



**HAL**  
open science

# Caractérisation fonctionnelle et mécanisme de l'inhibition de ExsA, régulateur clef du Système de Sécrétion de Type III de *Pseudomonas aeruginosa*.

Julie Thibault

► **To cite this version:**

Julie Thibault. Caractérisation fonctionnelle et mécanisme de l'inhibition de ExsA, régulateur clef du Système de Sécrétion de Type III de *Pseudomonas aeruginosa*.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00461581

**HAL Id: tel-00461581**

**<https://theses.hal.science/tel-00461581>**

Submitted on 5 Mar 2010

**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.

UNIVERSITE DE GRENOBLE

THESE

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE  
Discipline: Virologie, Microbiologie, Immunologie  
Présentée et soutenue publiquement par  
Julie THIBAUT  
le 8 Janvier 2010

**Caractérisation fonctionnelle et mécanisme de l'inhibition  
de ExsA, régulateur clef du Système de Sécrétion de Type III  
de *Pseudomonas aeruginosa*.**

JURY

Dominique SCHNEIDER	Président
Sophie de BENTZMANN	Rapporteur
Claude PARSOT	Rapporteur
William NASSER	Examineur
Ina ATTREE	Examineur
Sylvie ELSÉN	Examineur

Thèse préparée dans le laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés,  
iRTSV, Commissariat à l'Energie Atomique,  
17 rue des Martyrs, 38054 GRENOBLE Cedex 9, France  
UMR 5092, CEA/CNRS/UJF

# TABLE DES MATIERES

PRESENTATION ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....	9
CHAPITRE I <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ET VIRULENCE	
I. <i>P. aeruginosa</i> .....	16
I.1    Génome.....	16
I.2    Mode de vie.....	18
II.    Pouvoir pathogène pour l'homme .....	20
II.1    Un pathogène opportuniste et multirésistant.....	20
II.2    Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> .....	22
II.2.1    Les facteurs impliqués dans la motilité et l'adhérence. ....	23
II.2.2    Les facteurs de virulence associés à la formation de biofilm et l'infection chronique.....	26
II.2.3    Les principaux facteurs de virulence extracellulaires impliqués dans la phase d'infection aiguë.....	27
III.    Les systèmes de sécrétion. ....	28
III.1    SST1.....	29
III.2    SST2.....	29
III.3    SST5.....	30
III.4    SST6.....	32
IV.    Le Système de Sécrétion de Type III (SST3).....	33
IV.1    L'injectisome .....	34
IV.1.1    Le sécréton.....	35
IV.1.2    L'aiguille de sécrétion.....	36
IV.1.3    Le translocon.....	37
IV.2    Les toxines du SST3 .....	38
CHAPITRE II REGULATION DU SST3	
I. Régulation spécifique.....	43
I.1    Organisation génétique du SST3.....	43
I.2    Induction du SST3.....	45
I.3    La transcription des gènes du SST3 est couplée à l'activité de sécrétion: rôle des protéines ExsE, C, D.....	47
I.4    PtrA ( <i>Pseudomonas</i> Type II repressor A) .....	50
II.    Régulation Globale .....	52
II.1    Régulation réciproque du SST3 avec les autres facteurs de virulence .....	52
II.1.1    La voie de signalisation GacA/GacS/RsmYZ, RetS et LadS.....	52
II.1.2    Implication du régulateur global Vfr et de l'AMPc .....	55
II.1.3    Le Quorum –Sensing (QS) .....	57
II.1.4    MvaU/MvaT.....	59
II.1.5    La voie SadA/SadR/SadS (RocA1/RocR/RocS).....	60
II.2    Lien entre le stress, le métabolisme, RpoS.....	61
III.    Les cascades de couplage « Sécrétion/ Synthèse » chez <i>Shigella Flexneri</i> et <i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium. ....	64

III.1	<i>Shigella flexneri</i> .....	64
III.2	<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium.....	67
III.3	Implication des régulateurs transcriptionnels de type AraC/XylS.....	70

## CHAPITRE III LES REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS DE TYPE AraC/XylS

<b>I.</b>	<b>Relation Structure/Fonction.</b> .....	<b>73</b>
I.1	Evolution .....	73
I.2	Le domaine caractéristique de liaison à l'ADN, « 2HTH » .....	74
I.2.1	Organisation.....	74
I.2.2	Activité.....	77
I.2.2.1	Fixation et courbure de l'ADN.....	77
I.2.2.2	Activation de la transcription.....	78
I.3	Le domaine régulateur non conservé.....	79
I.3.1	Fixation du ligand .....	79
I.3.2	La dimérisation.....	79
I.3.3	Effet du domaine N-terminal sur la fixation à l'ADN du domaine « 2HTH »... ..	81
I.3.4	Interaction avec l'ARN polymérase. ....	81
I.4	La région charnière. ....	82
<b>II.</b>	<b>Fonctions activatrice et/ou répressive</b> .....	<b>84</b>
II.1	Les sites de fixation.....	84
II.2	Modèle d'activation de la transcription.....	87
II.2.1	Recrutement de l'ARN polymérase.....	88
II.2.2	Pré-recrutement de l'ARN polymérase. ....	88
II.2.3	Anti-répresseur.....	89
II.3	Activité de répression.....	90
II.3.1	Formation d'une boucle d'ADN (DNA-looping).....	90
II.3.2	Encombrement stérique .....	91
II.3.3	Inhibition de l'étape d'isomérisation. ....	91
<b>III.</b>	<b>Régulation des protéines de type A/X</b> .....	<b>92</b>
III.1	Synthèse/dégradation.....	92
III.2	Fixation de ligands.....	93
III.2.1	Les ligands non protéiques.....	93
III.2.2	Les ligands protéiques.....	95

## CHAPITRE IV MATERIELS ET METHODES .....100

<b>I.</b>	<b>Souches, plasmides et oligonucléotides.</b> .....	<b>100</b>
<b>II.</b>	<b>Microbiologie et biologie cellulaire</b> .....	<b>104</b>
II.1	Conditions de culture .....	104
II.2	Utilisation d'antibiotiques .....	104
II.3	Induction <i>in vitro</i> du SST3 par déplétion en calcium.....	104
II.4	Préparation d'extraits cytosoliques de <i>P. aeruginosa</i> .....	105
II.5	Préparation du surnageant de culture <i>P. aeruginosa</i> . ....	105
II.6	Cytotoxicité SST3-dépendante envers les macrophages.....	105

<b>III.</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire .....</b>	<b>106</b>
III.1	Construction des plasmides .....	106
III.2	SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension- Polymerase Chain Reaction) .....	108
III.3	Mutagenèse dirigée.....	109
III.4	Transformation de <i>P. aeruginosa</i> .....	110
III.5	Conjugaison triparentale.....	110
<b>IV.</b>	<b>Techniques de biochimie.....</b>	<b>112</b>
IV.1	Mesure de l'activité $\beta$ -galactosidase.....	112
IV.2	Mesure de la fluorescence par cytométrie en flux.....	113
IV.3	Séparation des protéines par SDS-PAGE et immunodétection.....	113
IV.3.1	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	113
IV.3.2	Transfert des protéines et immunodétection .....	114
IV.4	Purification des anticorps .....	115
IV.5	Co-immunoprécipitation.....	116
IV.6	Dosages des protéines .....	117
IV.7	Surproduction des protéines et purification par chromatographie.....	118
IV.8	Chromatographie sur colonne d'exclusion de taille (SEC) .....	120
IV.9	Analyse des protéines surproduites dans le lysat cellulaire total puis dans les fractions solubles et insolubles.....	122
IV.10	Solubilité de la protéine purifiée.....	122
IV.11	Retard sur gel.....	123

## CHAPITRE V

### ETUDE DE FONCTIONNALITE DE ExsA ET DE SES DOMAINES

<b>I.</b>	<b>Découpage de ExsA en domaines fonctionnels.....</b>	<b>129</b>
<b>II.</b>	<b>Etude de la fonctionnalité de ExsA et de ses domaines par une approche <i>in vivo</i></b>	<b>132</b>
II.1	Surproduction de ExsA et de ses domaines dans le mutant $\Delta exsA$ .....	132
II.2	Surproduction de ExsA et de ses domaines dans la souche sauvage CHA .....	136
II.3	Effet de la dimérisation artificielle du domaine .....	140
	C-terminal sur son activité.....	140
II.4	Identification de la région du domaine N-terminal impliquée dans l'effet dominant négatif.....	142
II.5	Analyse l'activité transcriptionnelle de ExsA par cytométrie en flux (FACS).....	145
II.6	Effet de la surproduction des domaines des ExsA sur la cytotoxicité SST3-dépendante de <i>P. aeruginosa</i> .....	150
II.7	Conclusions de l'étude de la fonctionnalité de ExsA et .....	153
	de ses domaines par une approche <i>in vivo</i> .....	153
<b>III.</b>	<b>Etude de la fonctionnalité de ExsA et de ses domaines par une approche <i>in vitro</i></b>	<b>154</b>
III.1	Stratégie de purification .....	155
III.2	Etude de l'état oligomérique de ExsA et de ses domaines .....	159
III.2.1	Analyse des protéines purifiées par chromatographie d'exclusion de taille	159
III.2.2	Etude de l'état oligomérique de la protéine ExsA <sub>H</sub> .....	161
III.2.3	Etude de la protéine Nter <sub>H</sub> .....	165

III.2.3.1	Etude de l'état oligomérique et approche structurale. ....	166
III.2.3.2	Interaction ExsA/Nter <sub>H</sub> .....	168
III.2.4	Etude des protéines <sub>H</sub> Cter et C/EBP-Cter .....	169
III.3	Caractérisation fonctionnelle.....	170
III.3.1	Propriétés de fixation à l'ADN des protéines ExsA <sub>H</sub> et <sub>H</sub> ExsA.....	170
III.3.2	Propriétés de fixation à l'ADN des protéines Cter et <sub>H</sub> Cter .....	171
III.3.3	Fonctionnalité de la protéine Nter <sub>H</sub> .....	173
<b>IV.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>174</b>
IV.1	Rôles des domaines de ExsA et dimérisation de la protéine.....	174
IV.2	Etude l'état oligomérique <i>in vitro</i> .....	177
IV.3	L'effet dominant négatif.....	182
IV.4	Phénotype intermédiaire.....	183
IV.5	Activité des promoteurs.....	184

## CHAPITRE VI

### ETUDE DE L'INHIBITION DE ExsA PAR SON ANTI-ACTIVATEUR ExsD

I.	Mise en évidence de l'interaction directe entre ExsD et ExsA.....	188
II.	Etude de l'interaction ExsA/ExsD <i>in vitro</i> à partir des protéines purifiées indépendamment. ....	190
II.1	Purification des partenaires.....	190
II.1.1	Purification de ExsA et de ses domaine N- et C-terminaux. ....	190
II.1.2	Purification de ExsD. ....	191
II.2	Effet de la protéine purifiée ExsD sur la fixation à l'ADN de <sub>H</sub> ExsA et ExsA <sub>H</sub> <i>in vitro</i> . ....	192
II.3	Tests d'interaction à partir des protéines purifiées indépendamment. ....	193
II.3.1	SPR et ELISA.....	194
II.3.2	Analyse par SEC de la formation du complexe ExsA/ExsD.....	195
III.	Etude du complexe ExsA/ExsD et du mécanisme moléculaire d'inhibition.....	198
III.1	Co-production et co-purification de ExsA et ExsD.....	198
III.2	Etude de l'interaction entre ExsD et les domaines N- et C- terminaux de ExsA.....	202
III.3	Stœchiométrie du complexe ExsA/ExsD. ....	203
III.4	Etude du mécanisme d'inhibition.....	205
III.4.1	Propriétés de fixation à l'ADN du complexe ExsA/ExsD .....	205
III.4.2	Analyse en solution de l'effet de la sonde <i>pC</i> sur le complexe ExsA-ExsD..	207
IV.	Discussion.....	209
IV.1	Le complexe ExsA/ExsD ne se fixe pas à l'ADN. ....	209
IV.2	Les protéines purifiées indépendamment n'interagissent pas, pourquoi ? .....	212
IV.3	Etat oligomérique de la protéine ExsD. ....	213
IV.4	Comment ExsD empêche ExsA de se fixer à l'ADN ? .....	214

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I.	Conclusion .....	218
II.	Perspectives. ....	221
II.1	Etude des interactions protéine/protéine. ....	221
II.2	Les rôles particuliers de ExsE, ExsC et ExsD. ....	223
II.3	Régulation de ExsA.....	225
II.4	Régulation par ExsA.....	227
II.5	Comprendre pour mieux combattre .....	229

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### ANNEXES

#### Alignements de séquence ExsA – ExsD et homologues Manuscrit

#### Table des Figures.

Figure 1. Le pangéome de <i>P. aeruginosa</i> (Mathee <i>et al.</i> , 2008). ....	17
Figure 2. Représentation schématique des étapes de développement du biofilm. ....	20
Figure 3. Etapes et caractéristiques des infections à <i>P. aeruginosa</i> .....	21
Figure 4. Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> associés à la surface.....	26
Figure 5. Les systèmes de sécrétion et les facteurs de virulence .....	29
Figure 6. Représentation schématique du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> .....	35
Figure 7. Activité des toxines du SST3.....	39
Figure 8. Réseau de régulation du SST3 .....	43
Figure 9. Organisation génétique du SST3 .....	45
Figure 10. Modèle de la cascade de couplage "Sécrétion/Synthèse" .....	48
Figure 11. La voie de signalisation RetS/GacAS/RsmZY/RsmA.....	53
Figure 12. Régulation de l'activité et de la synthèse de Vfr.....	56
Figure 13. Régulation des facteurs de virulence par les systèmes <i>las</i> , <i>rhl</i> et PQS.....	59
Figure 14. Modèle de régulation de la transcription par l'activité de sécrétion .....	66
Figure 15. Régulation de la transcription par le complexe InvF/SicA .....	68
Figure 16. Les principaux activateurs transcriptionnels impliqués .....	69
Figure 17. Ligands protéiques et sites de fixation à l'ADN de MxiE, InvF et ExsA.....	70
Figure 18. Représentation de la structure secondaire du domaine de liaison à l'ADN d'après la séquence de la protéine AraC (logiciel PSIPRED).....	74
Figure 19. Structure tridimensionnelle de MarA en complexe avec l'ADN.....	76
Figure 20. Structure tridimensionnelle du domaine de dimérisation et.....	80
Figure 21. Séquences, structures secondaires prédites et rôles des linkers.....	83
Figure 22. Séquences de fixation des protéines ToxT et MarA .....	84
Figure 23. Les activateurs transcriptionnels de Classe I et/ou Classe II. ....	85
Figure 24. Orientation et localisation des sites de fixation sur différents promoteurs régulés par AraC (A) ou ToxT (B)(d'après, Johnson and Schleif, 2000, Withey <i>et al.</i> , 2006). ....	86
Figure 25. Interaction entre MarA et l'ARN polymérase sur des promoteurs <i>zwf</i> et <i>fpr</i> de Classe I (Dangi <i>et al.</i> , 2004)... ..	87
Figure 26. . Le Pré-Recrutement de l'ARN polymérase.....	89
Figure 27. DNA looping induit par AraC en absence d'arabinose. ....	90
Figure 28. Orientation des domaines de AraC et du bras N-terminal en absence ou présence d'arabinose (Rodgers and Schleif, 2009).....	94
Figure 29. Modèle de répression intramoléculaire : le 3-méthyl-benzoate permet la libération du domaine C-terminal de XylS (Dominguez-Cuevas <i>et al.</i> , 2008b). ....	95
Figure 30. Principe de la SOE-PCR.....	108

