suite d'un signal de l'environnement mais ne disparaît pas avec ce stimulus, contrairement au phénomène d'adaptation (tableau 1). Autrement dit, avec le même génome, et dans des conditions identiques, des cellules ou des organismes peuvent avoir un phénotype différent, si leur passé a été différent. Ceci est la manière biologique de décrire ce que les physiologistes appellent la multistationnarité, résultant du fonctionnement de certains systèmes dynamiques non linéaires.

Il a déjà été montré que l'utilisation de cette notion de multistationnarité décrit relativement bien certains processus biologiques tels que l'épigénèse, la différenciation cellulaire ou la mémoire (Guespin-Michel, Polack, et Mérieau, 2003) (Casadesus et d'Ari, 2002; Demongeot, 1998).

Tableau 1 : Caractéristiques des différents phénomènes conduisant à une modification du phénotype.

| Mutation                          | Adaptation                        | Modification Epigénétique   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| – Rare / Affecte un individu      | – Affecte toute la population     | – Bascule un système dans un état parmi plusieurs états possibles |
| – Modification du génotype        | – Pas de modification du génotype | – Affecte tout ou partie de la population                         |
| – Irréversible / héréditaire      | – Réversible / non héréditaire    | – Pas de modification du génotype                                 |
| – Indépendante de l'environnement | – Dépend de l'environnement       | – Réversible sous certaines conditions / héréditaire              |
|                                   |                                   | – Induite par l'environnement puis indépendante                   |



#### **IV-A. L'épigenèse chez les bactéries : L'exemple de l'opéron lactose chez *E. coli***

L'épigenèse est aujourd'hui reconnue et étudiée chez les eucaryotes. Les recherches portent à l'heure actuelle sur des mécanismes biochimiques, comme la méthylation de l'ADN. Le modèle des modifications épigénétiques étudiées chez les organismes eucaryotes, selon ce type d'approche, est l'extinction d'un des deux chromosomes X dans les cellules de mammifères femelles. A l'inverse, peu d'études sur les modifications épigénétiques ont été menées chez les procaryotes bien qu'elles aient déjà été décrites dans les années cinquante pour l'opéron lactose chez *E. coli*.

Deux études indépendantes réalisées par Novick et Weiner (1957) et Cohn et Horibata (1959) ont mis en évidence un phénomène d'épigenèse dans l'opéron lactose (*lac*) (Cohn et Horibata, 1959a; Cohn et Horibata, 1959b; Cohn et Horibata, 1959c; Novick et Wiener, 1957). Ces deux travaux montrent qu'à partir d'une même culture, il existe des différences entre les sous-populations bactériennes, pouvant être maintenues pendant un très grand nombre de générations, en fonction de la présence ou non d'une induction antérieure. L'expérience a été la suivante. Une culture non induite d'*E. coli* a été placée dans un milieu contenant une concentration d'inducteur suffisante pour activer l'opéron lactose. Immédiatement après, la culture a été divisée en deux puis l'une a été diluée de telle façon que la concentration en inducteur, appelé « concentration de maintien », ne soit pas suffisante pour activer l'opéron lactose. L'autre moitié de la culture a été diluée à la « concentration de maintien » 10 minutes plus tard. Dans une autre expérience similaire, après avoir ou non été en contact avec la forte concentration d'inducteur, les deux cultures ont été placées avec de l'inducteur et du glucose. Dans ces conditions l'opéron lactose est normalement non induit. Le même résultat a été obtenu. La culture immédiatement diluée est restée non induite dans le milieu avec la « concentration de maintien » ou avec le glucose, contrairement à la culture qui a été en contact 10 min avec la forte concentration en inducteur et qui reste induite dans ces conditions. Le maintien de ces deux états est conservé sur au moins 150 générations. De plus, une co-culture de cellules induites et non induites, dans un milieu avec une faible concentration

d'inducteur, a montré que les descendants d'une sous population héritaient des mêmes caractéristiques d'induction ou de non induction.

Ainsi deux cultures génétiquement identiques, placées dans des conditions environnementales identiques, peuvent présenter un phénotype différent. Le seul détail différent est leur « histoire », ici un signal transitoire (une exposition temporaire à une forte concentration d'inducteur).

Ces expériences montrent également que la concentration nécessaire pour induire l'expression de l'opéron *lac* est beaucoup plus importante que celle pour laquelle l'expression de l'opéron retourne à l'état non induit. Ainsi, si l'induction de l'opéron *lac* (mesuré par la production de la beta-galactosidase) est représentée en fonction de la concentration en inducteur, on obtient un cycle d'hystérésis (figure 12b). Il y a alors possibilité de multistationnarité (bi stabilité dans ce cas) : pour une concentration d'inducteur donnée, il peut exister deux niveaux de production de beta-galactosidase. Le mécanisme de régulation de l'opéron lactose est décrit dans la figure 12a. La perméase est présente au niveau membranaire des cellules induites. Même si l'inducteur se trouve en faible concentration ou avec du glucose, elle permet son accumulation dans le cytoplasme à un niveau suffisant pour induire l'opéron *lac*. En l'absence de perméase, ce niveau ne peut être atteint en présence de glucose ou d'une faible concentration en inducteur. Ainsi la perméase facilite sa propre synthèse ce qui correspond à une boucle de rétroaction positive.

Cette modification épigénétique a été récemment réétudiée à l'aide d'un modèle mathématique décrivant le système pour mieux comprendre, au niveau quantitatif, les mécanismes de régulation régissant cette multistationnarité (Ozbudak *et al.*, 2004).

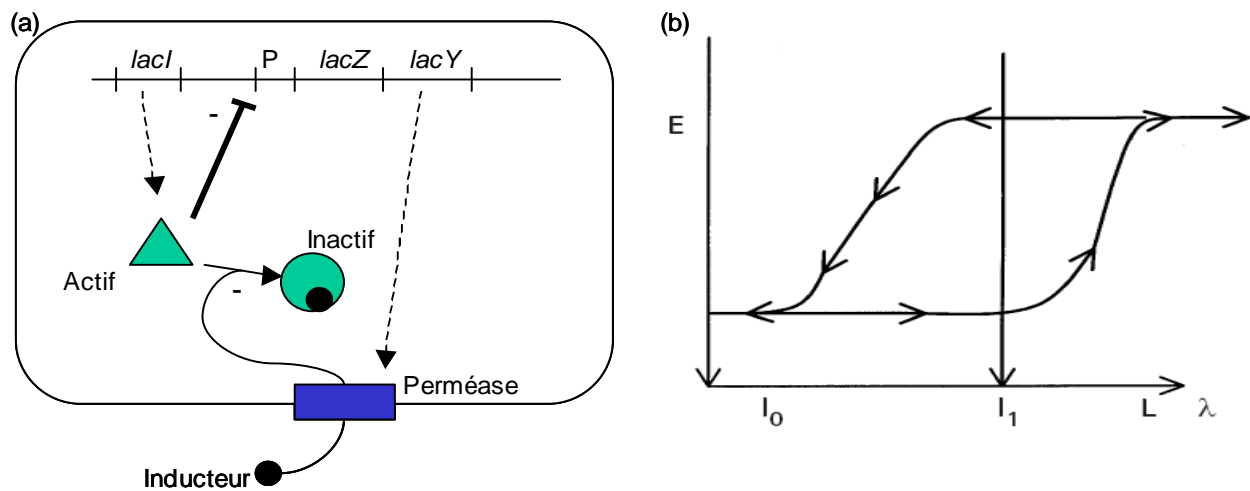


Figure 12 : Adaptation au lactose et épigénèse chez *E. coli*. (a) Représentation de l'opéron lactose avec la perméase codée par *lacY* amplifiant sa propre synthèse. (b) Production de  $\beta$ -galactosidase (E), produite par le gène *lacZ* en fonction de la concentration en inducteur ( $\lambda$ ) dans le milieu. En l'absence de lactose ou d'un autre inducteur ( $I_0$ ), le répresseur Lacl réprime l'expression de l'opéron *lacZY*. Lorsque l'inducteur est ajouté en forte concentration, il diffuse dans la cellule et inhibe Lacl. La  $\beta$ -galactosidase et la perméase sont alors produites. A faible concentration ( $I_1$ ), l'inducteur ne diffuse pas assez pour inactiver le répresseur sauf si la perméase est également présente à la surface notamment dans le cas d'une induction précédente. L'hystérésis provient du fait que la production de  $\beta$ -galactosidase à faible concentration ( $I_1$ ) dépend de la préexistence de la perméase à la membrane suite à une induction précédente. (D'après Guespin 2001)

Un tel phénomène de multistationnarité dans un système biologique a aussi été mis en évidence chez le phage  $\lambda$ . Thomas et Van Ham ont montré qu'une boucle de rétroaction positive est responsable de la coexistence de deux états stables, lyse ou lysogénie, que peut adopter un phage infectant une bactérie. Ces deux phénotypes coexistent dans la même population et dans le même environnement sans nécessité de modifications génétiques (Thomas et Van Ham, 1974). Un cas existe également chez les eucaryotes dans un modèle de sarcome chez la souris (Jain *et al.*, 2002)

Le comportement d'un système biologique peut donc ne pas dépendre seulement de l'environnement mais aussi de son histoire.

#### IV-B. Pré requis pour l'épigénèse et utilité de la modélisation

Les circuits de rétroaction positifs sont les éléments nécessaires à l'existence de multiples états stables dans des systèmes dynamiques non linéaires. Divers travaux ont conduit à montrer que la présence d'au moins un circuit de rétroaction positif est

nécessaire pour générer un phénomène d'épigénèse, de même qu'au moins une boucle de rétroaction négative est nécessaire au maintien d'une homéostasie (Soulé, 2003; Thomas, 1980; Thomas, Thieffry, et Kaufman, 1995). La présence d'au moins une boucle de rétroaction positive dans le réseau de régulation d'un processus biologique peut donc conduire à l'existence de deux états stables dans le même milieu qui peuvent correspondre à un phénomène d'épigénèse. Cependant, la présence d'un circuit de rétroaction positif n'est qu'une condition nécessaire à l'apparition d'une multistationnarité. Il faut également que l'ensemble des conditions, y compris celles dues à la présence d'autres régulateurs agissant sur le réseau, soient compatibles avec cette bistabilité. C'est pourquoi, il est nécessaire d'étudier dans chaque cas la dynamique du système.

Pour ce faire, le réseau de régulation que l'on considère peut être modélisé et analysé à l'aide de deux méthodes complémentaires : la logique généralisée développée par Thomas et ses collaborateurs (Kauffman, 1969; Thomas, 1973) et des outils bioinformatiques basés sur des algorithmes de vérification de modèle et la logique temporelle. Cette dernière a été utilisée dans le cadre de cette étude. L'utilisation de ces modélisations permet de définir les différentes dynamiques que le modèle considéré peut adopter. Ensuite, on vérifie si parmi toutes ces dynamiques certaines sont compatibles avec l'hypothèse épigénétique formulée pour ce modèle. C'est sur ce point que la bioinformatique est intéressante puisqu'elle permet de déterminer de façon exhaustive l'ensemble des dynamiques d'un modèle et de les tester automatiquement contre l'hypothèse. Une fois qu'une ou des dynamiques du système correspondant à l'hypothèse ont été trouvées, ces méthodes permettent également de proposer des expériences permettant de la vérifier.

# **MATERIELS ET METHODES**



## I. Plasmides et Souches bactériennes

Tableau 2 : Liste des souches et plasmides utilisés

| Souches et Plasmides               | Génotypes et caractéristiques   | Références               |
|------------------------------------|---|--------------------------|
| <b><i>E. coli</i></b>              |   |                          |
| JM109                              | <i>endA1, recA1, gyrA96, thi hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>relA1, supE44Δ(lac-proAB)</i> , [F' <i>traD36, proAB lacIqZΔM15</i> ]                    | Promega                  |
| HB101                              | F-, <i>thi-1, hsdS20(rB-, mB-), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, rspL20</i> , (strr), <i>xyl-5, mtl-1</i>                           | Promega                  |
| S17.1                              | <i>RP4-2-Tc ::Mu aph ::Tn7 recA</i> [SmR] ; souche donneuse pour conjugaison biparentale  | Simon 1983               |
| <b><i>P. aeruginosa</i></b>        |   |                          |
| CHA                                | Souche isolée d'un patient atteint de mucoviscidose   | Toussaint 1993           |
| CHA-D1                             | CHA <i>exsA::Gm<sup>R</sup></i>   | Dacheux 1999             |
| CHAΔ <i>pA</i>                     | CHA délétée de la région entre <i>exsB</i> et <i>exsA</i>   | Quénée 2004 (non publié) |
| CHAΔ <i>pAsdel</i>                 | CHA délétée de la région entre <i>exsB</i> et <i>exsA</i> en conservant la séquence de liaison au ribosome devant <i>exsA</i>                   | Quénée 2004 (non publié) |
| CHAΔ <i>lasI</i>                   | CHAΔ <i>lasI::lox</i>   | Ce travail               |
| CHAΔ <i>rhII</i>                   | CHAΔ <i>rhII::lox</i>   | Ce travail               |
| CHAΔ <i>lasIΔrhII</i>              | CHAΔ <i>lasIΔrhII::lox</i>  | Ce travail               |
| CHAΔ <i>rpoS</i>                   | CHAΔ <i>rpoS::lox</i>   | Ce travail               |
| CHAΔ <i>phnAB</i>                  | CHAΔ <i>phnAB::lox</i>  | Ce travail               |
| CHAΔ <i>cysB</i>                   | CHAΔ <i>cysB::lox</i>   | Quénée 2004 (non publié) |
| CHAp <i>Clux</i>                   | CHA <i>attB::pClux</i> (porte la fusion du promoteur de l'opéron <i>exsCEBA</i> avec l'opéron <i>luxCDABE</i> , intégrée au site <i>attB</i> ). | Shen 2005 (sous presse)  |
| CHAp <i>Slux</i>                   | CHA <i>attB::pClux</i> (porte la fusion du promoteur du gène <i>exoS</i> avec l'opéron <i>luxCDABE</i> , intégrée au site <i>attB</i> ).        | Shen 2005 (sous presse)  |
| CHAΔ <i>lasI/pClux</i>             | CHA <i>phpA::lox, attB::pClux</i>   | Ce travail               |
| CHAΔ <i>rhII/pClux</i>             | CHAΔ <i>phpA::lox, attB::pClux</i>  | Ce travail               |
| CHAΔ <i>lasIΔrhII/pClux</i>        | CHAΔ <i>lasIΔrhII::lox, attB::pClux</i>   | Ce travail               |
| CHAΔ <i>rpoS/pClux</i>             | CHAΔ <i>rpoS::lox, attB::pClux</i>  | Ce travail               |
| CHAΔ <i>phnAB/pClux</i>            | CHAΔ <i>phnAB::lox, attB::pClux</i>   | Ce travail               |
| CHA <i>exoS<sub>54</sub>xylEDR</i> | CHAΔ <i>exoS::exoS(54aa)-xylE</i> ; Gm <sup>R</sup>   | Quénée 2004 (non publié) |
| PAO1                               | Souche n'exprimant pas le SSTT  | Holloway                 |

|                    |  |                        |
|--------------------|--|------------------------|
| PAO1 $\Delta$ pA   | PAO1pA::lox  | Ce travail             |
| PAO1 cyto          | Souche exprimant le SSTT   | ATCC                   |
| PAO Ig             | Souche exprimant le SSTT   | Iglewski               |
| <b>Plasmides</b>   |  |                        |
| pEx100Tlink        | Ap <sup>R</sup> , pEX100T avec polylinker  | Quénée 2005            |
| pUCGmlox           | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , vecteur contenant le gène <i>aacC1</i> flanqué des séquences <i>lox</i>  | Quénée 2005            |
| PCM157             | Tc <sup>R</sup> , vecteur d'expression de la recombinase <i>cre</i>  | Marx 2002              |
| pexsAind           | Construction inductible <i>ptacexsA-rrnB-lacIq</i> porté par pUCP20  | Quénée (non publié)    |
| Mini-CTX-exsCp-lux | Contient l'opéron <i>luxCDABE</i> sous le contrôle du promoteur de l'opéron <i>exsCEBA</i>   | Laskowski 2004         |
| Mini-CTX-exoSp-lux | Contient l'opéron <i>luxCDABE</i> sous le contrôle du promoteur du gène <i>exoS</i>  | Laskowski 2004         |
| pDF1               | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , pEX100T contenant les séquences flanquantes 5' et 3' de <i>lasI::Gmlox</i>   | Ce travail             |
| pDF2               | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , pEX100T contenant les séquences flanquantes 5' et 3' de <i>rhlI::Gmlox</i>   | Ce travail             |
| pDF3               | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , pEX100T contenant les séquences flanquantes 5' et 3' de <i>phnAB::Gmlox</i>  | Ce travail             |
| pDF4               | Ap <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , pEX100T contenant les séquences flanquantes 5' et 3' de <i>rpoS::Gmlox</i>   | Ce travail             |
| <i>placexsAind</i> | Construction inductible <i>placexsa-rrnB-lacIq</i> portée par pUCP20   | Ce travail             |
| <i>plApSgfp</i>    | Ap <sup>R</sup> , dérivé de pUCP20, mobilisable dans <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> , fusion transcriptionnelle entre le promoteur <i>pexoS</i> du gène <i>exoS</i> , isolé de la souche CHA et le gène <i>gfpmut3</i> .     | Epaulard, (non publié) |
| <i>plApCgfp</i>    | Ap <sup>R</sup> , plasmide dérivé de pUCP20, mobilisable dans <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> , fusion transcriptionnelle entre le promoteur pC de l'opéron <i>exsCEBA</i> , isolé de la souche CHA et le gène <i>gfpmut3</i> | Dacheux 2001           |

### I-A. La souche de référence du laboratoire : CHA

La souche de *P. aeruginosa* du laboratoire est la souche CHA (Toussaint, Delic-Attree, et Vignais, 1993). Elle a été isolée au CHU de Grenoble, à partir d'un lavage broncho-pulmonaire de patient atteint de mucoviscidose. Cette souche adopte un phénotype mucoïde dans les conditions de culture du laboratoire et possède un système de sécrétion de type III actif *in vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez le rat, et *in vitro*, par une déplétion du milieu en calcium ou un contact



cellulaire. Elle dispose des gènes codant les exotoxines du SSTT : ExoS, ExoT, ExoY, mais ne possède pas le gène codant ExoU.

## **I-B. Culture bactérienne**

Sauf indication, les bactéries sont cultivées en aérobiose à 37°C sous agitation (260 rpm) dans du milieu Luria Bertani (LB) ou Tryptic soy Broth (TSB).

Composition du milieu LB :

|                              |      |
|------------------------------|------|
| Extrait de Levure            | 5 g  |
| Bactotryptone                | 10 g |
| NaCl                         | 10 g |
| Agar (pour le milieu gélosé) | 12 g |
| H <sub>2</sub> O qsp         | 1 l  |

### **I B-1. Escherichia coli**

La croissance en milieu solide gélosé est effectuée sur du LB dans une étuve à 37°C.

### **I B-2. Pseudomonas aeruginosa**

Pour certaines expériences, *P. aeruginosa* a été cultivée en milieu minimum Vogel-Bonner modifié (VB) (glucose 25 mM, acide citrique 9,5 mM, NaNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> 16,7 mM). Le milieu VB est stérilisé par filtration sur filtre Millipore de 0,22 µm.

La culture en milieu solide s'effectue en étuve à 37°C sur différents milieux :

- Milieu gélosé PIA (*Pseudomonas* Isolation Agar, Difco)
- Milieu LB gélosé supplémenté avec 5% de sucrose

### I-C. Antibiotiques utilisés

Tableau 3 : Antibiotiques utilisés.

|                | <i>E. coli.</i> |           | <i>P. aeruginosa</i> |                 |
|----------------|-----------------|-----------|----------------------|-----------------|
|                | Liquide         | Gélose    | Liquide              | Gélose          |
| Gentamycine    | 10 µg/ml        | 10 µg/ml  | 200 µg/ml            | 200 à 400 µg/ml |
| Carbenicilline | –               | –         | 300 µg/ml            | 300 à 600 µg/ml |
| Ampicilline    | 100 µg/ml       | 100 µg/ml | –                    | –               |
| Kanamycine     | 50 µg/ml        | 50 µg/ml  | –                    | –               |
| Trétracycline  | 20 µg/ml        | 20 µg/ml  | 250 µg/ml            | 150 à 250 µg/ml |

### I-D. Suivi de croissance et densité bactérienne

La croissance des bactéries est mesurée par la densité optique (DO) à 600 nm de la culture. Une unité de DO correspond à  $8.10^8$  bactéries/ml pour *E. coli* et  $6.10^8$  bactéries/ml pour les souches de *P. aeruginosa* mucoïdes et  $5.10^8$  bactéries/ml pour les souches non mucoïdes.

### I-E. Conservation des souches

Les souches d'*E. coli* sont conservées à -80°C dans du milieu de culture additionné de glycérol 40 % (v/v). Les souches de *P. aeruginosa* sont conservées également à -80°C sur des supports microbilles (tubes PROTECT Bacterial Preservers, Technical service consultant Limited, UK) inoculés à partir de culture sur gélose.

## **II. Techniques de biologie moléculaire**

### **II-A. Purification des acides nucléiques**

#### **II A-1. Dosage des acides nucléiques**

Les acides nucléiques (ANs) sont dosés par spectrophotométrie (Sambrook, Fritsch, et Maniatis, 1989). La concentration en acides nucléiques est proportionnelle à l'absorbance à 260 nm. Elle est déduite des relations suivantes :

- pour l'ADN bicaténaire : 1 unité de  $DO_{260}$  correspond à 50 $\mu$ g d'ADN/ml
- pour l'ARN : 1 unité de  $DO_{260}$  correspond à 30 $\mu$ g d'ARN/ml

#### **II A-2. Précipitation des acides nucléiques**

Pour éliminer d'éventuels contaminants protéiques dans une solution d'acides nucléiques, ceux-ci sont précipités en présence de sels et d'alcool. Sont ajoutés à la solution d'acides nucléiques, 1/10<sup>ème</sup> de volume d'acétate de potassium 3 M, pH 5.2 et 2,5 fois le volume d'éthanol absolu à -20°C. La précipitation est réalisée pendant 2 heures à -80°C suivie d'une centrifugation à 17500 g de 30 minutes à 4°C. Le culot, contenant les ANs, est ensuite lavé par un mélange eau/éthanol (30/70, v/v) pour éliminer les sels puis séché. Enfin les acides nucléiques sont repris dans de l'eau.

#### **II A-3. Extraction au mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique**

La purification d'une solution d'ADN contaminé par des protéines se fait par extraction en ajoutant à volume égal ADN et un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v). Les deux phases sont mélangées vigoureusement (vortex) puis séparées par centrifugation 15 minutes à 17500 g. La phase aqueuse contenant l'ADN est prélevée délicatement puis lavée par un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) pour éliminer le phénol résiduel. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol.

## II-B. Préparation d'ADN plasmidique d'*E. coli*

La technique dite de « miniprep » permet une extraction et une purification rapide d'ADN plasmidique à partir d'une culture liquide d'*E. coli*.

1,5 ml d'une culture de 16 h est centrifugé 5 minutes à 17500 g puis le culot bactérien est repris dans 100 µl de GTE (Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8). Les bactéries subissent ensuite une lyse alcaline par l'addition de 200 µl d'une solution de NaOH 0,2 N, SDS 5% pendant 5 minutes. La soude permet une dénaturation des acides nucléiques, en priorité de l'ADN chromosomique. Pour ne pas dénaturer l'ADN plasmidique, au bout des 5 minutes, on ajoute 150 µl d'acétate de potassium 3 M afin de neutraliser le pH et de précipiter le SDS. Après agitation et 5 minutes dans la glace, les protéines et acides nucléiques précipités sont éliminés par centrifugation à 4°C pendant 5 minutes à 17500 g. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité à l'éthanol absolu à -20°C. Le culot d'ADN plasmidique obtenu est lavé par une solution d'éthanol à 70% en eau, séché à température ambiante et repris dans de l'eau.

Pour certaines souches d'*E. coli*, comme la souche HB101, on utilise le kit de miniprep « QIAprep Spin Miniprep Kit » (Quiagen, France). Après la lyse alcaline des bactéries, l'ADN contenu dans la phase aqueuse est déposé sur une colonne de silicate. L'ADN retenu est alors lavé et élué à l'eau selon les instructions du fabricant. Les plasmides obtenus sont conservés à -20°C.

## II-C. Préparation d'ADN chromosomique de *P. aeruginosa*

Une culture de 16 h de 1,5 ml de *P. aeruginosa* est centrifugée 5 minutes à 17500 g, lavée en PBS, puis le culot est repris dans 500 µl d'une solution de NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 M, pH 8. La lyse des bactéries est faite à 60°C en présence de 2% de SDS. La lyse complète est indiquée par un éclaircissement de la solution. La réaction est arrêtée par l'ajout de 75 µl de perchlorate de sodium 5 M. On réalise ensuite une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis l'ADN dans la phase aqueuse est précipité à l'éthanol absolu à -20°C. Après séchage à température ambiante, l'ADN est repris dans de l'eau et conservé à +4°C.

## II-D. Préparation d'ARN de *P. aeruginosa*

L'extraction et la purification d'ARN de *P. aeruginosa* se fait grâce au « High Pure RNA Isolation kit » (Roche, France). Les bactéries sont pré-lysées dans une solution de Tris (10 mM, pH 8) et de lysozyme (1 mg/ml) puis est ajouté le tampon « lysis/-binding » permettant de terminer la lyse des bactéries et d'inhiber les RNases. Le mélange est ensuite déposé sur une colonne d'affinité. La présence de sels chaotropiques permet alors la liaison spécifique des acides nucléiques sur les fibres de glace de la colonne de purification, les conditions de liaison étant optimisées pour les ARN. Les restes d'ADN contaminant sont éliminés par l'action de la DNase I directement sur la colonne. L'ARN fixé subit ensuite des étapes de lavage pour éliminer les sels, les protéines et autres impuretés cellulaires. Enfin l'ARN est élué avec de l'eau.

## II-E. Electrophorèse d'ADN

### II E-1. Electrophorèse horizontale en gel d'agarose

Les fragments d'acides nucléiques sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose dans un tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 0,1 %, EDTA 2 mM, pH 8,5). La concentration d'agarose est dépendante de la taille des fragments à séparer, elle peut varier de 0,3 à 2%. Dans la majorité des cas, nous utilisons des gels d'agarose à 1 % en tampon TAE, avec 1 µg/ml de bromure d'éthidium (BrEt). Les échantillons à déposer sur le gel sont, au préalable, additionnés de 1/5 (v/v) d'une solution de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol FP 0,25 %, glycérol 30%) afin de visualiser la migration et d'augmenter la densité des échantillons pour les entraîner au fond du puits. Après une migration entre 25 et 100 V, selon la taille des échantillons, l'ADN est visualisé par fluorescence du BrEt sous ultraviolets (UV, 312 nm).

## **II E-2. Electrophorèse verticale en gel d'acrylamide**

Les fragments d'ANs de taille inférieure à 500 pb peuvent également être séparés par électrophorèse en gel d'acrylamide 5%, plus résolutive que celle en gel d'agarose. La migration s'effectue dans du TAE 0,5 X à 50 V.

Composition du gel :

|                 |          |
|-----------------|----------|
| TAE 10 X        | 1 ml     |
| Acrylamide 30 % | 1,65 ml  |
| APS 10 %        | 100 µl   |
| Temed           | 5 µl     |
| Eau             | 7,245 ml |

Après migration, le gel est coloré dans une solution de TAE, BrEt 0,6 µg/ml permettant de visualiser l'ADN sous UV.

## **II-F. Manipulation des fragments d'ADN**

### **II F-1. Digestion enzymatique**

Les enzymes de restriction utilisées pour digérer l'ADN sont des endonucléases clivant l'ADN double brin au niveau de sites de reconnaissances spécifiques à chaque enzyme. Elles sont utilisées suivant les instructions des fabricants (Roche, Appligene, Invitrogen ; France) à des concentrations de 1 à 2 U/µg d'ADN. Les conditions d'incubation peuvent varier selon l'enzyme, mais la plupart ont une activité optimale à 37°C. L'arrêt de la digestion s'effectue par la chaleur ou par l'addition du tampon de charge pour la migration sur gel.

### **II F-2. Extraction de fragments d'ADN**

Après migration de l'ADN dans un gel d'agarose, le fragment d'ADN d'intérêt est découpé sur table UV. L'extraction est réalisée en utilisant les kits Sephaglass (Amersham Pharmacia, France) ou Ultraclean 15 (MoBio, Ozyme, France) selon les protocoles spécifiés. L'agarose est dissout, puis l'ADN est piégé par une matrice de silice, lavée avec une solution contenant de l'éthanol, puis élué avec de l'eau.

### II F-3. Polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à l'amplification d'un fragment d'ADN au moyen d'une séquence matrice et d'oligonucléotides spécifiques en orientation inverse (amorces sens et anti-sens) de part et d'autre de la séquence à amplifier. Ces oligonucléotides servent d'amorces à la synthèse d'ADN par une ADN polymérase ADN dépendante thermostable. Deux polymérases sont utilisées, soit la Taq polymérase (Appligene, France) soit la PfuUltra polymérase (Stratagene, France) plus fidèle lors de la polymérisation. La réaction de PCR s'effectue dans un thermocycler automatique (Mini cycler) et commence par une dénaturation de la matrice à 95°C pendant 5 min, suivie de 30 cycles de synthèse et se termine par une étape d'élongation de 10 min à 72°C.

Un cycle de synthèse est constitué de trois étapes :

1 - Dénaturation de l'ADN double brin, 95 °C de 45 secondes à 5 min

2 - Hybridation des amorces sur la matrice à  $T_m - 5^\circ\text{C}$  , 45 secondes.

La température d'hybridation ( $T_m$ ) est estimée pour chaque amorce selon la relation  $T_m = 4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})$ .

3 - Elongation par l'ADN polymérase à partir des amorces.

Le mélange réactionnel est composé de :

|                      |                                 |
|----------------------|---------------------------------|
| ADN matrice          | 10 à 100 ng                     |
| Amorce sens          | 0,3 $\mu\text{M}$               |
| Amorce anti-sens     | 0,3 $\mu\text{M}$               |
| dNTP                 | 0,2 mM de chaque                |
| Tampon de Polymérase | 1x                              |
| Polymérase           | 2,5 U (Taq) / 1,25 U (PfuUltra) |
| H <sub>2</sub> O     | qsp 50 $\mu\text{l}$            |

Du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 4% et/ou du MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) peuvent être ajoutés pour optimiser la réaction.

Pour faciliter les clonages des fragments de PCR, des sites de restriction sont rajoutés aux extrémités des amorces. Deux températures d'hybridation sont alors utilisées. La première est calculée sans tenir compte des séquences rajoutées qui ne s'hybrident pas à la matrice, 5 cycles de synthèse sont alors effectués en début de réaction avec celle-ci. Puis 25 cycles sont effectués avec la seconde température d'hybridation correspondant à la totalité de la longueur des amorces.

## **II-G. Technique de retard sur gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA)**

Cette technique permet de mettre en évidence l'interaction spécifique d'une protéine ou d'un complexe protéique avec une séquence d'ADN ou d'ARN particulière. L'interaction est visualisée par le retard de migration électrophorétique, en condition non dénaturante, du fragment d'acides nucléiques en présence de la protéine ou du complexe par rapport à la migration du fragment seul.

### **II G-1. Marquage du fragment d'ADN**

Le fragment d'ADN double brin aux extrémités cohésives, obtenu par l'action d'une enzyme de restriction ou par PCR est marqué en 5' par l'ajout de biotine-dUTP. Le nucléotide modifié s'incorpore lors de la génération d'extrémités franches sur le fragment par l'action du fragment de Klenow de l'ADN polymérase d'*E. coli*. On mélange 50  $\mu$ M de biotine-dUTP avec, selon les besoins un ou plusieurs des trois nucléotides suivant à 50  $\mu$ M : dATP, dGTP, dCTP, 5 u de Klenow, du tampon H à 1X final (Roche), 200 ng du fragment d'ADN et de l'eau qsp 100  $\mu$ l. Le mélange est incubé durant 2 h à 37°C puis l'enzyme est inactivé e par 15 minutes d'incubation à 75°C.

### **II G-2. Préparation des extraits cellulaires**

La souche étudiée est cultivée dans 20 ml de LB jusqu'à une  $DO_{600}$  de 1.5. La culture est alors centrifugée 10 min à 9000 g, le culot est repris dans 600  $\mu$ l de tampon A



(Hepes 50, NaCl 100mM, glycérol 8% mM, pH 8). Les bactéries sont lysées par sonication 3x10 s à 4°C. Une centrifugation à 100 000 g pendant 10 min à 4°C permet de récupérer le surnageant contenant les protéines du cytosol.

### **Dosage des protéines**

La quantité de protéines est déterminée par la technique de Bradford (Bradford, 1976). Dix microlitres de l'échantillon sont mélangés avec 1 ml de réactif de Bradford dilué au 1/5<sup>e</sup> dans l'eau. Une gamme étalon est réalisée avec des solutions d'albumine bovine de 0.1 à 0.5 mg/ml. Après 10 minutes d'incubation, la DO à 595 nm est mesurée, et la concentration en protéines déduite à l'aide de la courbe étalon.

## **II G-3. Recherche d'un retard de migration**

### **II G 3-a) Interaction ADN/Protéines**

Dans un volume final de tampon A de 22 µl, on incube, pendant 30 minutes à 37°C, un aliquot de l'extrait bactérien étudié avec 2 ng du fragment marqué et 1 µg de poly-dIdC. Ce polynucléotide sert de compétiteur et permet d'éviter les interactions non spécifiques entre la séquence d'ADN et les protéines.

### **II G 3-b) Migration et transfert de l'ADN sur membrane de nylon**

Après incubation, le mélange est déposé sur un gel de polyacrylamide à 6% en TBE (Tris Buffer EDTA) 0.5X. La migration est réalisée en TBE 0.5X à 180 V. Ensuite l'ADN est transféré sur membrane de nylon (appareil HOEFER Sémiphor) durant 20 min à 1,5 mA/cm<sup>2</sup>.

### **II G 3-c) Révélation**

Après blocage de la membrane, une solution de streptavidine couplée à la peroxydase est ajoutée. Ce complexe se fixe sur le fragment grâce à la liaison biotine-streptavidine. Ensuite la membrane est lavée, puis placée dans la solution de révélation contenant du peroxyde d'hydrogène et du luminol. La peroxydase catalyse la réaction de transformation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O + ½ O<sub>2</sub> qui excite le luminol. Lorsque ce réactif retourne à son état stable, un photon est émis et permet de détecter les fragments en impressionnant un film photographique ou en utilisant une caméra.

## II-H. Clonage

### II H-1. Sous clonage

Le sous clonage est une étape de récupération et d'amplification de fragments d'ADN obtenus par PCR avec des polymérases générant des bouts francs comme la PfuUltra. La séquence d'intérêt est insérée dans un vecteur, celui-ci permettant ensuite la réplication du fragment par les bactéries *E. coli*.

Le sous clonage des produits PCR à bouts francs est réalisé selon le protocole du Zero Blunt TOPO PCR cloning kit<sup>®</sup> (Invitrogen, France). Ce kit permet l'insertion de fragment d'ADN dans le vecteur pCR-bluntII-TOPO<sup>®</sup>. Ce vecteur est fourni sous forme linéaire avec la topoisomérase I du virus de la vaccine fixée de façon covalente aux extrémités 3' phosphate du vecteur. Cette enzyme coupe l'ADN bi-caténaire au niveau d'un site spécifique 5'-CCCTT-3' et se fixe à l'extrémité 3' phosphate par la création d'une liaison phosphodiester entre le phosphate de la dernière base d'ADN en 3' et son résidu tyrosine en position 274. La liaison phospho-tyrosyl entre l'ADN et l'enzyme peut être cassée par une attaque des extrémités 5'OH du vecteur lui-même ou de tout autre fragment d'ADN, tel un produit de PCR ce qui a pour effet de libérer la topoisomérase et de liguer les fragments rentrés en interaction. La sélection des clones ayant incorporés un insert est réalisée grâce au gène *ccdB*, létal chez *E. coli*. L'insertion du fragment à cloner entraîne l'interruption du gène *ccdB*, permettant ainsi aux bactéries de se développer contrairement au cas où le vecteur se re-circularise sur lui-même.