Figure 31. Les promoteurs du SST3 régulés par ExsA.....	129
Figure 32. Identification des domaines de ExsA et hypothèses sur leurs fonctionnalités d'après la structure et les fonctions connues .....	130
Figure 33. Activité transcriptionnelle des protéines Nter, Cter et ExsA,.....	133
Figure 34. Comparaison de la quantité de protéines Nter et ExsA surexprimées.....	135
Figure 35. Activité transcriptionnelle des protéines Nter, Cter et ExsA,.....	136
Figure 36. Activité transcriptionnelle des protéines C/EBP-Cter, Cter et ExsA, surproduites dans les souches $\Delta exsA$ <i>pC-lacZ</i> et $\Delta exsA$ <i>pG-lacZ</i> .....	141
Figure 37. Structures secondaires du domaine N-terminal de ExsA et des différentes protéines mutées correspondantes. ....	143
Figure 38. Effets des mutations du domaine N-terminal sur l'activité de la protéine ExsA endogène dans la souche CHA <i>pG-lacZ</i> . ....	144
Figure 39. Analyse de l'activité transcriptionnelle de <i>pC<sup>+</sup>-gfp</i> par cytométrie en flux.....	147
Figure 40. Comparaison de l'activité transcriptionnelle entre la souche CHA <i>pC<sup>+</sup>-gfp</i> contrôle et les souches CHA <i>pC<sup>+</sup>-gfp</i> surproduisant le domaine Nter +/- tronqué et comparaison entre deux clones d'une même souche.....	149
Figure 41. A. Effet de la surproduction de ExsA et de ses domaines sur la cytotoxicité envers les macrophages des souches CHA et $\Delta exsA$ . ....	151
Figure 42. Schéma du protocole expérimental et tableau récapitulatif des propriétés <i>in vitro</i> , des protéines étudiées.....	157
Figure 43. Profil d'éluion des protéines ExsA <sub>H</sub> , Nter <sub>H</sub> et Cter sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Superdex 200, Hiload 10/60).....	160
Figure 44. Analyse par immunoblot de l'éluion de la protéine <sub>H</sub> ExsA par SEC, en absence ou en présence de Tween 20. ....	163
Figure 45. Stabilité <i>in vitro</i> de ExsA <sub>H</sub> ,.....	164
Figure 46. Profils de digestion de la protéine Nter <sub>H</sub> en fonction des protéases, du ratio protéine:protéase et du temps d'incubation.....	168
Figure 47. Analyse par SDS-PAGE de l'éluion des protéines Nter <sub>H</sub> et ExsA sur colonne de chromatographie d'affinité au nickel.....	169
Figure 48. Analyse <i>in vitro</i> de la fixation sur la sonde <i>pC</i> .....	171
Figure 49. Fixation <i>in vitro</i> sur le promoteur <i>pC</i> des protéines <sub>H</sub> ExsA et <sub>H</sub> Cter.....	172
Figure 50. Conclusion de notre étude à propos de la fonctionnalité .....	176
Figure 51. Comparaison de l'organisation et de la fonction des domaines de ExsA entre les deux études. ....	181
Figure 52. Hypothèses proposées pour le mécanisme d'inhibition. ....	187
Figure 53. Co-immunoprécipitation d'ExsA et ExsD à partir de la souche CHA sauvage et de la souche CHA surproduisant ExsA.....	189
Figure 54. Analyse par SEC de la protéine ExsD purifiée. ....	191
Figure 55. Fixation à l'ADN de <sub>H</sub> ExsA <i>in vitro</i> seule ou en présence de ExsD.....	192
Figure 56. Récapitulatif des conditions d'interaction testées. ....	195
Figure 57. A et B Profils d'éluion des protéines ExsA <sub>H</sub> ou <sub>H</sub> Cter ou Nter <sub>H</sub> après .....	196
Figure 58. Analyse par SDS-PAGE des protéines chargées sur les colonnes de chromatographie d'affinité et des fractions d'éluion. ....	199
Figure 59. Profils et analyses par SDS-PAGE des éluions par SEC préparative puis analytique du complexe ExsA <sub>H</sub> /ExsD. ....	200
Figure 60 A et B. Profil et analyse par SDS-PAGE de l'éluion par SEC préparative de MBP-ExsA et ExsD après leur co-purification. ....	201
Figure 61. Analyse par SDS-PAGE de l'éluion des domaines N-terminal ou C-terminal de ExsA co-produits avec ExsD, sur une colonne.....	202
Figure 62. Activité de fixation à l'ADN de ExsA seule ou en complexe avec ExsD.....	205
Figure 63. Analyse par SDS-PAGE et Western Blot des éluions par SEC des protéines <sub>H</sub> ExsA, ExsD et du complexe ExsA-ExsD seuls ou en présence d'ADN.....	208
Figure 64. L'anti-activateur ExsD inhibe la fixation sur l'ADN de ExsA .....	211
Figure 65. Modèle des interactions protéines/protéines de la cascade de couplage sécrétion/synthèse et du mécanisme d'activation de la transcription par ExsA et l'ARN polymérase sur le promoteur <i>pC</i> .....	221



Je tiens à adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans l'accomplissement de ce travail, que ce soit d'un point de vue purement professionnel que dans la vie de tous les jours.

Mes remerciements à Michel Satre et François Boulay pour m'avoir accueillie et acceptée dans leur laboratoire ces cinq dernières années. Je remercie également le Cluster 10, qui a financé ces trois années de thèse.

### **Je remercie vivement les membres du jury :**

Monsieur le professeur Dominique Schneider, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Madame le Docteur Sophie de Bentzmann, vous m'avez fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse et je vous adresse toute ma reconnaissance.

Monsieur le Docteur Claude Parsot, je suis sensible à l'honneur que vous m'avez fait d'être rapporteur de cette thèse. J'ai particulièrement apprécié nos échanges à propos des « fameuses » protéines de type AraC/XylS.

Monsieur le Docteur William Nasser, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et pour les connaissances que vous m'avez apportées lors de la soutenance.

### **L'ensemble de ce travail a été réalisé au sein, avec et grâce à « l'Equipe Pseudo » :**

Sylvie, je ne sais comment te transmettre ma profonde gratitude. Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans le temps, la confiance et la patience que tu m'as accordée. Tu m'as transmis ton expérience, tes connaissances, tes compétences, à travers l'enthousiasme, la rigueur et la passion qui t'anime. Je te remercie car j'ai pu m'épanouir sur le plan scientifique et humain lors de nos innombrables discussions. Tes qualités de chercheur n'ont d'égales que tes qualités humaines. MERCI.

Ina, je t'adresse mes remerciements, ma reconnaissance et toute mon admiration. Ta confiance, ton dynamisme et ton objectivité ont facilité l'aboutissement de cette thèse, le passage des obstacles et la concrétisation des projets.

Eric, tu m'as fait découvrir les joies (et les malheurs !) de la biochimie des protéines. Tu as contribué à l'évolution et à la définition de ce travail de thèse, dès les premières « manips » jusqu'à la rédaction finale. Je te remercie pour ton soutien, ta pédagogie, ta disponibilité et ta bonne humeur.

Caroline et Sophie, je ne sais plus si notre amitié a débuté devant une centrifugeuse ou une cuve de western blot, mais je suis ravie qu'elle continue en dehors du labo et j'espère qu'elle durera encore très longtemps....

Caro, un grand merci pour ta disponibilité et ton soutien à chacun de mes questionnements à propos de biochimie, de biologie moléculaire, de biophysique et d'AKTA et pour m'avoir aidé à comprendre les méandres de l'administration de l'UJF. J'ai adoré travailler avec toi et passer ces nombreuses heures au labo en ta compagnie. Je te souhaite la concrétisation de tout tes projets professionnels et personnels. Ert bien sûr, un grand merci à Nico aussi !

Fofie, tu m'as appris à ne jamais renoncer, à toujours aller au bout des choses. Ton incroyable motivation, ta soif d'apprendre et ton enthousiasme sont de magnifiques valeurs. Je te remercie pour ton soutien jour après jour et pour la confiance que tu m'as accordé. Je vous souhaite « tout le monde bonheur du monde » avec Stéphane.

Tammy, nous avons fait de nombreuses fois la fermeture du CEA ensemble ! Un grand merci pour ta bonne humeur communicative, ton goût pour la découverte et pour nos « english moment ». A très bientôt, à Grenoble, Londres ou ailleurs ! Julien et Cédric votre bonne humeur et votre humour m'ont été d'un grand soutien pendant les moments difficiles. Bonne chance pour l'avenir, « les filles » vous laissent les clés du labo Pseudo !

### **J'adresse également mes remerciements :**

A l'ensemble des membres du laboratoire BBSI pour m'avoir accueillie si chaleureusement et pour leur gentillesse. Mention spéciale à Véronique et François pour nos nombreuses discussions devant le FACS Calibur ! Un grand merci à Viviane et Marie-Pierre pour avoir rendu ma « vie administrative » un peu plus belle.

Merci à Jean-Pierre Simorre, Isabel Ayala et Thomas Kern qui m'ont initié aux joies de la RMN. J'ai vraiment apprécié notre collaboration, même si les résultats n'ont pas été à la hauteur du travail effectué...

Tous mes remerciements à Christine Ebel et Aline Appourchaux pour avoir mener à bien les expériences d'ultracentrifugation analytique qui nous ont enfin permis de savoir que « ExsA et ExsD forment un complexe stable de ratio 1 :1 » !

Merci à Yoann Roupioz et Thierry Livache de m'avoir initié à la résonance plasmonique de surface et « l'électropolymérisation des protéines sur couche d'or »!

Je remercie mes parents de m'avoir soutenu tout au long de ces années études. Vous n'avez jamais remis en cause mes choix professionnels et personnels. Trouver dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de vos efforts pour que « je réussisse dans la vie ».

Enfin à grand merci à Mariflo, Justine, Julie, Violaine, Loïc, Patrick, Dorothée, Alex, Lucy, Paul, Julia, Pierre, Pascal, Hélène, Claire, Aurélien et Marianne pour m'avoir supporté ces trois dernières années (et les nombreuses précédentes !). Vous êtes toujours là pour moi et savez me guider et me reconforter. J'espère être une amie à la hauteur de l'amitié que vous m'accordez.

@#\$\*\*^ \_#\*\_\*\* AraC protein!"

*in AraC protein: a love-hate relationship*

*Robert Schleif, Bioessays 25(3) 274-282, 2003*



## Présentation et Objectifs des travaux de thèse.

*Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable d'infections aiguës et chroniques chez les personnes immunodéprimées. Cette bactérie est capable d'injecter des toxines directement dans le cytosol des cellules cibles (macrophages, neutrophiles et cellules épithéliales) grâce à un Système de Sécrétion de type 3 (SST3) ; ceci lui permet d'échapper au système immunitaire et favorise la destruction tissulaire de son hôte. Le SST3 joue un rôle majeur dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* et en son absence, la virulence de la bactérie est fortement atténuée dans des modèles d'infections humaines et cellulaires.

L'expression du SST3 est finement contrôlée par un réseau de régulation complexe, dont les nombreuses voies convergent vers un facteur de transcription, ExsA. Cette protéine est spécifique à ce système et elle contrôle la transcription de la totalité des gènes du SST3 en se fixant directement sur les promoteurs.

ExsA appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels de type AraC/XylS, caractérisés par un domaine de fixation à l'ADN comportant deux motifs « Hélice-Tour-Hélice ». L'activité de ces protéines est généralement régulée par la fixation d'un ligand sur un domaine supplémentaire non conservé. Les protéines de cette famille impliquées dans la régulation du SST3 possèdent la particularité d'être régulée par des ligands de nature protéique. Ainsi, l'activité transcriptionnelle de ExsA est inhibée par un anti-activateur protéique, ExsD.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, les seules données concernant le mécanisme d'activation de la transcription de ExsA était que la protéine se liait à une séquence consensus « TXAAAAXA », présente en nombre et orientation variables sur les promoteurs des opérons du SST3. L'inhibition de son activité par ExsD avait été démontrée par mutagenèse ou surproduction de l'anti-activateur *in vivo* et l'interaction directe entre les deux protéines mise en évidence par la technique du double hybride. Par contre, rien n'était connu à propos du mécanisme de cette inhibition.

L'objectif de mes travaux de thèse était:

1. **D**e caractériser les deux domaines fonctionnels de ExsA *in vivo* et *in vitro* .
2. **D**'élucider le mécanisme moléculaire grâce auquel ExsD empêche ExsA d'activer la transcription et de caractériser les interactions moléculaires entre ces deux protéines.

Pour atteindre ces objectifs, des approches fonctionnelles et structurales ont été employées :

1. **J**'ai étudié la fonctionnalité de ExsA et de ses deux domaines (entiers ou tronqués) *in vivo* dans des études de complémentation du mutant  $\Delta exsA$  et de surproduction dans la souche sauvage. De plus, la protéine ExsA et ses domaines N- et C-terminaux ont été purifiés afin de poursuivre cette étude par une approche *in vitro*. En parallèle, la résolution de la structure du domaine N-terminal de ExsA, domaine supposé d'interaction avec ExsD, a été entreprise.
2. **P**our étudier le mécanisme d'inhibition, les protéines ExsA et ExsD ont été surproduites seules ou en présence de leur partenaire protéique, puis purifiées seules ou en complexe. Ensuite, les propriétés de fixation à l'ADN de ExsA en présence de son inhibiteur ont été analysées *in vitro*.

Après une introduction permettant de mieux appréhender nos hypothèses de travail et notre démarche expérimentale, ces deux aspects de mon travail seront présentés.