Après amplification du vecteur par les bactéries et purification du plasmide par miniprep, le fragment peut être récupéré et utilisé pour la suite du clonage.

### II H-2. Déphosphorylation de l'ADN

Pour certaines stratégies de clonage, il est nécessaire de déphosphoryler les extrémités du vecteur pour éviter sa recircularisation et augmenter ainsi le rendement d'insertion du fragment d'intérêt. L'enzyme catalysant la réaction est une phosphatase alcaline de *P. borealis* (Roche, France). Elle agit à raison d'une unité

pour 50 ng d'ADN. La réaction est réalisée à 37°C durant une heure puis elle est arrêtée par dénaturation de l'enzyme à 65°C pendant 15 minutes.

## **II H-3. Génération d'extrémités à bout franc**

### **IIH 3-a) Fragment de Klenow**

Le fragment de Klenow est issu de l'ADN Polymérase I sans activité exonucléase de 5' en 3'. Il permet de combler les extrémités 5' sortantes d'un fragment de restriction, grâce à son activité polymérase de 5' en 3', générant ainsi des extrémités à bout franc. La réaction nécessite la présence de dNTP et s'effectue à 37°C dans le tampon spécifique de l'enzyme.

## **II H-4. Ligation**

Le vecteur digéré, déphosphorylé ou non, et le fragment d'ADN d'intérêt sont mélangés selon un rapport molaire de 1/3. La ligation est catalysée par l'enzyme T4 DNA ligase (Proméga, France) durant la nuit à 4°C ou durant 4 heures à température ambiante. Le rendement de ligation peut être augmenté par l'ajout de 1 mM d'ATP.

## **II-I. Transformation**

### **II I-1. Transformation dans *E. coli***

Certaines souches d'*E. coli* sont rendues compétentes pour intégrer des plasmides à  $1 \times 10^6$  CFU/ $\mu\text{g}$  d'ADN, par un traitement au chlorure de calcium. D'autres sont disponibles dans le commerce jusqu'à une compétence de  $5 \times 10^9$  CFU/ $\mu\text{g}$  d'ADN. La transformation est réalisée en ajoutant 3 à 5  $\mu\text{l}$  de plasmide ou de réaction de ligation dans 100  $\mu\text{l}$  de bactéries compétentes. Après 30 minutes dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique par un passage de 30 secondes à 42°C. Après 2 minutes de refroidissement dans la glace, 450  $\mu\text{l}$  de LB sont ajoutés et les bactéries transformées sont incubées à 37°C pendant 1 heure sous agitation (300

rpm). Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu LB gélosé contenant l'antibiotique de sélection.

## **II I-2. Transformation dans *Pseudomonas aeruginosa* par électroporation**

La transformation d'un vecteur dans *P. aeruginosa* par électroporation consiste à rendre les cellules perméables à l'ADN au moyen d'une décharge électrique. On utilise la technique de Enderle et Farwell afin de préparer des cellules électrocompétentes (Enderle et Farwell, 1998). Les bactéries sont prélevées sur une boîte fraîche (étalement de 16 h) et lavées deux fois à l'eau stérile. De 5 à 50 ng de plasmide à intégrer, dilué en TE, sont ensuite incubés avec 40 µl de suspension bactérienne pendant 30 minutes dans la glace. L'électroporation est réalisée dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie à -20°C sur laquelle est appliquée une décharge de 1800 V pendant 5 millisecondes (appareil Electro Cell Manipulator ECM 399, BTX). Le mélange est repris par 1 ml de milieu LB puis incubé 1 heure à 37°C sous agitation (300 rpm). Les transformants sont sélectionnés sur milieu PIA ou LB contenant l'antibiotique approprié.

## **II-J. Mutagenèse par échange allélique chez *Pseudomonas aeruginosa***

La mutagenèse par échange allélique consiste à remplacer un gène d'intérêt par une séquence définie au moyen d'une insertion/délétion. Cette séquence comporte généralement un marqueur de sélection, qui peut être un gène de résistance à un antibiotique, pour sélectionner les souches recombinantes. En plus, elle peut également porter le gène ciblé, muté, ou un autre gène d'intérêt pour en étudier les effets dans un contexte chromosomique, plus proche des conditions physiologiques de la bactérie sauvage que dans un contexte plasmidique. L'échange allélique est effectué par une double recombinaison homologue entre les séquences homologues aux séquences flanquantes du gène d'intérêt. La technique utilisée est celle développée par Quénée *et al* et adaptée du travail de Schweizer et Hoang et de Marx et Lidstrom (Quénée, Lamotte, et Polack, 2005). Elle repose sur l'utilisation

d'un vecteur suicide, pEX100Tlink, incapable de se répliquer chez *P. aeruginosa*. Il possède un site de clonage multiple, le gène *bla3* qui confère une résistance à l'ampicilline et à la carbénicilline pour *P. aeruginosa* et le gène *sacB* qui induit une sensibilité au saccharose. Le produit du gène *sacB* est une enzyme permettant de dégrader le saccharose ; il en résulte un dérivé toxique pour la bactérie.

### **II J-1. Echange allélique**

Les fragments de 1 à 2 kb, correspondant aux séquences flanquantes 5' et 3' du gène d'intérêt, sont d'abord clonés dans le vecteur pEX100Tlink, puis le gène *aacC1* conférant une résistance à la gentamicine est inséré entre ces deux fragments. Ce gène de résistance est flanqué de deux courtes séquences nucléotidiques, *loxP*, reconnues par la recombinaise Cre qui permettra d'exciser le gène de résistance *aacC1* une fois la double recombinaison sélectionnée. Ce vecteur est ensuite transféré dans la souche de *P. aeruginosa* par conjugaison biparentale.

### **II J-2. Conjugaison biparentale**

La conjugaison biparentale est réalisée avec la souche d'*E. coli* S17.1 contenant le vecteur d'échange allélique. La souche d'*E. coli* et la souche de *P. aeruginosa* sont cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance puis mélangées et déposées, sans étalement, sur milieu LB gélosé sans NaCl. Après une nuit à 37°C, la culture est reprise dans 1 ml de milieu LB et étalée sur milieu PIA contenant de la gentamicine. Le vecteur pEX100Tlink ne pouvant se répliquer dans *P. aeruginosa*, seules les souches ayant intégré le gène *aacC1* par simple ou double recombinaison homologue entre les séquences flanquantes du gène d'intérêt pourront se développer sur ce milieu.

### **II J-3. Sélection des clones double recombinant**

L'événement de recombinaison peut être simple ou double. Une simple recombinaison, entre une séquence flanquante du gène d'intérêt au niveau du plasmide et son homologue génomique entraîne l'insertion complète du plasmide pEX100Tlink, incluant les gènes *bla* et *sacB*, dans le génome. Chez ces clones

simple recombinant (SR), le gène d'intérêt est reconstitué et non invalidé. Lors d'un événement de double recombinaison homologue, un pour chaque partie flanquante du gène, le gène d'intérêt est remplacé par le gène de résistance à la gentamicine sans incorporation des gènes *bla* et *sacB* dans le génome. Ce sont ces clones double recombinant (DR) que l'on cherche. En premier lieu, les clones recombinants, ayant incorporé dans leur génome le gène *aacC1*, sont sélectionnés sur milieu PIA contenant de la gentamicine. La proportion de clones DR obtenue ensuite est variable selon le gène ciblé, en raison des différents niveaux de compaction de l'ADN qui rendent des zones du génome plus ou moins accessible à la recombinaison. Ensuite, les colonies sont contre sélectionnées sur le milieu LB avec saccharose 5% grâce au gène *sacB*. Du fait de la toxicité qu'entraîne la présence de ce gène sur ce milieu, seuls les clones ayant éliminé *sacB* pourront se développer. Ceci se produit soit par réversion du premier événement de recombinaison, soit par un second événement de recombinaison conduisant à une souche DR. Ces clones contre sélectionnés sont ensuite repiqués sur milieu PIA gentamicine pour éliminer les révertants et sur PIA cabénicilline afin de sélectionner les clones DR. Ces mutants par insertion/délétion, avec un profil double recombinant, sont ensuite vérifiés par PCR sur ADN génomique ou Southern blot.

#### **II J-4. Excision du gène de résistance**

Pour exciser le gène de résistance *aacC1*, les clones DR sont électroporés avec le plasmide pCM157 portant un gène de résistance à la tétracycline et le gène codant le recombinase Cre. Cette enzyme reconnaît une séquence oligonucléotidique spécifique nommée *loxP* et entraîne une délétion par une recombinaison entre deux sites *loxP*. Les clones transformants sélectionnés sur tétracycline sont ensuite cultivés en milieu LB liquide supplémenté de tétracycline afin de permettre l'expression de l'enzyme Cre et l'élimination du gène *aacC1*. Ensuite, on cure le plasmide pCM157 en réalisant plusieurs cultures en milieu LB liquide sans antibiotique. Enfin, les colonies sont repiquées sur milieu PIA, PIA tétracycline pour vérifier que le plasmide a été curé et sur milieu PIA gentamicine afin de sélectionner les clones ne possédant plus le gène *aacC1*. L'excision de ce gène est vérifiée par PCR sur l'ADN génomique de ses mutants.

### III. Culture cellulaire

#### III-A. Interaction des bactéries avec des polynucléaires neutrophiles

##### III A-1. Préparation des polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNNs) sont obtenus à partir de sang frais (prélevé en tube de 5 ml sur anticoagulant : citrate de sodium) selon le protocole suivant. Trois volumes de sang pour un volume de Dextran T500 2% en eau stérile sont mélangés par retournement, puis le mélange est sédimenté 30 minutes à 37°C. Ensuite le plasma est déposé sur Ficoll 400 d=1.077 (2 volumes pour 1 volume), puis centrifugé à 500 g pendant 30 minutes à 20°C. Le culot contenant les PNNs et les hématies est remis en suspension dans 3 volumes d'eau distillée glacée pendant 30 secondes pour lyser les hématies puis l'isotonicité est rétablie par l'ajout d'un volume de NaCl 3.5%. Après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot de PNNs est lavé une fois par un petit volume de mHBS (Hepes 15 mM, glucose 8 mM, HCl 4 mM, NaCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, pH 7.4), la centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. La concentration est ajustée à 10<sup>7</sup> PMN/ml par comptage sur cellule de Malassez. Les PNNs sont conservés dans la glace s'ils ne sont pas utilisés dans le ¼ d'heure suivant.

##### III A-2. Préparation de *P. aeruginosa*

Une culture en phase stationnaire de *P. aeruginosa* est réensemencée en LB à 0.1 de DO<sub>600</sub> puis cultivée jusqu'à une DO<sub>600</sub> comprise entre 1.5 et 2. Les bactéries sont ensuite lavées une fois en mHBS, ajustées à 10<sup>9</sup> bactéries/ml puis opsonisées avec du sérum humain hétérologue du groupe AB ou autologue durant 20 minutes. Durant l'infection le milieu contient 10 % de sérum.

##### III A-3. Interaction des PNNs avec les bactéries

L'infection est réalisée pendant 3 heures à 37°C en microplaques 96 puits dans un volume final de 200 µl/puits dans les conditions suivantes : 100 µl de la solution de

PNNs ( $10^6$  cellules/puits) sont mélangés avec 100  $\mu$ l de bactéries opsonisées et diluées pour obtenir les multiplicités d'infection (MOI, multiplicity of infection : rapport entre le nombre de bactéries et le nombre de cellules) désirées.

### III A-4. Mesure de la cytotoxicité des bactéries

La cytotoxicité des bactéries envers les cellules est estimée en déterminant la nécrose des PNNs par mesure de la LDH (lactate déshydrogénase) libérée dans le milieu. La présence de cette enzyme cytosolique dans le surnageant d'infection reflète la perte de l'intégrité membranaire des PNNs lors du processus de nécrose. On utilise le Kit « Cytotoxicity detection kit » (Roche, France). Cette méthode est basée sur la détection de l'activité LDH par un test enzymatique colorimétrique : dans une première étape le  $\text{NAD}^+$  est réduit en  $\text{NADH}+\text{H}^+$  lors de la conversion du lactate en pyruvate catalysée par la LDH ; dans une seconde étape la diaphorase transfère les protons du  $\text{NADH}+\text{H}^+$  sur le sel de tétrazolium (jaune pâle) qui est alors réduit en sel de formazan (rouge). Trente microlitres du surnageant d'infection sont prélevés délicatement afin de ne pas accidentellement activer les PNNs intacts et augmenter indûment la concentration en LDH et ajoutés à 100  $\mu$ l du mélange de révélation dans une microplaque à puits à fond plat. Après 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, la  $\text{DO}_{492}$  de chaque puits est mesurée. Le contrôle positif (100% de cytotoxicité) s'obtient en ajoutant à des PNNs seuls 1% de Triton X100, 30 minutes avant de prélever le surnageant. Le pourcentage de cytotoxicité est déterminé selon le calcul suivant :  $\text{Cytotoxicité (\%)} = (\text{DO}_{492} \text{ test} / \text{DO}_{492} \text{ contrôle positif}) \times 100$ .

## IV. Expérimentation animale

Les animaux utilisés pour le modèle d'infection pulmonaire aiguë, décrit par Pennington et Ehrie, sont des rats Sprague Dawley de 280 à 380 grammes (Charles River Laboratoires France, St Germain/l'Arbresle, France) (Pennington et Ehrie, 1978). Ils sont tous certifiés indemnes d'infection et hébergés à la Faculté de Médecine de Lille avec de la nourriture et de l'eau à volonté.

Les cultures de bactéries, utilisées pour l'instillation intratrachéale, ont été lavées deux fois et resuspendues dans une solution saline à 0,9% tamponnée puis diluées à



la concentration désirée. L'instillation a été réalisée sous une brève anesthésie à l'éther. Après un badigeonnage à l'alcool, une petite incision a été pratiquée sur la face ventrale du cou. Ainsi exposée, la trachée a été injectée, à l'aide d'une aiguille de 28 gauge, avec la solution bactérienne à raison de 0,5 ml/kg, suivie de 0,5 ml d'air (Le Berre *et al.*, 2004; Viget *et al.*, 2000). L'incision a été refermée par un point de suture. Les animaux ont été étudiés 24h après l'instillation des bactéries.

## V. Techniques de biochimie

### V-A. Préparation des échantillons

#### V A-1. Activation du SSTT de *P. aeruginosa*

Le SSTT de *P. aeruginosa* est inductible par contact avec une cellule cible. *In vitro*, il peut être activé par déplétion calcique. Du milieu LB, avec antibiotique si nécessaire, estensemencé à une  $DO_{600}$  de 0,1 à partir d'une préculture de 16h. Lorsque cette culture a atteint une  $DO_{600}$  entre 0,8 et 1,2, le nombre de bactéries nécessaire pour ensemenecer le volume de milieu d'induction à une  $DO_{600}$  égale à 0,1 ou 0,2 est lavé une fois en milieu LB frais. Le milieu d'induction est en règle générale du LB complémenté par 5 mM d'EGTA, un chélateur des ions calcium et 20 mM de  $MgCl_2$  pour complémenter le milieu en ions divalents afin de permettre une bonne croissance des bactéries. Une culture dans du LB seul est réalisée comme contrôle négatif.

#### V A-2. V.1.2 Etude des protéines des surnageants de culture de *P. aeruginosa*

Après 3 heures de culture en condition induite ou non induite, la population bactérienne est mesurée par densité optique à 600 nm. Les cultures sont centrifugées 5 min à 17500 rpm et le volume de surnageant de culture à récolter est calculé en fonction de la population bactérienne mesurée en densité optique. Ce

volume est calibré sur la densité optique moyenne après 3 heures de culture : DO = 1.5. Chaque échantillon de surnageant correspond donc à un même nombre de bactéries, et peut alors être analysé directement. Cependant, pour visualiser les protéines présentes dans les surnageants de culture il est préférable de les concentrer par précipitation.

#### **VA 2-a) Précipitation au PCA**

L'acide perchlorique (PCA) à 15 %, à 4°C pendant une nuit, entraîne la précipitation des protéines contenues dans une solution aqueuse. Les protéines sont ensuite centrifugées pendant 30 min à 17500 rpm et lavées au moins trois fois à l'acétone à -20°C. Une fois l'acétone du dernier lavage complètement évaporé, l'échantillon de protéines est sous forme d'un culot sec. Ce culot peut être repris dans un petit volume de tampon de charge d'électrophorèse SDS-PAGE par exemple.

#### **VA 2-b) Précipitation au TCA**

L'acide trichloroacétique (TCA) à 12.5 %, a les mêmes propriétés que le PCA. Cependant, la précipitation des protéines contenues dans une solution est plus rapide, elle se fait dans la glace pendant 30 min. Les protéines sont ensuite traitées de la même façon que lors de la précipitation au PCA.

### **V-B. Dosage de l'activité enzymatique Catéchol Dioxygénase (CDO)**

Le gène de *Pseudomonas putida*, *xylE*, code une protéine catéchol-2,3-oxygénase (CDO), qui transforme le catéchol en semialdéhyde 2-hydroxymuconique, un pigment jaune visible à l'œil nu et qui peut être mesuré par spectrophotométrie. L'activité CDO dans une solution, lysat bactérien, lysat cellulaire ou surnageant de culture, est mesurée en ajoutant 15 mM de catéchol dans la solution à tester. L'activité CDO est suivie en cinétique à 375 nm. La quantité d'enzyme est calculée selon la formule  $(\Delta DO_{375} / 4.4 \times 10^4) \times 10^6 = \text{nombre de mU}$ .

## V-C. Electrophorèse SDS-PAGE

La migration en gel vertical de polyacrylamide en présence de SDS permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. En effet, les protéines sont toutes chargées négativement par le SDS. Le gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) est généralement composé d'un « gel de concentration » placé au dessus d'un « gel de séparation ». Le pourcentage d'acrylamide du « gel de séparation » varie selon la taille des protéines à séparer. La plupart des gels contiennent 8 à 15 % d'acrylamide.

Les protéines sont dénaturées dans du tampon de dépôt (Tris pH 6.5 630mM, 0.05% Bleu de Bromophénol en Glycérol, EDTA pH7 10 mM, SDS 20%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2.5%) et par chauffage à 100°C pendant 5 minutes avant d'être déposées sur le gel de concentration. La migration est réalisée à 10 mA dans le tampon d'électrophorèse (Tris 50 mM, glycine 380 mM, SDS 0,5 %).

Tableau 4 : Composition des gels SDS-PAGE

|   | Gel de concentration | Gel de séparation |              |
|---|----------------------|-------------------|--------------|
|   | 5%                   | 10%               | 12,5%        |
| Acrylamide 30 %                           | 0,4 ml               | 3,5 ml            | 4,4 ml       |
| Eau                                       | qsp 2,6 ml           | qsp 11 ml         | qsp 11 ml    |
| Tampon A (Tris 1,5 M, SDS 0,4%, pH=8,8)   | /                    | 2,65 ml           | 2,65 ml      |
| Tampon A' (Tris 0,5 M, SDS 0,4 %, pH=6,8) | 1,3 ml               | /                 | /            |
| APS 10 %                                  | 18 $\mu$ l           | 65 $\mu$ l        | 65 $\mu$ l   |
| Temed                                     | 5 $\mu$ l            | 12,5 $\mu$ l      | 12,5 $\mu$ l |

## V-D. Analyse des protéines

### V D-1. Coloration au bleu de Coomassie

Les protéines du gel d'acrylamide sont colorées, une heure, par le bleu de Coomassie R250 0,25% (p/v) dilué dans une solution d'acide acétique/éthanol/eau

(v/v/v, 10/50/40). La décoloration par une solution d'acide acétique/éthanol/eau (v/v/v, 10/30/60) fait apparaître les protéines qui retiennent la coloration bleue. Le gel est séché entre deux feuilles de cellophane afin d'être conservé.

## **V D-2. Western blot**

Après séparation des protéines par migration électrophorétique SDS-PAGE, il est possible de détecter spécifiquement la présence d'une protéine donnée. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et mises en évidence par immunomarquage grâce à un anticorps spécifique.

### **VD 2-a) Transfert semi-sec**

Le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose se fait dans un appareil de transfert semi-sec. Entre des feuilles de papier Wattman imbibées de tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 129 mM, Méthanol 10%, SDS 0.01%), le gel d'acrylamide contenant les protéines est déposé sur une membrane de nitrocellulose. Ce « sandwich » est réalisé entre deux électrodes et le transfert du gel d'acrylamide sur la membrane est réalisé sous un courant de 60 mA pendant 1 h.

### **VD 2-b) Immuno-détection**

Après le transfert, la membrane est saturée 45 min avec une solution de TBS 1X (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7.5) contenant 0.05 % de Tween20 et 3 % de lait écrémé. L'action détergente du Tween20 et l'action saturante des protéines du lait préparent la membrane pour l'immuno-détection par un anticorps spécifique. La membrane est ensuite lavée à plusieurs reprises par du TBSTween 1X. L'anticorps spécifique de la protéine à détecter est dilué à la concentration requise (entre 1/500<sup>ème</sup> et 1/5000<sup>ème</sup>) dans du TBSTween 1X et incubé sur la membrane pendant 1h30. La membrane est lavée à plusieurs reprises par du TBSTween 1X afin d'éliminer l'excédent d'anticorps primaire et les liaisons non spécifiques. La localisation de la fixation de cet anticorps sur la membrane se fait avec un anticorps secondaire, spécifiquement dirigé contre l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire

est dilué à la concentration requise (entre 1/2000<sup>ème</sup> et 1/10000<sup>ème</sup>) dans du TBSTween 1X et incubé sur la membrane durant 45 min. L'anticorps secondaire peut être couplé à la peroxydase pour une détection en chimiluminescence.

## **V-E. Mesure de l'activation transcriptionnelle des gènes du SSTT**

### **V E-1. Par fluorescence**

Le plasmide pIApC*gfp* contient le gène de la Green Fluorescent Protein modifié (*gfpmut3*) comme gène rapporteur du promoteur pC, placé en amont (Dacheux, Attree, et Toussaint, 2001). Les souches à étudier sont transformées par ce plasmide. Chaque souche est alors cultivée en présence ou en absence de calcium. Après 3 heures d'induction, chaque culture est ajustée à 1 de DO<sub>600</sub> dans de l'eau distillée. La fluorescence est mesurée par un fluorimètre ( $\lambda$  excitation à 485 nm,  $\lambda$  émission à 527 nm) et exprimée en pourcentage de la culture témoin. L'activité transcriptionnelle du promoteur est liée à la quantité de fluorescence émise par rapport à la condition témoin.

### **V E-2. Par luminescence**

L'analyse de l'activité transcriptionnelle des gènes du SSTT a également été réalisée par mesure de la bioluminescence émise par les bactéries possédant l'opéron *luxCDABE*. Les promoteurs de l'opéron *exsCEBA* ou du gène *exoS* ont été fusionnés en amont de l'opéron *luxCDABE* sans promoteur donnant les plasmides mini-CTX-*exsCplux* et mini-CTX-*exoSplux*. Les gènes rapporteurs ont ensuite été transférés dans le chromosome des différentes souches de *P. aeruginosa* au niveau du gène *attB* par recombinaison homologe selon la technique développée par (Becher et Schweizer, 2000; Laskowski, Osborn, et Kazmierczak, 2004). Les souches suivent le protocole d'activation du SSTT et la mesure par un luminomètre des unités relatives de luminescence (RLU) de la culture, rapportées à la DO<sub>600</sub>, permettent d'estimer l'activité transcriptionnelle du promoteur.

## **V-F. Analyse du surnageant de culture bactérien**

### **V F-1. Préparation du surnageant**

Une préculture en LB de 16 h, est utilisée pour ensemercer une culture en LB de volume X à une  $DO_{600}$  de 0,05. Après 6 h de culture, les bactéries sont centrifugées 5 min à 10 000g puis remises en culture dans un volume X/2 de milieu minimum VB pendant 16 h. La culture est ensuite centrifugée à 15 000 g durant 20 min à 4°C et le surnageant est récupéré.

### **V F-2. Précipitation et extraction**

Le surnageant est concentré par lyophilisation, repris par de l'eau puis précipité par 3 volumes d'éthanol absolu pendant 30 min à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les sels sont éliminés par centrifugation à 9000g durant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite passé au rotavapor pour éliminer l'éthanol, puis lyophilisé. Ce lyophilisat est repris par un petit volume d'eau distillée puis extrait 3 fois par 1 volume d'acétate d'éthyle acidifié (acide acétique 0.01 %) selon la méthode décrite (Pesci *et al.*, 1999). La phase organique est séchée au rotavapor, la phase aqueuse est lyophilisée. Cette extraction a été réalisée en collaboration avec le Dr MG.Dijoux du laboratoire de Pharmacognosie de la faculté de Pharmacie de Grenoble.

### **V F-3. Analyse par LC-MS-MS**

Pour déterminer le type de molécules présentes dans le surnageant de culture notamment les homosérines lactones, celui-ci a été analysé par chromatographie suivie d'une spectrographie de masse (LC-MS-MS) selon la technique développée par Morin *et al* (Morin *et al.*, 2003). Le surnageant après la culture en milieu VB est extrait trois fois avec  $\frac{1}{2}$  volume de dichlorométhane. L'extrait dichlorométhane est ensuite séché sur du sulfate de magnésium anhydre, filtré et évaporé au rotavapor. Le résidu sec est ensuite repris par 0.5 ml d'acétonitrile puis analysé conformément au protocole décrit par Morin *et al* (Morin *et al.*, 2003).

# **PRESENTATION DU TRAVAIL**





L'adaptation et la survie de *P. aeruginosa* dans un nouvel environnement dépendent de sa capacité à exprimer au moment opportun les gènes appropriés, notamment ceux contrôlant ces systèmes de virulence. Le système de sécrétion de type III est l'un de ces systèmes qui est fortement impliqué dans les processus d'invasion de *P. aeruginosa*. Le SSTT est activé par un contact avec une cellule ou une déplétion calcique et réprimé lorsque les bactéries se trouvent sous forme de biofilm. Différents phénotypes ont été observés pour ce facteur de virulence lors d'une infection pulmonaire chronique chez des patients atteints de mucoviscidose, sans qu'il y ait, *a priori*, de mutations des gènes du SSTT : un phénotype dit inductible par l'un des signaux précédents et un phénotype dit non inductible. Le premier est majoritaire chez des bactéries isolées au début de l'infection, les souches présentant le second phénotype semblent s'accumuler au cours de l'infection et pourraient provenir des isolats bactériens persistant sous forme de biofilm.

Nous nous sommes intéressés d'une part aux phénomènes permettant la répression du SSTT lors de la formation du biofilm et d'autre part à la possibilité d'un retour à un SSTT inductible à partir de souches non inductibles.

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre la bascule de l'état non inductible à l'état inductible entre des souches possédant le même génotype en posant l'hypothèse d'un mécanisme épigénétique. A partir des données de régulation connues et à l'aide d'outils informatiques de modélisation, nous avons d'abord montré qu'un phénomène d'épigénèse est possible au sein du réseau de régulation du SSTT. Ensuite, le logiciel utilisé nous a également permis de prévoir les expériences pour valider notre hypothèse. A l'aide d'un système permettant l'expression inductible du régulateur ExsA, nous avons montré qu'une modification épigénétique peut être à l'origine de l'acquisition d'un état inductible pour le SSTT. L'acquisition d'un phénotype cytotoxique dépendant du SSTT, par ce mécanisme, a été confirmée *in vivo* au moyen d'un modèle d'infection pulmonaire aiguë. Nous avons ainsi démontré qu'un phénomène d'épigénèse peut réguler l'inductibilité du SSTT et qu'il pourrait être à l'origine des deux phénotypes observés pour ce facteur de virulence dans les souches présentes dans les poumons.

Dans un second temps, nous avons étudié le SSTT en fonction de la croissance bactérienne. A l'aide de fusions transcriptionnelles nous avons mis en évidence que l'expression de ce facteur de virulence est dépendante de la densité cellulaire. Ensuite, nous avons démontré que l'activation du régulateur ExsA est inhibée à densité cellulaire élevée par un signal produit et sécrété par les bactéries. Cette inhibition portant les traits d'une régulation de type quorum sensing (QS), nous avons évalué le rôle des différents systèmes de QS chez *P. aeruginosa*. Pour cela les gènes des synthèses des signaux PAI1, PAI2 et PQS ont été invalidés puis la capacité d'inhibition du SSTT de ces souches a été testée. De la même façon que la souche parentale, les souches mutantes conservent une expression du SSTT dépendante de la densité cellulaire et elles sont toujours capables de produire le signal inhibiteur. Ces résultats démontrent que la répression du SSTT à densité cellulaire élevée est due à un mécanisme de type quorum sensing différent et indépendant du quorum sensing connu chez *P. aeruginosa*.

# RESULTATS



## I. Acquisition d'une cytotoxicité dépendante du SSTT par un mécanisme épigénétique

Ce travail a été réalisé en collaboration avec J. Guespin (co-directeur de thèse), A. Mérieau (laboratoire de microbiologie du froid d'Evreux) et B. Guery (EA2689 CHRU de Lille) pour la partie expérimentale et l'équipe de G. Bernot (LaMI au Génopôle d'Evry) pour l'analyse bioinformatique. Il fait l'objet d'un manuscrit soumis à *BMC bioinformatics* (voir Article 1 en annexe).

Le système de sécrétion de type III est activé par contact cellulaire ou en déplaçant le milieu de culture en calcium. L'activation provoque l'expression du régulateur global du SSTT, ExsA, qui active l'ensemble des gènes de ce système de virulence y compris sa propre expression formant une boucle de rétroaction positive. Certaines souches de *P. aeruginosa* dites non inductibles possèdent l'ensemble des gènes nécessaires au fonctionnement du SSTT. Cependant, elles ne sécrètent pas les toxines du SSTT ou ne présentent pas une cytotoxicité dépendante du SSTT lors d'un signal d'activation *in vitro* ou *in vivo* alors qu'elles en étaient, et qu'elles en sont toujours capables, si le système est réactivé par une surexpression d'exsA. Cela a été montré chez des souches isolées de patients atteints de mucoviscidose à différents stades de l'infection. En effet, des études sur des isolats clonaux issus d'un même patient montrent que les bactéries capables de sécréter les toxines du SSTT peuvent être isolées en grande proportion au début de l'infection puis que la proportion de ces bactéries diminue à mesure que celles-ci persistent dans les poumons, bien qu'elles possèdent les gènes nécessaires à l'expression du SSTT (Feltman *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2004). De plus, dans la plupart des souches testées, devenues non inductibles, une surexpression d'ExsA en *trans*, permet de rétablir un phénotype similaire à celui du début de l'infection en terme de cytotoxicité dépendante du SSTT et de sécrétion des toxines du SSTT (Dacheux, Attree, et Toussaint, 2001). Ainsi, bien que ces souches possèdent apparemment tous les gènes nécessaires à l'expression du SSTT, elles peuvent présenter deux phénotypes différents. Ainsi on peut trouver différentes souches de PAO1 issues de

patient ou de l'environnement se différenciant entre autre par l'inductibilité du SSTT sans que l'on ait pu expliquer ces différences à ce jour.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant aux mécanismes sous-jacents à cette dualité de phénotype. La perte d'inductibilité du phénotype de sécrétion de type III, après un passage dans les poumons, peut être due à une mutation dans la cascade de régulation conduisant à l'expression du gène *exsA* ou à la mutation de l'opéron *exsCEBA* lui-même. L'environnement pulmonaire sélectionnerait ensuite ces mutations expliquant l'accumulation des souches non inductibles au fur et à mesure de la persistance de l'infection. Une seconde hypothèse, faisant intervenir un phénomène d'épigénèse, peut également être formulée. En effet, deux caractéristiques du SSTT sont en accord avec celle-ci. Il existe dans la régulation du SSTT, une boucle de rétroaction positive qui est nécessaire pour une épigénèse (figure 13A) et il semble exister deux états d'inductibilité pour le SSTT chez des souches possédant apparemment le même génotype. Ces deux phénotypes du SSTT pourraient correspondre aux deux états stationnaires inhérents à un système possédant une boucle de rétroaction positive dans lequel intervient un phénomène d'épigénèse.

Ces deux hypothèses ne sont pas forcément incompatibles puisqu'une modification épigénétique peut être la cause initiale du changement de phénotype d'inductible à non inductible dans les poumons, suivie d'une mutation qui stabilise le phénotype.

Choisir entre l'une de ces hypothèses ne peut se faire en utilisant uniquement des techniques de biologie « classiques ». En effet, en ce qui concerne la première, l'absence de mutation est difficile à prouver du fait d'une connaissance incomplète des réseaux de régulation contrôlant le SSTT. Cette mutation peut également apparaître après le changement de phénotype et le stabiliser sans en être responsable. Pour la seconde hypothèse, bien que la boucle de rétroaction positive sur le gène *exsA* soit en faveur d'un phénomène d'épigénèse, il existe aussi une boucle de régulation négative sur le gène *exsA* (figure 13A). Cette boucle étant favorable à une homéostasie, il n'est donc pas évident que le réseau de régulation du SSTT permette de prédire la possibilité d'une bi-stabilité : phénotype non inductible / inductible.

L'utilisation d'outils mathématiques est donc nécessaire pour aider à déterminer si l'hypothèse épigénétique est cohérente et si un modèle du SSTT, conduisant à deux

états stables, peut être défini. Ce modèle devra également être cohérent avec les données biologiques connues pour correspondre à l'hypothèse d'épigénèse pour l'inductibilité du SSTT.

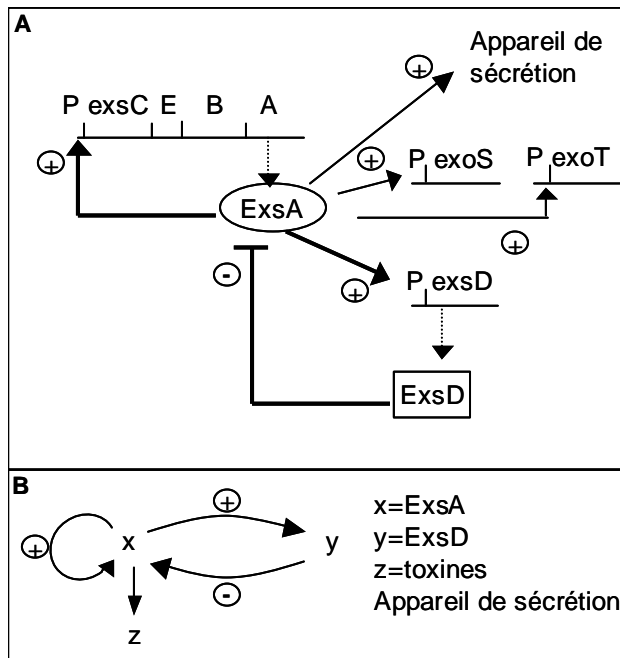


Figure 13 : (A) Schéma simplifié de la régulation du SSTT lors de l'activation par contact avec une cellule cible ou par déplétion calcique. ExsA s'autorégule, active l'expression de l'appareil de sécrétion/translocation, des toxines et de l'inhibiteur ExsD.

(B) Schéma minimal de régulation issu de (A) montrant essentiellement les boucles de rétroaction servant à la modélisation.