# Première Partie

## Introduction





# Chapitre I. *Pseudomonas aeruginosa* et virulence

## I. *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est un bacille d'environ 1,5  $\mu\text{m}$ , à Gram négatif, largement répandue dans notre environnement (Green *et al.*, 1974). Dans le langage médical, il est appelé « bacille pyocyanique » dû à la pyocyanine, un pigment de couleur bleue aux propriétés antibiotiques.

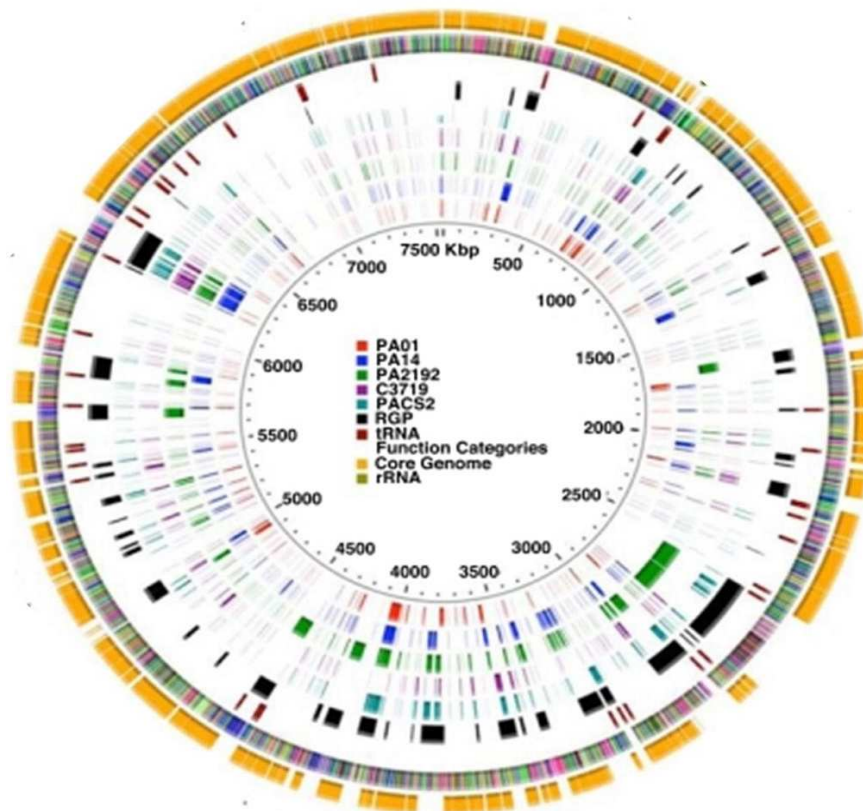
La température optimum de croissance de cette bactérie est de 37°C mais elle est aussi capable de croître entre 30°C et 42°C. Son métabolisme est respiratoire, elle utilise l'O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons mais en absence d'O<sub>2</sub>, elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Vasil, 1986). Enfin, *P. aeruginosa* est capable de métaboliser plus de 50 composés organiques ainsi que des composants inorganiques (Vasil, 1986).

L'ensemble de ces propriétés lui confère une extrême tolérance face à son environnement. *P. aeruginosa* peut ainsi vivre à l'état de saprophyte dans l'eau, le sol, les végétaux, les solutions antiseptiques et sur des surfaces inorganiques (Green *et al.*, 1974, Floret, 2009 #162). Elle vit également dans le tube digestif et sur la peau des mammifères. C'est un pathogène opportuniste qui peut infecter un large spectre d'hôtes (humain, souris, insectes, nématodes, plantes, et amibes) (D'Argenio *et al.*, 2001; Rahme *et al.*, 1995).

### I.1 Génome

Depuis le séquençage du génome de 6,3Mb composé de 5570 cadres de lecture de la souche modèle PAO1 (Stover *et al.*, 2000), six autres souches ont été entièrement séquencées : PA14, PA7, LES, B58, C3719 et PA2192 (seules les trois premières souches sont complètement annotées) (Winstanley *et al.*, 2009; Mathee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2006) (<http://www.Pseudomonas.com/index.jsp>). La taille de ces génomes varie entre 5 et 7 Mb.

La comparaison entre les différentes souches montre que le génome de *P. aeruginosa* peut être comparé à une « mosaïque » composée d'un squelette commun d'environ 5000 gènes, interrompus dans chaque souche par une combinaison de « blocs de gènes » spécifiques (dits accessoires) qui confèrent à chaque souche un répertoire génétique unique (Figure 1) (Qiu *et al.*, 2009; Mathee *et al.*, 2008).



**Figure 1. Le pangénome de *P. aeruginosa* (Mathee *et al.*, 2008).**

Un pangénome est une compilation de tous les gènes de toutes les souches d'une espèce. Les gènes communs de la souche PA14 ont servi de matrice sur laquelle tous les gènes accessoires des souches PA2192, C3719, PA01 et PACS2 (souche non entièrement séquencée) ont été intégrés. Le cercle doré indique le squelette commun, le second cercle indique l'annotation fonctionnelle de l'ensemble des souches et le troisième cercle indique la position des ARNt qui servent généralement de sites d'insertions. Le quatrième cercle indique les RGP (region of genomic plasticity) en noir. Les gènes accessoires de chaque souche sont ensuite indiqués pour les souches PACS2 (turquoise), C3719 (violet), PA2192 (vert), PA14 (bleu) et PA01 (rouge).

Ces blocs de gènes ont été acquis par transfert horizontal d'autres gènes bactériens et/ou de bactériophages et ont été insérés dans des régions instables du génome appelées RPG pour « Region of Genomic Plasticity ». Selon les souches, ces RPG peuvent être le site d'insertion de ces îlots génomiques ou encore de délétion de

segments d'ADN (Qiu *et al.*, 2009; Mathee *et al.*, 2008). Les îlots génomiques contiennent aussi bien des gènes permettant d'améliorer l'aptitude de la bactérie à survivre (fitness), dans des niches environnementales spécifiques que des gènes codant pour des traits de virulence (Qiu *et al.*, 2009). C'est le cas des îlots de pathogénicité qui portent des gènes codant pour des toxines et des protéines permettant l'assemblage des fimbriae et/ou des pili souche-spécifiques, tels les gènes *cupD* dans la souche PA14 (Qiu *et al.*, 2006; He *et al.*, 2004; Arora *et al.*, 2001). Par exemple, le gène codant pour l'exotoxine U (ExoU) exportée par le SST3 se trouve au sein de l'îlot de pathogénicité PAPI-2 (He *et al.*, 2004).

*P. aeruginosa* possède un taux de gènes dévoués à la régulation (8,4%) élevé par rapport aux autres bactéries ; ces gènes constituent respectivement 5.8% et 5.3% des génomes de *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Ceci lui confère une grande adaptabilité face à son environnement. Les autres gènes surreprésentés par rapport aux autres bactéries sont ceux codant pour les pompes d'efflux, les systèmes d'import de nutriments et les systèmes de chimiotactisme (Stover *et al.*, 2000).

## **I.2 Mode de vie**

*P. aeruginosa* est capable de vivre soit à l'état planctonique soit à l'état sessile fixé à un support (biofilm).

*Sous forme planctonique*, la bactérie se déplace de manière isolée grâce à des appendices associés à sa surface, le flagelle et le pili de type IV (décrits dans la partie II.2.1).

Dans l'environnement, les bactéries vivent généralement en *biofilm*, un mode de vie communautaire. Les bactéries adhèrent à une surface, forment des microcolonies puis synthétisent des substances qu'elles sécrètent et dont elles s'entourent pour se protéger et renforcer leur adhésion.

La structure du biofilm de *P. aeruginosa* est maintenue par une matrice (Figure 2) (Costerton *et al.*, 1999), composée majoritairement d'un mélange encore mal défini d'exopolysaccharides : les alginates, les Psl (Polysaccharide Synthesis Locus) et les

Pel (PELicule). Les autres composants minoritaires sont des protéines, des rhamnolipides et de l'ADN (appelé eDNA pour extracellular DNA, qui proviendrait de l'ADN chromosomique fragmenté suite à la lyse bactérienne) (Ryder *et al.*, 2007; Allesen-Holm *et al.*, 2006; Branda *et al.*, 2005; Matsukawa and Greenberg, 2004; Whitchurch *et al.*, 2002; Sutherland, 2001).

Les propriétés de ces polysaccharides permettent à *P. aeruginosa* d'échapper au système immunitaire, à la clairance pulmonaire et d'accroître sa résistance aux antibiotiques. En général, il est admis que les bactéries se rendent ainsi « invisibles » à leur hôte (Alkawash *et al.*, 2006; Costerton *et al.*, 1999).

Plusieurs étapes peuvent être distinguées dans la formation des biofilms (Figure 2) (Davies *et al.*, 1998): une étape dite d'attachement initial à la surface d'une muqueuse ou d'un matériel inorganique, qui fait intervenir le flagelle pour se déplacer jusqu'à la surface puis l'étape d'attachement irréversible suivie de deux étapes de maturation qui se caractérisent par :

I. la formation de macrocolonies et la synthèse de rhamnolipides,

II. la structuration en « champignon », d'une épaisseur maximale de 100 µm.

Les bactéries sont alors complètement immobiles et entourées d'une matrice exopolysaccharidique importante. Lorsque la structure des macrocolonies est altérée, les bactéries des couches internes sont à nouveau mobiles et s'échappent vers d'autres sites à coloniser. Le biofilm est ainsi dispersé (Figure 2).

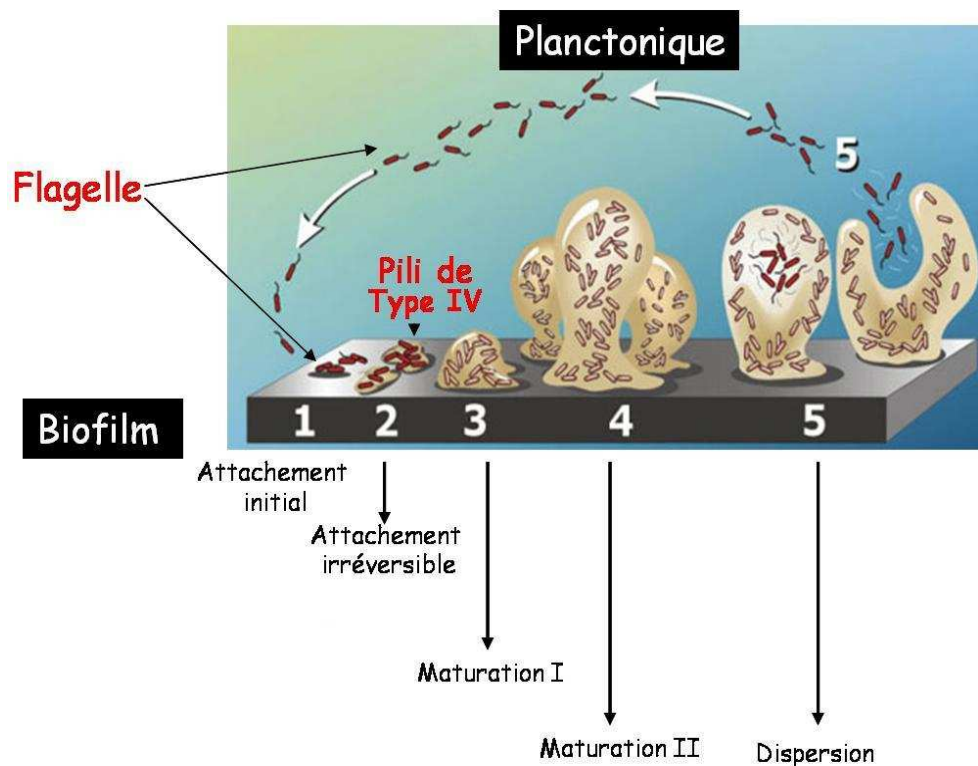


Figure 2. Représentation schématique des étapes de développement du biofilm.

(P. Dirckx, K. Sauer, and D. Davies the Annual Review of Microbiology 2002)

## II. Pouvoir pathogène pour l'homme

### II.1 Un pathogène opportuniste et multirésistant

*P. aeruginosa* représente le type même de l'espèce bactérienne opportuniste et multirésistante aux antibiotiques. Cette bactérie ne provoque une maladie chez l'homme que lorsqu'il existe une défaillance locale ou systémique du système immunitaire et n'adhère pas à l'épithélium normal intact. *P. aeruginosa* colonise les patients immunodéprimés, notamment les personnes atteintes du virus du SIDA, les grands brûlés ou les patients traités par des chimiothérapies neutropéniantes (Lyczak, 2000). Elle infecte également des personnes hospitalisées suite à une intervention chirurgicale ou munis de cathéters pendant une longue durée (Lyczak *et al.*, 2000). Sa multirésistance est due à la relative imperméabilité de sa

membrane, la synthèse de bêta-lactamases à large spectre et la présence de nombreuses pompes d'efflux (Mao *et al.*, 2002; Germ *et al.*, 1999).

*P. aeruginosa* est le 4<sup>ème</sup> organisme pathogène le plus courant en milieu hospitalier, elle est à l'origine de 10% des maladies nosocomiales et causent plus de 4000 décès par an en France (Institut de Veille Sanitaire, 2007).

Suite à la colonisation de l'hôte, la bactérie est capable d'engendrer deux types d'infection: aiguë ou chronique (Figure 3). La nature de l'infection dépend des facteurs de virulence exprimés par la bactérie en réponse à des signaux environnementaux et de l'efficacité du système immunitaire de l'hôte.

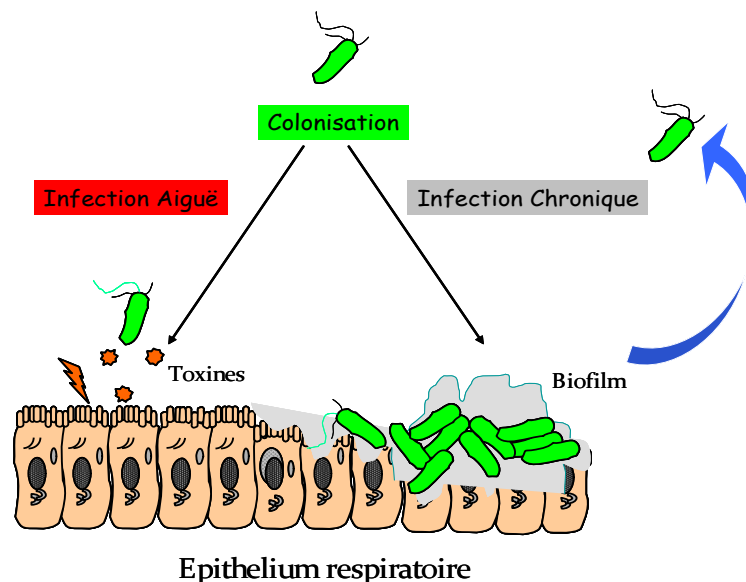


Figure 3. Etapes et caractéristiques des infections à *P. aeruginosa* (Benoit Polack)

L'infection aiguë, caractérisée par sa progression rapide et généralement considérée comme agressive, est associée au mode de vie planctonique et à la production accrue de facteurs de virulence. Ces infections conduisent à des cas de septicémies sévères notamment chez les grands brûlés, très susceptibles à l'infection par *P. aeruginosa*. Un autre type d'infection aiguë comprend la kératite (inflammation de la cornée), l'ulcère de la cornée et l'infection du globe oculaire. Leur origine est une blessure dans la cornée qui permet à la bactérie d'atteindre les couches profondes de

l'œil ou la présence de lentille de contact qui lui permettent d'adhérer fortement aux cellules de la cornée. Enfin, cette bactérie est aussi capable de provoquer des infections aiguës des poumons, du système digestif et des voies urinaires (Berthelot *et al.*, 2005; Lyczak *et al.*, 2000). Dans ce type d'infection *P. aeruginosa* est considérée comme invasive et cytotoxique.

### **L'infection chronique**

Les phénotypes de *P. aeruginosa* associés aux infections chroniques sont la surproduction des exopolysaccharides qui permettent la formation de biofilm, la perte de mobilité et la diminution de l'expression des facteurs de virulence (Figure 3). Dans ce type d'infection *P. aeruginosa* est considérée comme non-invasive et non-cytotoxique.

Ce mode de vie en biofilm est, en particulier, responsable d'infections chroniques mortelles chez les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces personnes, l'apparition de ce germe dans le tractus respiratoire constitue une étape importante dans l'évolution de la maladie et contribue à la mortalité (Aebi *et al.*, 1995). Après une première colonisation, lors de laquelle une éradication peut être éventuellement obtenue, s'installe une colonisation chronique où l'élimination totale du pathogène des voies bronchiques devient impossible. Cette colonisation chronique s'accompagne d'épisodes d'exacerbations aiguës qui entretiennent un cercle vicieux pro-inflammatoire et l'évolutivité vers une détérioration définitive des fonctions respiratoires.

## **II.2 Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa***

Le séquençage de la souche PAO1 a mis en évidence la présence de nombreux facteurs de virulence codés par le génome de *P. aeruginosa* ; ceux-ci lui permettent de survivre aussi bien dans les différents hôtes que dans l'environnement (Lazdunski, 2003). De manière générale, la fonction des facteurs

de virulence de *P. aeruginosa* est de permettre le déplacement et l'adhésion sur les cellules de la bactérie, de conduire à la mort cellulaire des cellules épithéliales, des macrophages et des neutrophiles, d'inhiber des processus immunitaires de défense (clairance, phagocytose) ainsi que d'activer la réponse inflammatoire entraînant la formation de lésions tissulaires.

Les facteurs de virulence associés à la membrane sont généralement impliqués dans la phase de colonisation et l'infection chronique tandis que les facteurs extracellulaires, extrêmement toxiques, sont associés à l'infection aiguë.

### II.2.1 Les facteurs impliqués dans la motilité et l'adhérence.

**Le flagelle** est un complexe multiprotéique formant un appendice filamenteux polaire à la surface. Il s'agit de l'appendice le plus important dans la motilité des bactéries à Gram négatif. Sa rotation permet les mouvements de type « swimming » (nage en milieu liquide) et « swarming » (nage en milieu semi-solide en concert avec le pili de type IV).

**Les pili de type IVa** sont des appendices de surfaces polaires présents en plusieurs copies sur la surface de la bactérie. Ils sont impliqués dans la motilité de type « twitching » qui permet le déplacement sur une surface solide grâce à l'extension puis à la rétraction du pili et la mobilité de type « swarming » (Asikyan *et al.*, 2008) (Figure 4).

Ces deux appendices interviennent également dans l'adhésion bactérienne. Le flagelle participe à la reconnaissance de la bactérie par l'hôte en induisant la réponse inflammatoire suite à l'interaction entre les monomère de la flagelline (FliC) avec les récepteurs Toll TLR5 (Steiner, 2007; Adamo *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 1998). Les pili de type IV interagissent avec les régions glycosylées des glycosphingolipides asialo-GM1 et asialo-GM2 à la surface des cellules épithéliales



pulmonaires (Bryan *et al.*, 1998; de Bentzmann *et al.*, 1996; Imundo *et al.*, 1995; Saiman and Prince, 1993, Hansen, 2006 #399Craig, 2008 #400 )

**Les rhamnolipides** (Figure 4) sont des glycolipides hémolytiques résistants à la chaleur capables d'inhiber la phagocytose et d'induire la nécrose des PMN (leucocytes PolyMorphoNucléaire) (Jensen *et al.*, 2007). Ces composés possèdent une activité détergente envers les phospholipides de la membrane eucaryote et participent aussi à l'architecture du biofilm (Filloux and Vallet, 2003; Kownatzki *et al.*, 1987).

Différents **fimbriae**, appelés **Cup** (pour Chaperone Usher Pathway) sont également impliqués dans l'adhésion des bactéries sur une variété de surfaces biotiques et abiotiques. Ce sont des appendices de nature protéique composés de sous-unités de type piline. L'adhérence aux cellules est possible grâce à l'interaction entre une adhésine (retrouvée en surface du pili) et son récepteur spécifique sur la cellule (Kostakioti *et al.*, 2005; Vallet *et al.*, 2001, Ruer, 2007 #60). La souche PAO1 possède quatre locus codant pour les machineries d'assemblage de ces structures, *cupA*, *cupB*, *cupC* et *cupE* (Ruer *et al.*, 2007; He *et al.*, 2004). Les fimbriae de type CupA sont essentielles à l'attachement sur des surfaces abiotiques en présence ou en absence de pili de type IV (Vallet *et al.*, 2001). Les fimbriae CupB et CupC semblent aussi impliqués dans l'adhérence aux cellules épithéliales ainsi que dans le processus de maturation du biofilm (Ruer *et al.*, 2007). Le rôle des fimbriae CupE n'a pas encore été clairement défini. Cependant, l'augmentation de l'expression des gènes codant pour *cupE* lors de la phase d'attachement irréversible du biofilm suggère l'implication de ces fimbriae dans cette phase de formation du biofilm (Waite *et al.*, 2006). Enfin, les gènes codant pour l'assemblage de CupD sont présents seulement dans certaines souches, dont la souche PA14 (He *et al.*, 2004).

Les **lectines** solubles de *P. aeruginosa*, LecA et LecB, sont des glycoprotéines qui reconnaissent respectivement le galactose et le fucose (Glick and Garber, 1983). Ces protéines ont tout d'abord été localisées en grande majorité dans le cytoplasme bactérien (Glick and Garber, 1983). Cependant, d'autres études indiquent que la protéine LecB est présente en grande quantité sur la membrane externe de la bactérie (Tielker *et al.*, 2005). Ces deux protéines jouent un rôle important dans l'adhésion et la cytotoxicité de *P. aeruginosa* envers les cellules épithéliales (Chemani *et al.*, 2009), mais les mécanismes et les interactions ne sont pas encore clairement définis.

Enfin, la surface de la membrane externe est principalement composée de **LPS** (LipoPolySaccharides). Il s'agit de composés amphiphiles constitués d'une partie hydrophobe, le lipide A, et d'une partie hydrophile constituée de chaînes polysaccharidiques, l'antigène O. La fixation des LPS sur les récepteurs eucaryotes asialo-GM1 et TLR4 entraîne la stimulation de la réponse inflammatoire (Kipnis *et al.*, 2006) tandis que leur fixation sur la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) diminue la clairance de *P. aeruginosa* au sein des poumons de patients atteints de la mucoviscidose (Pier *et al.*, 1997). Chez les souches isolées de ces patients, on observe une modification du LPS qui se traduit par la perte de l'antigène O et la modification de la structure du lipide A (addition de palmitate (100%) d'aminoarabinose (24,6%) et délétion de la fonction 3-hydroxydecanoate (33%)) (Ernst *et al.*, 2007; Nguyen and Singh, 2006; Smith *et al.*, 2006). La perte de l'antigène permet d'éviter la reconnaissance de la bactérie par le système immunitaire tandis que la présence d'aminoarabinose pourrait améliorer la résistance de *P. aeruginosa* à un antimicrobien, la colisine (Ernst *et al.*, 2007; Nguyen and Singh, 2006; Smith *et al.*, 2006).

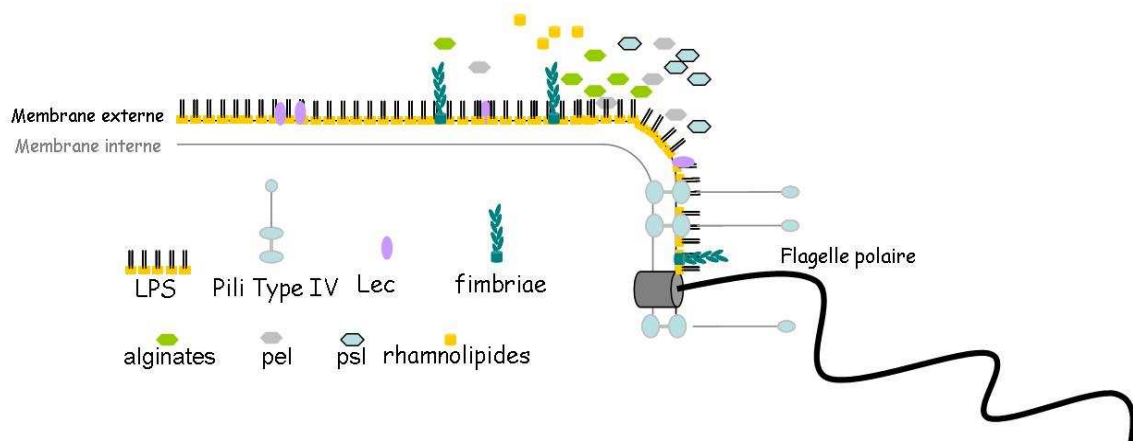


Figure 4. Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* associés à la surface.

## II.2.2 Les facteurs de virulence associés à la formation de biofilm et l'infection chronique.

**Les alginates** sont des exopolysaccharides qui donnent à la bactérie un aspect dit mucoïde; ils sont composés de polymères répétés d'acide mannuronique et d'acide glucuronique. (Shankar *et al.*, 1995). Ils sont impliqués dans l'attachement de la bactérie sur des surfaces biotiques et abiotiques et permettent la colonisation des cellules épithéliales respiratoires. Ils participent à l'architecture des biofilms, mais ne sont pas cruciaux au développement du biofilm (Wozniak *et al.*, 2003; Hentzer *et al.*, 2001). La surproduction d'alginates permettrait cependant de protéger la bactérie de la phagocytose et des antibiotiques ainsi que d'atténuer la réponse immunitaire (Cobb *et al.*, 2004; Hentzer *et al.*, 2001).

Les polysaccharides **Psl** et **Pel** sont essentiels au développement du biofilm et sont des composants indispensables de l'EPS des souches non-mucoïdes (Ryder *et al.*, 2007). La structure des Psl vient d'être décrite; il s'agit d'un pentasaccharide répété de D-mannose, D-glucose et D-rhamnose. (Byrd *et al.*, 2009). Les Pel sont des polysaccharides riches en glucose dont la structure exacte n'a pas encore été définie (Ryder *et al.*, 2007). Contrairement aux alginates, ces polysaccharides sont aussi produits par *P. aeruginosa* sous sa forme planctonique (Ryder *et al.*, 2007).

### II.2.3 Les principaux facteurs de virulence extracellulaires impliqués dans la phase d'infection aiguë.

*P. aeruginosa* sécrète un grand nombre de facteurs de virulence dont l'**exotoxine A**, considérée comme le composé protéique le plus toxique. Cette toxine agit d'une manière comparable à la toxine diphtérique : elle inhibe la synthèse protéique des cellules eucaryotes par ADP-ribosylation du facteur d'élongation EF2 entraînant invariablement la mort cellulaire (Collier and McKay, 1982; Foley, 1995 #214; Iglewski and Kabat, 1975).

La protéase alcaline **AprA** est une métalloprotéase à zinc qui dégrade les composants du complément C1q et C3, les cytokines et les chémokines. Ces cibles suggèrent que cette protéase jouerait le rôle d'immunomodulateur pendant l'infection (Leidal *et al.*, 2003; Hong and Ghebrehiwet, 1992; Parmely *et al.*, 1990; Horvat and Parmely, 1988).

**L'élastase B** (LasB) est une métalloprotéase à zinc capable de détruire les jonctions entre les cellules épithéliales en clivant l'élastine et le collagène. Cette destruction augmente la perméabilité épithéliale et facilite le recrutement des neutrophiles. Elle joue de plus un rôle pro-inflammatoire en augmentant le niveau de IL-8 mais peut aussi diminuer la réponse immunitaire innée en clivant des protéines du surfactant, SP-A et SP-D, et des récepteurs à protéases afin de les rendre inactifs (Azghani *et al.*, 2000; Kon *et al.*, 1999; Azghani, 1996; Azghani *et al.*, 1993). Cette métalloprotéase possède une activité protéolytique élevée envers la protéine uPAR2 (urokinase-type plasminogen activator receptor) qui appartient à la cascade protéolytique d'activation du plasminogène et qui participe à la protéolyse péricellulaire ainsi qu'à la migration et l'adhérence des cellules épithéliales et des leukocytes. La protéolyse de uPAR2 par LasB réduit drastiquement la capacité des cellules à fixer l'urokinase et abolit l'interaction entre uPAR et la vitronectine, une protéine d'adhésion de la matrice. LasB est aussi capable d'activer une autre protéine de cette cascade, uPA, ce qui contribue à

l'invasion bactérienne (Beaufort *et al.*, 2009). Enfin, l'élastase empêche la réparation des cellules épithéliales lésées en altérant la mobilité cellulaire et en causant un déséquilibre entre les formes pro et actives de la protéine MMP2 (matrix metalloproteinases) (De Bentzmann *et al.*, 2000).

**Les phospholipases C** (PLC) sont des enzymes extracellulaires thermolabiles dont l'activité majeure est l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (Lazdunski *et al.*, 1990), très abondante dans le surfactant pulmonaire ce qui favorise la colonisation bactérienne des poumons (Kipnis *et al.*, 2006).