## I-A. Modélisation de la régulation du SSTT

### I A-1. Description par la logique généralisée

Pour évaluer la validité de l'hypothèse épigénétique, la modélisation de la dynamique de tout le réseau de régulation du SSTT n'est pas indispensable. Puisque ce sont les interactions entre les boucles de régulation positive et négative au niveau d'exsA qui déterminent la possibilité d'une multistationnarité ou d'une homéostasie du SSTT ; nous avons seulement considéré un sous modèle de la régulation de ce facteur de virulence, restreint aux interactions contenant ces boucles (figure 13B). De plus, étant donné que nous cherchons à déterminer la capacité d'inductibilité du SSTT, nous n'avons modélisé que la situation où il est stimulé par une déplétion calcique ou un contact avec une cellule eucaryote. Pour cela trois variables ont été définies. x et y représentent respectivement les protéines ExsA et ExsD. La variable de sortie z,

témoin de l'inductibilité, regroupe la production des toxines et de l'appareil de sécrétion lors d'une induction du SSTT. Les flèches représentent les interactions positives (+) ou négatives (-) entre les variables.

L'analyse du graphe de la figure 13B a été réalisée par logique généralisée. Le régulateur ExsA, représenté par la variable  $x$ , peut agir sur sa propre expression et sur l'expression d'ExsD. ExsD, représentée par la variable  $y$ , n'agit que sur ExsA. De plus, il est peu probable que la concentration à laquelle ExsA agit sur lui-même soit identique à celle à laquelle cet activateur agit sur ExsD. Deux « seuils d'action » ont donc été associés à ExsA et un seul à ExsD. Et deux modèles dynamiques ont été définis selon la sensibilité des promoteurs à ExsA (figure 14). Dans un cas le seuil au dessus duquel  $x$  est actif sur lui-même est plus élevé (niveau 2) que celui au dessus duquel  $x$  agit sur  $y$  (niveau 1). Dans le second cas,  $x$  agit sur lui-même au niveau 1 et sur  $y$  seulement lorsqu'il passe le niveau 2. La variable  $z$ , correspondant à l'expression des toxines et de l'appareil de sécrétion, est une variable dont le niveau est déterminé par les valeurs de  $x$  : les faibles valeurs (phénotype non cytotoxique) ne permettront pas la production de  $z$  qui nécessite des valeurs élevées (phénotype cytotoxique).

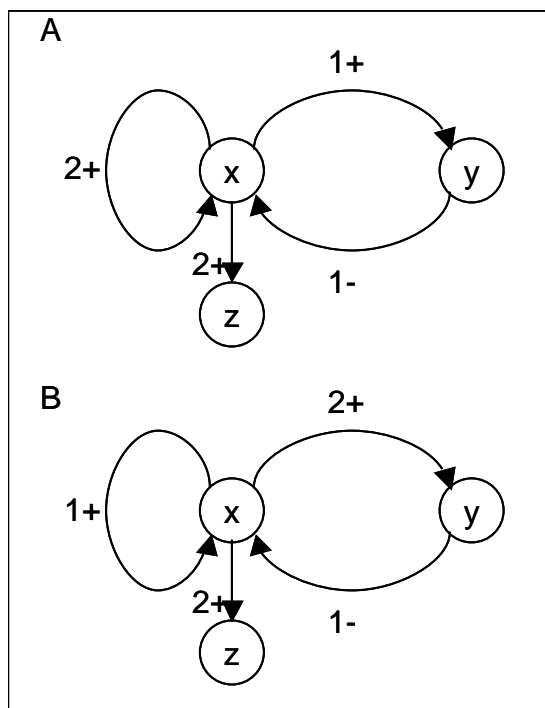


Figure 14 : Les deux modèles dynamiques issus de la modélisation de la régulation du SSTT (figure 1B) selon la sensibilité des promoteurs à ExsA. (A) Le seuil de concentration au dessus duquel  $x$  agit sur lui-même est plus élevé (niveau 2) que celui au dessus duquel  $x$  est actif sur  $y$  (niveau 1). (B) Représente le cas inverse.  $x$ =ExsA,  $y$ =ExsD,  $z$ =toxines/appareil de sécrétion, (-)=inhibition, (+)=activation.

Les graphes exposés dans la figure 13B et la figure 14 sont identiques à ceux obtenus par Guespin-Michel et Kauffman dans leur analyse d'une acquisition



possible du phénotype mucoïde par épigénèse (Guespin-Michel et Kaufman, 2001). Dans ce cas les auteurs ont pu montrer qu'il existait des paramètres, pour chacun des deux modèles, compatibles avec les données biologiques et conduisant à l'existence des deux états stables supposés par l'hypothèse d'une modification épigénétique entre les phénotypes mucoïde et non mucoïde. Les mêmes équations et les mêmes paramètres conduisent à démontrer la cohérence de l'hypothèse épigénétique pour l'inductibilité du SSTT (Guespin-Michel *et al.*, 2004).

### I A-2. Validation bioinformatique des modèles

Nous avons également eu l'opportunité de collaborer avec une équipe de bioinformaticiens, ce qui nous a permis de déterminer de façon formelle et exhaustive l'ensemble des paramètres compatibles avec l'hypothèse épigénétique. Pour cela, l'équipe du LaMi a mis au point un logiciel dédié, *SmbioNet* (Bernot *et al.*, 2004). Les mêmes deux séries de paramètres compatibles avec l'hypothèse épigénétique ont été obtenues. (*Pour une description plus détaillée de l'analyse du modèle par le logiciel SMBioNet, voir article 1*).

D'autre part, cette collaboration a permis de déterminer l'ensemble des preuves à apporter, nécessaires pour démontrer expérimentalement l'existence de cette bistabilité. Le graphe d'état correspondant à un de ces modèles et schématisant la dynamique d'inductibilité du SSTT est représenté en figure 15. Il reprend les différentes valeurs possibles pour le couple de variables (x,y) et illustre par des flèches vers quelles valeurs les variables de ce couple tendent à évoluer au cours du temps. On voit que le système peut évoluer sous deux états stables distincts (dont un avec des oscillations), ce qui est compatible avec l'hypothèse épigénétique. Ces deux états diffèrent seulement par la quantité de x et les variations de concentration de y ne peuvent pas changer le phénotype. En effet, quel que soit l'état de départ, si la valeur de y change, le système reste dans le même état. La seule possibilité de basculer de l'un à l'autre nécessite la modification, même transitoire, de la valeur de x, pour la faire passer, dans ce cas, au-dessus ou au-dessous du seuil 1. Donc, si on peut montrer qu'une augmentation transitoire de la valeur de x permet de basculer un système se trouvant dans l'état où x est sous le seuil 1, dans l'autre état et que

cette modification d'état est stable alors l'hypothèse épigénétique sera pleinement validée.

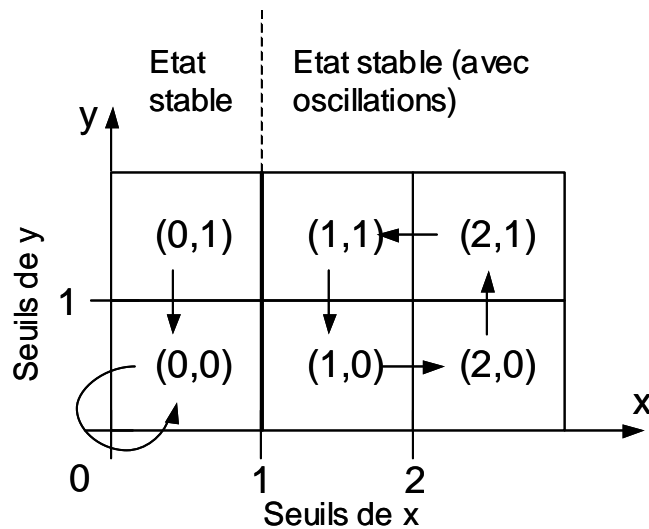


Figure 15 : **Graphe d'état d'un des résultats obtenu avec le logiciel SMBioNet en accord avec l'hypothèse épigénétique sur le modèle de régulation du SSTT.** Les différentes valeurs que peut prendre le couple de variables  $x$  et  $y$  sont représentées. Les flèches montrent vers quel état le couple va évoluer selon les paramètres définis pour cette solution du modèle.  $x = \text{ExsA}$ ,  $y = \text{ExsD}$

### I A-3. Détermination d'une validation expérimentale

Les deux états stables issus de l'analyse du modèle sont compatibles avec l'hypothèse épigénétique et peuvent correspondre aux deux phénotypes observés pour le SSTT. L'état dans lequel  $x$  ( $\text{ExsA}$ ) est en dessous du seuil 1 correspondrait au SSTT non inductible, le second état avec  $x$  au dessus du seuil 1 serait quant à lui l'image du SSTT inductible. Donc, pour valider l'hypothèse épigénétique expérimentalement, on doit montrer que l'acquisition du second état (SSTT inductible) par une souche avec un SSTT non inductible est possible et qu'elle est stable même après l'arrêt de la perturbation qui a permis la modification du phénotype.

Ainsi, l'expérience à réaliser est la suivante : à l'aide d'un stimulus, exprimer  $\text{ExsA}$  à saturation de façon transitoire dans une bactérie avec un SSTT non inductible, puis attendre un certain laps de temps pour permettre au système de se stabiliser et observer le phénotype (e.g. sécrétion des toxines). Ce laps de temps doit être déterminé expérimentalement. Ici, il signifie « autant de générations bactériennes possibles ». Si la bactérie n'a pas changé de phénotype alors l'hypothèse d'épigénèse est erronée. Mais, si une augmentation transitoire du niveau d' $\text{ExsA}$

peut déplacer le système d'un état non inductible à un état inductible stable, alors l'existence d'une modification épigénétique sera démontrée.

## **I-B. Démonstration expérimentale de la modification épigénétique pour l'acquisition d'un SSTT inductible.**

### **I B-1. Construction et validation d'un gène *exsA* inductible**

#### **IB 1-a) Le plasmide *pexsAind***

Nous avons utilisé le plasmide *pexsAind* (Thèse de L. Quénée, UJF-Grenoble, 2004) pour réaliser l'expression transitoire d'ExsA, le facteur de transcription essentiel à l'expression du SSTT. Ce plasmide contient le gène *exsA* sous le contrôle du promoteur *tac* (*ptac*) et le gène *lacIQ* séparés par le terminateur de transcription *rrnB* (Stark, 1987) (figure 16A). Le promoteur fort, *ptac*, est un hybride entre *plac* et *ptrp* respectivement promoteur des opérons lactose et tryptophane chez *E.coli*. Le gène *lacIQ* code un répresseur transcriptionnel qui inhibe l'expression d'*exsA*. En présence d'inducteur (du lactose ou de l'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), la répression exercée par LacIQ est levée, permettant une surexpression d'ExsA (figure 16B). Si l'inducteur n'est plus présent dans le milieu, l'expression du gène *exsA* à partir du plasmide est de nouveau inhibée. Ce système inductible nous permet donc de contrôler finement l'expression d'*exsA* dans le temps.

Le choix de l'inducteur pour activer la transcription s'est porté sur l'IPTG. Contrairement au lactose, cette molécule diffuse librement à travers les membranes bactériennes. Cela permet de garder constante la concentration initiale d'inducteur lors de la supplémentation et d'éviter que le signal ne reste présent dans les bactéries lorsqu'elles seront placées dans un milieu sans IPTG. Ainsi, l'induction est quasiment stoppée immédiatement si l'IPTG est éliminé du milieu.

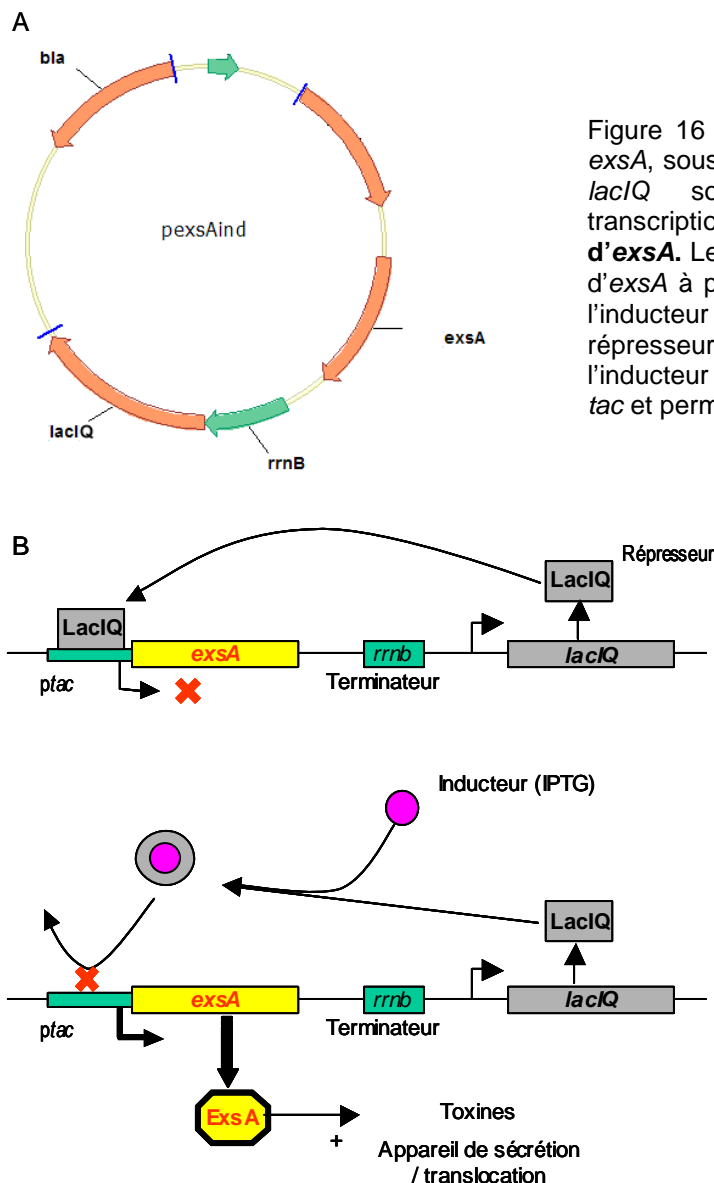


Figure 16 : **(A) Le plasmide pexsAind.** Le gène *exsA*, sous le contrôle du promoteur *tac* et le gène *lacIQ* sont séparés par le terminateur transcriptionnel *rrnB*. **(B) Expression inducible d'*exsA*.** Le répresseur LacIQ inhibe la transcription d'*exsA* à partir du promoteur *tac*. En présence de l'inducteur (lactose ou IPTG) la structure du répresseur est modifiée par son interaction avec l'inducteur empêchant sa liaison sur le promoteur *tac* et permettant la transcription du gène *exsA*.

### IB 1-b) Validation du plasmide pexsAind : Complémentation du mutant CHA-D1 (*ExsA*<sup>-</sup>)

Afin de déterminer si la protéine ExsA, synthétisée à partir du plasmide pexsAind, est fonctionnelle, nous avons transféré le plasmide pexsAind dans la souche CHA-D1 et testé son phénotype de sécrétion de type III. Cette souche, dérivée de la souche parentale CHA qui possède un SSTT inducible, ne produit plus l'activateur transcriptionnel essentiel au SSTT du fait de l'insertion de la cassette de résistance *aac1* dans le gène *exsA* (Dacheux *et al.*, 1999). Elle est non cytotoxique et incapable de sécréter les toxines du SSTT *in vitro* lors de la déplétion du milieu en calcium.

Seule la complémentation de cette souche avec un gène *exsA* exprimé de façon continu permet de rétablir un phénotype similaire à la souche CHA (Dacheux *et al.*, 1999).

La souche CHA-D1(*pexsAind*) a été cultivée en LB, en présence ou non d'une déplétion calcique, jusqu'à une densité optique à 600 nm ( $DO_{600}$ ) égale à 1,5. Pour induire l'expression du gène *exsA*, le milieu a été supplémenté avec différentes concentrations d'IPTG. Les surnageants de culture, correspondant à un même nombre de bactéries, ont été analysés après SDS-PAGE (figure 17). A partir d'une concentration de 0,5 mM d'IPTG, la sécrétion des toxines ExoS et ExoT est détectable lors de la déplétion calcique. Cette sécrétion augmente avec 1 mM d'IPTG puis reste identique si la concentration d'IPTG augmente. Ces profils de sécrétion confirment la fonctionnalité de la construction *pexsAind*. L'expression en *trans* d'*exsA* permet de compléter la souche CHA-D1 qui retrouve un profil de sécrétion similaire à celui de la souche parentale CHA, avec la sécrétion des toxines ExoS et ExoT. Le maximum de sécrétion étant atteint à partir d'une concentration de 1 mM, nous avons utilisé celle-ci pour la suite de l'étude.

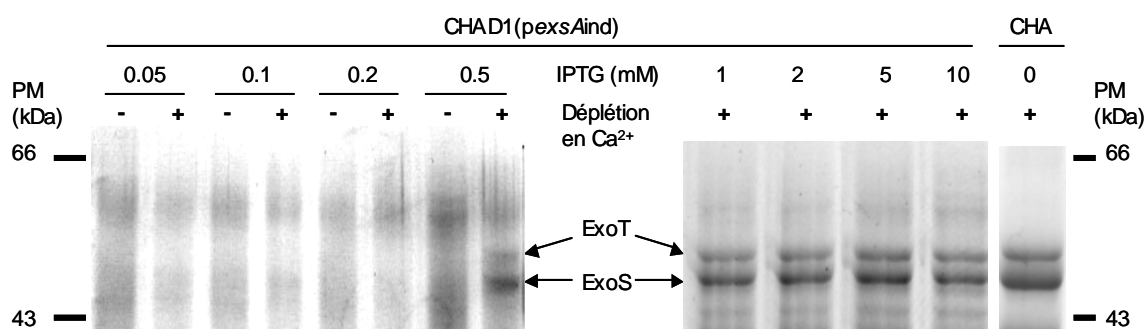


Figure 17 : **Profil de sécrétion des souches CHA et CHA-D1(*pexsAind*) cultivées avec ou sans déplétion calcique en présence de différentes concentrations d'IPTG.** Les protéines sécrétées ont été séparées par SDS PAGE et colorées au bleu de Coomassie.

## I B-2. La souche PAO1

La souche choisie pour évaluer la validité de l'hypothèse épigénétique est l'une des souches de PAO1 possédant un SSTT non inductible. L'absence d'inductibilité du SSTT de cette souche se traduit par un défaut de cytotoxicité dépendante du SSTT

(Dacheux *et al.*, 1999) sur des cellules et une incapacité à répondre à la déplétion calcique *in vitro* par une sécrétion des toxines du SSTT.

Dans un premier temps, cette souche a été électroporée avec le plasmide *pexsAind* puis testée pour son phénotype de sécrétion afin de déterminer si elle possédait l'ensemble des gènes nécessaires au fonctionnement du SSTT. Les souches ont été cultivées en déplétion calcique, avec ou sans 1 mM d'IPTG, jusqu'à une densité optique à  $DO_{600}$  d'environ 1,5. Les surnageants de culture, correspondant à un même nombre de bactéries, ont été analysés par SDS-PAGE.

La souche PAO1(*pexsAind*) en l'absence d'IPTG sécrète en très faibles quantités les toxines ExoT et ExoS lors de la déplétion calcique tout comme la souche parentale PAO1. Par contre, lorsque le gène *exsA* est exprimé en *trans* durant toute la durée de la déplétion calcique, la quantité de protéine sécrétée est similaire à la souche de référence, CHA (figure 18).

Ces résultats confirment que la souche PAO1 non inductible, qui sécrète en très faibles quantités les toxines du type III *in vitro* et qui est peu cytotoxique sur des cellules (Dacheux *et al.*, 1999), possède bien les gènes nécessaires au fonctionnement du SSTT à l'exception d'*exsA* dont on ne sait pas s'il est fonctionnel par ce biais.

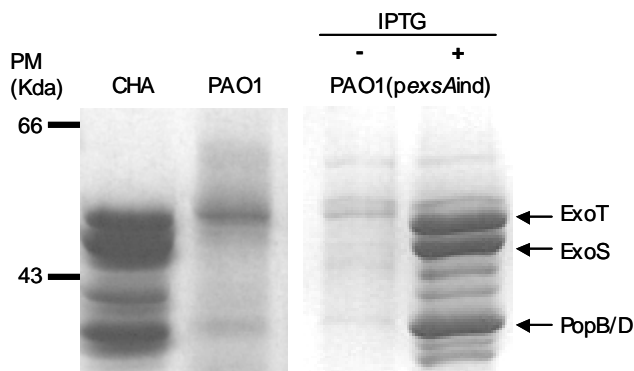


Figure 18 : Profils de sécrétion des souches CHA, PAO1 et PAO1(*pexsAind*) en déplétion calcique avec ou sans IPTG (1 mM). Les protéines sécrétées ont été séparées par SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie.

### I B-3. Effet d'une augmentation transitoire d'ExsA dans une souche non cytotoxique *in vitro*

#### IB 3-a) Phénotype de sécrétion de type III

La modélisation préalablement effectuée du SSTT suggère que la souche PAO1 peut acquérir l'inductibilité du système de sécrétion de type III par un mécanisme épigénétique si l'expression d'*exsA* est augmentée, même de façon transitoire. Différentes souches CHA et PAO1 contenant ou non le plasmide *pexsAind*, ont donc été soumises ou non à un pulse d'IPTG durant 20 min en LB à une  $DO_{600}$  de 0,2 ( $1,2 \cdot 10^8$  CFU/ml). Ensuite, les bactéries ont été lavées puis mises en culture dans du milieu LB en déplétion calcique pendant 3 générations. Les protéines des surnageants de culture, correspondant au même nombre de bactéries, ont été analysées, après SDS-PAGE, par coloration au bleu de Coomassie ou par Western blot avec un anticorps spécifique d'ExoS (figure 19 et figure 20).

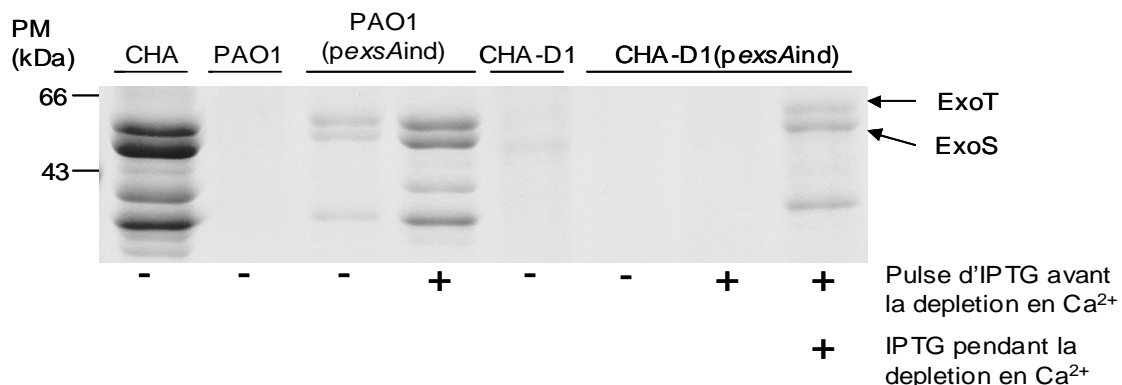


Figure 19 : **Profils de sécrétion de différentes souches en déplétion calcique avec ou sans expression transitoire d'ExsA.** Les protéines sécrétées ont été séparées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie. La souche PAO1(*pexsAind*) a subi un pulse d'IPTG de 20 min avant la déplétion calcique ; la souche CHA-D1(*pexsAind*) a subi ou non un pulse d'IPTG de 20 min avant d'être cultivée en déplétion calcique avec ou sans IPTG. L'IPTG a été utilisé à 1mM.

La souche CHA qui, cultivée en déplétion calcique, sécrète une quantité importante de toxines ExoS et ExoT, sert de contrôle positif de sécrétion. La souche PAO1 ne sécrète pas de toxine. En absence d'inducteur, la souche PAO1(*pexsAind*) sécrète très peu de toxines. Le pulse d'IPTG de 20 min avant la culture en déplétion calcique, résulte en une augmentation significative de la sécrétion de la souche

PAO1(*pexsAind*) 3 générations plus tard. Une expression transitoire d'ExsA a donc permis de basculer le phénotype du SSTT d'une souche d'un phénotype non inductible, par une déplétion calcique, à inductible.

La souche mutée dans le gène *exsA*, CHA-D1(*pexsAind*) ne sécrète pas les toxines du SSTT après avoir subi un pulse d'IPTG de 20 min. Seule une expression d'ExsA en *trans* durant toute la déplétion calcique permet d'obtenir la sécrétion des toxines ExoS et ExoT. Les mêmes conditions de culture que pour la souche CHA-D1(*pexsAind*) ont été appliquées à la souche PAO1 $\Delta$ pA contenant le plasmide *pexsAind*. Cette souche est un mutant isogénique de PAO1 ayant subi une délétion de la séquence non codante entre le gène *exsB* et *exsA*, y compris la séquence de liaison au ribosome. Elle ne peut donc exprimer le régulateur ExsA. Comme la souche CHA-D1(*pexsAind*), cette souche ne sécrète pas les toxines du SSTT après avoir subi un pulse d'IPTG de 20 min. Seule une surexpression continue d'*exsA* en *trans*, au moyen du plasmide *pexsAind*, permet une sécrétion d'ExoS détectée par Western blot (figure 20). Cependant, cette sécrétion est beaucoup plus faible que celle exprimée par PAO1(*pexsAind*) ou CHA-D1(*pexsAind*) dans cette condition : la sécrétion d'ExoS n'est pas visible en coloration au bleu de Coomassie. Les causes de cette différence ne sont pas connues mais pourraient provenir de la nature même de la souche.

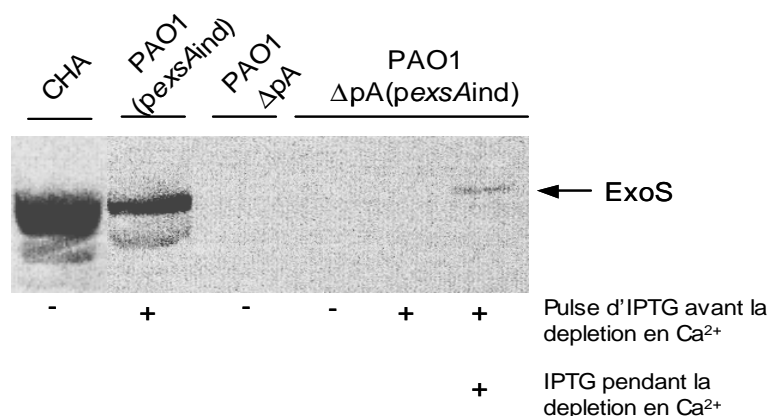


Figure 20 : **Sécrétion d'ExoS chez différentes souches en déplétion calcique avec ou sans expression transitoire d'ExsA.** Les protéines sécrétées ont été séparées par SDS-PAGE. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, la toxine ExoS a été détectée avec un anticorps spécifique. La souche PAO1(*pexsAind*) a subi un pulse d'IPTG de 20 min avant la déplétion calcique ; la souche PAO1 $\Delta$ pA(*pexsAind*) a subi ou non un pulse d'IPTG de 20 min avant d'être cultivée en déplétion calcique avec ou sans IPTG. L'IPTG a été utilisé à 1mM.

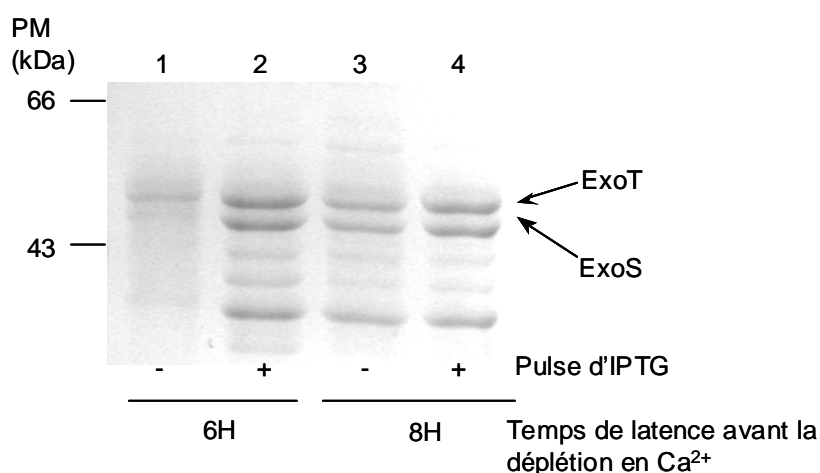


Ces résultats, avec des mutants incapables d'exprimer ExsA, démontrent que la souche PAO1 n'est pas un mutant d'*exsA*. De plus, la capacité d'induction de la sécrétion des toxines dans la souche PAO1(*pexsAind*), en déplétion calcique, est bien due à la réactivation de la boucle de rétroaction positive sur le gène *exsA* par une production transitoire d'ExsA en *trans*, ayant conduit au maintien de l'expression du gène natif. Cette sécrétion ne peut être imputée à une accumulation de la protéine ExsA, surexprimée à partir de *pexsAind*, ou à une « fuite » transcriptionnelle à partir de ce plasmide, ou encore à des traces d'IPTG restées dans le milieu après les lavages qui auraient permis l'expression continue d'ExsA en *trans*. Quelle que soit la quantité d'ExsA restante ou produite à partir du plasmide *pexsAind* après le pulse d'IPTG, elle n'est pas suffisante pour activer la sécrétion des toxines du SSTT par elle-même, ni dans la souche PAO1 $\Delta$ pA, ni même dans la souche CHA-D1, chez laquelle, pourtant, l'expression d'*exsA* à partir du plasmide semble avoir un effet beaucoup plus important. Cette expérience confirme également que la présence de la boucle de rétroaction positive au niveau d'*exsA* est nécessaire à l'acquisition du phénotype « SSTT inductible » par une modification épigénétique.

### **IB 3-b) Influence de la déplétion calcique sur la stabilité du phénotype acquis**

Pour démontrer la validité de l'hypothèse épigénétique, l'une des conditions était que le phénotype acquis par la souche PAO1(*pexsAind*) soit stable. Nous l'avons mis en évidence lorsque cette souche a été cultivée pendant 3 générations en déplétion calcique après le pulse d'IPTG. On peut se demander si cette stabilité peut être démontrée pendant plus de générations et si la présence de calcium dans le milieu après le pulse interfère avec l'inductibilité ultérieure. C'est pourquoi, après un pulse d'IPTG de 20 min, la souche PAO1(*pexsAind*) a été cultivée dans du milieu LB sans déplétion calcique pendant 6h ou 8h : condition dans laquelle le SSTT n'est pas stimulé par la déplétion calcique. Durant ce temps, les bactéries ont été maintenues en phase exponentielle de croissance par des dilutions séquentielles dans du milieu LB frais, précédées d'un lavage pour retirer l'ancien milieu. La culture a ensuite été soumise ou non à une déplétion calcique et les protéines des surnageants de culture ont été analysés après SDS-PAGE (figure 21).

Figure 21 : **Profil de sécrétion de la souche PAO1 (pexsAind) en déplétion calcique.** La souche a subi ou non un pulse d'IPTG de 1 mM de 20 min puis a été maintenue en phase exponentielle en LB durant un temps défini avant la déplétion calcique comme indiqué. Les protéines sécrétées ont été séparées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie.



Même après 8h de culture en présence de calcium suite au pulse d'IPTG, la souche est toujours capable de sécréter les toxines ExoS et ExoT sous l'effet d'une déplétion calcique. L'absence de stimulus d'activation (déplétion calcique) juste après l'acquisition de l'inductibilité du SSTT n'interfère donc en rien sur l'inductibilité ultérieure, qui est stable pendant au moins 10 générations.

De façon surprenante, la souche n'ayant pas subi de pulse est également capable de sécréter les toxines ExoS et ExoT, en déplétion calcique, après les 8h de culture en quantité beaucoup plus importante qu'après les 6h. On peut supposer que pendant ces deux heures le niveau d'ExsA dans les bactéries s'est élevé au dessus du seuil nécessaire pour permuter le phénotype. La quantité de toxines sécrétées à 8h étant plus faible dans la culture sans le pulse comparée à celle ayant subi le pulse, on peut penser que la bascule de phénotype n'est pas intervenue dans toutes les bactéries entre 6h et 8h ou alors qu'elle s'est produite après avoir éliminé le calcium du milieu.

#### **I B-4. Effet d'une augmentation transitoire d'ExsA dans une souche non cytotoxique *in vivo***

Il a été montré qu'un SSTT actif est associé à la sévérité des lésions pulmonaires lors d'une infection à *P. aeruginosa* chez l'homme et dans des modèles murins (Hauser *et al.*, 2002; Roy-Burman *et al.*, 2001). De plus, contrairement à la souche CHA, le mutant CHA-D1, n'induit pas d'augmentation de la quantité de protéines dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire qui est un marqueur d'altération de la membrane alvéolo-capillaire et d'inflammation, lors d'une infection (Ader *et al.*, 2005).

Nous avons donc recherché si l'acquisition épigénétique d'un phénotype « SSTT inductible », permettant une sécrétion de toxines *in vitro*, avait une influence, *in vivo*, sur la cytotoxicité de la souche PAO1. Pour cela, un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez le rat par une instillation de bactéries, développé au Laboratoire de Recherche en Pathologie Infectieuse (Faculté de médecine, Lille), a été utilisé.

Les différentes cultures des souches PAO1 et PAO1(pexsAind) ont subi ou non un pulse d'IPTG de 20 min puis elles ont été lavées et cultivées en milieu TSB pendant 4 générations avant l'infection. Les rats ont été injectés avec  $10^8$  ou  $2.10^9$  CFU/ml. L'atteinte pulmonaire a été estimée par la quantité de protéines présentes dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire des rats (figure 22).

Pour une charge infectieuse de  $10^8$  CFU/ml, la souche PAO1(pexsAind), traitée avec un pulse d'IPTG, est associée à une quantité de protéines ( $1,6 \pm 0,2$  g/dl) plus importante que celle trouvée dans les poumons des rats infectés avec la souche parentale ( $0,4 \pm 0,03$  g/dl). Même à une charge infectieuse dix fois plus importante ( $1,04 \pm 0,21$  g/dl pour la souche PAO1 inoculée à  $2.10^9$  CFU/ml) la souche parentale reste moins cytotoxique que la souche pulsée.

Cette expérience illustre le fait que l'acquisition stable d'un SSTT inductible par une augmentation transitoire du régulateur transcriptionnel ExsA se traduit par un accroissement de la cytotoxicité dépendante du type III *in vivo*.

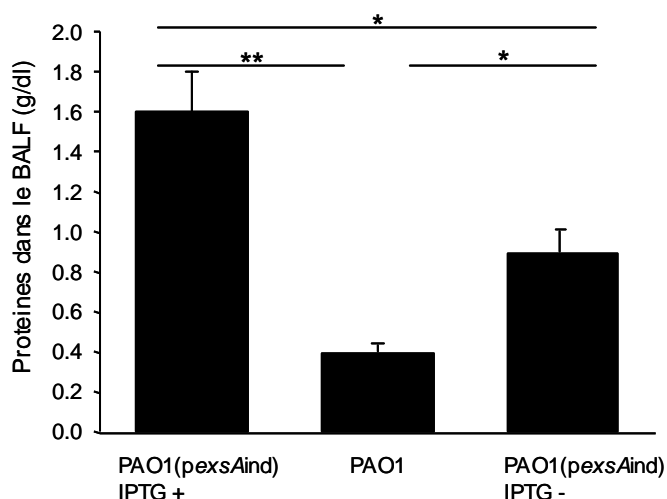


Figure 22 : **Cytotoxicité pulmonaire chez le rat.** La quantité de protéines a été mesurée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) de trois groupes expérimentaux : PAO1(pexsAind) injectée à  $10^8$  CFU/ml avec un pulse d'1 mM d'IPTG (IPTG+) ou pas (IPTG-), PAO1 injectée à  $10^8$  CFU/ml ou  $10^9$  CFU/ml. La quantité de protéines est significativement différente entre chaque groupe : \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.0001$ . les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

### I B-5. Les limites du plasmide pexsAind

Malgré la présence d'un promoteur inductible contrôlant l'expression d'ExsA, il existe une transcription résiduelle de l'activateur du SSTT à partir du plasmide pexsAind.