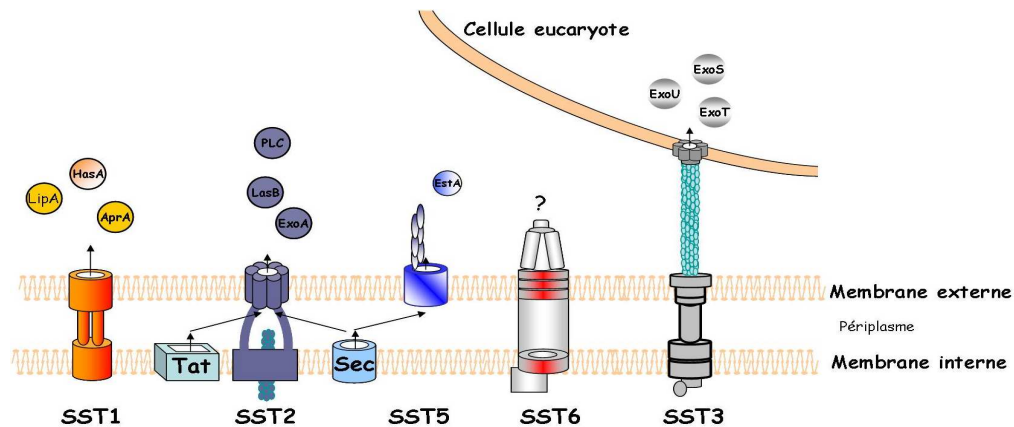
En plus de sécréter des toxines dans le milieu extracellulaire, *P. aeruginosa* est capable de transloquer des **Exotoxines** directement dans le cytosol de la cellule hôte cible grâce à un système sécrétion de type III. Ce système de sécrétion étant l'objet de cette étude, il sera décrit plus en détail ainsi que l'activité de ces exotoxines dans la Partie I.4.

### III. Les systèmes de sécrétion.

Les facteurs de virulence nécessaires à la colonisation bactérienne de l'hôte sont généralement des protéines qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire ou transloquées dans le cytosol de la cellule eucaryote cible. Ces facteurs doivent donc franchir les deux membranes bactériennes. Pour cela, *P. aeruginosa* a développé différents systèmes de sécrétion (SST) dont chacun est dédié à la sécrétion de molécules spécifiques.

Les systèmes de sécrétion de type 1, 3 et 6 permettent le franchissement des deux membranes en une seule étape. Les systèmes de sécrétion de type 2 et 5 ne permettent que le franchissement de la membrane externe ce qui nécessite une première étape de sécrétion des protéines substrats dans le périplasme (Figure 5). Cette première étape est réalisée par des voies d'export de la membrane interne, les systèmes Sec (ou GSP pour General Secretion Pathway) et Tat (Twin arginine

translocation) (Figure 5). Le système Tat se distingue du système Sec par sa capacité à transporter des protéines repliées (Voulhoux *et al.*, 2001).



**Figure 5. Les systèmes de sécrétion et les facteurs de virulence associés de *P. aeruginosa*.**

### III.1 SST1

Le SST1 est composé d'un ABC transporteur (ATP Binding Cassette) localisé dans la membrane interne, d'une protéine spécifique de la membrane externe appelée OMP (Outer Membrane Protein) habituellement exportée par la voie Sec et d'une protéine dite de « fusion membranaire » (MFP), ancrée dans la membrane interne qui relie l'ABC transporteur à l'OMP. Les protéines sécrétées par le SST1 possèdent un signal de sécrétion d'une cinquantaine d'acides aminés localisé en C-terminal (Mackman *et al.*, 1987).

*P. aeruginosa* possède quatre SST1, dont les substrats sécrétés ont été identifiés pour deux de ces systèmes (Ma *et al.*, 2003). Le système Apr permet la sécrétion de la protéase alcaline AprA et de la lipase LipA (Ma *et al.*, 2003). Le système HasDEF sécrète la protéine HasA qui chélate des ions de l'hème de l'hémoglobine (Ma *et al.*, 2003).

### III.2 SST2

Le SST2 possède trois 3 composants structuraux principaux (Johnson *et al.*, 2006) : le complexe de la machinerie Tat ou Sec situé au niveau de la membrane interne, un pseudo-pilus supposé traverser l'espace périplasmique et un pore formé dans la membrane externe, composé de multimères d'une protéine de la famille des sécrétines. Les protéines sécrétées par le SST2 sont dotées d'une séquence signal en N-terminal qui permet, selon sa nature, aux protéines d'être prises en charge soit par le système Tat soit par le système Sec (Voulhoux *et al.*, 2001). Après le clivage du peptide signal par une peptidase dans le périplasma, ces protéines sont transportées à travers la membrane externe.

*P. aeruginosa* possède deux SST2 complets, les systèmes Xcp et Hcx (Ball *et al.*, 2002; Voulhoux *et al.*, 2001). La machinerie Xcp permet notamment le transport des élastases LasA et LasB, de l'exotoxine A et des Phospholipases C (Filloux *et al.*, 1998). La machinerie Hcx intervient dans le transport de la phosphatase alcaline (Ball *et al.*, 2002). Un troisième système incomplet, XphA/XqhA, a récemment été identifié dans le génome de la souche PAO1 (Michel *et al.*, 2007). Il a été montré que les protéines XphA et XqhA sont capables de former avec les protéines de la machinerie Xcp : XcpR et XcpZ, un SST2 hybride fonctionnel. A la différence des gènes *xcpR* et *xcpZ*, les gènes *xphA* et *xqhA* sont transcrits pendant la phase précoce de la croissance bactérienne. Les tandems protéiques XphA/XqhA et XcpP/XcpQ seraient donc impliqués dans le processus de sécrétion à des stades différents au cours de la croissance (Michel *et al.*, 2007).

### III.3 SST5

*P. aeruginosa* possède deux types de SST5 : les systèmes autotransporteurs (Type Va ou AT-1) et la voie de sécrétion à deux partenaires (Type Vb ou TPS) (Desvaux *et al.*, 2004).

Les protéines sécrétées par le système Va possèdent des similarités dans leur structure primaire: i) une séquence signal en N-terminal permettant l'export par le

système Sec, ii) un domaine « Passager » fonctionnel qui peut être exposé à la surface ou relargué dans le milieu extracellulaire, iii) une région linker nécessaire à la translocation du domaine passager à travers la membrane externe, iiiii) une région en C-terminal composée de feuillets  $\beta$  impliquée dans la formation d'un pore transmembranaire.

Une fois que la protéine a traversé la membrane interne via le système Sec, la séquence signal est clivée dans le périplasma puis les feuillets  $\beta$  du domaine C-terminal s'insèrent dans la membrane externe pour former un pore en tonneau  $\beta$ . Le domaine « Passager » est ensuite transloqué à la surface de la bactérie via ce pore où il peut subir d'autres modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité. Ce processus est assisté par une séquence interne « auto-chaperonne » dans le domaine « passager » et par la présence de protéines chaperons périplasmiques (Gerlach and Hensel, 2007, Henderson, 2004 #402).

*P. aeruginosa* possède 3 systèmes de Type Va dont les exoprotéines putatives seraient des protéases à sérine et des aminopeptidases (Ma *et al.*, 2003). L'estérase EstA est une enzyme lipolytique de la famille des sérines protéases. Cette activité lui permettrait d'interférer dans le processus de renouvellement des composés lipidiques de la membrane eucaryote (Wilhelm *et al.*, 1999).

La voie Vb (TPS) diffère de la voie Va (autotransporteur) par le fait que le domaine passager et le domaine C-terminal formant le pore en tonneau  $\beta$ , sont traduits en tant que deux protéines séparées, membres de la famille TspA (aussi appelée exoprotéine) et TpsB (aussi appelé domaine transporteur) respectivement. Les gènes codant pour ces deux protéines sont généralement organisés en opéron. Ces deux protéines sont sécrétées dans le périplasma par le biais du système Sec. En plus de former le tonneau  $\beta$ , TpsB sert de récepteur à la séquence TPS de TspA.



*P. aeruginosa* possèdent 6 systèmes de Type Vb, 5 complets et un cargo TspA orphelin, dont les exoprotéines putatives seraient des hémagglutinines et des adhésines (Ma *et al.*, 2003).

### III.4 SST6

Bien que nommé SST6 en 2006 (Pukatzki *et al.*, 2006), des indices sur de l'existence de ce système remonte à une dizaine d'années avec la découverte de la protéine Hcp (Haemolysin Co-regulated Protein) chez *Vibrio cholerae* dont l'export ne nécessitait pas le clivage d'un peptide signal. Les clusters de gènes codant pour ce système ont été nommés IAHP, pour « IcmF-Associated Homologous Proteins », car ils contiennent un gène codant pour la protéine IcmF associée au système de sécrétion de type IVb de *L. pneumophila*.

Les composants communs à tous les SST6 incluent les protéines « IcmF- et IcmH- like » du SST4, une lipoprotéine, l'ATPase Clp et les protéines Hcp et VgrG (Cascales, 2008). Dans le génome de *P. aeruginosa*, il existe trois clusters de gènes codent pour trois machineries de SST6 appelés HSI-1, HSI-2 et HSI-3 (pour Hcp Secretion Island). Le système de sécrétion codé par le locus HSI-1 est le seul caractérisé à l'heure actuelle. Le canal d'export composé de Hcp serait surmonté de la protéine VgrG, une protéine structurellement homologue à la queue du bacteriophage T4 (Pukatzki *et al.*, 2007).

Des anticorps dirigés contre la protéine Hcp1 ont été détectés chez des patients atteints de la mucoviscidose (Mougous *et al.*, 2006), suggérant que le système est actif lors d'infection chronique. De plus, de nombreuses souches de *P. aeruginosa* isolée au cours d'une primo infection chez ces patients, sécrètent constitutivement Hcp1 dans le surnageant de culture (Bastonero *et al.*, 2009).

Contrairement à l'expression du locus HSI-1, l'expression des loci HSI-2 et HSI-3 est régulée positivement par le Quorum-Sensing (voir Chapitre II : Régulation du SST3) (Lesic *et al.*, 2009). L'étude de modèles d'infections dans la plante et chez

l'animal a révélé le rôle important de ces deux loci dans la pathogénie de la bactérie lors d'infections aiguës (Lesic *et al.*, 2009).

Nous ne savons pas encore, si le SST6 exporte ou sécrète les macromolécules et quelle est la nature de ces macromolécules, ADN, protéine, les deux ?

#### IV. Le Système de Sécrétion de Type III (SST3)

Le SST3 diffère des autres systèmes de sécrétion par sa capacité à transloquer les protéines substrats directement depuis le cytosol bactérien dans le cytosol de la cellule cible. Il est présent chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif notamment des pathogènes humains, animaux mais aussi chez les pathogènes de plantes ou des bactéries symbiotiques. Selon les bactéries, le SST3 peut avoir des fonctions diverses comme permettre l'internalisation de la bactérie, induire l'apoptose des cellules cibles ou créer des relations symbiotiques. Cette fonction dépend de la nature des toxines transloquées qui sont spécifiques à chaque espèce bactérienne (Pallen *et al.*, 2005).

Le SST3 est codé par des régions génétiques instables comme les ilots de pathogénicité (chez *Salmonella*) ou des plasmides (chez *Yersinia pestis*). Ce système possède un ancêtre commun avec le flagelle et il a évolué au cours de nombreux transferts de gènes horizontaux (Gophna *et al.*, 2003). Environ 10 des protéines qui composent l'appareil de sécrétion (Figure 6) présente une forte similitude au niveau de leur séquence et de leur fonction avec des composants du flagelle (Yip and Strynadka, 2006; Blocker *et al.*, 2003). Les observations par microscopie électronique des parties basales de l'appareil de ces deux systèmes ont révélé qu'elles sont ancrées dans les deux membranes bactériennes et qu'elles présentent de fortes similitudes structurales (Blocker *et al.*, 2001; Kubori *et al.*, 1998).

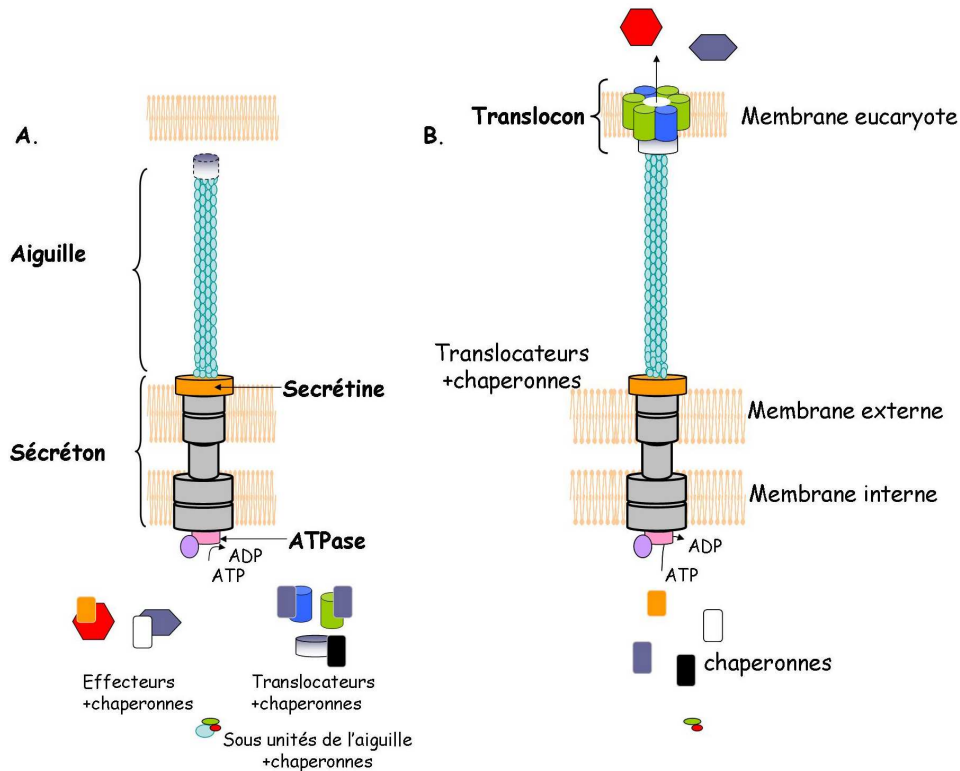
Lors d'infections aiguës, *P. aeruginosa* est considérée comme invasive et cytotoxique. Sa cytotoxicité est principalement due aux exotoxines transloquées

par le SST3, qui participent à la dissémination de la bactérie dans l'organisme en perpétuant l'état lésé des cellules épithéliales (en inhibant la réparation des blessures cellulaires), ce qui entraîne une réaction inflammatoire forte et provoque la destruction de la barrière épithéliale et/ou endothéliale (Kipnis *et al.*, 2006; Shaver and Hauser, 2004; Sundin *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2003). De plus, ces exotoxines permettent à la bactérie d'échapper aux systèmes immunitaires en induisant la mort des neutrophiles et des macrophages (Engel and Balachandran, 2009).

Lors de septicémies et d'infections pulmonaires aiguës, la production des exotoxines augmente d'un facteur de 6 le risque de mortalité des patients (Roy-Burman *et al.*, 2001). L'étude de nombreuses souches mucoïdes isolées de patients atteints de la mucoviscidose montrent qu'elles n'expriment plus le SST3 (Dacheux *et al.*, 2001a). Il est ainsi communément admis que le SST3 serait « perdu » au cours de l'infection chronique. Néanmoins, la souche CHA isolée d'un patient atteint de mucoviscidose (souche référence de notre laboratoire) possède un SST3 actif et un phénotype mucoïde stable.

#### **IV.1 L'injectisome**

La machinerie de sécrétion de type III, aussi appelée « l'injectisome », est une véritable nanomachine constituée de plus de 25 protéines et composée de trois parties principales: le sécréton, l'aiguille de sécrétion et le translocon (Figure 6). Les protéines structurales de l'injectisome sont conservées entre les différents SST3 avec des similarités de séquences importantes (de l'ordre de 25% d'identité entre protéines orthologues) (Cornelis, 2006; Troisfontaines and Cornelis, 2005; Tampakaki *et al.*, 2004).



**Figure 6. Représentation schématique du SST3 de *P. aeruginosa***

**A.** L'injectisome se compose d'un corps basal relié par une sécrétine à une structure de type « aiguille », composée de centaines de sous-unités d'une même protéine. Cette aiguille est surplombée à son extrémité par la protéine PcrV. L'ATPase serait reliée à la face cytoplasmique du corps basal. En absence d'activation de la sécrétion, les protéines substrats (effecteurs cytotoxiques, translocateurs et la protéine qui compose l'aiguille) sont associées à leurs chaperons dans le cytoplasme bactérien. **B.** Suite au contact avec la cellule cible, le translocon se forme à l'extrémité de l'aiguille et s'insère dans la membrane eucaryote. Le pore ainsi formé permet la translocation des protéines effectrices.

#### IV.1.1 Le sécréton

L'assemblage et la structure du sécréton ont été bien étudié chez *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia sp.*, et *E. coli* enteropathogène (EPEC) (Spreter *et al.*, 2009; Marlovits *et al.*, 2004; Blocker *et al.*, 2001); les similitudes de séquences entre les protéines permettent de proposer un modèle chez *P. aeruginosa*. Chez ces trois espèces, la base de l'appareil est un complexe macromoléculaire, composé de structures annulaires interconnectées qui traversent les deux membranes

bactériennes. Ces structures sont formées principalement de trois protéines conservées, membres des familles de protéines EscJ/PrgK/YscJ (membrane interne), EscD/InvG/YscD (membranaire interne, bitopique) et EscC/InvG/YscC (sécrétine, membrane externe). Elles forment chacune des anneaux homo-oligomériques, composés de 12 à 24 sous-unités et dont le diamètre varie de 110 à 170 Å (Spreter *et al.*, 2009). Chez *P. aeruginosa* (Hauser, 2009), PscC, la « sécrétine », serait capable d'oligomériser avec l'aide d'une lipoprotéine PscW pour former un canal dans la membrane externe qui servirait d'ancrage à l'aiguille de sécrétion (Burghout *et al.*, 2004a; Burghout *et al.*, 2004b; Koster *et al.*, 1997). PscJ est prédite comme étant une lipoprotéine.

Une ATPase, la protéine PscN, serait associée à la face cytoplasmique de ce sécréton et fournirait l'énergie nécessaire à ce système de sécrétion (Blaylock *et al.*, 2006). Il est proposé que la dissociation du complexe entre le substrat sécrété et sa chaperonne est catalysée par cette ATPase (Galan and Wolf-Watz, 2006). De plus, celle-ci serait impliquée dans le processus de reconnaissance des substrats qui permet la hiérarchisation de la sécrétion (Akeda and Galan, 2005). L'activité de PscN serait régulée par la protéine PscL (Blaylock *et al.*, 2006). Enfin, il est proposé que l'assemblage du sécréton dépende du système d'export Sec (Hauser, 2009).

#### IV.1.2 L'aiguille de sécrétion

L'aiguille du SST3 de *P. aeruginosa* mesure entre 60 et 80 nm de long et possède un diamètre externe de 8 nm (Pastor *et al.*, 2005). Elle est composée d'une centaine de sous-unités de la protéine PscF de 9 kDa (Pastor *et al.*, 2005). La polymérisation de PscF s'effectue principalement à travers son domaine C-terminal (Quinaud *et al.*, 2007) pour former une structure hélicoïdale comme cela a été démontré pour l'aiguille de *S. flexneri* (Deane *et al.*, 2006; Cordes *et al.*, 2003). La polymérisation de PscF à l'intérieur du cytoplasme bactérien est empêchée par deux protéines, PscG et PscE, qui forment un complexe trimérique avec une sous-

unité de PscF (Quinaud *et al.*, 2007). Dans ce complexe, il semble que PscE soit la chaperonne de PscG et PscG celle de PscF (Quinaud *et al.*, 2007) (Plé *et al.*, en préparation). Ces deux chaperonnes appartiennent à la **Classe III** des chaperons du SST3 qui se lient au composant de l'aiguille afin d'empêcher sa polymérisation prématurée dans le cytoplasme. PscG possède un motif « TPR » (Tetratricopeptide Repeat) qui est un motif hélicoïdal de 34 résidus repliés en 2 hélices  $\alpha$  liées par une courte boucle et qui forment l'unité de base. Un domaine TPR est constitué de 3 à 16 motifs TPR auxquels est ajoutée une hélice de solvatation à l'extrémité C-terminale (Main *et al.*, 2003).

La taille de l'aiguille est fixe chez une espèce bactérienne donnée et varie peu d'une espèce à l'autre (entre 50 et 80 nm). Il est proposé que de manière similaire à la protéine YscP qui contrôle la taille de l'aiguille chez *Yersinia* spp, la taille de l'aiguille du SST3 de *P. aeruginosa* est régulée par la protéine PscP (Cornelis, 2006; Marlovits *et al.*, 2006; Journet *et al.*, 2003).

Cette aiguille est trop étroite (3 nm) pour que les translocateurs et les effecteurs puissent la traverser sous leur forme repliée ; il est largement admis qu'ils la traversent dans un état déplié (Deane *et al.*, 2006; Cordes *et al.*, 2003).

Ensemble, le sécrétion et l'aiguille forment l'appareil de sécrétion du SST3.

#### IV.1.3 Le translocon

La traversée de la membrane plasmique de la cellule eucaryote s'effectue par un pore de translocation constitué de protéines bactériennes (Goure *et al.*, 2004; Blocker *et al.*, 1999). Trois protéines sont nécessaires à la formation de ce pore *in vivo*, dont deux sont des protéines membranaires, PopB et PopD, et une troisième est hydrophile et soluble, PcrV (Goure *et al.*, 2004). La présence conjointe des deux translocateurs, PopB et PopD, est nécessaire à la formation du pore *in vivo* (Goure *et al.*, 2004). Avant leur oligomérisation, PopB et PopD sont associés à leur chaperonne commune PcrH dans le cytoplasme bactérien dans un complexe de ratio 1:1 (Faudry *et al.*, 2006; Schoehn *et al.*, 2003). PcrH est une chaperonne du

SST3 de **Classe II** : ces chaperonnes à domaine TPR (Broms *et al.*, 2006) se lient aux translocateurs dans le but de bloquer leur l'oligomérisation prématurée et d'inhiber leur toxicité pour la bactérie (Neyt and Cornelis, 1999; Menard *et al.*, 1994). Les homologues de PcrH et PopD/B chez *S. flexneri* et *S. enterica* sont IpgC et IpaB/C, et SicA et SipB/C, respectivement. Il est intéressant de noter qu'IpgC et SicA jouent un rôle important dans la voie de régulation permettant de relier l'activité transcriptionnelle à l'activité de sécrétion du SST3 (Parsot *et al.*, 2005; Darwin and Miller, 2001) (décrit dans le Chapitre II, Partie III), alors qu'aucun rôle régulateur n'a été mis en évidence pour PcrH.

Le pore de translocation inséré dans la membrane est formé par PopB et PopD alors que PcrV, situé à l'extrémité de l'aiguille (Gebus *et al.*, 2008; Broz *et al.*, 2007) sert de plateforme à la formation de ce pore. En effet, cette protéine n'est pas insérée dans la membrane eucaryote mais sa présence est nécessaire à la formation du pore (Goure *et al.*, 2004).

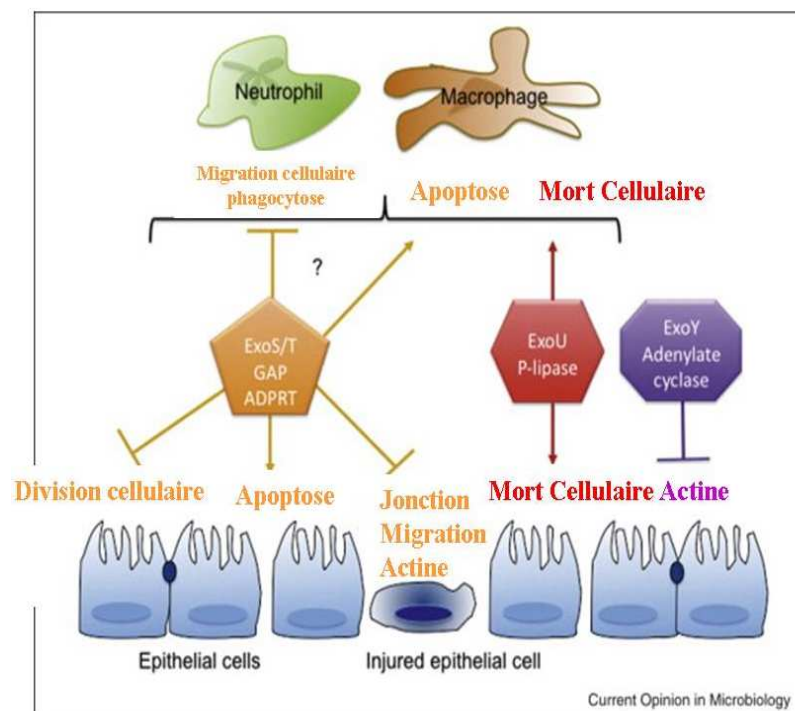
## IV.2 Les toxines du SST3

*P. aeruginosa* possède quatre exotoxines (aussi appelés effecteurs), ExoY, ExoU, ExoT et ExoS, transloquées par le SST3 directement dans le cytosol des cellules cibles (Engel and Balachandran, 2009; Vallis *et al.*, 1999; Yahr *et al.*, 1998; Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Yahr *et al.*, 1997; Yahr *et al.*, 1996). Ces quatre effecteurs requièrent un co-facteur eucaryote pour être actifs (Engel and Balachandran, 2009).

La présence des gènes des toxines est différente selon les souches. Alors que le gène *exoT* est présent dans toutes les souches, les gènes codant pour ExoY et ExoS sont présents respectivement dans 89% et 72% des souches. Le gène *exoU* est présent dans seulement 28% des souches et ceci majoritairement dans les souches les plus agressives, isolées de septicémie ou d'infections urinaires (Berthelot *et al.*, 2005; Shaver and Hauser, 2004). Les gènes *exoU* et *exoS* sont mutuellement

exclusifs. Dans les souches possédant *exoU*, le gène *exoS* aurait été excisé lors de la recombinaison qui a permis l'insertion de l'îlot de pathogénicité contenant *exoU* (Kulasekara *et al.*, 2006).

Malgré la présence majoritaire du gène *exoY*, toutes les souches ne produisent pas de toxine ExoY fonctionnelle et ceci est dû à la présence de mutations qui décalent la phase de lecture (Engel and Balachandran, 2009).



**Figure 7. Activité des toxines du SST3 (Engel and Balachandran, 2009).**

Les toxines du SST3 de *P. aeruginosa* ont des effets divers et pléiotropes sur les fonctions de la cellule hôte. Les cellules colorées en bleu clair représentent la barrière épithéliale polarisée. La cellule colorée en bleu foncé représente une cellule blessée, cellule dépolarisée de la barrière épithéliale. Un neutrophile est représenté en vert et un macrophage en orange. Les toxines sont représentées par : un pentagone pour ExoS et ExoT, un hexagone pour ExoU et un octogone pour ExoY. Les effets positifs ou négatifs de chacune des toxines sur les processus cellulaires ( migration, apoptose, phagocytose, mort, division, migration, jonction et polymérisation de l'actine) sont respectivement indiquées par des flèches ou des lignes barrées, orientées en direction des cellules cibles.

**ExoU** possède une activité phospholipase A2 envers un large spectre de substrats (lipides neutres et phospholipides) (Sitkiewicz *et al.*, 2007). Le co-facteur eucaryote de ExoU est une superoxyde dismutase (SOD) à  $Zn^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  dont



l'activité enzymatique n'est pas nécessaire à l'activité de ExoU (Sato *et al.*, 2006). Suite à sa translocation dans l'hôte, ExoU est rapidement associée la membrane ce qui lui permet d'être à proximité de ses substrats phospholipidiques (Rabin *et al.*, 2006; Stirling *et al.*, 2006). Elle entraîne une mort nécrotique des cellules eucaryotes (Sato *et al.*, 2003). En plus de son activité cytotoxique, ExoU induit l'expression des gènes de l'inflammation en ciblant *in vivo* une cascade de l'inflammation dépendante de l'acide arachidonique (Cuzick *et al.*, 2006; Saliba *et al.*, 2005; McMorran *et al.*, 2003). Cette toxine est aussi capable d'inhiber la voie caspase-1 pro-inflammatoire de production de cytokines (Figure 7) (Sutterwala *et al.*, 2007).

**ExoS** et **ExoT** sont deux effecteurs qui possèdent 75% de similitude entre leurs séquences (Liu *et al.*, 1997). Leur domaine C-terminal possède une activité ADP ribosyltransferase (ADPRT) et leur domaine N-terminal une activité GAP spécifique des petites protéines G de la famille Rho (Goehring *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1997).