Cette fuite est notamment visible dans les expériences avec la souche PAO1(pexsAind) en l'absence d'IPTG. Dans la figure 19, en l'absence de pulse d'IPTG, cette souche présente une faible sécrétion des toxines ExoS et ExoT. Lors du test de stabilité du phénotype acquis, la souche PAO1(pexsAind), n'ayant pas subi de pulse et cultivée en LB durant 8h, est capable de sécréter ExoS et ExoT lors de la déplétion calcique (figure 20 ligne 3). Mais dans les deux cas, cette sécrétion est moins importante que celle issue de la souche ayant subi le pulse. Cette fuite a aussi un effet *in vivo*. Les poumons des rats infectés avec la souche PAO1(pexsAind) n'ayant pas subi de pulse d'IPTG montrent une quantité de protéines ( $0,9 \pm 0,1$  g/dl) significativement différente et comprise entre celles provoquées par la souche PAO1(pexsAind) pulsée et la souche PAO1 (figure 22). Cependant, cette souche ne présente pas une différence significative ( $p=0,63$ ) avec la souche PAO1 à un inoculum dix fois plus important.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'une transcription résiduelle, à partir de pexsAind, a pu élever le niveau d'ExsA suffisamment pour passer au dessus du seuil nécessaire pour permuter l'état du SSTT. Cet évènement n'a dû se produire que dans certaines bactéries au sein de la culture, aboutissant aux phénotypes médians observés. Ceci pose un problème pour déterminer, au long terme, la durée pendant laquelle l'inductibilité acquise du SSTT est conservée.

Dans le but d'obtenir un système inductible avec une meilleure répression en l'absence d'IPTG, le promoteur *tac*, sur le plasmide pexsAind, a été remplacé par le promoteur natif, *lac*, issu d'*E. coli* conduisant au plasmide p*lac*pexsAind. La transcription à partir du promoteur *lac* est plus « faible ». La sécrétion des différentes souches avec ou sans pulse d'IPTG a été réalisée comme précédemment (figure 23).

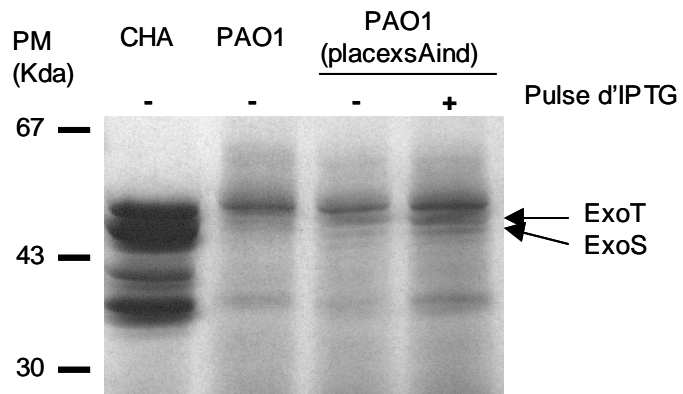


Figure 23 : **Profil de sécrétion des souches CHA, PAO1 et PAO1(p/acexsAind) en déplétion calcique.** Les souches ont subi ou non un pulse d'IPTG de 20 min avant la déplétion calcique. Les protéines sécrétées ont été séparées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie.

L'expression transitoire d'ExsA à partir de ce plasmide *p/acexsAind* conduit aussi à une récupération du phénotype inductible avec sécrétion des effecteurs du SSTT. Cependant la quantité de protéines sécrétées est plus faible qu'avec *p/exsAind*. De plus, il semble qu'il existe également une transcription résiduelle à partir du promoteur *lac* en absence d'inducteur. Le système inductible reste donc à perfectionner afin d'éviter autant que possible ces phénomènes, probablement dus à la fuite de la construction, notamment lors des expériences chez l'animal.



## II. Régulation de l'expression du Système de Sécrétion de Type III

Lors d'une infection chronique des poumons chez les personnes atteintes de mucoviscidose, le développement de *P. aeruginosa* sous forme d'un biofilm joue un rôle important dans le maintien de la bactérie au sein de l'hôte. Sous cette forme, les bactéries n'expriment pas et ne sécrètent pas les toxines du SSTT bien qu'elles possèdent les gènes nécessaires (Hogardt *et al.*, 2004). Il a également été mis en évidence qu'un changement de phénotype du SSTT de *P. aeruginosa* apparaît au cours du temps. La majorité des souches isolées des poumons au début de l'infection expriment un SSTT inductible puis, plus l'infection progresse plus la quantité de souches capables d'exprimer un SSTT inductible diminue, même dans le cas d'isolats issus du même clone (Jain *et al.*, 2004). Comme il est démontré au chapitre précédant, le maintien de ces deux phénotypes distincts, au sein d'une population clonale, peut être expliqué par un phénomène d'épigénèse. Mais cela n'explique pas la répression du SSTT lors du passage d'un mode de croissance planctonique à un mode en biofilm chez une bactérie possédant un SSTT inductible. Depuis deux ans, un nombre grandissant de systèmes de régulation ont été mis à jour dans la régulation du SSTT. Il s'agit principalement de systèmes de régulation à deux composants. Certains, comme SadARS, sont supposés être le détecteur formant une charnière entre une croissance sous forme planctonique exprimant un phénotype virulent avec un SSTT actif et une croissance en biofilm sous laquelle le SSTT est réprimé (Hogardt *et al.*, 2004; Kuchma, Connolly, et O'Toole, 2005). L'apparition de ce mode de développement en biofilm est grandement dépendante du quorum sensing, qui est lui-même dépendant de la densité bactérienne. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation du SSTT en fonction de la densité cellulaire pour comprendre ce phénomène d'inhibition du SSTT.

## II-A. Rôle de la densité cellulaire

### II A-1. Effet de la multiplicité d'infection sur la cytotoxicité dépendante du SSTT

La première étape dans l'étude de la régulation du SSTT en fonction de la densité cellulaire a été d'évaluer la cytotoxicité de la souche CHA sur des polynucléaires neutrophiles (PNNs) en variant la multiplicité d'infection (MOI – nombre de bactéries par cellules). Ces cellules immunitaires sont celles qui sont retrouvées au niveau pulmonaire, avec les macrophages, lors d'une infection et ont déjà fait l'objet d'un modèle pour étudier la cytotoxicité de *P. aeruginosa* (Dacheux *et al.*, 1999).

La souche CHA et le mutant CHA-D1, possédant un SSTT défectif, ont été cultivés en LB jusqu'à une  $DO_{600}$  de 1 ( $6.10^8$  CFU/ml) puis mis en culture pendant 3h avec  $10^6$  cellules à une MOI de 10 à 100. La cytotoxicité a été évaluée par la mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) relarguée par les cellules (figure 24).

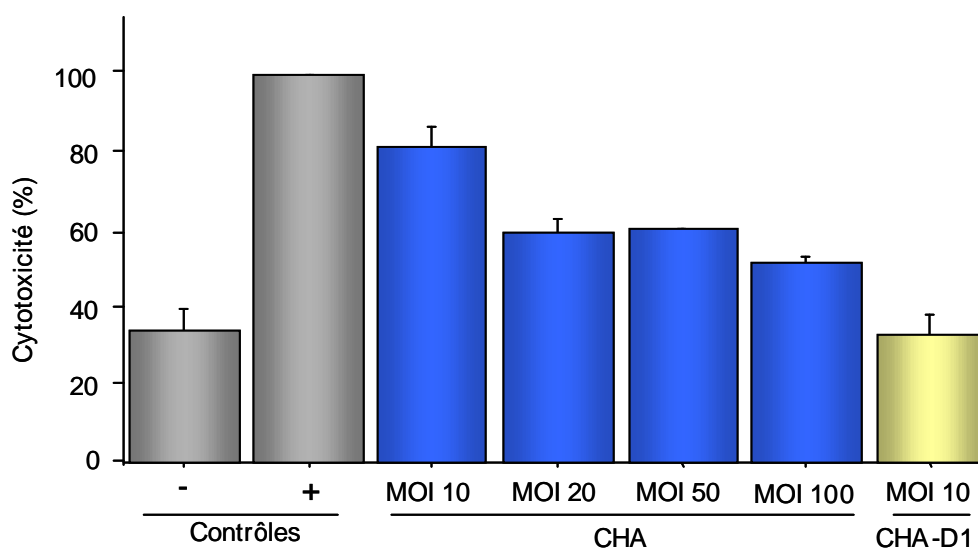


Figure 24 : **Cytotoxicité des souches CHA et CHA-D1 sur  $10^6$  PNNs à différentes multiplicités d'infection (MOI)**. La mort cellulaire est mesurée en fonction du taux de LDH relarguée par les cellules lysées. Les contrôles (-) et (+) correspondent respectivement au taux de mortalité des PNNs sans bactérie et à 100% de lyse après traitement des cellules au triton X100. CHA-D1 est la souche CHA mutée dans le gène *exxA*.

La mort par nécrose des PNNs, induite par la souche CHA, diminue lorsque le nombre de bactéries/PNNs augmente : elle passe ainsi de 82% à une MOI de 10 à



52% à une MOI de 100. Lors de l'infection avec une souche ne produisant plus l'activateur transcriptionnel ExsA (CHA-D1), le pourcentage de PNNs vivants est similaire à celui trouvé lorsque les PNNs ne sont pas en contact avec les bactéries (~70%). Ceci suppose que dans ces conditions, la cytotoxicité de CHA envers ce type de cellules est dépendante du SSTT.

La virulence de la souche CHA, apparemment due au SSTT, diminue donc lorsque le nombre de bactéries augmente.

## **II A-2. Effet du stade de croissance sur l'expression transcriptionnelle du SSTT**

Afin de déterminer si cette réduction de cytotoxicité résultait d'une diminution d'expression des gènes du SSTT, la transcription de l'opéron *exsCEBA*, régulant le SSTT, et du gène de la toxine ExoS a été mesurée. Pour ce faire, les promoteurs pC et pS, correspondant respectivement aux gènes ci-dessus, ont été utilisés pour réaliser des fusions transcriptionnelles avec deux types de rapporteur : le gène codant la GFP ou l'opéron *luxCDABE* permettant la production de bioluminescence. Les fusions avec la GFP sont portées sur les plasmides pApCgfp et pApSgfp. Les fusions avec l'opéron *luxCDABE* ont été placées, en une seule copie, dans le chromosome de la souche CHA au niveau du locus *attB* selon la méthode décrite par Becher (Becher et Schweizer, 2000), donnant les souches CHApC*lux* et CHApS*lux*. Une fusion traductionnelle, entre les 54 premiers acides aminés d'ExoS et la protéine XylE, a également été utilisée. Cette construction a été placée en simple copie sur le chromosome de la souche CHA au niveau du locus du gène *exoS* donnant la souche CHA*exoS*<sub>54</sub>*xylEDR*. Cette fusion se trouve sous le contrôle de pS et permet d'évaluer l'expression d'ExoS en mesurant l'activité catéchol déoxygénase (CDO) portée par la protéine XylE.

Une préculture des souches CHApC*lux* et CHApS*lux* a été diluée à une DO<sub>600</sub> de 0,1 depuis cultivée jusqu'à une DO<sub>600</sub> de 1 puis de nouveau remise à 0,1 de DO<sub>600</sub> en déplétion calcique. Au fur et à mesure de la croissance, la luminescence des bactéries exprimée en RLU (unité de luminescence relative), qui représente l'activation du promoteur pC, a été mesurée et normalisée par rapport à la DO<sub>600</sub> de la culture (figure 25).

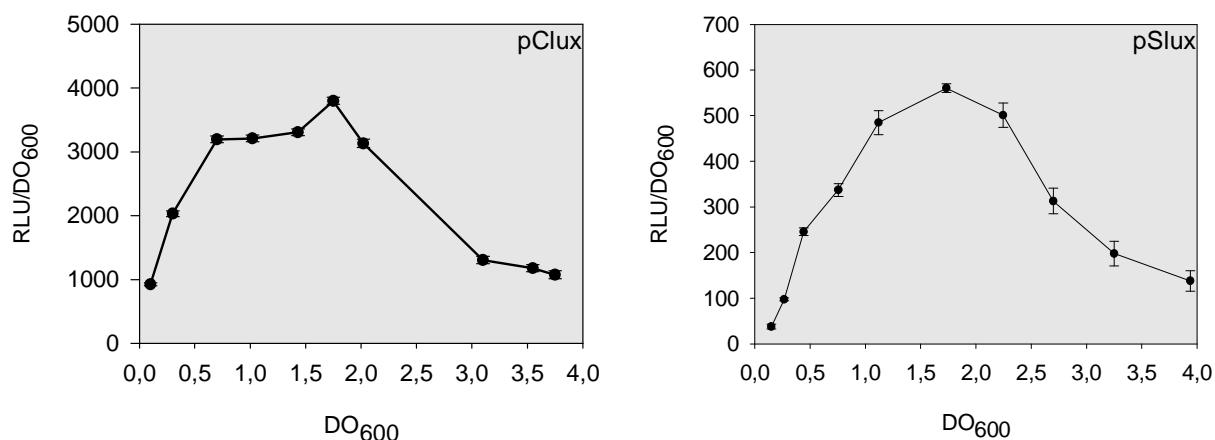


Figure 25 : **Activité du promoteur pC et pS dans les souches CHApClux et CHApSlux, en fonction de la croissance bactérienne lors d'une déplétion calcique.** La luminescence (RLU) des cultures a été mesurée à différents stades de la croissance, représentés par la DO<sub>600</sub>. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

Dans la souche CHApClux, la luminescence augmente au cours de la croissance bactérienne jusqu'à atteindre un pic en fin de phase exponentielle (1,7 de DO<sub>600</sub> ~ 1.10<sup>9</sup> CFU/ml). Ensuite, elle diminue au fur et à mesure que la culture gagne en densité. Au bout de 24 h de culture, la luminescence atteint des niveaux très bas par rapport à celle de départ (~20 RLU/DO<sub>600</sub>). Ceci suggèrent un arrêt précoce (vers 1,5 de DO<sub>600</sub>) de la production de LuxCDABE et donc de l'activité de pC. L'activité du promoteur de la toxine ExoS présente le même profil que celui du promoteur de l'opéron exsCEBA, mais avec des valeurs plus faibles et un retard par rapport à la DO<sub>600</sub>. Donc, la densité cellulaire module aussi l'expression du gène *exoS*, probablement en agissant sur celle de l'opéron *exsCEBA* qui code l'activateur général du SSTT.

Pour confirmer ces résultats, la capacité d'activation des promoteurs pC et pS en déplétion calcique, à différentes phases de croissance, a été déterminée. L'influence du milieu de culture (milieu frais ou ayant servi à la culture) a également été évaluée. Pour cela, la souche CHA contenant le plasmide pIApCgfp ou pIApSgfp a été cultivée à partir d'une DO<sub>600</sub> de 0,1 en l'absence d'induction du SSTT (culture mère).

A différents temps au cours de la croissance, représentés par la  $DO_{600}$ , un aliquot a été prélevé puis traité de trois façons différentes :

- l'échantillon a été conservé comme tel.
- les bactéries ont été centrifugées puis reprises dans du milieu de culture frais tout en conservant la  $DO_{600}$  du prélèvement.
- les bactéries ont été centrifugées puis remises dans du milieu de culture frais à une  $DO_{600}$  de 0.1.

Chaque essai a ensuite été cultivé avec ou sans induction du SSTT par une déplétion calcique. Après 3 heures, les bactéries ont été reprises dans de l'eau distillée à une  $DO_{600}$  de 1 et la fluorescence, représentant l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'opéron *exsCEBA* ou du gène *exoS*, a été mesurée. La valeur de la fluorescence émise est calculée en pourcentage de celle émise par la culture induite à 0,1 de  $DO_{600}$ . Le rapport (fluorescence de la culture induite / fluorescence de la culture non induite) permet de calculer l'induction transcriptionnelle du gène étudié. Les résultats sont présentés sur la figure 26.

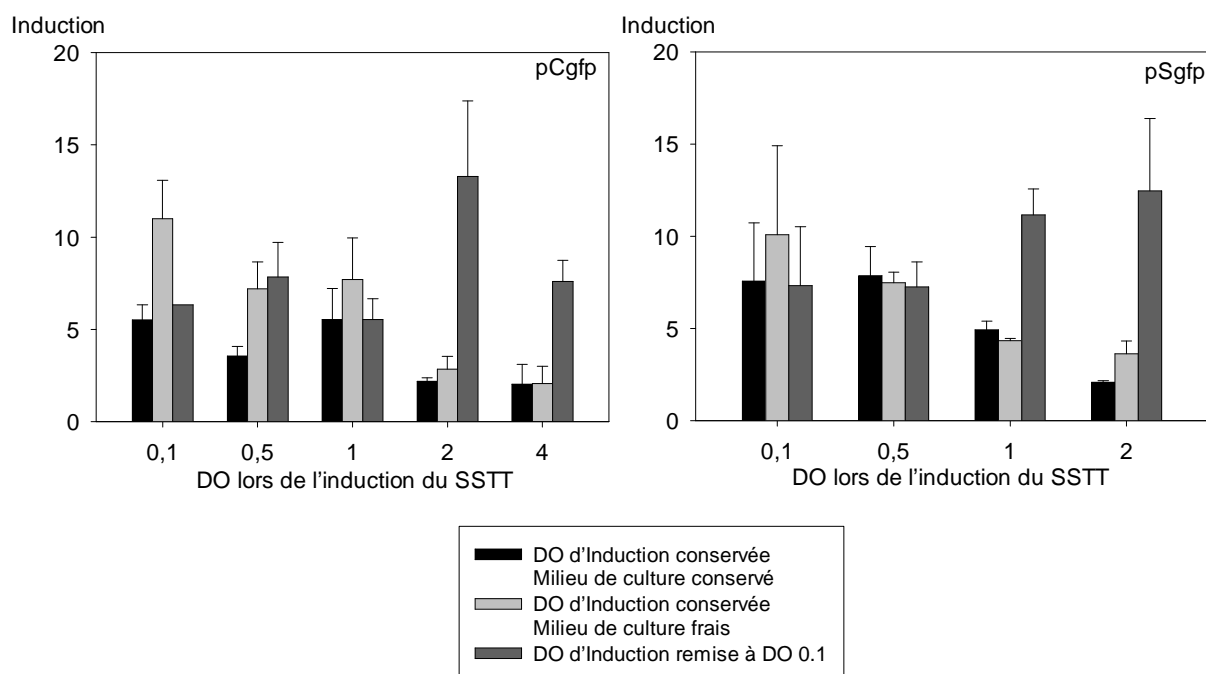


Figure 26 : Induction des promoteurs de l'opéron *exsCEBA* (pC) et du gène *exoS* (pS) en fonction de la densité bactérienne et du milieu chez la souche CHA. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

Comme dans l'expérience précédente, l'expression de l'opéron *exsCEBA*, lors d'une activation du SSTT *in vitro* en LB, est dépendante de la phase de croissance. Les bactéries en fin de phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance montrent une capacité d'activation de l'opéron contrôlant le SSTT moins importante que celles en phase exponentielle de croissance. Les mêmes résultats sont obtenus avec la fusion entre le promoteur de la toxine *exoS* et le gène de la GFP (*pSgfp*). De plus, cette répression n'est pas due à une carence en nutriments puisque l'inhibition du SSTT est conservée lorsque le milieu de la culture en phase stationnaire est remplacé par du milieu LB frais.

L'effet de la densité cellulaire sur l'activité du promoteur *pC*, lors d'une activation du SSTT *in vitro*, a également été testé chez les souches PAOlg et PAO1cyto contenant le plasmide *pIApCgfp*. L'induction de *pC* (fluorescence de la culture induite / fluorescence de la culture non induite), après trois heures de culture en déplétion calcique, est représentée sur la figure 27. Comme pour la souche CHA, l'activation du promoteur *pC* diminue avec l'augmentation de la densité cellulaire.

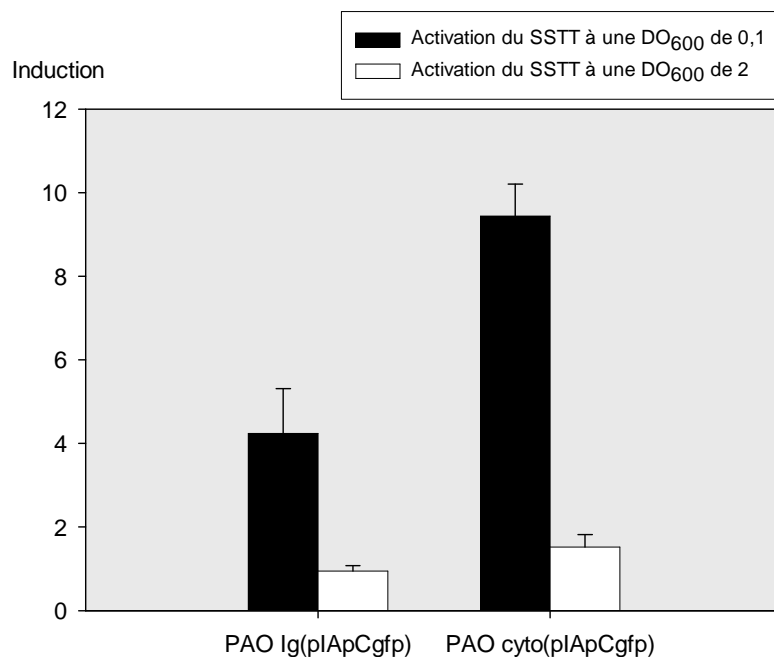


Figure 27 : Induction du promoteur de l'opéron *exsCEBA* à différentes densités cellulaires chez les souche PAOlg(*pIApCgfp*) et PAOcyto(*pIApCgfp*). La densité est représentée par la DO<sub>600</sub> de la culture. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.

Dacheux et al. avaient déjà mis en évidence le rôle de la densité cellulaire dans la cytotoxicité SSTT dépendante de la souche CHA, sur des macrophages (Dacheux et al., 2000). Shouguang et al. ont également montré ce phénomène avec la souche PAK sur des cellules HeLa (Ha et Jin, 2001).

L'ensemble de ces résultats laisse à penser que la répression du SSTT, lorsque les bactéries sont à forte densité cellulaire, ne concerne pas seulement la souche CHA, mais se produit chez la majorité des souches de *P. aeruginosa*.

Le mécanisme contrôlant cette répression du SSTT pourrait être de type quorum sensing puisque ce dernier régule une majorité de facteurs de virulence en fonction de la densité bactérienne. Si tel est le cas, alors *P. aeruginosa* doit produire et sécréter un signal à forte densité cellulaire qui induit la répression du SSTT.

### **II A-3. Effet du surnageant de culture sur l'expression transcriptionnelle du SSTT**

Afin de déterminer si un signal de type quorum sensing est produit et régule l'expression du SSTT, l'activité du promoteur pC dans une culture à faible densité cellulaire a été mesurée en présence de surnageant d'une culture de *P. aeruginosa* à forte densité cellulaire.

Ce surnageant de la souche CHA a été produit en milieu minimum VB selon la méthode décrite dans la partie matériels et méthodes du manuscrit, puis après avoir été lyophilisé, il a été repris dans de l'eau de façon à le concentrer. L'activation transcriptionnelle de l'opéron *exsCEBA* dans la souche CHA<sub>pClux</sub> a été mesurée, *in vitro*, en présence de ce surnageant de la souche CHA concentré 1x par rapport au volume de la culture. La lecture de luminescence a été effectuée à une DO<sub>600</sub> comprise entre 1,6 et 1,8 (figure 28).

L'activation de l'opéron *exsCEBA* par la déplétion calcique est réprimée par ce surnageant issu d'une culture en phase stationnaire de croissance. La même expérience, en présence de milieu VB traité comme s'il s'agissait de surnageant, n'induit pas de répression.

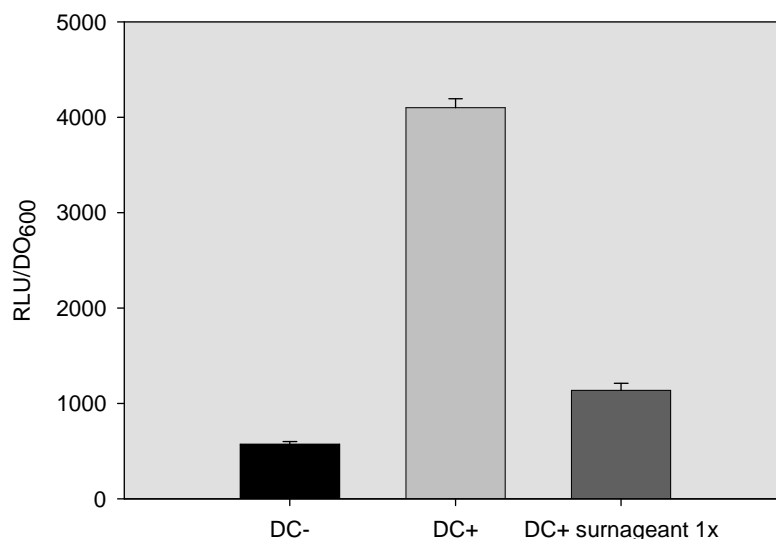


Figure 28 : **Activité du promoteur pC dans la souche CHApClux, en présence de surnageant de la souche CHA en phase stationnaire de croissance.** La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée entre une DO<sub>600</sub> comprise entre 1,6 et 1,8. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. DC-/+ : -/+ déplétion calcique.

La même expérience a été réalisée avec le surnageant de deux autres souches de *P. aeruginosa*, PAO1 et PAOIg. L'activité du promoteur pS ou pC a été visualisée dans la souche CHA<sub>exoS<sub>54</sub>xy/EDR</sub> ou CHA(pIApCgfp), respectivement par mesure de l'activité CDO ou de la fluorescence des bactéries. Ces souches ont été induites jusqu'à une DO<sub>600</sub> de 1,6 en présence ou non du surnageant des cultures à forte densité cellulaire des souches CHA, PAOIg ou PAO1. L'activité CDO ou la fluorescence des bactéries ont été rapportées à la culture induite en l'absence de surnageant, qui représente 100% d'activité (figure 29). Le surnageant des souches PAO1 et PAOIg induit une répression de l'activation de pC ou pS similaire à celui de la souche CHA.

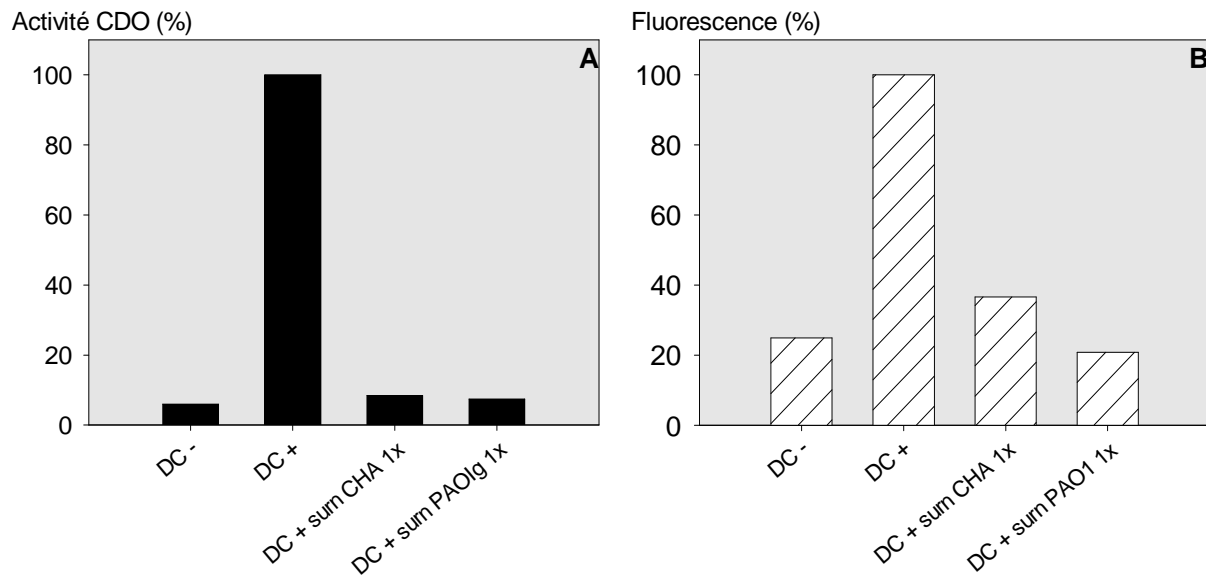


Figure 29 : **Activité des promoteurs pS ou pC lors d'une activation du SSTT, *in vitro*, en présence de surnageant de différentes cultures de *P. aeruginosa* à forte densité cellulaire.** (A) Activité CDO dans la souche CHA<sub>exoS<sub>54</sub>xy</sub>/EDR. (B) Fluorescence de la culture de CHA(pIAPc<sub>gfp</sub>). Le surnageant des souches CHA, PAO1 et PAOIg a été utilisé concentré 1x/ volume final de culture. DC-/+ : -/+ déplétion calcique.

L'effet d'inhibition intervenant au niveau transcriptionnel, nous avons voulu déterminer si l'activité de fixation sur le promoteur de l'opéron *exsCEBA* (pC) était modifiée en présence de surnageant chez les souches CHA et CHA-D1 (ExsA-). Pour cela, la technique de gel retard (EMSA) a été utilisée avec pC en présence d'extraits totaux des cultures des différentes souches. Le SSTT des souches CHA et CHA-D1 a été activé, à partir d'une DO<sub>600</sub> de 0,1, en présence ou en absence de surnageant de la souche CHA à une concentration finale de 2x. Lorsque les cultures ont atteint une DO<sub>600</sub> de 1,5, le cytosol a été extrait et mis en contact avec le fragment pC. L'interaction a été visualisée par chimiluminescence après migration sur gel de polyacrylamide (figure 30).

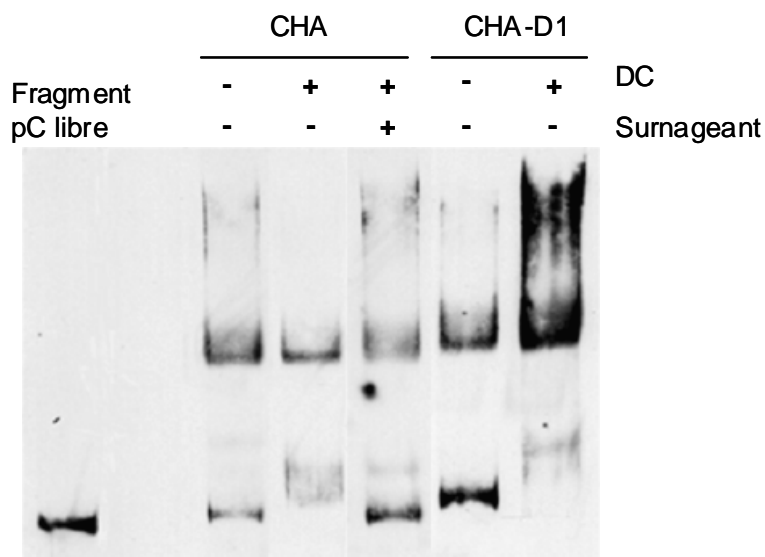


Figure 30 : **Effet du surnageant de la souche CHA à forte densité cellulaire sur la fixation à pC visualisé par EMSA.** Les souches CHA et CHA-D1 ont été cultivées avec ou sans déplétion calcique en présence ou non de surnageant. Les réactions de liaison ADN-protéines ont été réalisées avec 2 ng du fragment pC marqué à la biotine, 1 µg de polydIdC et 2.4 µg d'extraits totaux de cytosol de bactéries. Après 30 min. à 37°C la liaison à l'ADN est analysée par PAGE et révélation ECL. Le surnageant a été utilisé concentré 2x. DC : déplétion calcique.

L'activation du SSTT par une déplétion en calcium induit un retard de migration de pC qui ne dépend pas d'ExsA car on retrouve cette activité de fixation dans le mutant d'inactivation d'*exsA*, CHA-D1. Il existe donc une autre protéine qui fixe le promoteur de l'opéron *exsCEBA* en réponse à une activation *in vitro* du SSTT et qui aurait un rôle d'activateur. Le surnageant agit, directement ou indirectement, sur l'activité de cette protéine puisque la quantité de fragment pC retardé diminue lors de l'essai avec l'extrait d'une culture de CHA induite en présence de surnageant.

L'inhibition du SSTT par le surnageant d'une culture de *P. aeruginosa* à forte densité cellulaire agit donc au niveau transcriptionnel en empêchant la fixation d'une protéine sur le promoteur pC. De plus, cette régulation en fonction de la densité bactérienne est de type quorum sensing puisque les souches CHA, PAOlg, PAO1 et probablement les autres souches de *P. aeruginosa*, se trouvant à densité bactérienne élevée, produisent et sécrètent un signal capable de réprimer l'expression du régulateur ExsA et donc de l'ensemble du SSTT. Nous avons nommé ce signal PARST, pour « Pseudomonas Auto Repressor of Secretion Three ».



## II-B. Rôle du quorum sensing dans la régulation négative du SSTT

### II B-1. Les mutants du quorum sensing

L'un des composants de la régulation par le quorum sensing (QS), RhII, et le facteur sigma RpoS, contrôlé par le QS, ont un rôle d'inhibiteur de l'expression des gènes du SSTT (Bleves *et al.*, 2005; Hogardt *et al.*, 2004). Afin d'investiguer si le PARST est l'un des signaux du quorum sensing connu chez *P. aeruginosa* ou si sa production dépend du QS connu ou de RpoS, nous avons réalisé différents mutants du QS et le mutant du gène *rpoS* dans les souches CHA et CHA*pClux*. Les gènes des enzymes LasI ou RhII, responsables respectivement de la synthèse des autoinducteurs, PAI1 (3-oxo-C12-HSL) et PAI2 (C4-HSL), ont été inactivés par échange allélique couplé à la stratégie *cre-lox*, à l'aide des plasmides pDF1, pDF2 et pCM157, pour obtenir des mutants sans gène de résistance. Des souches doubles mutantes ont aussi été réalisées par délétion des deux gènes *lasI* et *rhII*. Pour le mutant incapable de produire le signal quinolone (PQS), nous avons inactivé l'opéron *phnAB* codant l'antranilate synthase qui est une enzyme impliquée dans la voie de synthèse du PQS (Pesci *et al.*, 1999) en utilisant la même méthode avec les plasmides pDF3 et pCM157. Le génotype de ces souches a été contrôlé par PCR.

Nous avons également vérifié, en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (UBS - Lorient), que les mutants ne produisaient plus PAI1 et/ou PAI2. Le surnageant des cultures, à densité cellulaire élevée, des souches CHA $\Delta$ *lasI*, CHA $\Delta$ *rhII*, et CHA $\Delta$ *lasI* $\Delta$ *rhII* a été produit de la même façon que celui de la souche parentale CHA dans les expériences précédentes, puis analysé par LC-MS-MS (Morin *et al.*, 2003) (tableau 5).

Le signal 3-oxo-C12-HSL n'est pas présent dans le surnageant de la souche CHA $\Delta$ *lasI*, de même que le signal C4-HSL dans celui de la souche CHA $\Delta$ *rhII*. Aucun des deux signaux n'est retrouvé dans le surnageant du double mutant CHA $\Delta$ *lasI* $\Delta$ *rhII*.

Tableau 5 : **Homosérines lactones détectées dans le surnageant de la souche CHA et des ses mutants isogéniques par LC-MS-MS.** Les valeurs sont exprimées en pmole.

|   | C4-HSL | 3-oxo-C12-HSL |
|---|--------|---------------|
| CHA   | 8399   | 29,8          |
| CHA $\Delta$ <i>lasI</i>                      | 4149   | 0             |
| CHA $\Delta$ <i>rhII</i>                      | 0      | 1,6           |
| CHA $\Delta$ <i>lasI</i> $\Delta$ <i>rhII</i> | 0      | 0             |

## II B-2. Profil de sécrétion des mutants du quorum sensing

Après obtention et caractérisation génotypique des mutants, les souches ont été testées pour leur phénotype de sécrétion de type III. Chaque souche a été cultivée en milieu LB, en présence de 5 mM d'EGTA et 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, jusqu'à une DO<sub>600</sub> comprise entre 1,6 et 1,8. Les protéines des surnageants de culture de chaque souche, correspondant à un même nombre de bactéries, ont été précipités au TCA, puis les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie après électrophorèse SDS-PAGE (figure 31).