Les séquences des domaines ADPRT de ExoS et ExoT sont hautement similaires et leur activité requiert la protéine FAS (Factor Activating ExoS), une protéine de la famille 14-3-3 (Henriksson *et al.*, 2002; Ganesan *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1993). Les cibles majeures de l'activité ADPRT de ExoS sont les protéines de la famille Ras. L'inhibition de la voie de signalisation Ras par ExoS perturbe la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que le processus apoptotique (Henriksson *et al.*, 2000; Ganesan *et al.*, 1998). Il été démontré *in vitro* que cette activité enzymatique est aussi impliquée dans la destruction des jonctions des cellules épithéliales respiratoires, contribuant ainsi à la perméabilisation de la barrière épithéliale ce qui permet la migration des bactéries vers les vaisseaux sanguins (Soong *et al.*, 2008).

Les cibles de l'activité ADPRT de ExoT *in vivo* incluent les protéines CrkI et CrkII, des phosphoglycérate kinases (Sun and Barbieri, 2003; Sundin *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1997). En interférant avec leur activité, ExoT inhibe de nombreux processus cellulaires (Figure 7) et induit l'apoptose (Pielage *et al.*, 2008; Shafikhani *et al.*, 2008;

Shafikhani and Engel, 2006; Garrity-Ryan *et al.*, 2004). L'activité ADPRT de ExoT ne représente que 0,2 à 1% de celle de ExoS (Barbieri and Sun, 2004).

L'activité GAP de ces deux toxines stimule la réorganisation du squelette d'actine à travers de l'inhibition de Rac et Cdc42 et induit la disparition des fibres de tension qui sont constituées d'actine, à travers l'inhibition de Rho (ExoS) et RhoA (ExoT). Ceci provoque l'inhibition de processus cellulaires comme la mobilité et la phagocytose (Krall *et al.*, 2002).

**ExoY** est une adénylate cyclase initialement identifiée suite à une analyse protéomique des protéines spécifiquement sécrétées par le SST3 et dont le co-facteur dans l'hôte n'a pas encore été identifié. La production d'AMPc par cette enzyme dans le cytoplasme génère un gradient d'AMPc inverse aux conditions physiologiques qui induit l'arrondissement de la cellule (Sayner *et al.*, 2004; Yahr *et al.*, 1998); Cowell, 2005 #301}. Son rôle exact dans la virulence reste inconnu jusqu'à aujourd'hui.

La production de l'ensemble des protéines du SST3 est maintenue à un taux très faible jusqu'au moment où, suite au contact avec la cellule eucaryote qui va activer la sécrétion, leur expression est très rapidement augmentée. Ce phénomène nécessite une régulation génique très fine qui intègre de nombreux signaux environnementaux ainsi que de nombreux processus cellulaires.

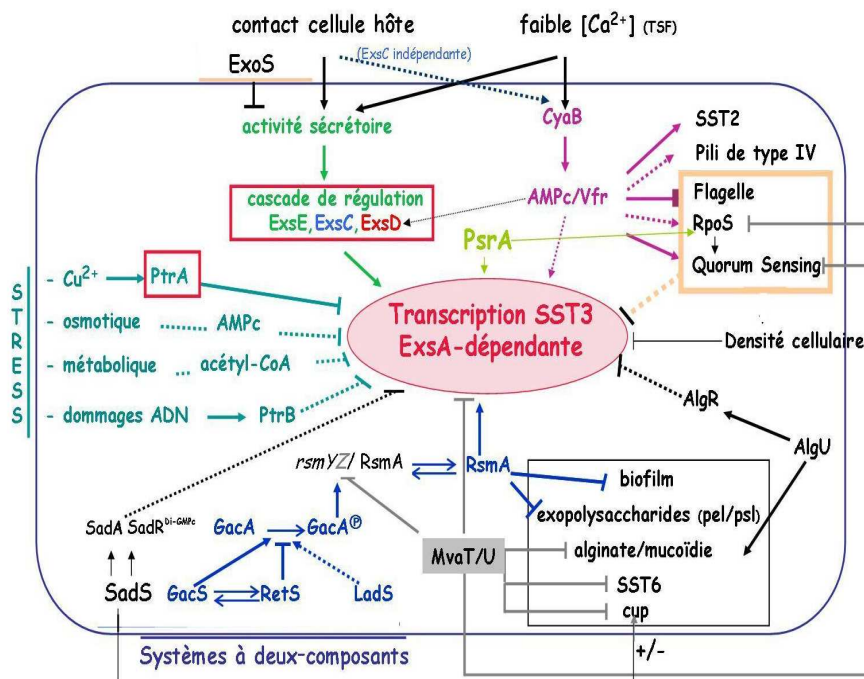
## Chapitre II.

### Régulation du Système de Sécrétion de type III

Huit % des gènes de *P. aeruginosa* codent pour des protéines de régulation (Stover *et al.*, 2000), majoritairement pour des systèmes de régulation à deux-composants (64 senseurs histidine kinase et 72 régulateurs de réponse) qui sont surreprésentés chez *P. aeruginosa* par rapport aux autres espèces bactériennes (Rodrigue *et al.*, 2000). Ces systèmes confèrent à la bactérie la capacité à s'adapter à différents milieux et jouent un rôle prépondérant dans sa virulence. En fonction du type d'infection (aiguë ou chronique), des systèmes à deux-composants dédiés permettent la régulation coordonnée des nombreux facteurs de virulence dont le SST3, qui est généralement régulé positivement lors de la phase aiguë de l'infection et négativement lors de la phase chronique. Le SST3 est aussi finement régulé en fonction de la densité bactérienne, du métabolisme bactérien et en réponse au stress. Le SST3 se trouve donc au sein d'un réseau « global » de régulation dont les nombreuses voies font intervenir, en plus des systèmes à deux-composants, des messagers secondaires, des petits ARNs non traduits et des régulateurs globaux.

Le SST3 est aussi régulé de manière spécifique suite au contact avec la cellule cible. L'une des voies impliquées dans cette régulation spécifique est uniquement dédiée à la régulation du SST3. Celle-ci permet de relier l'activité de sécrétion de l'injectisome à l'expression des gènes du SST3. Cette cascade de couplage « sécrétion/synthèse » est retrouvée chez de nombreux pathogènes et implique généralement un régulateur transcriptionnel de type AraC/XylS (voir Chapitre III: les Régulateurs de type AraC/XylS) dont l'activité est régulée par un ligand protéique en fonction de l'activité de sécrétion.

L'ensemble de ces voies globales et spécifiques converge vers le régulateur clef du SST3 de *P.aeruginosa*, ExsA, et forme « le Réseau de Régulation du SST3 » (Figure 8). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces voies de régulation ainsi que leurs fonctions dans la régulation du SST3 sont décrits dans ce chapitre.



Adapté de : Yahr et Wolfgang, Mol Microbiol. 2006

**Figure 8. Réseau de régulation du SST3**

Les flèches pleines indiquent des connexions de régulation directe et les flèches en pointillées des connexions de régulation indirecte ou à définir.

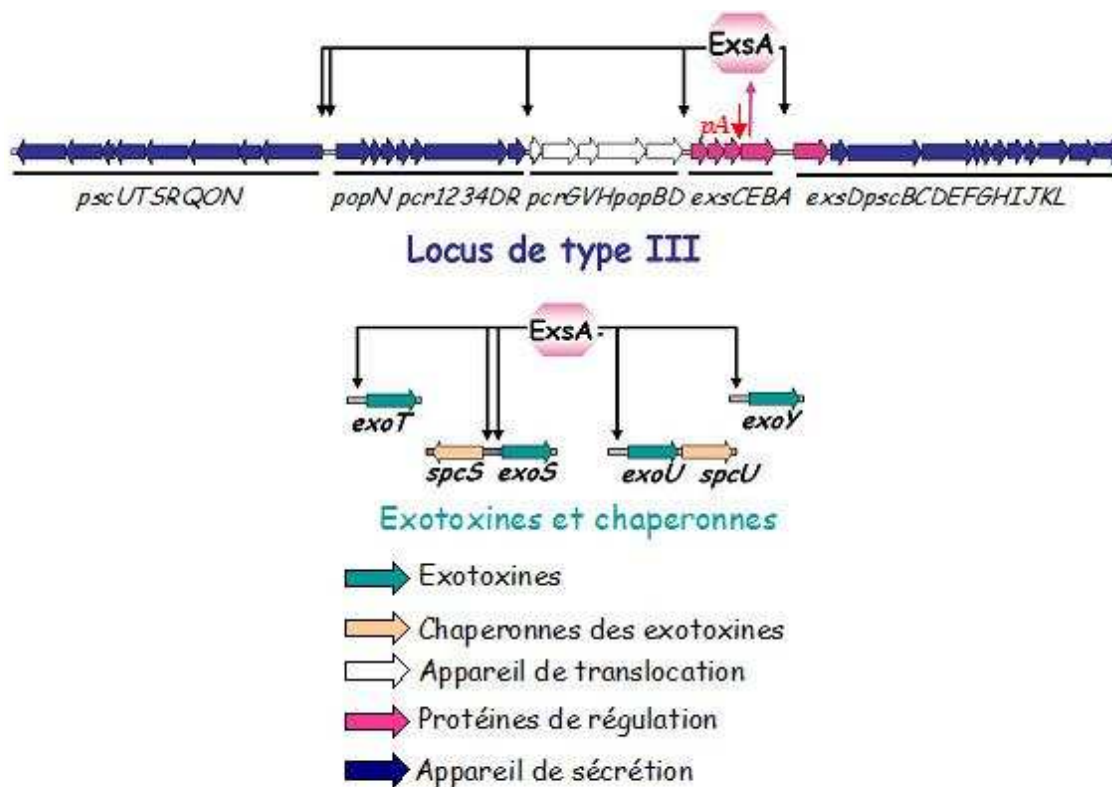
## I. Régulation spécifique

### I.1 Organisation génétique du SST3

Les gènes du SST3 de *P. aeruginosa* codent pour les protéines de l'appareil de sécrétion, les protéines de l'appareil de translocation, les protéines de régulation, les effecteurs et les chaperons associés. La majorité de ces gènes est organisée en 5 opérons regroupés au sein du « Locus de type III » situé sur le chromosome (Figure 9) (Yahr and Wolfgang, 2006). Ces opérons codent pour les protéines de l'appareil de sécrétion, les protéines de l'appareil de translocation et les protéines de régulation (Figure 9). Il est à noter que le gène *exsD* qui code pour

une protéine de régulation se trouve en dehors de l'opéron des gènes de régulation (Figure 9). Les gènes codant pour les effecteurs ExoU, ExoS, ExoY, et ExoT et leurs chaperonnes, SpcU et SpcS, sont localisés en dehors de ce locus sur des sites éloignés les uns des autres (Figure 9) (Yahr and Wolfgang, 2006). La transcription de la totalité des gènes du SST3 est sous la dépendance stricte de ExsA (Exoenzyme S regulator protein A), un régulateur transcriptionnel de type AraC/XylS (Dacheux *et al.*, 2001a; Hovey and Frank, 1995). En absence de ce facteur de transcription clef, la virulence de *P. aeruginosa* est sévèrement atténuée dans des modèles d'infection aiguë (Dacheux *et al.*, 2001a; Yahr *et al.*, 1995; Frank *et al.*, 1994). Une étude transcriptomique a montré que ce régulateur active **uniquement** la transcription des gènes du SST3 (Smith, 2004).

Le contrôle de l'opéron des gènes de régulation *exsCEBA* permet à ExsA de réguler positivement sa propre transcription. Très récemment, l'équipe de S. Lory a démontré qu'il existe un deuxième promoteur en amont du gène *exsA* (non publié, *Pseudomonas* Congress 2009). L'activité de ce promoteur serait  $\sigma^{70}$ -dépendante et ExsA-indépendante. De plus, la stabilité des transcrits *exsA* serait régulée par une voie de régulation globale de la virulence impliquant la protéine RsmA (décrite dans la partie II.1.1) (non publié, *Pseudomonas* Congress 2009).



**Figure 9. Organisation génétique du SST3**

(Yahr, 2006; Yahr *et al.*, 1996; Hovey and Frank, 1995; Yahr *et al.*, 1995; Yahr and Frank, 1994)

Les opérons sont indiqués par des traits sous les gènes et la fonction des gènes est rapportée à une couleur indiquée dans la légende. La protéine ExsA est représentée par un hexagone et les flèches noires indiquent sa fixation sur les promoteurs des opérons du SST3. La flèche rouge indique le promoteur *pexsA*.

## I.2 Induction du SST3

Une signalisation contact-dépendante entre *P. aeruginosa* et la cellule eucaryote cible est indispensable *in vivo* pour induire l'expression des gènes du SST3 par ExsA (Engel and Balachandran, 2009; Vallis *et al.*, 1999; Rosqvist *et al.*, 1995). L'adhésion de la bactérie aux cellules grâce aux pili de type IV est nécessaire à cette induction (Sundin *et al.*, 2002).

Suite au contact avec la cellule cible, l'ouverture du canal de sécrétion permet la translocation d'une protéine de 9 kDa, ExsE, dans la cellule cible et active une adénylate-cyclase, CyaB (ces mécanismes sont décrits en détail en I.2 et II.1.2). (Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005; Wolfgang *et al.*, 2003). La

diminution de la concentration intracellulaire de la protéine ExsE entraîne l'activation de la transcription ExsA-dépendante des gènes du SST3 à travers une cascade de couplage qui relie l'activité de translocation à l'activité transcriptionnelle. Les effecteurs néo-synthétisés sont ensuite transloqués dans le cytoplasme eucaryote.

L'induction du SST3 peut être mimée *in vitro* par déplétion en calcium du milieu de culture et la présence de sérum (Vallis *et al.*, 1999). Dix ans après cette découverte, nous ne savons toujours pas si ces phénomènes représentent une réalité physiologique. Cependant, la faible concentration en calcium résultant de la présence d'un chélateur dans le milieu n'est pas suffisante pour induire le SST3 (Kim *et al.*, 2005). Cette induction nécessite la présence additionnelle de TSF (Type III Secretion Factors), des protéines comme la caséine et l'albumine présentes dans le sérum ainsi que dans le milieu LB (Kim *et al.*, 2005). Ces protéines ont la particularité de posséder une faible affinité mais de nombreux sites de fixation pour le calcium. L'action coordonnée des TSF et du chélateur permettrait d'initier la sécrétion par un mécanisme encore inconnu (Kim *et al.*, 2005). Certaines études suggèrent que la déplétion en calcium n'active pas la machinerie de sécrétion mais induit « un switch » parmi les substrats sécrétés. Ainsi les translocateurs seraient constitutivement sécrétés et la déplétion en calcium induirait seulement la sécrétion de ExsE puis des toxines (Cisz *et al.*, 2008).