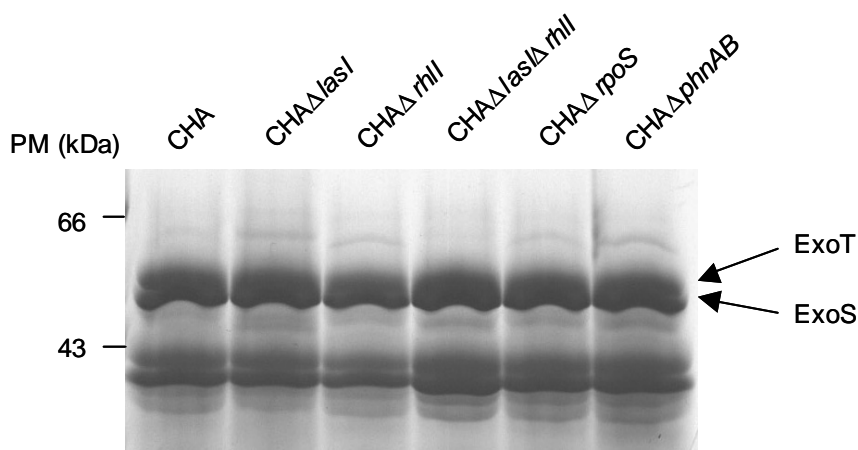


Figure 31 : **Profil de sécrétion de la souche CHA et des mutants isogéniques pour les gènes *lasI*, *rhII*, *lasI* et *rhII*, *phnAB* et *rpoS*, cultivés en déplétion calcique.** Les protéines sécrétées ont été séparées par SDS PAGE et colorées au bleu de Coomassie.

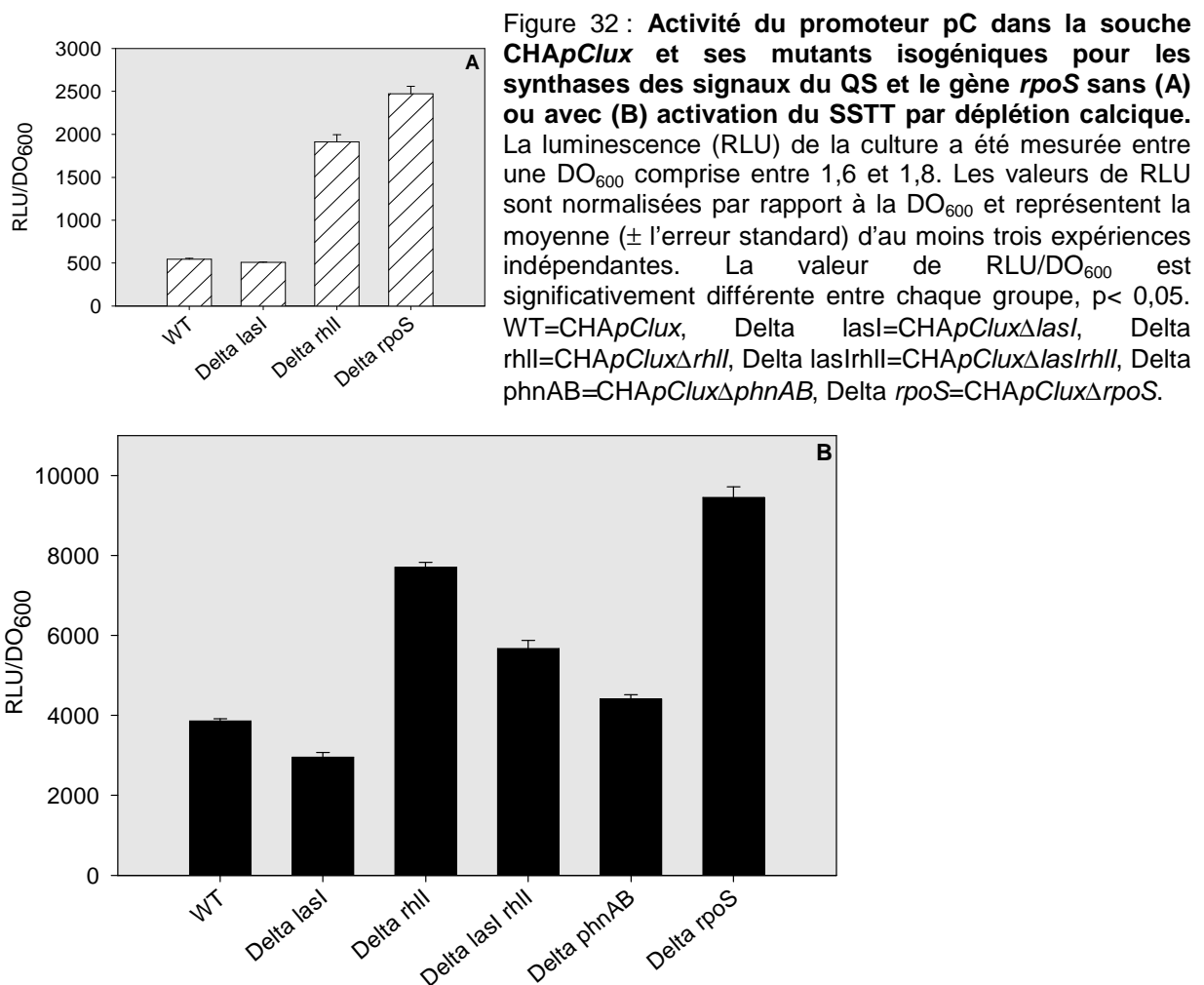
La sécrétion des mutants du QS et du mutant  $CHA\Delta rpoS$  est similaire à celle de la souche parentale CHA. La mutation des gènes codant le facteur transcriptionnel, RpoS ou les enzymes impliquées dans la synthèse des signaux du QS n'a donc pas d'effet sur la sécrétion des toxines du SSTT.

### II B-3. Activité transcriptionnelle des mutants du quorum sensing

Après avoir regardé l'effet du QS sur la sécrétion des toxines du SSTT, le rôle de ce mécanisme de régulation sur l'expression de l'opéron *exsCEBA*, dans les mêmes conditions, a été étudié en utilisant la souche  $CHApClux$  et les souches isogéniques mutées pour les gènes *lasI*, *rhII*, *lasI* et *rhII*, *phnAB* ou *rpoS*. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB, avec ou sans déplétion calcique, jusqu'à une  $DO_{600}$  comprise entre 1,6 et 1,8. La luminescence des cultures a ensuite été mesurée et rapportée à la  $DO_{600}$  (figure 32).

La mutation des gènes *rhII* et *rpoS* entraîne une dérégulation importante de l'activité de pC quelque soit la concentration en calcium. Cette inhibition du SSTT par le produit de ces gènes a déjà été montrée chez les souches PDO100 ( $RhII^-$ ) et SS24 ( $RpoS^-$ ) de *P. aeruginosa* (Bleves *et al.*, 2005; Hogardt *et al.*, 2004). Cependant, dans la souche PDO100, Bleves *et al.* ont montré que la mutation du gène *rhII* n'a pas d'effet sur l'expression d'*exsCEBA* et que la dérégulation sur les autres gènes du SSTT testés n'intervient qu'en déplétion calcique. De plus, dans l'étude d'Hogardt *et al.*, RpoS n'a pas d'effet répressif sur l'expression d'*exoU*. Même si dans ce dernier cas le gène *exoU*, contrôlé par son propre promoteur, provenait d'une autre souche de *P. aeruginosa* que celle utilisée pour l'expérience, il semble que la régulation négative par RpoS et RhII agisse différemment sur les gènes du SSTT selon les souches. Le gène *rpoS* étant activé par le complexe récepteur RhIR/signal C4-HSL produit par la synthase RhII, cette dernière pourrait agir via RpoS pour inhiber le SSTT. De plus, l'absence de site de fixation spécifique de RpoS ou du couple RhIR/C4-HSL sur pC laisse supposer que ces protéines agissent par l'intermédiaire d'une ou d'autres protéines.

Bien que l'augmentation d'activité dans le mutant *CHApCluxΔphnAB* par rapport à la souche parentale soit faible, elle est significative. Il semble donc que le PQS ait un effet inhibiteur sur l'expression de pC. Contrairement au mutant *CHApCluxΔrhII*, le mutant *CHApCluxΔlasI* présente une diminution d'expression à partir de pC par rapport à la souche parentale, positionnant *LasI* comme un activateur. Le contrôle de *rhII* par *lasI* laissait pourtant supposer un phénotype similaire. Cependant, comme le montre les données du tableau 5, *rhII* est encore exprimé dans un mutant *lasI* car il existe une production du signal C4-HSL bien qu'à un niveau plus faible que dans la souche parentale. Cette expression semble suffisante pour réprimer le SSTT. L'action de *LasI* pourrait intervenir à travers le signal C12-HSL, qui est capable d'entrer en compétition avec le signal C4-HSL pour sa liaison au récepteur RhIR et de former un complexe inactif. Le phénotype du double mutant  $\Delta lasI \Delta rhII$  présente une dérépression de pC, intermédiaire entre celle des deux simples mutants. L'effet répresseur de *rhII* sur pC a donc un poids plus important que l'activation par *lasI*.



## **II B-4. Effet de la densité cellulaire sur l'expression transcriptionnelle du SSTT chez les mutants du quorum sensing**

Ensuite, nous avons déterminé si chez ces mutants du quorum sensing comme chez la souche parentale CHA, l'expression du SSTT est dépendante de la densité cellulaire. Pour cela, l'activité du promoteur pC a été suivie au cours de la croissance au moyen de la construction rapportrice pC*lux*. Les différents mutants ont été cultivés en déplétion calcique (figure 33).

Comme pour la souche parentale, l'activité du promoteur pC chez toutes les souches mutées augmente au cours de la croissance jusqu'à une  $DO_{600}$  comprise entre 1,6 et 1,8, puis diminue progressivement. Chez les mutants CHAp*Clux* $\Delta$ *rhII* et CHAp*Clux* $\Delta$ *lasI* $\Delta$ *rhII*, on retrouve la dérégulation du SSTT par rapport à la souche parentale, quel que soit le stade de croissance. On constate également que l'inhibition de l'activité de pC n'est pas aussi importante que celle observée chez la souche CHAp*Clux*, en particulier pour la souche CHAp*Clux* $\Delta$ *lasI*. Ceci peut être dû à la surexpression de l'opéron *exsCEBA* dans ces mutants qui diminue l'effet d'inhibition à densité cellulaire élevée. La synthèse de l'inhibiteur ou de son récepteur (s'il y en a un) peut également être dépendante d'une protéine dont l'expression est diminuée dans ces mutants. Cette seconde hypothèse est plus vraisemblable pour expliquer les résultats obtenus avec la souche délétée pour le gène *lasI* car le produit de ce gène a plutôt un effet d'activation sur l'activité de pC. En effet, quel que soit le stade de croissance, le niveau de luminescence de la souche CHAp*Clux* $\Delta$ *lasI* est inférieur à celui de la souche parentale.

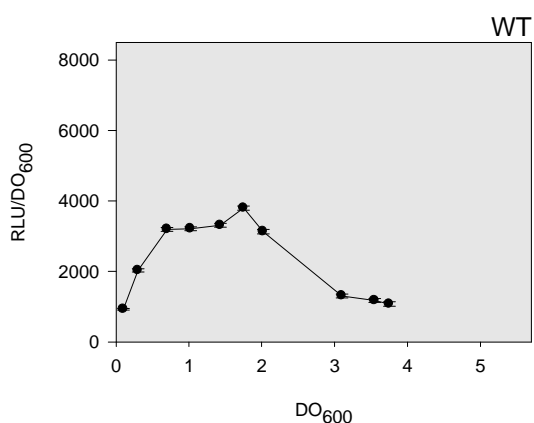
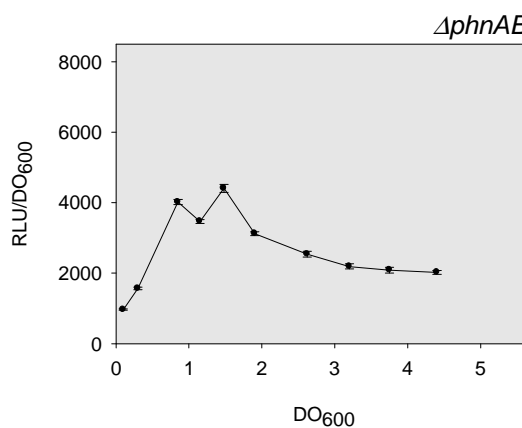
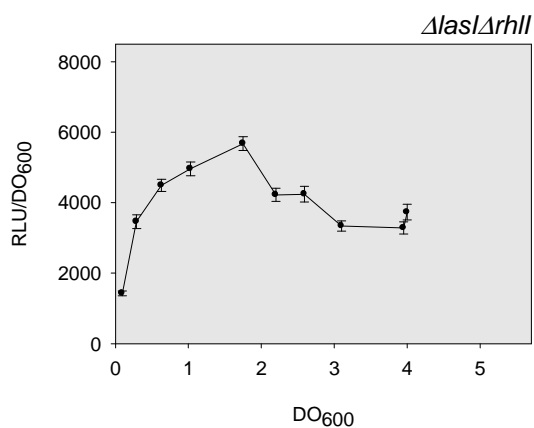
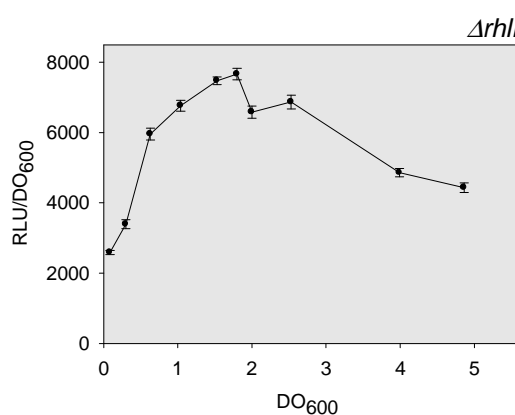
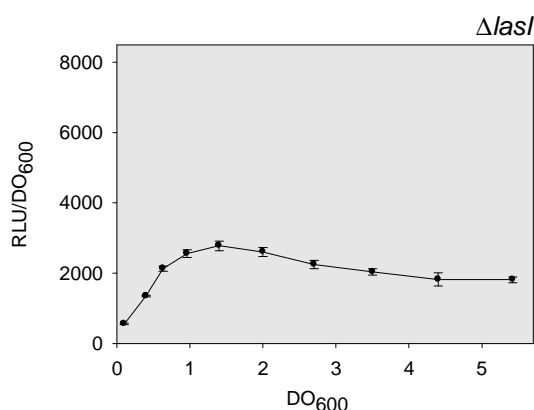


Figure 33 : Effet de la densité bactérienne sur l'activité du promoteur pC chez CHA et les souches mutantes du QS lors d'une déplétion calcique.

WT : CHApClux,  $\Delta lasI$  : CHApClux $\Delta lasI$ ,  $\Delta rhII$  : CHApClux $\Delta rhII$ ,  $\Delta lasI\Delta rhII$  : CHApClux $\Delta lasI\Delta rhII$ ,  $\Delta phnAB$  : CHApClux $\Delta phnAB$ . La luminescence (RLU) des cultures, utilisée pour mesurer l'activité de pC, a été mesurée à différentes densités bactériennes, représentées par la DO<sub>600</sub>. Les valeurs sont rapportées à la DO<sub>600</sub> et représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes.



Ces expériences mettent en évidence que l'expression de l'opéron *exsCEBA* à partir de pC et probablement celle de tous les gènes du SSTT, est dépendante de la densité cellulaire chez la souche CHA et que ce mécanisme est conservé chez les mutants incapables de synthétiser un ou des signaux du quorum sensing. Elles confirment également le rôle répresseur de RhII dans l'expression transcriptionnelle du SSTT, démontré auparavant dans d'autres souches de *P. aeruginosa*. Elles

montrent aussi que LasI semble avoir un effet activateur sur le SSTT. De plus, cette protéine semble prendre part à la réponse à l'inhibition du SSTT à forte densité cellulaire. Cependant, LasI et RhlI ne semblent pas directement impliquées dans la voie de régulation, densité dépendante, du SSTT puisqu'elle est toujours active chez ces mutants.

#### **II B-5. Effet de la densité cellulaire et du PARST sur le mutant *CHAΔrpoS***

L'effet de la densité cellulaire sur la souche *CHAΔrpoS* a également été étudié en utilisant le plasmide pIApCgfp. Tout d'abord, nous avons déterminé la capacité d'induction de pC au cours de la croissance (induction = niveau d'activité de pC avec déplétion calcique/ niveau d'activité sans déplétion calcique). Pour cela, des aliquots ont été régulièrement prélevés au cours de la culture puis soumis ou non à une déplétion calcique et la fluorescence a été mesurée (figure 34A).

Lorsque la densité cellulaire augmente l'induction de pC diminue jusqu'à devenir égale à 1. La fluorescence dans les bactéries non activées étant faible et stable au cours de la croissance cela signifie que le niveau d'activité de pC dans les cellules activées a diminué avec l'augmentation de la densité cellulaire.

Nous avons également déterminé l'effet du PARST sur le mutant *CHApC*lux*ΔrpoS*. Pour cela, cette souche a été cultivée avec ou sans surnageant de la souche *CHA* à densité cellulaire élevée. L'activité du promoteur pC dans une culture en déplétion calcique a été mesurée par luminescence (figure 34B).

Bien que l'activité de pC soit déréprimée dans la souche mutée pour le gène *rpoS*, le surnageant a toujours un effet inhibiteur sur l'activité de pC qui est du même ordre de grandeur que celui observé dans la souche *CHApC*lux**.

Une souche mutée pour le gène *rpoS* est donc toujours sensible à l'augmentation de la densité cellulaire et répond toujours au surnageant de la souche *CHA* par l'inhibition de pC. Bien que RpoS soit un inhibiteur du SSTT, il semble donc qu'il n'intervienne pas directement dans la répression du SSTT par le PARST.

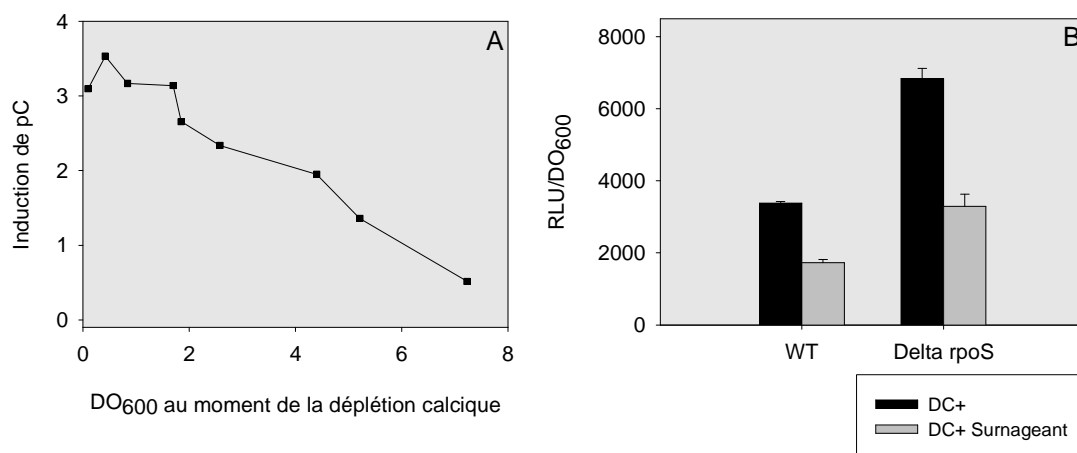


Figure 34 : **Rôle de RpoS dans la régulation du SSTT par le PARST.** (A) Induction du promoteur pC dans la souche  $CHA\Delta rpoS(pIApCgfp)$ . L'induction correspond au rapport de fluorescence de la culture activée/culture non activée. (B) Activité du promoteur pC dans les souches  $CHApClux$  (WT) et  $CHApClux\Delta rpoS$  (Delta rpoS) en déplétion calcique, avec ou sans surnageant de la souche CHA. Le surnageant a été utilisé concentré 1x/volume final de culture. La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée entre une  $DO_{600}$  comprise entre 1,6 et 1,8. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la  $DO_{600}$  et valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. DC+ : déplétion calcique.

## II B-6. Production du PARST par les mutants du quorum sensing.

Si l'expression du SSTT est toujours dépendante de la densité cellulaire chez les mutants du QS et le mutant  $CHA\Delta rpoS$ , alors ces souches doivent être capables de synthétiser et de sécréter le signal inhibiteur (PARST) mis en évidence précédemment dans le surnageant de culture de la souche CHA à densité cellulaire élevée. Un tel surnageant a donc été produit à partir des différentes cultures des mutants  $CHA\Delta rpoS$ ,  $CHA\Delta lasI$ ,  $CHA\Delta rhII$ ,  $CHA\Delta lasI\Delta rhII$ ,  $CHA\Delta phnAB$ . Le SSTT de la souche  $CHApClux$  a ensuite été induit en présence de ce surnageant et la luminescence de la culture, témoin de l'activité du promoteur pC, a été mesurée (figure 35).

Tous les surnageants induisent une inhibition de l'activité de pC. La répression exercée par le surnageant des mutants des signaux 3-oxo-C12-HSL et/ou C4-HSL est cependant moins importante que celle induite par le surnageant de la souche



CHA, ce qui pourrait expliquer pourquoi la répression du SSTT dans ces mutants, à densité cellulaire élevée, est moins rapide que dans la souche parentale.

Il n'en reste pas moins que tous les mutants sont capables de produire et de sécréter le signal inhibiteur, appelé PARST. L'absence des signaux du quorum sensing dans le surnageant de ces souches (tableau 5), en particulier celui du double mutant  $CHA\Delta lasI\Delta rhII$ , et la conservation de l'activité d'inhibition du SSTT montrent que le PARST n'est pas l'un des autoinducteurs connus du QS chez *P. aeruginosa* (3-oxo-C12-HSL, C4-HSL et PQS). De plus, ni les enzymes responsables de la synthèse de ces autoinducteurs ni le facteur sigma RpoS n'interviennent dans la production du PARST.

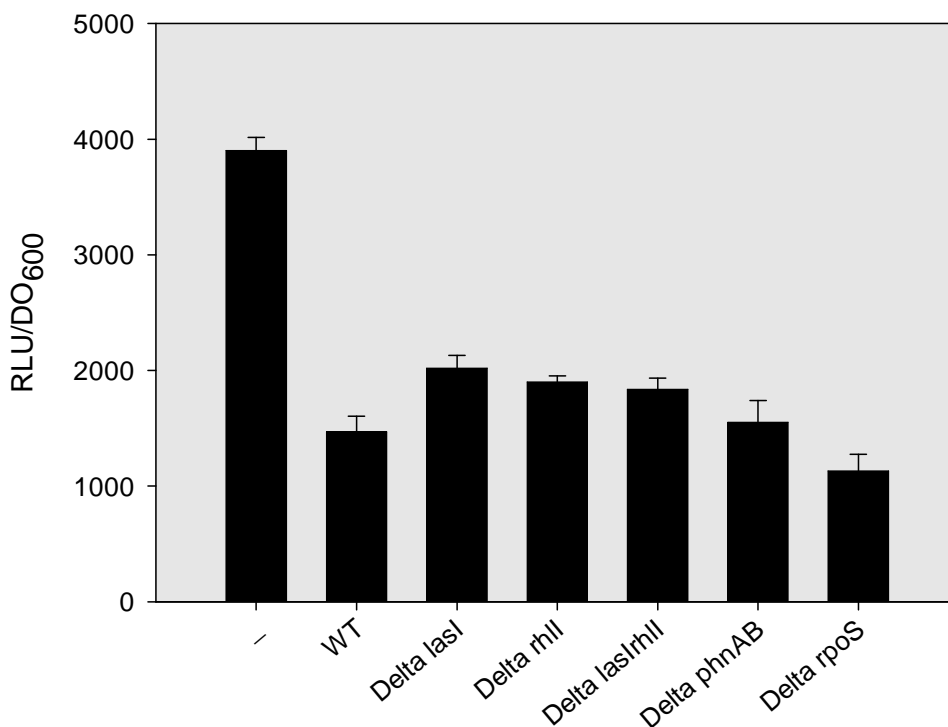


Figure 35 : **Activité du promoteur pC lors d'une déplétion calcique dans la souche CHApClux, en présence de surnageant de culture de CHA et des mutants du QS à densité cellulaire élevée.** La luminescence (RLU) de la culture a été mesurée entre une DO<sub>600</sub> comprise entre 1,5 et 1,8. Les valeurs de RLU sont normalisées par rapport à la DO<sub>600</sub> et représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard) d'au moins trois expériences indépendantes. Le surnageant a été utilisé concentré 1x/volume final de culture. La souche dont est issu le surnageant est indiquée en abscisse : « \_ » = aucun surnageant, WT=CHA, Delta lasI=CHA $\Delta$ lasI, Delta rhII=CHA $\Delta$ rhII, Delta lasIrhII=CHA $\Delta$ lasIrhII, Delta phnAB=CHA $\Delta$ phnAB, Delta rpoS=CHA $\Delta$ rpoS.

## II-C. Caractérisation du PARST

Dans le but de caractériser le PARST, un surnageant de CHA contenant l'inhibiteur a subi différents traitements physiques : UV durant 30 minutes ou une exposition à la chaleur et à la pression avec 20 min à 120°C sous 2 bars. Nous avons également essayé un traitement biochimique en utilisant de la trypsine (100 µg/ml de surnageant) pendant 15 min. L'inhibiteur de cette protéase a ensuite été ajouté au surnageant. L'activité de la trypsine a été testée positive dans le surnageant.

L'effet inhibiteur de ces différents surnageants a ensuite été évalué sur la souche *CHAexoS<sub>54</sub>xy/EDR* en déplétion calcique par mesure de l'activité CDO (figure 36).

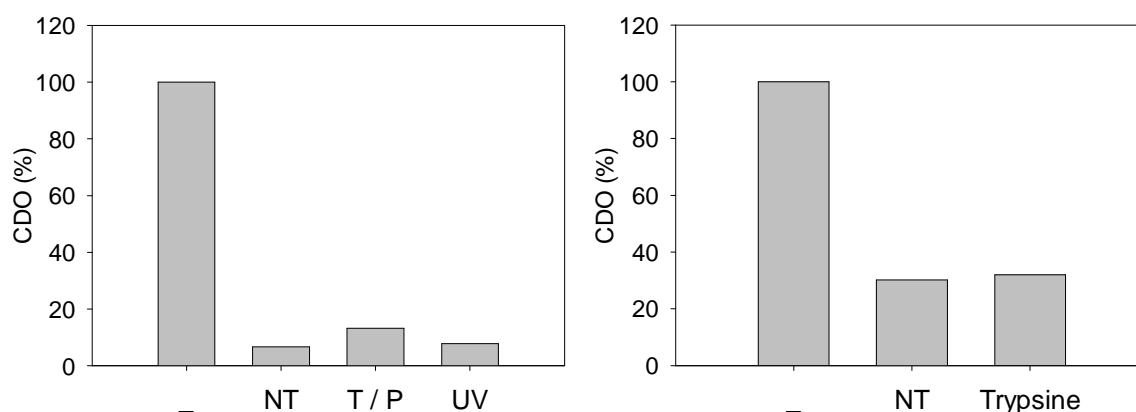


Figure 36 : **Effet de traitements physiques et biochimiques sur l'inhibition du SSTT par le surnageant chez la souche *CHAexoS<sub>54</sub>xy/EDR* en déplétion calcique.** L'activité CDO a été mesurée sur  $5.10^7$  bactéries. La valeur dans la souche sans surnageant représente le 100% d'activité. (-) : pas de surnageant, NT : surnageant non traité, T/P : surnageant traité par la température (120°C) et la pression (2 bar) durant 20 min, UV : surnageant traité par les UV durant 30 min, Trypsine : surnageant traité avec 100 µg de trypsine/ml de surnageant durant 15 min.

Quel que soit le traitement effectué, le surnageant induit une inhibition de l'expression de la fusion traductionnelle ExoS-XylE similaire à celle provoquée par le surnageant non traité. Deux surnageants avec des activités inhibitrices différentes ont été utilisés pour réaliser les traitements physiques et biochimiques. D'après ces résultats préliminaires, le PARST semble être composé d'une ou de plusieurs molécules résistantes aux UV, et à des températures et pressions auxquelles les bactéries sont détruites. Le PARST est également résistant à l'action de la trypsine. Il

ne s'agit donc pas d'un peptide contenant des lysines ou des arginines en liaison carboxy-terminale avec d'autres acides aminés.

De premiers essais de purification ont également été réalisés selon le protocole décrit dans la partie "matériels et méthodes". Les fractions de surnageant issues de l'extraction à l'acétate d'éthyle acidifié ont été testées sur la souche CHA(pIApCgfp) pour déterminer leur activité d'inhibition de pC (figure 37). L'extraction à l'acétate d'éthyle acidifié est basée sur celle réalisée pour l'extraction des acyl-HSLs et du PQS. L'inhibition de l'activité du promoteur pC dans une culture en déplétion calcique est induite par la phase aqueuse de cette extraction. Aucun effet inhibiteur de la phase organique n'est constaté. Ces résultats apportent un élément de plus en défaveur de l'action des acyl-HSLs et du PQS dans le phénomène observé, puisque ces signaux du QS sont classiquement récupérés dans la phase organique lors d'une extraction à l'acétate d'éthyle acidifié d'un surnageant.

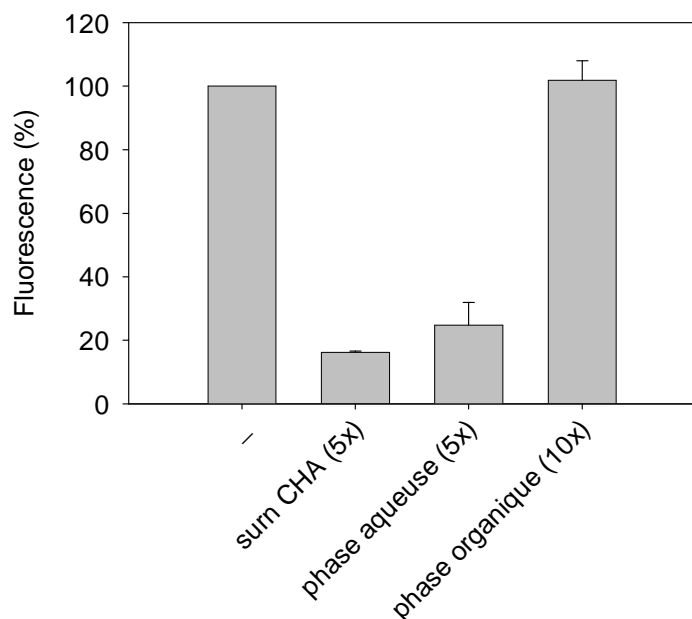


Figure 37 : **Activité du promoteur pC dans la souche CHA(pIApCgfp) en présence d'extrait de surnageant de la souche CHA.** L'activité de pC mesurée par fluorescence est rapporté par rapport à l'activité dans la souche cultivée sans surnageant. (-) : pas de surnageant, surn CHA : surnageant non extrait de la souche CHA, phase aqueuse ou organique : phase aqueuse ou organique de l'extraction à l'acétate d'éthyle acidifié du surnageant de la souche CHA. (5x) et (10x) sont les concentrations relatives des extraits par rapport au volume de la culture. Les valeurs représentent la moyenne ( $\pm$  l'erreur standard).

## II-D. Autres partenaires de la régulation du SSTT

### II D-1. La protéine CysB

Lors d'une recherche des partenaires de la toxine ExoS ou de sa possible chaperonne Orf1, une interaction spécifique entre ces protéines et la protéine CysB a été mise en évidence (Thèse L. Quénée, 2004, UJF). CysB est une enzyme du métabolisme soufré qui chez la souche CHA est également impliquée dans l'acquisition du phénotype mucoïde en agissant comme facteur de transcription positif sur le promoteur du gène *algD* (Delic-Attree *et al.*, 1997). Ce gène code l'enzyme clé de la synthèse de l'alginate et il est impliqué dans l'acquisition du phénotype mucoïde et de la croissance en biofilm. Les précédentes expériences de sécrétion par le SSTT, avec un mutant  $CHA\Delta cysB$ , ont montré un effet inhibiteur de la protéine CysB sur la production et/ou la sécrétion des toxines de type III. Les deux fonctions de cette protéine font du gène *cysB* un candidat intéressant qui pourrait intervenir dans la régulation transcriptionnelle du SSTT par le PARST.

Afin de préciser le rôle du gène *cysB* au niveau de la transcription du SSTT et son implication possible dans la signalisation via le PARST, le plasmide rapporteur pIApCgfp a été introduit dans la souche  $CHA\Delta cysB$ . L'activité de pC a ensuite été mesurée dans les cultures avec ou sans surnageant de la souche CHA (figure 38).

La souche parentale CHA, cultivée en condition de déplétion calcique sert de référence et l'activité de pC dans cette souche est associée avec 100% de fluorescence, c'est à dire 100% d'expression du régulateur *exsA*. Dans la souche mutée pour le gène *cysB*, en l'absence de surnageant, on observe une fluorescence deux fois plus importante que celle que soit la concentration en calcium du milieu. De plus, le surnageant a un effet inhibiteur sur l'expression de pC dans le mutant  $CHA\Delta cysB$  mais dans une moindre mesure par rapport à la souche parentale. Cette différence dans la répression de l'expression du SSTT peut être due à la surexpression du régulateur *ExsA* à partir de pC qui contre le mécanisme inhibiteur.

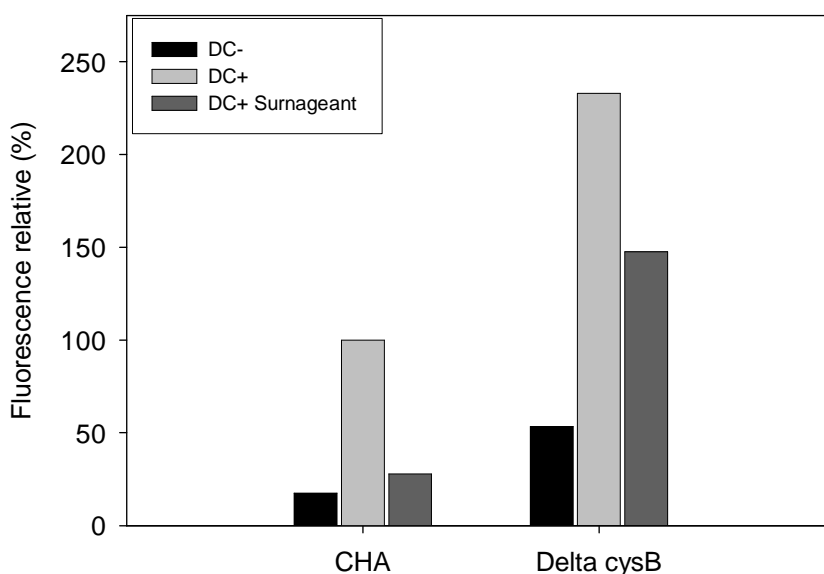


Figure 38 : **Activité du promoteur pC chez les souches CHA et CHA $\Delta$ cysB (Delta cysB).** La souche CHA en condition de déplétion calcique sert de référence pour établir le niveau 100% de fluorescence. La fluorescence des autres souches est exprimée en fluorescence relative par rapport à la souche CHA. DC -/+ : culture sans ou avec déplétion calcique, DC+ surnageant : culture avec déplétion calcique en présence de surnageant d'une culture de la souche CHA à forte densité cellulaire (concentré 1x).

Ces résultats suggèrent que CysB est un régulateur transcriptionnel négatif de l'expression du SSTT dans la souche CHA, indépendamment de la déplétion calcique et qu'il n'intervient pas dans la réponse au PARST pour la répression du SSTT.

## II D-2. La région pA

Dans cette étude visant à mieux comprendre la régulation du SSTT et en particulier le contrôle de l'expression de l'activateur ExsA à partir de l'opéron *exsCEBA*, nous nous sommes intéressés à la région comprise entre les gènes *exsB* et *exsA*, que nous avons nommé pA. Ce fragment compte 297 bases et pourrait être un site de fixation potentiel pour des régulateurs influençant soit la transcription soit la traduction d'*exsA*. Pour étudier le rôle de cette région pA dans l'expression d'*exsA*, deux types de mutants ont été réalisés dans la souche CHA par échange allélique combiné au système *cre-lox*. Un mutant délété de pA dans lequel la séquence de liaison au ribosome (RBS) devant *exsA* a été conservée et un autre où cette

séquence est manquante. Ces mutants ont été respectivement nommés  $CHA\Delta pAsdel$  et  $CHA\Delta pA$ . Le plasmide  $pApCgfp$  a ensuite été introduit dans ces souches pour mesurer par fluorescence l'expression d'*exsA* (figure 39). Le mutant sans la séquence RBS est incapable de synthétiser le régulateur ExsA et nous a permis de définir la fluorescence de base exprimée à partir du plasmide  $pApCgfp$ .

La mutation de la zone pA dans le mutant  $CHA\Delta pAsdel$  entraîne une diminution de plus de dix fois de l'expression d'*exsA* quelque soit la concentration en calcium. Mais contrairement à la souche  $CHA\Delta pA$ , cette souche conserve la capacité d'activation de l'expression d'*exsA* puisque le niveau de fluorescence est augmenté d'un facteur similaire à celui de la souche parentale (~4) lors d'une déplétion calcique. Ce résultat suggère que la zone pA joue un rôle important quant au niveau d'expression d'ExsA mais pas dans l'activation du gène codant ce régulateur. Cette région pourrait avoir un rôle post-transcriptionnel dans la conformation de l'ARN en assurant une meilleure stabilité ou être une zone où interagissent des régulateurs de la traduction.

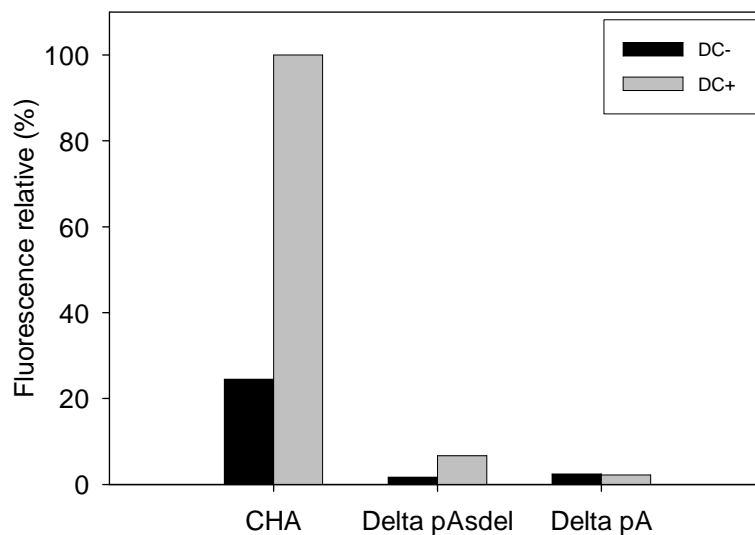


Figure 39 : **Activité du promoteur pC chez les souches CHA, et  $CHA\Delta pAsdel$  (Delta pAsdel) et  $CHA\Delta pA$  (Delta pA).** La souche CHA en condition de déplétion calcique sert de référence pour établir le niveau 100% de fluorescence. La fluorescence des autres souches est exprimée en fluorescence relative par rapport à la souche CHA. DC +/- : culture sans ou avec déplétion calcique.

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**





Le Système de Sécrétion de Type III de *P.aeruginosa* est un système de virulence extrêmement performant notamment grâce à la finesse de sa régulation. Il permet à la bactérie d'échapper aux cellules immunitaires et en particulier à l'action bactéricide des PNNs et des macrophages, en injectant des effecteurs toxiques directement dans le cytoplasme de ces cellules. Cette capacité fait de ce facteur de virulence l'un des éléments clés, avec la formation du biofilm, du processus de colonisation d'un organisme par *P. aeruginosa* puis de sa propagation au sein de cet hôte. C'est notamment le cas lors du développement d'infections pulmonaires chroniques, en particulier chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Déterminer le fonctionnement du SSTT au sein des poumons est un des enjeux majeurs dans la recherche de nouvelles thérapies ciblant ce facteur de virulence.

### **Les différents phénotypes du SSTT au sein des poumons : mutation ou épigénèse ?**

La compréhension du fonctionnement du SSTT dans les poumons nous a d'abord conduit à étudier le mécanisme sous-jacent à la diversité de phénotype du SSTT rencontrée dans des isolats cliniques issus de patients atteints de mucoviscidose. Comme, l'ont montré différentes études, les bactéries isolées en début d'infection présente majoritairement un SSTT inductible (par un contact cellulaire ou une déplétion du milieu en calcium) et au fur et à mesure que l'infection persiste la proportion de souches non inductibles augmente.

Ce changement de phénotype peut être dû à une mutation dans le réseau de régulation contrôlant l'expression du gène *exsA* ou dans *exsA* lui-même. Le SSTT, coûteux en énergie, n'est vraisemblablement pas utile aux bactéries lorsqu'elles se développent sous forme de biofilm. Une ou des mutations, inactivant l'expression du SSTT, faciliteraient donc la sélection de ces mutants lors de la persistance de l'infection.

Au regard de ces deux états possibles du SSTT et à la présence d'une boucle de rétroaction positive au niveau du régulateur ExsA, nous avons émis l'hypothèse

qu'un phénomène d'épigénèse pouvait également être la raison de cette dualité de phénotype pour l'inductibilité du SSTT.

Après avoir défini le modèle minimal de régulation nécessaire pour étudier cette hypothèse, les dynamiques possibles de ce modèle ont été analysées par bioinformatique en utilisant le logiciel SmbioNet. Cette méthode a permis de montrer que deux des dynamiques du modèle présentaient deux états stables pouvant correspondre aux deux états observés pour le SSTT. Elle nous a également permis de définir l'expérience pour valider l'hypothèse d'une acquisition d'un phénotype inductible par modification épigénétique : partir d'un état non inductible, élever transitoirement le niveau du régulateur responsable de la boucle de rétroaction positive et observer si le système acquiert de façon stable le second phénotype. Ainsi, à l'aide d'une construction plasmidique, nous avons montré qu'une augmentation transitoire du régulateur ExsA dans la souche PAO1 non inductible permet de rétablir de façon stable un SSTT inductible, c'est-à-dire, une sécrétion de toxines ExoS et ExoT lors d'une déplétion calcique et une augmentation de cytotoxicité dépendante du SSTT en modèle animal.

Ces expériences, suggérées par la modélisation et l'analyse de la régulation du SSTT assistées par ordinateur, apportent pour la première fois la preuve qu'une modification épigénétique peut commander la capacité du SSTT à répondre à des signaux de l'environnement et qu'elle peut être responsable de la cytotoxicité *in vivo*. De plus l'hypothèse d'une acquisition d'un SSTT inductible par modification épigénétique étant vérifiée, la bascule inverse (de l'état inductible vers l'état non inductible), doit également être possible. On peut donc supposer qu'au sein des poumons, une ou des conditions environnementales induisent, chez certaines bactéries, une bascule du SSTT vers un état non inductible lors du développement des bactéries en biofilm. Cet état étant transmis sur plusieurs générations sans modification du génotype, ceci expliquerait l'accumulation de bactéries non inductibles au cours de l'infection des poumons et une possible rebasculé du phénotype lors de la sortie du biofilm.

Bien que l'hypothèse épigénétique pour l'inductibilité du SSTT soit vraie, ce n'est pas nécessairement le cas pour les autres systèmes de virulence de *P. aeruginosa* ou d'autres bactéries pour lesquels on a observé de multiples états et mis en évidence la présence d'une boucle de rétroaction positive, pré requis pour un phénomène

d'épigénèse. Dans chaque cas, il est nécessaire de modéliser le système, d'en étudier les dynamiques possibles et de vérifier si certaines correspondent à l'hypothèse d'épigénèse.

## **Le PARST : un nouveau signal de type quorum sensing**

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons cherché à comprendre les événements menant à la répression du SSTT lorsque les bactéries se développent en biofilm. Pour ce faire, nous avons étudié l'expression des gènes du SSTT lors de l'accroissement de la densité cellulaire qui est une étape dans la formation du biofilm (figure 1).

Nous avons pu mettre en évidence que le SSTT est régulé en fonction de la densité cellulaire chez la souche CHA et chez deux souches de PAO. Ainsi, l'expression du régulateur ExsA augmente dans une culture à faible densité cellulaire jusqu'à atteindre un pic puis son expression diminue progressivement avec l'augmentation de la densité cellulaire. Cette diminution est due à une répression de l'opéron *exsCEBA* à forte densité cellulaire par un mécanisme de type quorum sensing. En effet, nous avons montré que la souche CHA, à densité cellulaire élevée, est capable de produire et de sécréter un signal, que nous avons nommé PARST (Pseudomonas auto-repressor of secretion III). Le PARST est capable d'inhiber l'activation du gène *exsA* chez la souche CHA en phase exponentielle de croissance. Cette répression passe par l'inhibition de la fixation d'une protéine sur le promoteur de l'opéron *exsCEBA*, pC. Cette protéine, qui n'est pas ExsA, a été nommée BPC2. (Binding pC 2). La réalisation de gel retard avec du lysat de bactéries, suivie d'une analyse par MALDI-TOF des fractions capables de lier pC pourrait permettre l'identification de BPC2.

L'action du PARST sur ce nouvel activateur du SSTT, peut être directe, par une interaction de BPC2 avec le PARST qui induirait une conformation impropre à la fixation sur le promoteur pC. Elle peut aussi être indirecte, en impliquant une autre protéine, activée par le PARST ou la cascade de transduction induite par le PARST, qui piègerait ou dégraderait BPC2. Il a déjà été montré que des inhibiteurs du SSTT, chez *E. coli* (RpoS) et chez *Yersinia* (YmoA) sont dégradés par les protéases ClpXP

(*E. coli* et *Yersinia*) et Lon (*Yersinia*). La modification de leur expression ou de leur activité par la température ou au cours de la croissance module l'activité du gène du régulateur principal du SSTT chez ces bactéries (Iyoda et Watanabe, 2005; Jackson, Silva-Herzog, et Plano, 2004). Ce type de dégradation régulant l'expression du SSTT n'a pas été mis en évidence chez *P. aeruginosa*. Cependant, Venturi *et al.* ont montré dans une souche de *P. putida* que ClpXP dégradait plus rapidement RpoS (Bertani *et al.*, 2003) à faible densité cellulaire. A l'inverse, chez *P. aeruginosa* le substrat des ces enzymes pourrait être un activateur (BPC2 ?). Déterminer l'activation d'*exsA* et la quantité de RpoS dans mutant ClpXP chez *P. aeruginosa*, avec ou sans PARST, permettrait d'apporter une réponse à cette question. Ce ne serait pas le premier mécanisme de régulation qui soit inversé chez *P. aeruginosa* par rapport aux autres bactéries à Gram négatif. En effet, l'effet du quorum sensing sur l'expression du SSTT a déjà été mis en évidence chez une souche d'*E. coli* entéropathogène (Sperandio *et al.*, 1999). Mais chez cette bactérie, ce système de régulation active le SSTT alors que chez *P. aeruginosa*, le PARST et le quorum sensing, via le signal C4-HSL produit par RhII, répriment l'expression du SSTT.

Afin de rechercher la nature du signal PARST, nous avons muté les voies de synthèse des signaux connus du quorum sensing en éliminant les gènes des protéines LasI, RhII et PhnAB. Le facteur sigma RpoS, sous le contrôle du quorum sensing, ayant également un rôle inhibiteur sur le SSTT dans d'autres souches de *P. aeruginosa* que celle que nous utilisons, nous avons également inactivé le gène *rpoS*. Grâce à ces différents mutants nous avons montré que LasI est un activateur du SSTT et confirmé que RhII et RpoS ont un rôle inhibiteur sur le SSTT dans la souche CHA. Cette répression intervient sur l'expression du gène *exsA* et par conséquent sur les autres gènes du SSTT tout au long de la croissance bactérienne et quelque soient les conditions (avec ou sans induction du SSTT). Une partie de ces conclusions vont à l'encontre de celles de l'équipe de Filloux (Bleves *et al.*, 2005). Ils ont montré d'une part que RhII n'influe pas sur l'expression du gène *exsA* et d'autre part que cette protéine modifie l'expression des autres gènes du SSTT testés uniquement lors de l'activation du SSTT par déplétion calcique. Hogardt *et al.* ont déjà mis en évidence des différences dans la régulation du SSTT par RpoS entre les gènes des toxines qui ne proviennent pas de la même souche (Hogardt *et al.*, 2004). L'expression du gène *exoS* est réprimée alors que celle d'*exoU* ne l'est

pas. L'étude des différences au niveau des promoteurs de ces gènes et la comparaison des expériences de retard sur gel avec ces promoteurs en condition de répression du SSTT pourraient permettre de comprendre ces différences entre les souches et donner des informations quant aux protéines impliquées dans le mécanisme de répression par RhII et RpoS.

La mesure d'activité de l'opéron *exsCEBA* nous a également permis de montrer que l'expression du SSTT dans les mutants du quorum sensing et le mutant  $\Delta rpoS$  est toujours dépendante de la densité cellulaire, avec une inhibition à densité cellulaire élevée. Le système de quorum sensing connu chez *P. aeruginosa* et RpoS ne sont donc pas directement impliqués dans la réponse au PARST. De plus, ces mutants qui sont incapables de synthétiser un ou des signaux du quorum synthétisent toujours le PARST. Ainsi, les enzymes RhII, LasI et PhnAB ne sont pas responsables de la synthèse du PARST et ni PAI1, ni PAI2, ni le PQS ne peuvent être le signal PARST. *P. aeruginosa* ne synthétisant pas le signal AI2, régulant le SSTT chez les *E. coli* entéropathogènes, il ne peut pas non plus s'agir de ce signal. Les expériences préliminaires de purification du PARST tendent à confirmer cela puisque l'inhibition est retrouvée dans la phase d'extraction où les homosérines et le PQS ne sont normalement pas présentes.

Ce mécanisme de répression du SSTT de type quorum sensing, mis en évidence pour la première fois chez une bactérie possédant ce facteur de virulence, est donc différent et indépendant du quorum sensing connu chez *P. aeruginosa* et fait intervenir un signal, le PARST, autre que PAI1, PAI2 et PQS.

Diverses expériences seront entreprises afin de déterminer les acteurs de la production et de la réponse au PARST ainsi que la nature de ce signal. Pour ce faire, une banque de mutants par transposition réalisée au laboratoire est actuellement criblée. Le surnageant des clones issus de ce crible et incapables de produire le PARST sera analysé par LC-MS et comparé à celui de la souche parentale pour essayer de caractériser ce signal. La recherche de récepteurs au PARST sera réalisée en analysant la réponse des mutants au surnageant de la souche parentale. Un tel récepteur pourrait être le senseur d'un des systèmes de régulation à deux composants récemment mis en évidence dans la régulation du SSTT. L'un deux, SadARS, est un candidat intéressant. Il est nécessaire à la formation d'un biofilm mature et réprime l'expression du SSTT, pour cela il a été proposé comme charnière

entre un état planctonique avec un SSTT actif et une croissance sous forme de biofilm avec un SSTT réprimé (Kuchma, Connolly, et O'Toole, 2005). Nous pourrions également observer si le PARST affecte la formation du biofilm. Enfin, l'utilisation de puces à ADN est également envisagée afin de déterminer si le PARST est un régulateur global ou spécifique.

### **La région pA et CysB : d'autres voies de régulation du SSTT**

L'étude de la régulation du SSTT nous a également permis de mettre en évidence que la zone intergénique entre *exsB* et *exsA*, nommée pA, joue un rôle dans le niveau de production d'ExsA, son expression étant fortement diminuée lorsque cette partie du génome est délétée. Cependant, l'absence de pA ne modifie pas la capacité d'activation de l'opéron *exsCEBA* en déplétion calcique suggérant un rôle post-transcriptionnel de cette région. Nous envisageons d'analyser la stabilité de l'ARN des différents gènes de l'opéron *exsCEBA* par northern blot ou PCR quantitative en présence ou en absence de pA, ainsi que la production des différentes protéines pour déterminer s'il s'agit réellement d'une régulation post-transcriptionnelle se déroulant au niveau de la stabilité de l'ARN et de sa reconnaissance par le ribosome et d'autres protéines.

Nous avons aussi montré le rôle inhibiteur de la protéine CysB sur l'activité transcriptionnelle de l'opéron *exsCEBA*. CysB a été mise en évidence dans un complexe protéique ExoS/SpcS/CysB dans le cytosol de *P.aeruginosa* (thèse L. Quénée 2004, UJF grenoble) et elle est déjà connue pour son rôle positif dans l'expression du phénotype mucoïde (Delic-Attree *et al.*, 1997). Le SSTT étant réprimé sous ce phénotype, l'implication de cette protéine comme inhibiteur dans la régulation du SSTT est donc intéressante. Il est possible que CysB ait un rôle dans la répression du SSTT lors du passage au phénotype mucoïde. Cependant, ce rôle n'est pas directement en relation avec la voie du PARST puisque le mutant est toujours sensible à ce signal inhibiteur. Le niveau exact d'intervention de la protéine CysB reste donc à déterminer. Puisqu'il a été montré que *cysB* est capable de lier l'ADN, des expériences de retard sur gel peuvent être envisagées pour préciser la manière dont CysB réprime le SSTT.

## Un modèle d'infection pulmonaire par *P. aeruginosa*

En s'appuyant sur l'ensemble des résultats obtenus et sur les données de la littérature nous avons proposé un modèle d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* en se focalisant sur les deux facteurs de virulence fortement impliqués dans l'invasion et la persistance des bactéries : Système de sécrétion de type III et formation de biofilm (figure 40).

Lors du processus d'invasion des poumons d'un hôte les bactéries possèdent un SSTT sous l'état inductible qui est activé pour éliminer les défenses de l'organisme. Au fur et à mesure que la densité bactérienne augmente les gènes nécessaires à la formation d'un biofilm sont activés par le quorum sensing impliquant les couples LasI/LasR et RhII/RhIR. Parallèlement, l'expression des gènes du SSTT est inhibée par le mécanisme de type quorum sensing utilisant le signal PARST. La répression du SSTT par ce mécanisme se poursuit lorsque le biofilm est établi et peut être suffisante pour abaisser le niveau d'ExsA au dessous du seuil nécessaire à la modification épigénétique et permuter le SSTT de l'état inductible à non inductible. Cette modification étant stable et héréditaire le nombre de bactéries non inductibles s'accumule durant la phase de persistance. Certaines bactéries peuvent cependant conserver un phénotype inductible, la répression n'étant pas assez importante pour abaisser suffisamment le niveau d'ExsA pour qu'il se produise la modification épigénétique.

Lorsqu'une bactérie ressort de ce biofilm pour relancer un cycle d'invasion à proximité, elle se retrouve de nouveau face aux défenses immunitaires et l'on suppose que le SSTT est de nouveau nécessaire. Soit ces bactéries subissent de nouveau une modification épigénétique pour acquérir un SSTT inductible grâce à un ou des signaux augmentant suffisamment le niveau d'ExsA soit il s'agit de bactéries qui sont restées inductibles ou qui ont retrouvé un SSTT inductible même dans le biofilm. Cette dernière possibilité peut être due à des phénomènes stochastiques faisant fluctuer l'expression d'ExsA. Dans certaines bactéries une de ces fluctuations pourrait suffisamment augmenter le niveau du régulateur pour permettre la bascule du phénotype.

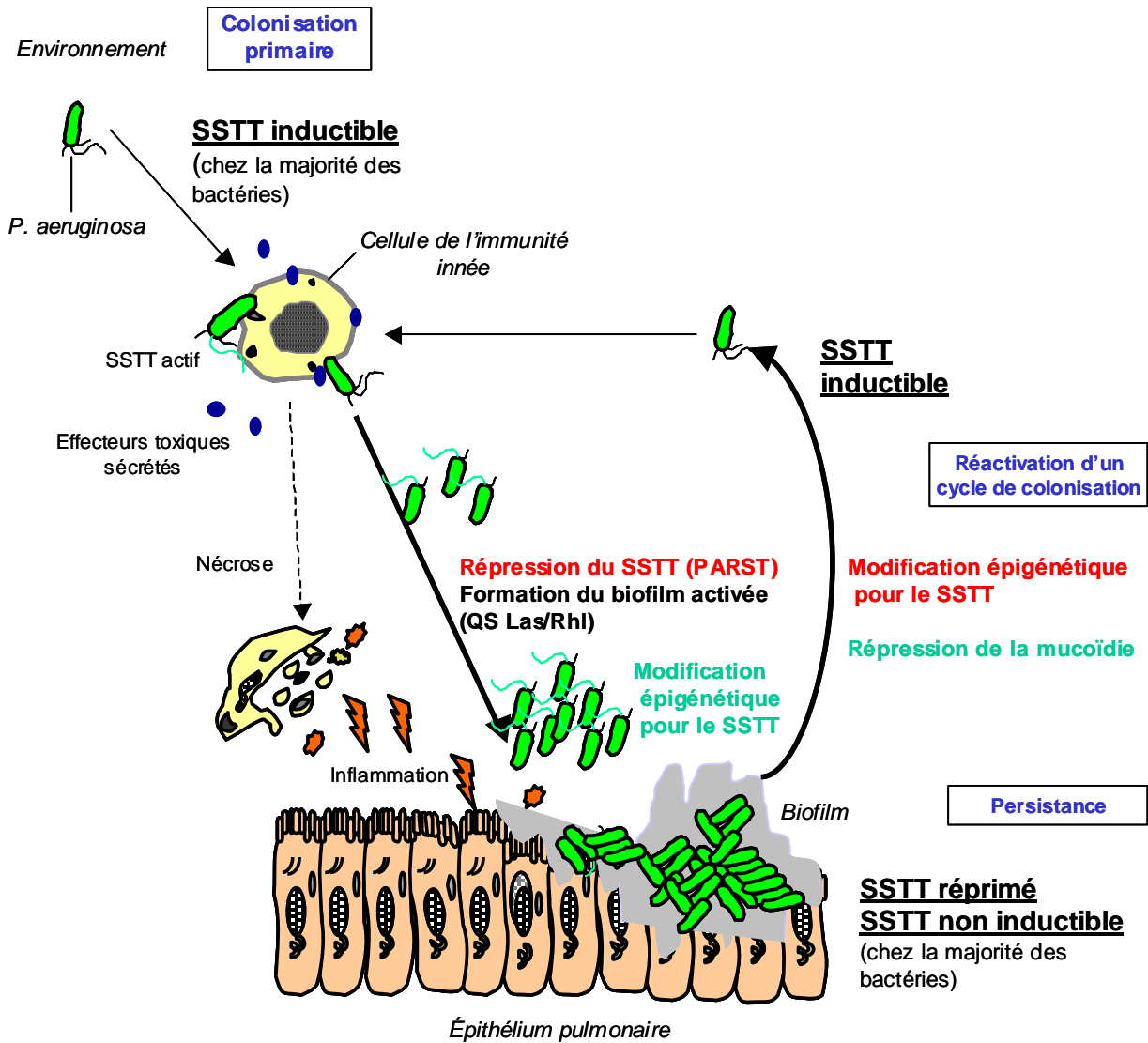


Figure 40 : **Modèle d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa***. Lors de la première infection le SSTT sous l'état inducible, est activé par le contact avec les cellules de l'immunité innée et participe à l'élimination des défenses de l'hôte. Puis les bactéries se développent, s'attachent à l'épithélium et initient le développement d'un biofilm. Le SSTT est alors réprimé par un mécanisme de type quorum sensing médié par le PARST et bascule dans un état non inducible chez la plupart des bactéries par modification épigénétique. Lors des phases aiguës de l'infection des bactéries ressortent du biofilm et investissent une autre partie des poumons. A ce moment, les facteurs de virulence doivent être réactivés et le SSTT devrait retrouver un état inducible par une nouvelle modification épigénétique. QS : quorum sensing, PARST : Pseudomonas auto repressor of secretion III.

Pour valider ce modèle, nous devons déterminer si le passage sous forme de biofilm avec répression du SSTT peut induire la modification épigénétique, état inducible vers état non inducible. Pour cela on pourra utiliser une souche inducible, réprimer le SSTT par une croissance en biofilm en utilisant un système de flow-cell. Puis au cours du temps prélever des bactéries et vérifier si elles ont changé de phénotype. Si tel est le cas alors on devra vérifier si la modification de phénotype n'est pas due à une mutation en essayant de basculer de nouveau le phénotype vers un état inducible avec une expression transitoire d'ExsA.



# **BIBLIOGRAPHIE**



- Ader,F., Le Berre,R., Faure,K., Gosset,P., Epaulard,O., Toussaint,B., Polack,B., Nowak,E., Viget,N.B., Kipnis,E., and Guery,B.P. (2005) Alveolar Response to *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the Type III Secretion System *Infect.Immun.* **73**: 4263-4271.
- Aendekerk,S., Diggle,S.P., Song,Z., Hoiby,N., Cornelis,P., Williams,P., and Camara,M. (2005) The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication *Microbiology* **151**: 1113-1125.
- Ahn,K.S., Ha,U., Jia,J., Wu,D., and Jin,S. (2004) The *truA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is required for the expression of type III secretory genes *Microbiology* **150**: 539-547.
- Aizawa,S. (2001) Bacterial flagella and type III secretion systems *FEMS Microbiol.Lett.* **202**: 157-164.
- Albus,A.M., Pesci,E.C., Runyen-Janecky,L.J., West,S.E., and Iglewski,B.H. (1997) *Vfr* controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **179**: 3928-3935.
- Anderson,D.M., Ramamurthi,K.S., Tam,C., and Schneewind,O. (2002) YopD and LcrH regulate expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a posttranscriptional mechanism and bind to yopQ RNA *J.Bacteriol.* **184**: 1287-1295.
- Arevalo-Ferro,C., Hentzer,M., Reil,G., Gorg,A., Kjelleberg,S., Givskov,M., Riedel,K., and Eberl,L. (2003) Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics *Environ.Microbiol.* **5**: 1350-1369.
- Bajaj,V., Hwang,C., and Lee,C.A. (1995) *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes *Mol.Microbiol.* **18**: 715-727.
- Bajaj,V., Lucas,R.L., Hwang,C., and Lee,C.A. (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression *Mol.Microbiol.* **22**: 703-714.
- Barbieri,J.T., Sun,J. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **152:79-92. Epub;%2004 Aug 24.**: 79-92.
- Barker,A.P., Vasil,A.I., Filloux,A., Ball,G., Wilderman,P.J., and Vasil,M.L. (2004) A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis *Mol.Microbiol.* **53**: 1089-1098.
- Baxter,M.A., Fahlen,T.F., Wilson,R.L., and Jones,B.D. (2003) HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype *Infect.Immun.* **71**: 1295-1305.
- Becher,A., Schweizer,H.P. (2000) Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions *BioTechniques* **29**: 948-950.

- Bernot,G., Comet,J.P., Richard,A., and Guespin,J. (2004) Application of formal methods to biological regulatory networks: extending Thomas' asynchronous logical approach with temporal logic *J.Theor.Biol.* **229**: 339-347.
- Bertani,I., Sevo,M., Kojic,M., and Venturi,V. (2003) Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas* *Arch.Microbiol.* **180**: 264-271.
- Bleves,S., Soscia,C., Nogueira-Orlandi,P., Lazdunski,A., and Filloux,A. (2005) Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *J.Bacteriol.* **187**: 3898-3902.
- Boles,B.R., Thoendel,M., and Singh,P.K. (2005) Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms *Mol.Microbiol.* **57**: 1210-1223.
- Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal.Biochem.* **72**: 248-254.
- Bustamante,V.H., Santana,F.J., Calva,E., and Puente,J.L. (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression *Mol.Microbiol.* **39**: 664-678.
- Cambronne,E.D., Schneewind,O. (2002) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: *yscM1* and *yscM2* regulate *yop* gene expression by a posttranscriptional mechanism that targets the 5' untranslated region of *yop* mRNA *J.Bacteriol.* **184**: 5880-5893.
- Cambronne,E.D., Sorg,J.A., and Schneewind,O. (2004) Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector *yop* expression in *Yersinia enterocolitica* *J.Bacteriol.* **186**: 829-841.
- Cao,H., Krishnan,G., Goumnerov,B., Tsongalis,J., Tompkins,R., and Rahme,L.G. (2001) A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 14613-14618.
- Casadesus,J., d'Ari,R. (2002) Memory in bacteria and phage *BioEssays* **24**: 512-518.
- Chugani,S.A., Whiteley,M., Lee,K.M., D'Argenio,D., Manoil,C., and Greenberg,E.P. (2001) QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 2752-2757.
- Coburn,J., Gill,D.M. (1991) ADP-ribosylation of p21ras and related proteins by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S *Infect.Immun.* **59**: 4259-4262.
- Cohn,M., Horibata,K. (1959a) Analysis of the differentiation and of the heterogeneity within a population of *Escherichia coli* undergoing induced  $\beta$ -galactosidase synthesis *J.Bacteriol.* **78**: 613-623.
- Cohn,M., Horibata,K. (1959b) Inhibition by glucose of the induced synthesis of the  $\beta$ -galactosidase-enzyme system of *Escherichia coli*. Analysis of maintenance *J.Bacteriol.* **78**: 601-611.

- Cohn, M., Horibata, K. (1959c) Physiology of the inhibition by glucose of the induced synthesis of the  $\beta$ -galactoside-enzyme system of *Escherichia coli* *J.Bacteriol.* **78**: 624-635.
- Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S., and Engel, J.N. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia *Infect.Immun.* **67**: 3625-3630.
- Corech, R., Rao, A., Laxova, A., Moss, J., Rock, M.J., Li, Z., Kosorok, M.R., Splaingard, M.L., Farrell, P.M., and Barbieri, J.T. (2005) Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis *J.Clin.Microbiol.* **43**: 3956-3962.
- Cornelis, G.R., Wolf-Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells *Mol.Microbiol.* **23**: 861-867.
- Cowell, B.A., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M. (2005) Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion *FEMS Microbiol.Lett.* **250**: 71-76.
- D'Argenio, D.A., Calfee, M.W., Rainey, P.B., and Pesci, E.C. (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants *J.Bacteriol.* **184**: 6481-6489.
- D'Argenio, D.A., Gallagher, L.A., Berg, C.A., and Manoil, C. (2001) *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection *J.Bacteriol.* **183**: 1466-1471.
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999) Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system *Infect.Immun.* **67**: 6164-6167.
- Dacheux, D., Attree, I., and Toussaint, B. (2001) Expression of ExsA in *trans* confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates *Infect.Immun.* **69**: 538-542.
- Dacheux, D., Epaulard, O., De Groot, A., Guery, B., Leberre, R., Attree, I., Polack, B., and Toussaint, B. (2002) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase *aceAB* operon *Infect.Immun.* **70**: 3973-3977.
- Darwin, K.H., Miller, V.L. (1999) InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium* *J.Bacteriol.* **181**: 4949-4954.
- Dasgupta, N., Lykken, G.L., Wolfgang, M.C., and Yahr, T.L. (2004) A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system *Mol.Microbiol.* **53**: 297-308.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., and O'Toole, G.A. (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *J.Bacteriol.* **185**: 1027-1036.

- de Kievit, T., Seed, P.C., Nezezon, J., Passador, L., and Iglewski, B.H. (1999) RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **181**: 2175-2184.
- de Kievit, T.R., Iglewski, B.H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships *Infect.Immun.* **68**: 4839-4849.
- Delic-Attree, I., Toussaint, B., Garin, J., and Vignais, P.M. (1997) Cloning, sequence and mutagenesis of the structural gene of *Pseudomonas aeruginosa* CysB, which can activate *algD* transcription *Mol.Microbiol.* **24**: 1275-1284.
- Demongeot, J. (1998) Multistationarity and cell differentiation *J.Biol.Systems* **6**: 1-2.
- Deretic, V., Schurr, M.J., Boucher, J.C., and Martin, D.W. (1994) Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors *J.Bacteriol.* **176**: 2773-2780.
- Deziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lepine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., and Rahme, L.G. (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones *Mol.Microbiol.* **55**: 998-1014.
- Duan, K., Dammel, C., Stein, J., Rabin, H., and Surette, M.G. (2003) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication *Mol.Microbiol.* **50**: 1477-1491.
- Durand, J.M., Bjork, G.R. (2003) Putrescine or a combination of methionine and arginine restores virulence gene expression in a tRNA modification-deficient mutant of *Shigella flexneri*: a possible role in adaptation of virulence *Mol.Microbiol.* **47**: 519-527.
- Durand, J.M., Dagberg, B., Uhlin, B.E., and Bjork, G.R. (2000) Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the virF gene *Mol.Microbiol.* **35**: 924-935.
- Enderle, P.J., Farwell, M.A. (1998) Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells *BioTechniques* **25**: 954-956.
- Fagerlind, M.G., Rice, S.A., Nilsson, P., Harlen, M., James, S., Charlton, T., and Kjelleberg, S. (2003) The role of regulators in the expression of quorum-sensing signals in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **6**: 88-100.
- Fauvarque, M.O., Bergeret, E., Chabert, J., Dacheux, D., Satre, M., and Attree, I. (2002) Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing *Microb.Pathog.* **32**: 287-295.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., and Prince, A. (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection *Infect.Immun.* **66**: 43-51.

- Feltman,H., Schulert,G., Khan,S., Jain,M., Peterson,L., and Hauser,A.R. (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* *Microbiology* **147**: 2659-2669.
- Filloux,A., Vallet,I. (2003) [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community] *Med.Sci.(Paris)* **19**: 77-83.
- Fong,K.P., Chung,W.O., Lamont,R.J., and Demuth,D.R. (2001) Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS *Infect.Immun.* **69**: 7625-7634.
- Fuqua,C., Greenberg,E.P. (1998) Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones *Curr.Opin.Microbiol.* **1**: 183-189.
- Galán,J.E. (2001) *Salmonella* interactions with host cells: Type III secretion at work *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **17**: 53-86.
- Gallagher,L.A., McKnight,S.L., Kuznetsova,M.S., Pesci,E.C., and Manoil,C. (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **184**: 6472-6480.
- Gambello,M.J., Iglewski,B.H. (1991) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression *J.Bacteriol.* **173**: 3000-3009.
- Ganesan,A.K., Vincent,T.S., Olson,J.C., and Barbieri,J.T. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S disrupts Ras-mediated signal transduction by inhibiting guanine nucleotide exchange factor-catalyzed nucleotide exchange *J.Biol.Chem.* **274**: 21823-21829.
- Garcia,V.E., Soncini,F.C., and Groisman,E.A. (1996) Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence *Cell* **84**: 165-174.
- Garmendia,J., Beuzon,C.R., Ruiz-Albert,J., and Holden,D.W. (2003) The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system *Microbiology* **149**: 2385-2396.
- Gilson,L., Kuo,A., and Dunlap,P.V. (1995) AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins *J.Bacteriol.* **177**: 6946-6951.
- Goehring,U.M., Schmidt,G., Pederson,K.J., Aktories,K., and Barbieri,J.T. (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases *J.Biol.Chem.* **274**: 36369-36372.
- Goldberg,J.B., Pier,G.B. (1996) *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis *Trends Microbiol.* **4**: 490-494.
- Goldberg,M.D., Johnson,M., Hinton,J.C., and Williams,P.H. (2001) Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli* *Mol.Microbiol.* **41**: 549-559.

- Goodman,A.L., Kulasekara,B., Rietsch,A., Boyd,D., Smith,R.S., and Lory,S. (2004) A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa* *Dev.Cell* **7**: 745-754.
- Goranson,J., Hovey,A.K., and Frank,D.W. (1997) Functional analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of exoenzyme S production by *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **179**: 1646-1654.
- Govan,J.R., Harris,G.S. (1986) *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis *Microbiol.Sci.* **3**: 302-308.
- Guespin-Michel,J.E., Kaufman,M. (2001) Positive feedback circuits and adaptive regulations in bacteria *Acta Biotheor.* **49**: 207-218.
- Guespin-Michel,J.E., Polack,B., and Mérieau,A. (2003) Bacterial adaptation and epigenesis *Recent Res.Devel.Microbiology* **7**: 289-305.
- Guespin-Michel,J.F., Bernot,G., Comet,J.P., Merieau,A., Richard,A., Hulen,C., and Polack,B. (2004) Epigenesis and dynamic similarity in two regulatory networks in *pseudomonas aeruginosa* *Acta Biotheor.* **52**: 379-390.
- Ha,U., Jin,S. (2001) Growth phase-dependent invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and its survival within HeLa cells *Infect.Immun.* **69**: 4398-4406.
- Ha,U.H., Kim,J., Badrane,H., Jia,J., Baker,H.V., Wu,D., and Jin,S. (2004) An in vivo inducible gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an anti-ExsA to suppress the type III secretion system *Mol.Microbiol.* **54**: 307-320.
- Hahn,H.P. (1997) The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. [Review] [64 refs] *Gene* **192**: 99-108.
- Harrington,K.M., Nazarenko,I.A., Dix,D.B., Thompson,R.C., and Uhlenbeck,O.C. (1993) In vitro analysis of translational rate and accuracy with an unmodified tRNA *Biochemistry* **32**: 7617-7622.
- Hauser,A.R., Fleiszig,S., Kang,P.J., Mostov,K., and Engel,J.N. (1998) Defects in type III secretion correlate with internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells *Infect.Immun.* **66**: 1413-1420.
- Hauser,A.R., Cobb,E., Bodí,M., Mariscal,D., Vallés,J., Engel,J.N., and Rello,J. (2002) Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* *Crit.Care Med.* **30**: 521-528.
- Heck,L.W., Alarcon,P.G., Kulhavy,R.M., Morihara,K., Russell,M.W., and Mestecky,J.F. (1990) Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase *J.Immunol.* **144**: 2253-2257.
- Henke,J.M., Bassler,B.L. (2004) Bacterial social engagements *Trends Cell Biol.* **14**: 648-656.



- Henriksson, M.L., Sundin, C., Jansson, A.L., Forsberg, Å., Palmer, R.H., and Hallberg, B. (2002) Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases *in vivo* *Biochem.J.* **367**: 617-628.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N., and Givskov, M. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors *EMBO J.* **22**: 3803-3815.
- Herz, J., Kowal, R.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment *EMBO J.* **9**: 1769-1776.
- Hogardt, M., Roeder, M., Schreff, A.M., Eberl, L., and Heesemann, J. (2004) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS *Microbiology* **150**: 843-851.
- Hong, Y.Q., Ghebrehiwet, B. (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3 *Clin.Immunol.Immunopathol.* **62**: 133-138.
- Hornef, M.W., Roggenkamp, A., Geiger, A.M., Hogardt, M., Jacobi, C.A., and Heesemann, J. (2000) Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis *Microb.Pathog.* **29**: 329-343.
- Hovey, A.K., Frank, D.W. (1995) Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon *J.Bacteriol.* **177**: 4427-4436.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**: 379-433.
- Imamura, Y., Yanagihara, K., Tomono, K., Ohno, H., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Kadota, J., Tsukamoto, K., and Kohno, S. (2005) Role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems in a mouse model of chronic respiratory infection *J.Med.Microbiol.* **54**: 515-518.
- Ishimoto, K.S., Lory, S. (1989) Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**: 1954-1957.
- Iyoda, S., Watanabe, H. (2004) Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells *Microbiology* **150**: 2357-2571.
- Iyoda, S., Watanabe, H. (2005) ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *J.Bacteriol.* **187**: 4086-4094.

- Jackson, M.W., Silva-Herzog, E., and Plano, G.V. (2004) The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein *Mol. Microbiol.* **54**: 1364-1378.
- Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., Sundberg, C.D., Bishop, J.M., and Felsher, D.W. (2002) Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of *MYC* *Science* **297**: 102-104.
- Jain, M., Ramirez, D., Seshadri, R., Cullina, J.F., Powers, C.A., Schulert, G.S., Bar-Meir, M., Sullivan, C.L., McColley, S.A., and Hauser, A.R. (2004) Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis *J. Clin. Microbiol.* **42**: 5229-5237.
- Kaniga, K., Bossio, J.C., and Galan, J.E. (1994) The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins *Mol. Microbiol.* **13**: 555-568.
- Kauffman, S.A. (1969) Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets *J. Theor. Biol.* **22**: 437-467.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B.B. (1997) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract *Infect. Immun.* **65**: 2606-2612.
- Kimbara, K., Chakrabarty, A.M. (1989) Control of alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation of the *algR1* gene *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 601-608.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., and de Vos, W.M. (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria *Mol. Microbiol.* **24**: 895-904.
- Kobayashi, H. (2005) Airway biofilms: implications for pathogenesis and therapy of respiratory tract infections *Treat. Respir. Med.* **4**: 241-253.
- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C., and Pechere, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili *J. Bacteriol.* **182**: 5990-5996.
- Kohler, T., Van Delden, C., Curty, L.K., Hamzhepour, M.M., and Pechere, J.C. (2001) Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* **183**: 5213-5222.
- Kostakioti, M., Newman, C.L., Thanassi, D.G., and Stathopoulos, C. (2005) Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane *J. Bacteriol.* **187**: 4306-4314.
- Krall, R., Schmidt, G., Aktories, K., and Barbieri, J.T. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein *Infect. Immun.* **68**: 6066-6068.

- Kuchma,S.L., Connolly,J.P., and O'Toole,G.A. (2005) A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **187**: 1441-1454.
- Lambert,d.R., Sluifers,C., and Cornelis,G.R. (1992) Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica* *Mol.Microbiol.* **6**: 395-409.
- Laskowski,M.A., Osborn,E., and Kazmierczak,B.I. (2004) A novel sensor kinase-response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa* *Mol.Microbiol.* **54**: 1090-1103.
- Latifi,A., Foglino,M., Tanaka,K., Williams,P., and Lazdunski,A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS *Mol.Microbiol.* **21**: 1137-1146.
- Laue,B.E., Jiang,Y., Chhabra,S.R., Jacob,S., Stewart,G.S., Hardman,A., Downie,J.A., O'Gara,F., and Williams,P. (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase *Microbiology* **146**: 2469-2480.
- Lazdunski,A. (1998) Les facteurs de virulences de *Pseudomonas aeruginosa* et leur régulation. *Med Mal Infect*: 109-118.
- Le Berre,R., Faure,K., Fauvel,H., Viget,N.B., Ader,F., Prangere,T., Thomas,A.M., Leroy,X., Pittet,J.F., Marchetti,P., and Guery,B.P. (2004) Apoptosis inhibition in *P. aeruginosa*-induced lung injury influences lung fluid balance *Intensive Care Med.* **30**: 1204-1211.
- Ledgham,F., Ventre,I., Soscia,C., Foglino,M., Sturgis,J.N., and Lazdunski,A. (2003) Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR *Mol.Microbiol.* **48**: 199-210.
- Lee,V.T., Tam,C., and Schneewind,O. (2000) LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells *J.Biol.Chem.* **275**: 36869-36875.
- Lee,V.T., Smith,R.S., Tummler,B., and Lory,S. (2005) Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection *Infect.Immun.* **73**: 1695-1705.
- Linares,J.F., Lopez,J.A., Camafeita,E., Albar,J.P., Rojo,F., and Martinez,J.L. (2005) Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **187**: 1384-1391.
- Lucas,R.L., Lostroh,C.P., DiRusso,C.C., Spector,M.P., Wanner,B.L., and Lee,C.A. (2000) Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium *J.Bacteriol.* **182**: 1872-1882.

- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 194-222.
- Matson, J.S., Nilles, M.L. (2001) LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis* *J. Bacteriol.* **183**: 5082-5091.
- McCaw, M.L., Lykken, G.L., Singh, P.K., and Yahr, T.L. (2002) ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon *Mol. Microbiol.* **46**: 1123-1133.
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H., and Pesci, E.C. (2000) The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* **182**: 2702-2708.
- McNab, R., Lamont, R.J. (2003) Microbial dinner-party conversations: the role of LuxS in interspecies communication *J. Med. Microbiol.* **52**: 541-545.
- Miki, T., Okada, N., and Danbara, H. (2004) Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system *J. Biol. Chem.* **279**: 34631-34642.
- Miller, V.L. (2002) Connections between transcriptional regulation and type III secretion? *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 211-215.
- Milton, D.L., Chalker, V.J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M., and Williams, P. (2001) The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone *J. Bacteriol.* **183**: 3537-3547.
- Morin, D., Grasland, B., Vallee-Rehel, K., Dufau, C., and Haras, D. (2003) On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices *J. Chromatogr. A* **1002**: 79-92.
- Novick, A., Wiener, M. (1957) Enzyme induction is an all-or-none phenomenon *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **43**: 553-556.
- O'Toole, G.A., Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304.
- Ochsner, U.A., Reiser, J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**: 6424-6428.
- Ozbudak, E.M., Thattai, M., Lim, H.N., Shraiman, B.I., and van Oudenaarden, A. (2004) Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli* *Nature* **427**: 737-740.
- Page, A.L., Parsot, C. (2002) Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades *Mol. Microbiol.* **46**: 1-11.

- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., and Greenberg, E.P. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 197-201.
- Pearson, J.P., Van Delden, C., and Iglewski, B.H. (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals *J.Bacteriol.* **181**: 1203-1210.
- Pederson, K.J., Barbieri, J.T. (1998) Intracellular expression of the ADP-ribosyltransferase domain of *Pseudomonas* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells *Mol.Microbiol.* **30**: 751-759.
- Pennington, J.E., Ehrie, M.G. (1978) Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during immunosuppression *J.Infect.Dis.* **137**: 764-774.
- Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., and Iglewski, B.H. (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa* *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 11229-11234.
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **179**: 3127-3132.
- Petersen, S., Young, G.M. (2002) Essential role for cyclic AMP and its receptor protein in *Yersinia enterocolitica* virulence *Infect.Immun.* **70**: 3665-3672.
- Pier, G.B. (2002) CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection *Curr.Opin.Microbiol.* **5**: 81-86.
- Plano, G.V., Day, J.B., and Ferracci, F. (2001) Type III export: new uses for an old pathway *Mol.Microbiol.* **40**: 284-293.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J. (2002) The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **99**: 3159-3164.
- Quenee, L., Lamotte, D., and Polack, B. (2005) Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa* *Biotechniques* **38**: 63-67.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals *Science* **268**: 1899-1902.
- Ramamurthi, K.S., Schneewind, O. (2002) Type III protein secretion in *Yersinia* species *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **18**: 107-133.
- Ratjen, F., Döring, G. (2003) Cystic fibrosis *Lancet* **361**: 681-689.
- Regnstrom, K., Sauge-Merle, S., Chen, K., and Burgess, B.K. (1999) In *Azotobacter vinelandii*, the E1 subunit of the pyruvate dehydrogenase complex binds *fpr* promoter region DNA and ferredoxin I *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 12389-12393.

- Reimann,C., Beyeler,M., Latifi,A., Winteler,H., Foglino,M., Lazdunski,A., and Haas,D. (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase *Mol.Microbiol.* **24**: 309-319.
- Reisner,A., Hoiby,N., Tolker-Nielsen,T., and Molin,S. (2005) Microbial pathogenesis and biofilm development *Contrib.Microbiol.* **12**: 114-131.
- Rietsch,A., Vallet-Gely,I., Dove,S.L., and Mekalanos,J.J. (2005) ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa* *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**: 8006-8011.
- Rietsch,A., Wolfgang,M.C., and Mekalanos,J.J. (2004) Effect of metabolic imbalance on expression of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa* *Infect.Immun.* **72**: 1383-1390.
- Robinson,C., Thompson,S.J., and Woolhead,C. (2001) Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts *Traffic.* **2**: 245-251.
- Rodrigue,A., Quentin,Y., Lazdunski,A., Méjean,V., and Foglino,M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in Microbiology* **8**: 498-504.
- Roy-Burman,A., Savel,R.H., Racine,S., Swanson,B.L., Revadigar,N.S., Fujimoto,J., Sawa,T., Frank,D.W., and Wiener-Kronish,J.P. (2001) Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections *J.Infect.Dis.* **183**: 1767-1774.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Sato,H., Frank,D.W., Hillard,C.J., Feix,J.B., Pankhaniya,R.R., Moriyama,K., Finck-Barbançon,V., Buchaklian,A., Lei,M., Long,R.M., Wiener-Kronish,J., and Sawa,T. (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU *EMBO Journal* **22**: 2959-2969.
- Sawa,T., Yahr,T.L., Ohora,M., Kurachi,K., Gropper,M.A., Wiener-Kronish,J.P., and Frank,D.W. (1999) Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury *Nature Med.* **5**: 392-398.
- Sayner,S.L., Frank,D.W., King,J., Chen,H., VandeWaa,J., and Stevens,T. (2004) Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY *Circ.Res.* **95**: 196-203.
- Scaletsky,I.C., Silva,M.L., and Trabulsi,L.R. (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells *Infect.Immun.* **45**: 534-536.
- Schechter,L.M., Jain,S., Akbar,S., and Lee,C.A. (2003) The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect hliA expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *Infect.Immun.* **71**: 5432-5435.

- Schroeder, T.H., Lee, M.M., Yacono, P.W., Cannon, C.L., Gerceker, A.A., Golan, D.E., and Pier, G.B. (2002) CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 6907-6912.
- Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., and Greenberg, E.P. (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing *Mol.Microbiol.* **51**: 973-985.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., and Greenberg, E.P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis *J.Bacteriol.* **185**: 2066-2079.
- Seed, P.C., Passador, L., and Iglewski, B.H. (1995) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy *J.Bacteriol.* **177**: 654-659.
- Shaver, C.M., Hauser, A.R. (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung *Infect.Immun.* **72**: 6969-6977.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., and Holden, D.W. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium* *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 2593-2597.
- Sircili, M.P., Walters, M., Trabulsi, L.R., and Sperandio, V. (2004) Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing *Infect.Immun.* **72**: 2329-2337.
- Smith, R.S., Fedyk, E.R., Springer, T.A., Mukaida, N., Iglewski, B.H., and Phipps, R.P. (2001) IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2 *J.Immunol.* **167**: 366-374.
- Smith, R.S., Iglewski, B.H. (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence *Curr.Opin.Microbiol.* **6**: 56-60.
- Soulé, C. (2003) Graphic requirement for multistationarity *ComplexUs* **1**: 123-133.
- Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., and Kaper, J.B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 15196-15201.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2003) Bacteria-host communication: The language of hormones *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **100**: 8951-8956.
- Stark, M.J. (1987) Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli* *Gene* **51**: 255-267.
- Stonehouse, M.J., Cota-Gomez, A., Parker, S.K., Martin, W.E., Hankin, J.A.,

- Murphy,R.C., Chen,W., Lim,K.B., Hackett,M., Vasil,A.I., and Vasil,M.L. (2002) A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C *Mol.Microbiol.* **46**: 661-676.
- Stover,C.K., Pham,X.Q., Erwin,A.L., Mizoguchi,S.D., Warrenner,P., Hickey,M.J., Brinkman,F.S.L., Hufnagle,W.O., Kowalik,D.J., Lagrou,M., Garber,R.L., Goltry,L., Tolentino,E., Westbrook-Wadman,S., Yuan,Y., Brody,L.L., Coulter,S.N., Folger,K.R., Kas,A., Larbig,K., Lim,R., Smith,K., Spencer,D., and Wong,G.K.S. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen *Nature* **406**: 959-964.
- Sun,J.J., Barbieri,J.T. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins *J.Biol.Chem.* **278**: 32794-32800.
- Sundin,C., Hallberg,B., and Forsberg,A. (2004) ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton in vivo *FEMS Microbiol.Lett.* **234**: 87-91.
- Surette,M.G., Bassler,B.L. (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**: 7046-7050.
- Surette,M.G., Miller,M.B., and Bassler,B.L. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 1639-1644.
- Tampakaki,A.P., Fadouloglou,V.E., Gazi,A.D., Panopoulos,N.J., and Kokkinidis,M. (2004) Conserved features of type III secretion *Cell Microbiol.* **6**: 805-816.
- Tang,H.B., DiMango,E., Bryan,R., Gambello,M., Iglewski,B.H., Goldberg,J.B., and Prince,A. (1996) Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection *Infect.Immun.* **64**: 37-43.
- Tateda,K., Ishii,Y., Horikawa,M., Matsumoto,T., Miyairi,S., Pechere,J.C., Standiford,T.J., Ishiguro,M., and Yamaguchi,K. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils *Infect.Immun.* **71**: 5785-5793.
- Teplitski,M., Goodier,R.I., and Ahmer,B.M. (2003) Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella* *J.Bacteriol.* **185**: 7257-7265.
- Thomas,R. (1973) Boolean formalization of genetic control circuits *J.Theor.Biol.* **42**: 563-585.
- Thomas,R. (1980) On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations *Springer Series in Synergies* **9**: 180-193.
- Thomas,R., Thieffry,D., and Kaufman,M. (1995) Dynamical behaviour of biological regulatory networks -I. Biological role of feedback loops and practical use of the concept of the loop-characteristic state *Bull.Math.Biol.* **57**: 247-276.



- Thomas,R., Van Ham,P. (1974) Analyse formelle de circuits de régulation génétique: le contrôle de l'immunité chez les bactériophages lambdaïdes *Biochimie* **56**: 1529.
- Thompson,L.S., Webb,J.S., Rice,S.A., and Kjelleberg,S. (2003) The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene rhII in *Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiol.Lett.* **220**: 187-195.
- Toussaint,B., Delic-Attree,I., and Vignais,P.M. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **196**: 416-421.
- Umanski,T., Rosenshine,I., and Friedberg,D. (2002) Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli* *Microbiology* **148**: 2735-2744.
- Urbanowski,M.L., Lykken,G.L., and Yahr,T.L. (2005) A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**: 9930-9935.
- Urbonavicius,J., Durand,J.M., and Bjork,G.R. (2002) Three modifications in the D and T arms of tRNA influence translation in *Escherichia coli* and expression of virulence genes in *Shigella flexneri* *J.Bacteriol.* **184**: 5348-5357.
- Vallet,I., Olson,J.W., Lory,S., Lazdunski,A., and Filloux,A. (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**: 6911-6916.
- Vallis,A.J., Yahr,T.L., Barbieri,J.T., and Frank,D.W. (1999) Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions *Infect.Immun.* **67**: 914-920.
- Van Delden,C., Comte,R., and Bally,M. (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **183**: 5376-5384.
- Vance,R.E., Rietsch,A., and Mekalanos,J.J. (2005) Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo *Infect.Immun.* **73**: 1706-1713.
- Viget,N.B., Guery,B.P., Ader,F., Neviere,R., Alfandari,S., Creuzy,C., Roussel-Delvallez,M., Foucher,C., Mason,C.M., Beaucaire,G., and Pittet,J.F. (2000) Keratinocyte growth factor protects against *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **279**: L1199-L1209.
- Wade,D.S., Calfee,M.W., Rocha,E.R., Ling,E.A., Engstrom,E., Coleman,J.P., and Pesci,E.C. (2005) Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **187**: 4372-4380.
- Wagner,V.E., Bushnell,D., Passador,L., Brooks,A.I., and Iglewski,B.H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment *J.Bacteriol.* **185**: 2080-2095.

- Wagner, V.E., Gillis, R.J., and Iglewski, B.H. (2004) Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa* *Vaccine* **22 Suppl 1**:S15-20.: S15-S20.
- Walter, T., Aronson, A. (1999) Specific binding of the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase to the upstream region of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes *J.Biol.Chem.* **274**: 7901-7906.
- Wick, M.J., Frank, D.W., Storey, D.G., and Iglewski, B.H. (1990) Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A *Annu.Rev.Microbiol.* **44**: 335-363.
- Williams, S.C., Patterson, E.K., Carty, N.L., Griswold, J.A., Hamood, A.N., and Rumbaugh, K.P. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells *J.Bacteriol.* **186**: 2281-2287.
- Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., Lazdunski, A., Stewart, G.S.A.B., and Williams, P. (1995) Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**: 9427-9431.
- Withers, H., Swift, S., and Williams, P. (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria *Curr.Opin.Microbiol.* **4**: 186-193.
- Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., and Lory, S. (2003) Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway *Dev.Cell* **4**: 253-263.
- Wozniak, D.J., Ohman, D.E. (1994) Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT* *J.Bacteriol.* **176**: 6007-6014.
- Wu, W., Badrane, H., Arora, S., Baker, H.V., and Jin, S. (2004) MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* *J.Bacteriol.* **186**: 7575-7585.
- Yahr, T.L., Hovey, A.K., Kulich, S.M., and Frank, D.W. (1995) Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene *J.Bacteriol.* **177**: 1169-1178.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**: 13899-13904.
- Yarwood, J.M., Schlievert, P.M. (2003) Quorum sensing in *Staphylococcus* infections *J.Clin.Invest* **112**: 1620-1625.
- Zolfaghar, I., Angus, A.A., Kang, P.J., To, A., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M. (2005) Mutation of *retS*, encoding a putative hybrid two-component regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*, attenuates multiple virulence mechanisms *Microbes.Infect.*

# **ANNEXES**



# ARTICLE 1

(soumis à BMC Bioinformatics)



---

Epigenetic acquisition of inducibility of type III cytotoxicity in *P. aeruginosa*.

D. Filopon<sup>1</sup>, A. Mérieau<sup>2</sup>, G.Bernot<sup>3</sup>, J.P. Comet<sup>3</sup>, R. LeBerre<sup>4</sup>, B. Guery<sup>4</sup>, B. Polack<sup>1§</sup>, J. Guespin-Michel<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> GREPI EA 2938 CHU de Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de microbiologie du froid, EA 2123, Université de Rouen, F-76 821 Mt St Aignan, France.

<sup>3</sup> LaMI, CNRS UMR 8042, Université d'Évry-Val-d'Essonne, Boulevard François Mitterrand, 91025 Évry, France.

<sup>4</sup> EA 2689, Faculté de Médecine, Pole Recherche, CHRU de Lille, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France

§ Corresponding author

Email addresses:

DF: [dfilopon@chu-grenoble.fr](mailto:dfilopon@chu-grenoble.fr)

AM: [annabelle.merieau@univ-rouen.fr](mailto:annabelle.merieau@univ-rouen.fr)

GB: [gilles.bernot@lami.univ-evry.fr](mailto:gilles.bernot@lami.univ-evry.fr)

JPC: [comet@lami.univ-evry.fr](mailto:comet@lami.univ-evry.fr)

RL: [rleberre@invivo.edu](mailto:rleberre@invivo.edu)

BG: [bguery@invivo.edu](mailto:bguery@invivo.edu)

BP: [bpolack@chu-grenoble.fr](mailto:bpolack@chu-grenoble.fr)

JFGM: [janine.guespin@univ-rouen.fr](mailto:janine.guespin@univ-rouen.fr)





## **Abstract**

### *Background*

*Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen, is often encountered in chronic lung diseases such as cystic fibrosis or chronic obstructive pneumonia, as well as acute settings like mechanical ventilation acquired pneumonia or neutropenic patients. It is a major cause of mortality and morbidity in these diseases. In lungs, *Pseudomonas* produces mucus that enhances its antibiotic resistance and contributes to the respiratory deficiency of the patients. However, the bacteria must first multiply to a high density to avoid the host's defences. At the beginning of the infection, most strains isolated from patients' lungs display a cytotoxic phenotype mainly through the type III secretion system (TTSS) expression, allowing them to overcome the host's defences. Once acquired, the type III cytotoxicity is preserved even outside the lungs. These heritable changes of phenotype are generally due to mutations. However, epigenetic switches, *i.e.* bistability, can also cause heritable phenotypic modifications without mutations. In this study, we designed a new experimental strategy based on biological observations and previous theoretical models to establish the possibility of an epigenetic acquisition of a type III cytotoxic phenotype by *P. aeruginosa*.

### *Result*

Using the generalised logical method, we designed a minimal model of the TTSS regulatory network that could support the epigenetic hypothesis, and studied its dynamics. A mathematical framework based on formal methods from computer science allowed a rigorous validation and certification of parameters of this model leading to epigenetic behaviour and helped to define a discriminating experimental scenario sufficient to validate the epigenetic hypothesis. We first demonstrated the

epigenetic acquisition by a non inducible strain of the capacity for the type III secretion system of *P. aeruginosa* to be activated by calcium depletion. The increased cytotoxicity of a strain after this epigenetic phenotypic switch was then demonstrated *in vivo* in an acute pulmonary infection model.

### *Conclusion*

These results may offer new perspectives for therapeutic strategies to prevent lethal infections by *P. aeruginosa* by preventing or reverting the possible epigenetic acquisition of an inducible type III cytotoxicity.

## Background

*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic pathogen associated with sepsis in burned, neutropenic, and intensive care patients as well as with severe chronic lung injury in cystic fibrosis and chronic obstructive pneumonia disease[1]. Cytotoxic *P. aeruginosa* inject toxins from their cytoplasm into eukaryotic target cells through a protein secretory apparatus, the type III secretion system (TTSS)[2]. Activation of this virulence factor is dependant on the contact between the bacteria and the host cells. *In vitro*, secretion of the type III effectors is induced by calcium depletion of the growth medium. TTSS is encoded by three classes of genes coding the secretion apparatus, the toxins and the regulators. These genes are co-ordinately controlled by a common transcriptional activator, ExsA, which controls its own synthesis[3], leading to a positive feedback circuit in the TTSS regulatory network. *exsD*, the first gene of one of the TTSS operon encodes an ExsA inhibitor [4] inactivated by ExsC, encoded by the first gene of the *exsCEBA* operon[5,6]. Finally, ExsE, encoded in the *exsA* operon and secreted by the TTSS upon its activation by calcium depletion, interacts with ExsC and inhibits its activity[6,7]. However, numerous strains possessing the entire set of genes required for type III cytotoxicity cannot be induced by host contact or calcium depletion unless submitted to *exsA* over expression[8,9]. These strains will be named below as non inducible for type III cytotoxicity to distinguish them from truly non cytotoxic, such as type III secretory mutated strains. It has recently been shown that they accumulate in the lungs of cystic fibrosis patients with long term infection.

Epigenetic switches, corresponding to phenotype modifications, arise and can be transmitted from a cell to its progeny in the absence of any genetic modifications. As a consequence, several phenotypes may arise from the same genome in the same

conditions, which is equivalent to the existence of multiple steady states according to physicist's terminology. Such a phenomenon has been under investigations in the lactose metabolic network of *Escherichia coli* since 1957 [10-12]. Thomas conjectured that a positive feedback circuit (comprising interacting elements, each of which exerts, directly or indirectly, a positive action on itself) in a non linear dynamical system, such as a regulatory network controlling a biological process, is a necessary condition for the existence of multiple steady states[13,14]. This hypothesis has now been formally demonstrated[15,16]. Consequently, the presence of a positive feedback circuit in a regulatory network controlling a process could lead to epigenetic switching [17].

Since all the genes necessary for cytotoxic secretion are present and can be activated in non inducible *P. aeruginosa* strains, this is consistent with inductibility of type III cytotoxicity being associated with an epigenetic switch. However, molecular techniques are unable to prove or refute this hypothesis. Indeed, the absence of a mutation can be very difficult to demonstrate, since all possible genes in which a mutation could induce such a phenotypic change may not be known. Furthermore, the presence of a mutation in a putatively involved gene in inducible strains may not mean that it is the initial cause of the phenotypic change: an epigenetic switch could be the first event, followed by a mutation that may further stabilize it.

In addition, at least two feedback circuits control the production of ExsA a positive feedback circuit at the transcriptional level and a negative feedback circuit involving ExsA (Fig.1B). ExsA is required for its own synthesis (the positive feedback circuit), and the synthesis of its inhibitor (the negative feedback circuit), so these circuits are intertwined. The actual regulatory network is more complicated as shown in figure 1A. However, proteins ExsC and ExsE are modulators of protein ExsD activity, and

can be omitted from the model as far as the aim of this model is not to describe the whole regulatory network, but only to address the question of the possibility of an epigenetic switch between inducibility and non inducibility of the TTSS. Figure 1C shows this minimal regulatory network: vertices represent the biological entities ( $x = \text{ExsA}$ , and  $y = \text{ExsD}$ ) and lines their interactions (“-” for negative action and “+” for positive action). The output ( $z$ ), is the production of the secretory devices under induction by calcium depletion, i.e. inducibility. A similar scheme has been worked out for the regulation of mucoidy in the same bacteria[18]. Although the positive feedback circuit is consistent with the epigenetic hypothesis, negative circuits are necessary for homeostasis[13]. Consequently, it is not apparent whether this regulatory network can lead to a bi-stable behaviour. Mathematical analysis of the network’s dynamic is therefore necessary to determine if the epigenetic hypothesis is coherent: this means if a reasonable model, which exhibits two stable solutions, can be drawn. As the parameters of the system are not known, we used generalized logics, a method derived from a Boolean approach[19,20]. A formal computer science approach, using model checking Computation Tree Logic (CTL) and a dedicated framework SmbioNet[21], allowed us not only to fully establish the consistency of the epigenetic hypothesis for the acquisition of a type III cytotoxicity and to propose experimental evidences that are sufficient to prove it. We thus could design *in vivo* and *in vitro* experiments to test it.

## Results

### ***Computer modelling***

#### *Generalised logical analysis.*

Logical analysis relies on a simplification of the sigmoid curve representing the action of a transcriptional activator as a step function, defining a threshold of concentration above which the activation takes place[20]. In the case of the network shown in figure 1C,  $x$  has two distinct actions and it is very unlikely that the concentration thresholds above which protein ExsA is active on the promoter of gene  $exsD$  and on the promoter of its own gene are identical. Consequently, we associate two threshold values with  $x$  and treat it as a three-level logical variable (0,1,2).  $y$  has one action only and is treated as a two-level logical variable (0,1). Therefore, two different graphs must be drawn depending on which promoter is the most sensitive to ExsA (Fig. 2). For simplicity, we consider only the two master elements,  $x$  and  $y$ .

Another aspect of the generalised logical method is that it allows analysis of the dynamic properties of a network in terms of the "functionality" of its constitutive feedback circuits. The effect of a circuit does not only depend on the mere existence of the relevant interactions, but also on their relative strengths, which are noted as discrete parameters ( $K$ ). For a given regulatory network, the number of dynamics depends on the number of thresholds and parameters[17]. In the case of the two graphs depicted in figure 2, there are 324 different combinations of parameters for each graph.

Each set of parameters defines a specific temporal behaviour. Different set of values of the parameters can lead either to an epigenetic behaviour or to a non epigenetic behaviour.

*The use of a Formal computer science methods allows to select parameter set that lead to a model exhibiting the hypothesised behaviour.* Finding suitable valuations for parameters constitutes a major issue for the modelling. We runned the whole corpus of formal methods from computer science to include the dynamical knowledge or hypotheses on the system[21]. Our method starts by expressing the biological hypothesis (i.e. the epigenetic behaviour) formally, as formal sentences which can be manipulated automatically by computer. Here we applied a widely used temporal logic called Computation Tree Logic, because time plays a central role in behavioural properties. Moreover, formal sentences in CTL can be automatically checked against the 648 models by using a Model Checking algorithm. Technically, behaviour is represented by a transition system (state graph), which can be automatically computed from the regulatory network and the values of parameters. Then, it becomes possible to extract (*via* the 'brut force technique') the sets of parameters, if any, which lead to a behaviour that satisfies the CTL sentences. Model Checking thereby classifies the set of possible dynamic behaviours into two groups: those which satisfy the property and those which do not. This methodology is instrumented by the software SMBioNet [21] which, for the given regulatory network, automatically returns all sets of parameters which make the hypothesis coherent with the model.

In the present case, the dynamical hypothesis (epigenetic hypothesis) can be translated into two CTL. In the first, the non inducible phenotype is stable in most of the bacteria. The sets of parameters to be considered for consistency must therefore induce a behaviour where a non-cytotoxic bacterium ( $z=0$ ) cannot subsequently become cytotoxic, in the same conditions. This is formally expressed in temporal logic as:  $(z=0) \Rightarrow \text{always } (z=0)$ . In the second CTL, the cytotoxic phenotype is stable. Thus, even in the presence of the inhibitor ( $y$ ) there is a state in which inducibility of

the type III cytotoxicity ( $z=1$ ) is activated recurrently (i.e.  $z$  is activated in a recurrent way even if the  $y \rightarrow x$  inhibition is functionally active). This means that if at a given time the bacterium has acquired the new phenotype, then later on, it will be again in the same state. This is formally expressed in temporal logic as:  $(z=1) \Rightarrow F_s(z=1)$ , where  $F_s$  means “in a strict future”.

The epigenetic hypothesis is consistent, if and only if, at least one set of parameters leads to a behaviour satisfying these two formal properties.

From figure 2,  $z=1$  requires that  $x=2$ . Consequently the epigenetic hypothesis means that it is possible to make recurrent ( $x=2$ ) and the previous formulae are equivalent to  $[(x=2) \Rightarrow F_s(x=2)]$  and  $[(x=0) \Rightarrow \text{always}(\text{not}(x=2))]$  as well as to  $[(x=2) \Rightarrow F_s(z=1)]$  and  $[(x=0) \Rightarrow \text{always}(z=0)]$ . SMBioNet formally proves that the epigenetic hypothesis is consistent because 8 models satisfy these formulae, 2 of which are in agreement with the known biological facts. The state graph, for one of these 2 models, is displayed in figure 3.

#### *Design of a discriminating experimental scenario.*

In addition to proving the consistency of the epigenetic hypothesis, formal methods can establish the discriminating power of the previous experimental scenario. The goal is to prove both formal sentences *in vivo*. The two previous formulae reflect the existence of two steady states.

As indicated above, the first formula states that the basal level of  $x$  is a steady state and is consequently satisfied *in vivo* which is true for a non inducible strain. Thus, only the second formula remains to be experimentally validated. The second formal sentence  $(x=2) \Rightarrow F_s(z=1)$  is always true when  $x \neq 2$  because, according to the



truth table, the implication (false  $\Rightarrow$  anything) is always true. Consequently it is unnecessary to conduct an experiment where  $x \neq 2$ . Therefore any experiment must start by pushing the concentration of  $x$  to 2 which means to pulse  $x$  to saturation with an external signal. Moreover  $F_s(z=1)$  signifies “wait a lapse of time to allow the system to settle down and check if the bacterium has acquired a cytotoxic phenotype”. If the bacterium has not changed its phenotype, then the experiment *a priori* fails. Consequently the second part of the experimental scenario is rigorously sufficient to check the second formal sentence. The length of this “lapse of time” must be determined experimentally; here it stands for “as many generations later as possible”. If the bacterium has acquired an inducible phenotype, that lasts at least several generations after the external signal has been removed, then epigenesis is proven.

This formal approach was useful to suggest *in vitro* and *in vivo* experiments to test our hypothesis. It showed that the two stable attractors differ only by the amount of ExsA protein, and that, if the hypothesis is correct, no differences in the concentration of the inhibitor ExsD can lead to a change in phenotype (Fig. 3B). Thus, if a transient increase in the amount of ExsA protein can shift the system from a non cytotoxic to a stable cytotoxic state, the existence of the epigenetic switch would be demonstrated.

## **Experimental results**

### *An ExsA pulse allows to recover a stable Type III Secretory phenotype*

Experiments suggested by the formal method require pulsing ExsA by application of an external stimulus and observing the change in phenotype (if any) and its stability when the stimulus is removed. In order to pulse ExsA, we added an additional *exsA*

gene, under the control of an inducible promoter, to a non inducible *P. aeruginosa* strain PAO1. Thus, we constructed plasmid *pexsAind*. In this construction, transcription of *exsA* is under the control of the *ptac* promoter repressed by the *Lacl* protein produced in large amounts because of the presence of the *lacI<sup>q</sup>* gene[22]. Under inducing conditions (presence of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), transcriptional repression by *Lacl* is inhibited, permitting over-expression of the *exsA* gene from the *ptac* promoter. This induction is immediately released when the medium is depleted of the inducer. The most straightforward test to determine the resulting phenotype is the electrophoretic detection of the type III toxins secreted *in vitro* after bacteria have been submitted to calcium depletion.

Strain PAO1 used in this study was described as unable to induce death of human polymorphonuclear neutrophils through the TTSS [23], and is non inducible (does not produce type III toxins). This strain was transformed with *pexsAind*. In the absence of inducer it produced no, or very little, toxin after 3 hours of culture in calcium-depleted medium (Fig. 4A, lane 3). Strain CHA, a cytotoxic strain that secretes large amounts of toxins ExoS and ExoT[23], was used as a positive control (Fig. 4A, lane 1). The presence of IPTG during the 3 h of growth (not shown) or for a 20 min pulse before the 3 h culture (Fig. 4A, lane 4) results in substantial toxin production. We observed this epigenetic switch from a culture grown in Luria Berani medium (LB) without EGTA after the ExsA pulse up to 6 hours (about 7 generations), before the leakiness of the construct became a drawback (Fig. 4B, lane 1 vs 3). The secretory phenotype, under calcium depletion, acquired by PAO1 (*pexsAind*) is therefore stable for about 10 generations, including the induction time, after the transient increase of ExsA production. In contrast, a CHA ExsA<sup>-</sup> mutant (CHA-D1) transformed with *pexsAind* did not produce toxins absence of IPTG nor after a 20 min pulse (Fig. 4A, lane 6-7).

Secretion of type III toxins from this strain was only obtained when IPTG was present in the medium all along the calcium depletion (Fig. 4A, lane 8). This shows that induction of toxin secretion by a 20 min pulse in strain PAO1 was not an artefact. Leakiness of the construct or noise, high production of protein ExsA upon a 20 min IPTG pulse (the *exsA* gene is on a high-copy-number plasmid and under the control of a strong promoter), or even persistence of some IPTG in the culture medium after 3 h of growth cannot be responsible for toxin secretion. Whatever the remaining production or presence of ExsA protein in the bacteria after four generations without IPTG, it is not high enough to promote toxin secretion by itself.

*PAO1 (pexsAind) acquires an in vivo type III cytotoxicity after a transient increase of ExsA.*

A clinical correlation between type III secretory protein phenotype and lung injury severity has previously been shown[24,25]. Indeed, unlike the wild type strain CHA, an *exsA* null mutant induces no increase of protein concentration in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) during the infection[26]. Therefore, we examined, through an acute pulmonary infection model, the cytotoxicity of PAO1 carrying or not *pexsAind*. Strains were pulsed or not with IPTG during 20 min, washed and then cultivated in tryptic soy broth before infection. The injury of the alveolar capillary barrier was estimated by the amount of proteins recovered in the BALF (Fig. 5). A bacterial inoculum of  $10^8$  CFU/ml, strain PAO1 (*pexsAind*) treated with an IPTG pulse, led to a higher quantity of proteins ( $1.6 \pm 0.2$  g/dL) compared to the wild type strain ( $0.4 \pm 0.03$  g/dL) even if the latter was injected at a ten times lower inoculum ( $1.04 \pm 0.21$  g/dL for PAO1 at  $2 \cdot 10^9$  CFU/ml, data not shown). The non pulsed PAO1 (*pexsAind*) strain showed protein level ranging between the pulsed and

the wild type strain which was significantly different. But this strain showed no significant difference with the wild type strain injected at a ten times higher inoculum. Although results obtained with the non pulsed strain PAO1 (pexsAind) remained unclear, this experiment illustrated the stable acquisition of cytotoxicity by a transient increase of the main transcriptional regulator, ExsA.

## Discussion

Despite a functional wild-type genomic background, some *P.aeruginosa* strains are unable to develop a type III dependent cytotoxicity except with an over-expression, *in trans*, of the transcriptional activator of this virulence system, ExsA [8]. We proposed to call these strains non-inducible for type III cytotoxicity. This observation and the presence of a positive feedback loop regulating the expression of *exsA* led us to hypothesize the possibility of an epigenetic mechanism in the acquisition of an inducible type III dependant cytotoxicity in *P.aeruginosa*. Indeed a positive feedback circuit in a biological regulatory network is consistent with the existence of multiple steady states (phenotypes) for a system (genotype) in a given environment. With the help of generalised logic and a formal computer approach we designed a minimal model of *P.aeruginosa* type III basic regulation under calcium depletion and established the consistency of the hypothesis of an epigenetic acquisition of an inducible type III cytotoxicity. Next, we engineered an *exsA* inducible gene. With this construction, we demonstrated that the acquisition of the secretory phenotype after a transient signal relies on the presence of the feedback loop of the auto regulated *exsA* gene in agreement with the model of the system. A stable acquisition of *in vivo* inducible type III cytotoxicity by this transient increase in a non inducible strain was

also observed.. The epigenetic hypothesis also involves that the reverse transformation from inducible to non inducible type III cytotoxicity, as evidenced in the lungs of cystic fibrosis patients with lasting infection, is the reverse epigenetic switch. Since the *exsA* gene added *in trans* was under the control of the inducible promoter, *ptac*, we have experienced leakiness or noise. This phenomenon, ubiquitous in biological systems, is responsible for cell-to-cell variation in gene expression[27]. It has been shown to be the cause of population bimodal heterogeneity, when coupled with a feedback circuit responsible for multistationarity, for instance in the repartition of lytic/temperate phages in the population upon infection of *E.coli* by bacteriophage- $\lambda$ [28]. In some individuals in the population bearing *pexsA*ind such a noise-dependant switch could be responsible for the slight activity observed in experiments *in vitro* (Fig. 4B, lane 3) and the *in vivo* increase of cytotoxicity of non induced PAO1 (*pexsA*ind). Thus, during an infection, cell-to-cell variability in gene expression due to noise, together with external stimuli could induce the switch for an epigenetic acquisition of a type III cytotoxicity in some individuals in the population, these individuals can therefore overcome the host's defense and take over the bacterial population. Although this does not prove that this is the mechanism involved to acquire or lose type III cytotoxicity during infection, the results obtained *in vivo* make the epigenetic hypothesis very likely. However, this hypothesis does not necessarily apply to the cytotoxicity of other bacteria, nor to mucoidy in *P. aeruginosa* for which an epigenetic acquisition had been proposed[18]. In each case, the hypothesis must be tested, first by modeling then experimentally.

## Conclusion

These *in vitro* and *in vivo* experiments, in accordance to the predictions of the formal method, indicate that a stable acquisition of a phenotypic trait involved in the pathogenicity of *P. aeruginosa* can arise from an epigenetic switch. Direct therapeutic consequences could arise for *P. aeruginosa* infections especially in cystic fibrosis. Any therapy inhibiting the type III regulon would reduce the pathogenicity of the bacteria and the severity of the infection. If the acquisition of the inducibility of type III secretory phenotype is due, as it appears, to bistability, a reduction of ExsA activity below the triggering threshold would be sufficient to impede the positive feedback circuit leading to reversion of the type III secretory phenotype and reduction of the pathogenicity of the bacteria. According to the hypothesis that planctonic type III secreting form of *P. aeruginosa* is responsible for early and invasive phases of the infection[29-31], such a therapy would improve antibiotic performance and other treatments to eradicate the infection or limit spreading.

## Materials and Methods

### *Bacterial strains and growth conditions.*

*Pseudomonas aeruginosa* strains used in this study were: CHA, a cytotoxic isolate from a cystic fibrosis patient[32] which secretes toxins under inducing condition for the type III secretion system[23]; PAO1, a noncytotoxic strain widely used in laboratory studies; PAO1 ExsA<sup>-</sup>, an isogenic mutant of PAO1 unable to synthesize ExsA. PAO1 ExsA<sup>-</sup> was obtained using a mutation method based on *sacB* negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling[33]. Strains were routinely grown in Luria-Bertani broth (LB), Tryptic Soy Broth (TSB) or plated on PIA (*Pseudomonas*

Isolation Agar, Difco, France). The *pexsA*ind plasmid was introduced into PAO1 and its isogenic mutant by electroporation and maintained with 300 µg of carbenicillin/ml.

#### *Construction of an inducible exsA gene.*

The *exsA* gene was amplified by PCR using the high fidelity polymerase PfuUltra (Stratagene) with *P. aeruginosa* chromosomal DNA as the template and primers EXSAS and EXSAR (see table 1). Their 5' termini contain *EcoRI* and *HindIII* restriction sites, respectively. PCR products were ligated into pCR®-Blunt II-TOPO® vector (Invitrogen). The *EcoRI-HindIII exsA* fragment from this plasmid was inserted into pTTQ18[22], digested by the same enzymes. This inducible system was amplified from pTTQ18*exsA* with the Xbaptac and Kpnlaclq primers (see table 1), carrying *XbaI* and *KpnI* restriction sites, respectively, and inserted into the vector pCR®-Blunt II-TOPO®. For the final construct, *pexsA*ind, the *XbaI-KpnI* fragment from the previous vector containing *exsA* was ligated into pUCP20[34], a high-copy-number shuttle vector for *P. aeruginosa*.

#### *SDS PAGE.*

Bacteria were cultivated in LB broth overnight, diluted to  $1.2 \times 10^8$  cfu/ml in LB supplemented or not supplemented with 1mM IPTG and incubated with aeration for 20 min at 37°C. Then, bacteria were spun down, washed twice in LB and grown with aeration for 3 h at 37°C in the presence or absence of 1mM IPTG in conditions of calcium depletion: LB medium supplemented with 5mM EGTA and 20mM MgCl<sub>2</sub> (inducing conditions known to induce secretion of type III toxins *in vitro*[35]). Bacterial densities were determined by optical density measurement at 600nm. Cultures were spun down, and proteins in the supernatant were precipitated by perchloric acid

(precipitated volume was normalised to  $9 \times 10^8$  cfu) and washed with acetone. Proteins were separated on a 12% SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue. In the secretion experiment with a delay between the IPTG pulse and calcium depletion (figure 4B), bacteria were pulsed with 1mM IPTG for 20 min then washed with LB. Next, they were maintained in exponential phase of growth by serial dilution with fresh medium during a definite time before calcium depletion.

#### *Animals and infection model*

Specific pathogen-free Sprague Dawley rats (n=40) (280-320g), (Charles River Laboratoires France, St Germain/l'Arbresle, France) were housed in the Lille University Animal Care Facility and allowed food and water *ad lib*. All experiments were performed with approval of the Lille Institutional Animal Care and Use Committee. *P. aeruginosa* strains were cultivated in Tryptic Soy Broth (TSB) broth overnight, diluted to  $1.2 \times 10^8$  cfu/ml in TSB supplemented or not supplemented with 1mM IPTG and incubated with aeration for 20 min at 37°C. Cultures were then centrifuged, washed twice and grown with aeration at 37°C in tryptic soy broth medium. After 3 hours, bacteria were washed and resuspended in physiological serum to reach a final concentration of  $10^8$  or  $2 \times 10^9$  cfu/ml evaluated by spectrophotometry. Acute lung injury was produced according to the method described by Pennington and Ehrie[36]. Under short anaesthesia, a small midline incision was made on the neck ventral surface after swabbing it with ethanol. The trachea was exposed by blunt dissection. Using a 28-gauge needle, 0.5 ml/kg of bacterial suspension was instilled into the trachea, followed by injection of 0.5 ml of air[37,38]. The animals were studied 24 h after instillation of the bacteria.



### *Bronchoalveolar lavage (BAL)*

Bronchoalveolar lavage was performed by cannulating the trachea. Lungs from each experimental group were washed with a total of 20 ml in 5-ml aliquots of PBS with 3 mM EDTA. The returned fluid was pooled and centrifuged (200g for 10 min). BAL fluid (BALF) samples were filtered and immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  after collection. Protein concentration in the BALF was measured with an automated analyzer (Hitachi 917, Japan).

### **Authors' contributions**

DF participated to the design of the study, carried out the microbiological and animal experiments and drafted the manuscript. RL carried out animal experiments. BG carried out animal experiments and drafted the manuscript. JFGM proposed the model while GB and JPC designed and performed computer studies and draft the manuscript. AM, BP, JFGM conceived the study and participated to its design and coordination and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the “association Vaincre la Mucoviscidose”. We thank L. Quénee for technical assistance and Professors F. Morel and F. Molina, and the members of the epigenomic workshop in genopole for helpful discussions.

### **References**

1. Govan JR, Harris GS: **Pseudomonas aeruginosa and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis.** *Microbiol Sci* 1986, **3**:302-308.

2. Hueck CJ: **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:379-433.
3. Frank DW: **The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Mol Microbiol* 1997, **26**:621-629.
4. McCaw ML, Lykken GL, Singh PK, Yahr TL: **ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon.** *Mol Microbiol* 2002, **46**:1123-1133.
5. Dasgupta N, Lykken GL, Wolfgang MC, Yahr TL: **A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system.** *Mol Microbiol* 2004, **53**:297-308.
6. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ: **ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:8006-8011.
7. Urbanowski ML, Lykken GL, Yahr TL: **A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:9930-9935.
8. Dacheux D, Attree I, Toussaint B: **Expression of ExsA in *trans* confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates.** *Infect Immun* 2001, **69**:538-542.
9. Jain M, Ramirez D, Seshadri R, Cullina JF, Powers CA, Schulert GS, Bar-Meir M, Sullivan CL, McColley SA, Hauser AR: **Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:5229-5237.
10. Novick A, Wiener M: **Enzyme induction is an all-or-none phenomenon.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1957, **43**:553-556.

11. Cohn M, Horibata K: **Inhibition by glucose of the induced synthesis of the b-galactoside-enzyme system of *Escherichia coli*. Analysis of maintenance.** *J Bacteriol* 1959, **78**:601-611.
12. Ozbudak EM, Thattai M, Lim HN, Shraiman BI, van Oudenaarden A: **Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*.** *Nature* 2004, **19;427**:737-740.
13. Thomas R: **On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations.** *Springer Series in Synergies* 1980, **9**:180-193.
14. Thomas R: **Laws for the dynamics of regulatory networks.** *Int J Dev Biol* 1998, **42**:479-485.
15. Soulé C: **Graphic requirement for multistationarity.** *ComplexUs* 2003, **1**:123-133.
16. Angeli D, Ferrell JE, Jr., Sontag ED: **Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:1822-1827.
17. Kaufman M, Thomas R: **Emergence of complex behaviour from simple circuit structures.** *C R Biol* 2003, **326**:205-214.
18. Guespin-Michel JE, Kaufman M: **Positive feedback circuits and adaptive regulations in bacteria.** *Acta Biotheor* 2001, **49**:207-218.
19. Snoussi EH, Thomas R: **Logical identification of all steady states: the concept of feedback loop characteristics states.** *Bull Math Biol* 1993, **57**:277-297.
20. Thomas R, d'Ari R: *Biological feedback*. CRC Press; 1990.
21. Bernot G, Comet JP, Richard A, Guespin J: **Application of formal methods to biological regulatory networks: extending Thomas' asynchronous logical approach with temporal logic.** *J Theor Biol* 2004, **229**:339-347.

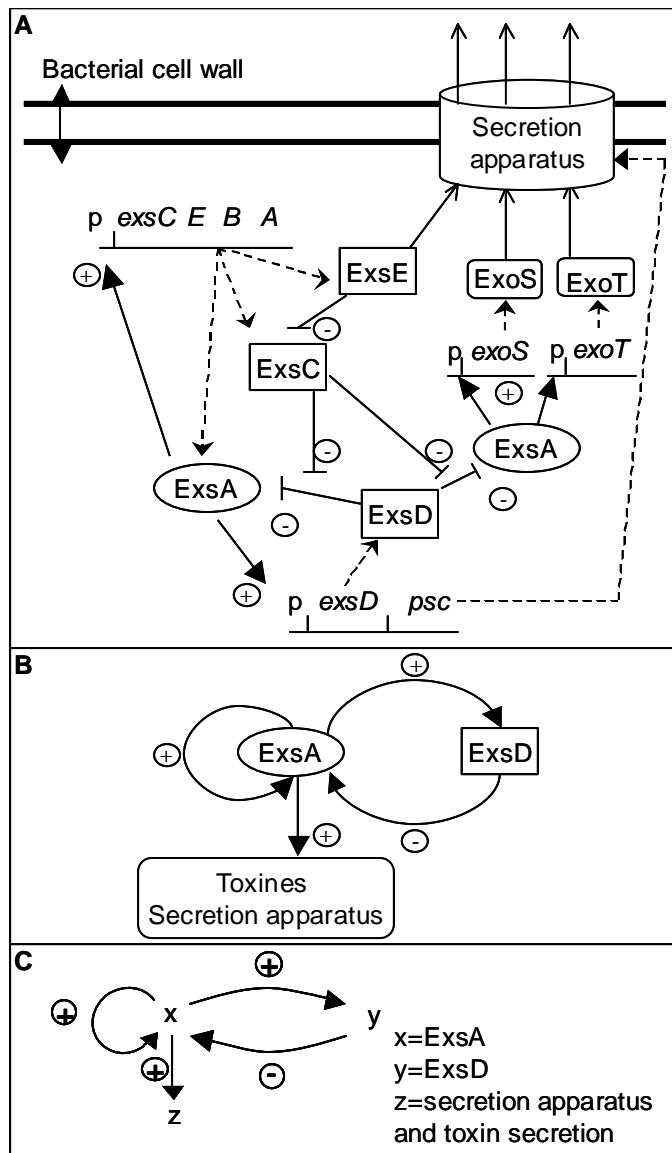
22. Stark MJ: **Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in Escherichia coli.** *Gene* 1987, **51**:255-267.
23. Dacheux D, Attree I, Schneider C, Toussaint B: **Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system.** *Infect Immun* 1999, **67**:6164-6167.
24. Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, Sawa T, Frank DW, Wiener-Kronish JP: **Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections.** *J Infect Dis* 2001, **183**:1767-1774.
25. Hauser AR, Cobb E, Bodí M, Mariscal D, Vallés J, Engel JN, Rello J: **Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Crit Care Med* 2002, **30**:521-528.
26. Ader F, Le Berre R, Faure K, Gosset P, Epaulard O, Toussaint B, Polack B, Nowak E, Viget NB, Kipnis E et al.: **Alveolar Response to *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the Type III Secretion System.** *Infect Immun* 2005, **73**:4263-4271.
27. Ozbudak EM, Thattai M, Kurtser I, Grossman AD, van Oudenaarden A: **Regulation of noise in the expression of a single gene.** *Nat Genet* 2002, **31**:69-73.
28. Arkin A, Ross J, McAdams HH: **Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage lambda-infected *Escherichia coli* cells.** *Genetics* 1998, **149**:1633-1648.
29. Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Yoon SS, Hilliard GM, Parvatiyar K, Kamani MC, Wozniak DJ et al.: **Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic**

- treatment strategies and drug targets.** *Adv Drug Deliv Rev* 2002, **54**:1425-1443.
30. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ: **Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo.** *Infect Immun* 2005, **73**:1706-1713.
31. Corech R, Rao A, Laxova A, Moss J, Rock MJ, Li Z, Kosorok MR, Splaingard ML, Farrell PM, Barbieri JT: **Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:3956-3962.
32. Toussaint B, Delic-Attree I, Vignais PM: ***Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **196**:416-421.
33. Quenee L, Lamotte D, Polack B: **Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Biotechniques* 2005, **38**:63-67.
34. West SEH, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ: **Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Gene* 1994, **128**:81-86.
35. Hovey AK, Frank DW: **Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon.** *J Bacteriol* 1995, **177**:4427-4436.
36. Pennington JE, Ehrie MG: **Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during immunosuppression.** *J Infect Dis* 1978, **137**:764-774.
37. Viget NB, Guery BP, Ader F, Nevriere R, Alfandari S, Creuzy C, Roussel-Delvallez M, Foucher C, Mason CM, Beaucaire G et al.: **Keratinocyte growth factor protects against *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L1199-L1209.

38. Le Berre R, Faure K, Fauvel H, Viget NB, Ader F, Prangere T, Thomas AM, Leroy X, Pittet JF, Marchetti P et al.: **Apoptosis inhibition in *P. aeruginosa*-induced lung injury influences lung fluid balance.** *Intensive Care Med* 2004, **30**:1204-1211.

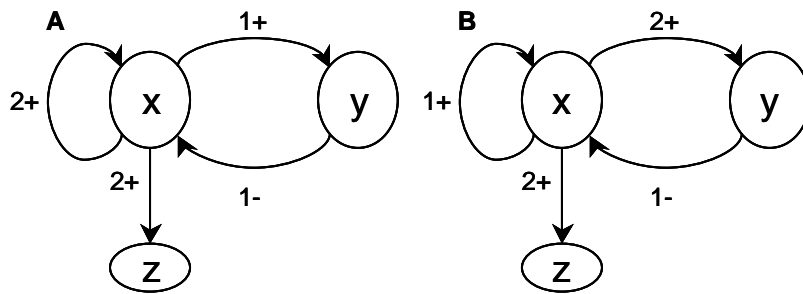
**Table 1.** PCR primers used, restriction sites are in bold.

| Name     | Primers                                    | Description                     |
|----------|--|---------------------------------|
| EXSAS    | 5'-CC <b>GAATTC</b> TTATAATATGCAAGGAG-3'   | Amplification of <i>exsA</i>    |
| EXSAR    | 5'-GG <b>AAGCTT</b> TCAAAAACGTCAGTTA-3'    |                                 |
| Xbaptaq  | 5'-CG <b>TCTAG</b> ATTGACAATTCATCGCCTCG-3' | Amplification of <i>exsAind</i> |
| KpnIacIq | 5'-GG <b>TACCT</b> CACTGCCCGC TTTCCAGT-3'  |                                 |

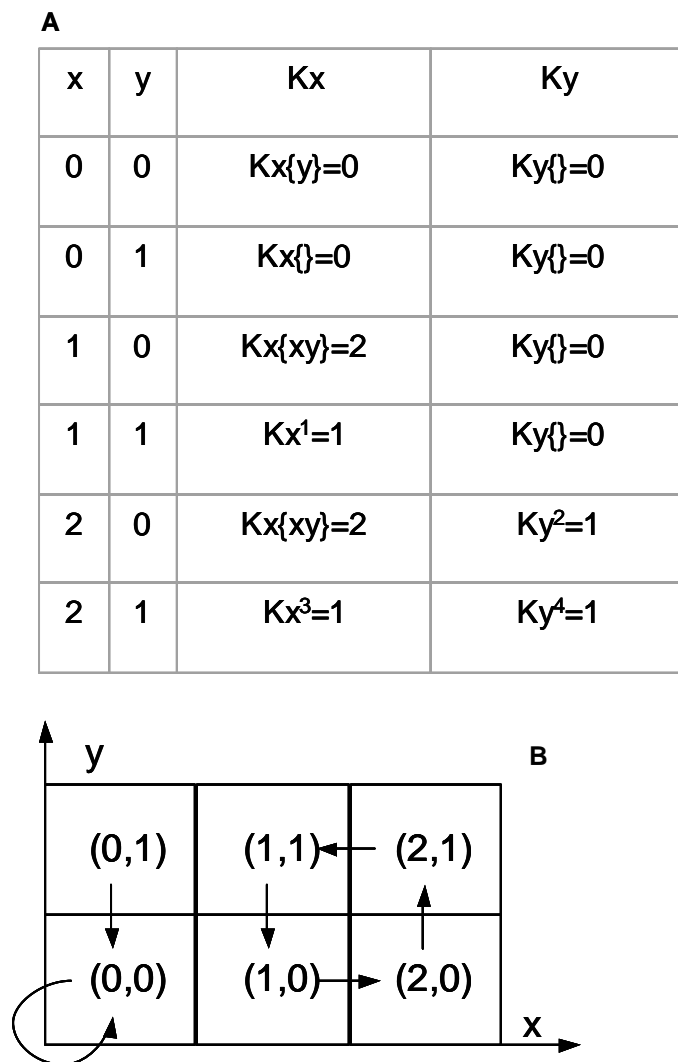


**Figure 1.** Models of the Regulation of the TTSS. (A) The regulatory network of the type III secretion system. Regulators encoded outside of the ExsA regulon are not shown. Filled arrows and dashed lines represent positive or negative interactions respectively, dotted lines stand for transcription and translation, opened arrows represent the secretion of proteins. (B) The molecular sub-network drawn here only shows interactions involved in feedback circuits: autoregulation of *exsA*, activation by ExsA of the operons involved in the cytotoxic response, and the inhibition of ExsA by ExsD. Induction of secretion and expression of cytotoxicity by the target, or by calcium depletion, is considered constant and is therefore not indicated. Other regulations of the *exsA* gene are not represented. (C) The minimal regulatory graph extracted from the molecular graph. The three variables are  $x = \text{ExsA}$ ,  $y = \text{ExsD}$  (the ExsA inhibitor), and  $z = \text{type III secretory apparatus and toxin secretion}$ . The four arrows represent autoregulation of the *exsA* gene ( $x \rightarrow x$ ), transcriptional activation of the *exsD* gene by protein ExsA ( $x \rightarrow y$ ), transcriptional activation of the genes involved in type III secretory system ( $x \rightarrow z$ ), and inhibition of ExsA by ExsD ( $y \rightarrow x$ ).

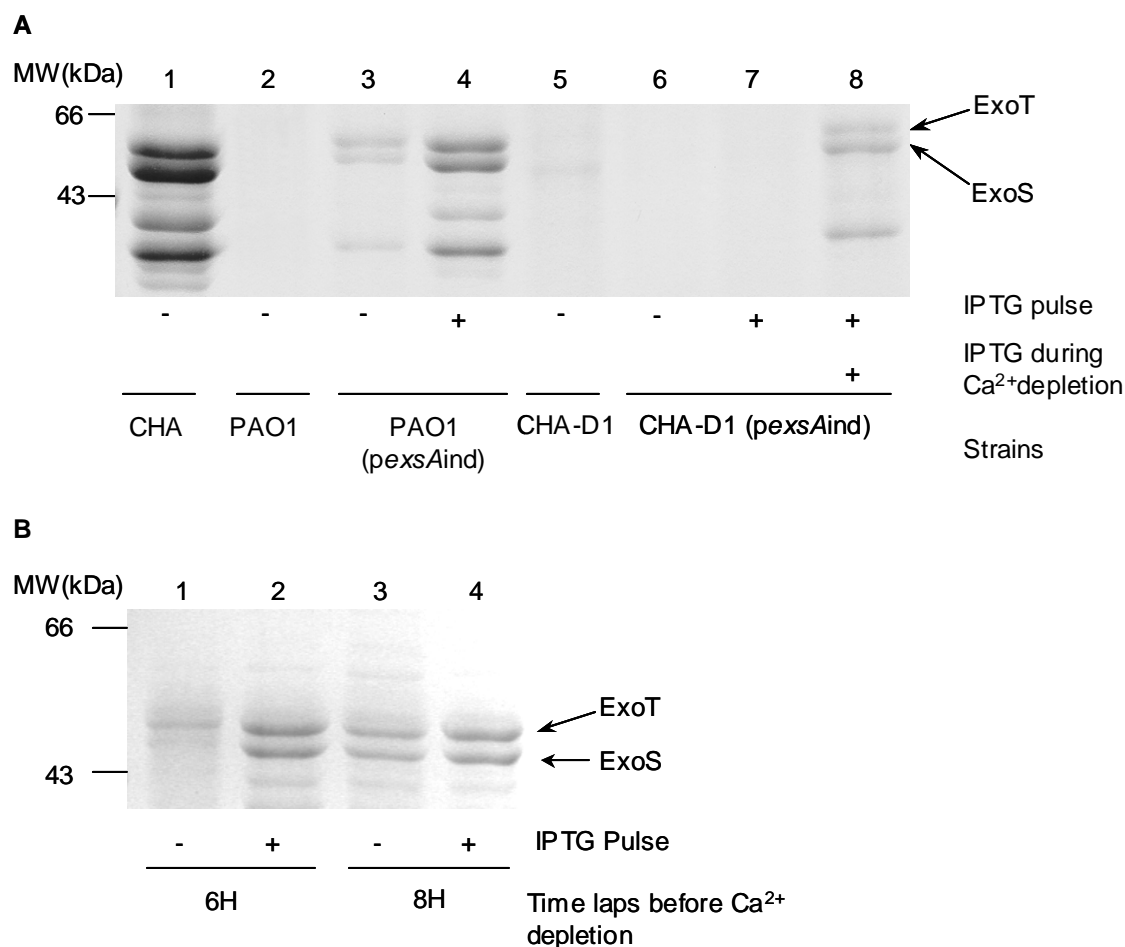




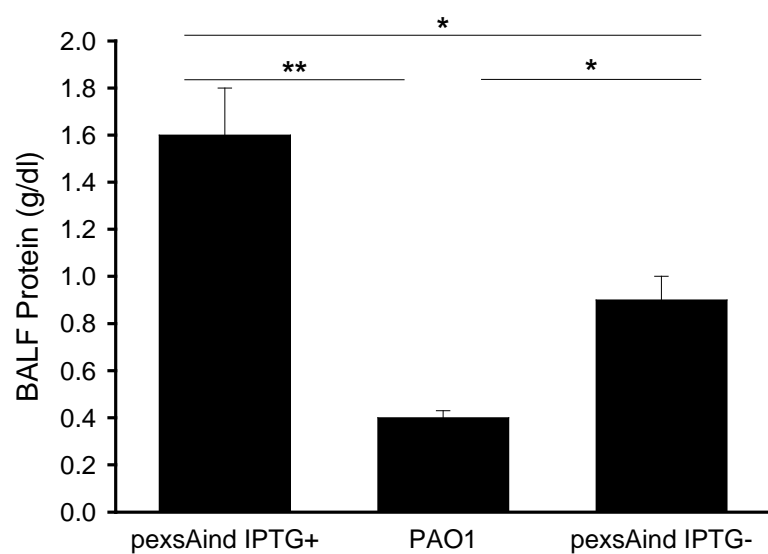
**Figure 2.** Underlying dynamics depend on the values of interactions thresholds and on the parameters values. The labels of the vertices indicate the sign of the interaction and its threshold. As these thresholds are almost always unknown, value 1 means only that the corresponding threshold is the lowest one, and value 2 that it is the second lowest threshold. Two different graphs must then be drawn depending on which promoter is more sensitive to ExsA. (A) In this case, the threshold above which x is active on x is higher (level 2) than that above which it is active on y (level 1). (B) represents the reverse case. z is an output element whose level is determined by the value of x: low values of x will lead to negligible amounts of z, while high values of x will lead to high levels of z.



**Figure 3.** One result from *SMBioNet* in accordance with the epigenetic hypothesis of the regulatory graph. *SMBioNet* provides a graphical interface that allows the user to define a regulatory graph and to edit temporal properties. *SMBioNet* exhibits all sets of parameters which satisfy the properties. Consistency is thus established if and only if at least one set of parameters is selected by *SMBioNet*. (A) Parameter table. The two first columns list all possible states of the network according to genes  $x$  and  $y$ . The third column gives the  $Kx,w$  parameters which define the expression level towards which  $x$  tends to evolve. Note that  $w$  represents all the positive regulatory effects that are active on  $x$  (including the lack of active negative effects). Here,  $w$  reflects the effects of  $x$ , if its value is higher than the activity thresholds indicated in the graph, and the effects of  $y$ , if its value is lower than the activity threshold. The fourth column similarly gives the  $Ky,w$  parameters which define the expression level towards which  $y$  tends to evolve. (B) State transition graph. The dynamics of the model are deduced from the values of the parameters *via* a desynchronisation algorithm[21].



**Figure 4.** Secretion profiles of various *P. aeruginosa* strains induced for type III secretion. Coomassie blue-stained SDS-PAGE of TTSS secreted proteins. ExoS and ExoT toxins, the most abundant type III-related exoproducts[3], are indicated on the right side of the gel. IPTG was used at 1mM. (A) Lane 1, CHA; lane 2, PAO1; lanes 3 and 4, PAO1 (pexsAind) without or with a 20 min IPTG pulse; lane 5, PAO1 ExsA<sup>-</sup>; lanes 6 and 7, PAO1 ExsA<sup>-</sup> (pexsAind) without or with a 20-min IPTG pulse; lane 8, PAO1 ExsA<sup>-</sup> (pexsAind) with a 20 min IPTG pulse and with IPTG during the calcium depletion. (B) PAO1 (pexsAind) was pulsed or not with 1mM IPTG during 20 min then wash with fresh LB. Next, bacteria were maintained in exponential phase of growth by serial dilution with fresh medium during a definite time before calcium depletion as indicated below the gel.



**Figure 5.** Epigenetic acquisition of *in vivo* type III cytotoxicity. Protein levels measured in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in the three experimental groups: PAO1 pexsAind ( $10^8$  CFU/ ml) with 1 mM IPTG Pulse (pexsAind IPTG+) or not (pexsAind IPTG-), PAO1 ( $10^8$  CFU/ ml). Proteins levels are significantly different between each group. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.0001$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SE.

## Résumé

*Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable d'infections graves chez les personnes immunodéprimées, les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose. Cette pathogénicité repose sur de nombreux facteurs de virulence dont le système de sécrétion de type III (SSTT). Ce système est activé par le contact de la bactérie avec une cellule ou une déplétion calcique et permet l'injection de toxines directement dans le cytoplasme de la cellule cible. Différents phénotypes ont été observés pour ce facteur de virulence lors d'une infection pulmonaire chronique chez des patients atteints de mucoviscidose : un phénotype dit inductible par le contact cellulaire ou la déplétion calcique et un phénotype dit non inductible. En l'absence de mutations des gènes constituant le SSTT, cette dualité de phénotype peut être envisagée sous un aspect épigénétique.

A l'aide d'un outil informatique, nous avons déterminé l'ensemble des dynamiques possibles d'un modèle restreint du SSTT supportant l'hypothèse de bistabilité et mis en évidence l'existence possible d'un phénomène d'épigénèse pour l'inductibilité de ce facteur de virulence. Grâce à cette méthode nous avons également pu définir les expériences permettant de tester cette hypothèse. Ainsi, nous avons démontré qu'une modification épigénétique pouvait être à l'origine d'une acquisition stable de l'inductibilité du SSTT *in vitro* par déplétion calcique. Ce changement héréditaire de phénotype a également été confirmé, *in vivo*, à l'aide d'un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez le rat.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence que le SSTT est réprimé à densité cellulaire élevée. Cette inhibition est induite par un signal produit et sécrété par *P. aeruginosa*. L'utilisation de mutants délétés des gènes *lasI* et *rhII*, déficients pour la production de PAI1 et PAI2, a permis de montrer que ces signaux connus du quorum sensing chez ce pathogène ne sont pas impliqués dans cette répression. De même, le facteur de transcription RpoS, qui gouverne de nombreux processus à densité cellulaire élevée, en relation avec le quorum sensing, ne semble pas être un acteur direct de ce mécanisme de régulation. Ainsi, l'expression du SSTT dépend de la densité bactérienne et la répression à densité cellulaire élevée de ce facteur de virulence est induite par un mécanisme de type quorum sensing non connu.

Mots clé : *Pseudomonas aeruginosa*, pathogénicité, système de sécrétion de type III, multistationnarité, épigénèse, quorum sensing