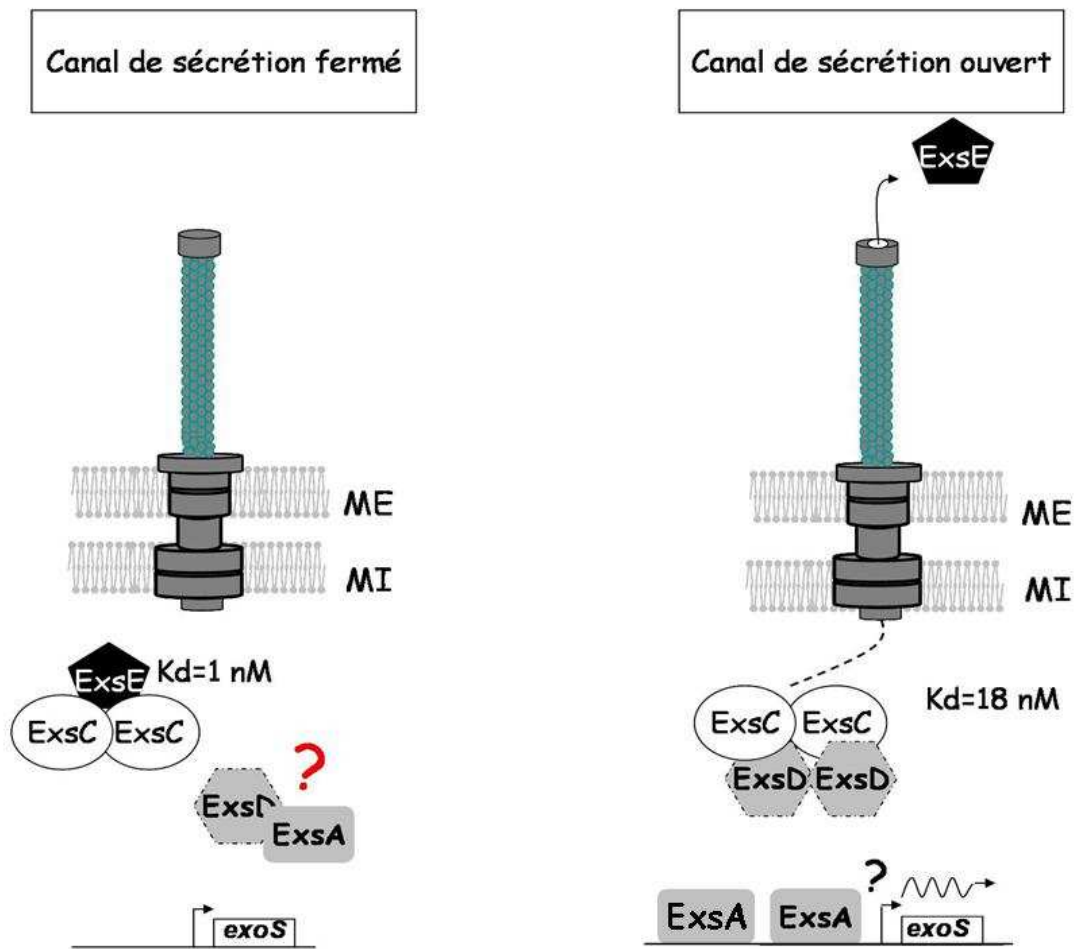
Le rôle physique de l'aiguille du SST3 de *P. aeruginosa* dans la détection du signal d'induction n'a pas été mis en évidence. Chez *Yersinia pestis* et *Shigella flexneri*, l'aiguille de sécrétion pourrait jouer le rôle de senseur de la faible concentration en calcium et du contact cellulaire (Blocker *et al.*, 2008; Torruellas *et al.*, 2005). Ces deux phénomènes induiraient un changement de conformation de l'aiguille qui passerait du mode fermé au mode ouvert. Le signal serait généré à son sommet et serait relayé à la base par de faibles changements structuraux des unités la composant. Ce modèle reste à l'heure actuelle très spéculatif.

### I.3 La transcription des gènes du SST3 est couplée à l'activité de sécrétion: rôle des protéines ExsE, C, D.

Il existe une voie de régulation uniquement dédiée à la régulation du SST3 qui permet de rapidement déclencher la synthèse des exotoxines suite à l'insertion du pore de translocation dans la cellule eucaryote cible. Cette voie, appelée « cascade de couplage sécrétion /synthèse», permet de réguler la transcription des gènes du SST3 en fonction de l'activité de sécrétion, à travers une cascade d'interactions protéiques incluant **ExsA** et trois autres protéines **ExsD** (anti-activateur de **ExsA**), **ExsC** (anti-anti-activateur de **ExsA**) et **ExsE** (protéine transloquée) (Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005; Dasgupta *et al.*, 2004; McCaw *et al.*, 2002).

Le modèle du couplage sécrétion/synthèse propose qu'en absence de sécrétion, **ExsC** interagit avec **ExsE**, et ainsi **ExsD** inhibe l'activité de **ExsA** (Figure 10). L'ouverture du canal de sécrétion, entraîne la translocation de **ExsE**. Dans cette condition de faible concentration intracellulaire de **ExsE**, **ExsC** interagit avec **ExsD** et **ExsA** est ainsi capable d'activer la transcription des gènes du SST3 (Figure 10). La diminution de la concentration de **ExsE** suite à sa translocation est « l'évènement déclencheur » qui permet de déplacer les équilibres d'interactions entre les partenaires protéiques.





**Figure 10. Modèle de la cascade de couplage "Sécrétion/Synthèse"**

Les abréviations indiquent ME=Membrane externe ; MI=Membrane interne. Le gène *exoS* est indiqué comme exemple.

**ExsD** est une protéine de 33 kDa trimérique en solution (Zheng *et al.*, 2007). Au sein de ce trimère, l'auto-association entre les trois molécules est dynamique mais n'est pas nécessaire à son activité *in vivo* (Zheng *et al.*, 2007; Lykken *et al.*, 2006). ExsC et ExsD forment un complexe de ratio 2:2. La constante d'affinité entre ces deux protéines mesurée par microcalorimétrie est de 18 nM (Zheng *et al.*, 2007). **ExsC** est aussi un dimère seule en solution et possède les caractéristiques physico-chimiques d'une chaperonne SST3 de **Classe I**. En effet, il s'agit d'une petite protéine (16 kDa) dimérique qui possède un pI acide (4,9) et qui stabilise dans le cytoplasme la protéine transloquée ExsE (Urbanowski *et al.*, 2007; Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005). Il a été montré que son homodimérisation est indispensable à sa fonctionnalité *in vivo* (Lykken *et al.*, 2006). ExsE et ExsC forment

un complexe de ratio 1:2 et avec une constante d'affinité de 1 nM (Zheng *et al.*, 2007). Enfin, les interactions de ExsC avec ExsD et ExsE représentent un rare exemple de chaperonne du SST3 de Classe I associée à une protéine qui n'est pas sécrétée (ExsD) et à une protéine sécrétée qui n'est pas une exotoxine (ExsE).

Aucune activité cytotoxique de ExsE n'a été détectée jusqu'à aujourd'hui (Urbanowski *et al.*, 2007). Ceci suggère que sa translocation est uniquement dédiée à l'induction de l'activité transcriptionnelle du SST3 suite au contact avec la cellule cible. En effet, les délétions individuelles ou combinées des quatre exotoxines connues ExoU, S, T et Y, montrent que l'ensemble des effets cytotoxiques sur les cellules eucaryotes est la conséquence des activités de chacune de ces toxines et que celles-ci fonctionnent en synergie (Ichikawa *et al.*, 2005). A priori, il n'existe donc pas d'effet cytotoxique non attribué à une toxine. De plus, la translocation d'ExsE à partir d'une souche de *P. aeruginosa* n'exprimant pas les deux principales toxines ( $\Delta$ exoUT) n'a aucun effet cytotoxique sur les cellules CHO. Néanmoins, la cytotoxicité de cette souche n'a pas été testée sur des macrophages ou sur des cellules épithéliales. Il est donc toujours possible que le co-facteur eucaryote spécifique d'ExsE, nécessaire à son activité intracellulaire, soit uniquement présent dans ces types de cellules (Urbanowski *et al.*, 2007).

En plus de cette cascade de régulation bien établie, (Dasgupta *et al.*, 2006) il a été montré qu'il est possible de déclencher l'activation du SST3 de façon ExsC-indépendante. Cette voie est spécifique aux cellules épithéliales et lignées « macrophage like » et nécessite le régulateur global Vfr (homologue de CRP de *E. coli*) (Dasgupta *et al.*, 2006). Il est proposé l'existence d'un homologue d'ExsC ou d'une régulation post-traductionnelle d'ExsA ou d'ExsD.

Des homologues de ExsC, ExsD, ExsE et ExsA sont retrouvés chez d'autres bactéries ce qui suggère que ce mécanisme de régulation utilisé par *P. aeruginosa* est aussi employé par d'autres espèces. Les homologues de ExsA chez *Aeromonas*

*hydrophila* et *Photobacterium luminescens* complètent une souche  $\Delta$ exsA à 90% et 50%, respectivement (Brutinel *et al.*, 2008). Chez *Vibrio parahaemolyticus*, il a été montré que l'homologue de ExsD ne se fixe pas sur les promoteurs du SST3 et qu'il régule négativement l'activité de l'homologue de ExsA (Zhou *et al.*, 2008).

Chez d'autres espèces comme *Shigella* ou *Salmonella*, l'activité transcriptionnelle des gènes du SST3 est aussi reliée à l'activité de sécrétion (décrit dans la partie II de ce chapitre). Il est intéressant de noter que ces cascades de couplage ne se compose que de **trois** protéines : le facteur de transcription, la protéine sécrétée et enfin le co-activateur du facteur de transcription, co-activateur qui est aussi la chaperonne de la protéine sécrétée. D'après les fonctions décrites ci-dessus, dans la cascade « DCEA » ExsD est la protéine « supplémentaire » et qui possède la fonction particulière d'inhibiteur.

#### **I.4 PtrA (*Pseudomonas* Type II repressor A)**

PtrA a été identifié comme le deuxième inhibiteur spécifique d'ExsA. Cette protéine a été identifiée par la technique IVET (*in vivo expression technology*) dans un modèle d'infections de brûlure de peau de souris ; elle serait capable d'inhiber spécifiquement la transcription des gènes du SST3 en réponse à un stress cuivrique (Ha *et al.*, 2004). L'interaction entre PtrA et ExsA a été mise en évidence par des expériences de double hybride, ELISA et Pull down (Ha *et al.*, 2004).

Malgré de nombreuses approches utilisées dans le laboratoire, nous n'avons pas confirmé l'effet de PtrA sur ExsA, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.



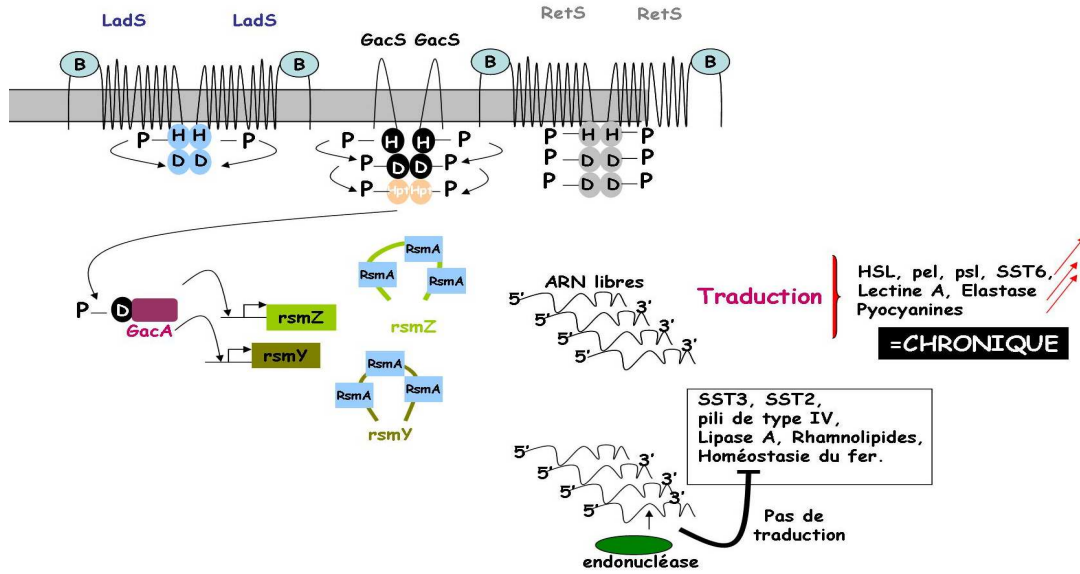
## II. Régulation Globale

### II.1 Régulation réciproque du SST3 avec les autres facteurs de virulence

#### II.1.1 La voie de signalisation *GacA/GacS/RsmYZ, RetS et LadS*

Le système à deux-composants *GacA/GacS* joue un rôle prépondérant dans la régulation de nombreux processus qui incluent la formation du biofilm, la motilité, la résistance aux antibiotiques et l'expression des facteurs de virulence extracellulaires (Davies *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 2006; Ventre *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2004; Parkins *et al.*, 2001). Le régulateur de réponse *GacA*, est nécessaire à la pathogénie de la bactérie dans de nombreux hôtes (mammifères, nématodes, insectes et plantes) (Gooderham and Hancock, 2009). Suite à la détection d'un signal extracellulaire encore inconnu (identifié comme étant des saccharides chez *P. putida*) (Dubern *et al.*, 2006)), le senseur *GacS* qui est une histidine kinase membranaire s'autophosphoryle (Heeb, 2001) (Figure 11) et le phosphate est transféré sur *GacA*, ce qui permet son activation. Le régulateur de réponse ainsi activé se fixe exclusivement sur la « *GacA box* » en amont des gènes *rsmZ* et *rsmY* (Figure 11) (Brencic *et al.*, 2009). *RsmZ* et *RsmY* sont deux petits ARN qui contrôlent négativement l'activité de *RsmA*, une protéine qui se fixe sur l'ARN (Heeb *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2006). Plusieurs molécules de *RsmA* peuvent être séquestrées par *RsmZ* et *RsmY* et ceci empêche la protéine de réguler au niveau post-transcriptionnel ses ARN cibles. *RsmA* contrôle l'activité de plus de 500 gènes impliqués dans la virulence, la motilité, le QS et la réponse au stress dont deux tiers sont régulés négativement (Brencic and Lory, 2009). La régulation négative post-transcriptionnelle par *RsmA* s'effectue par sa fixation sur les ARNm au niveau d'un motif GCA en 5', empêchant ainsi l'initiation de leur traduction (Lory *et al.*, 2009).

A.



B.

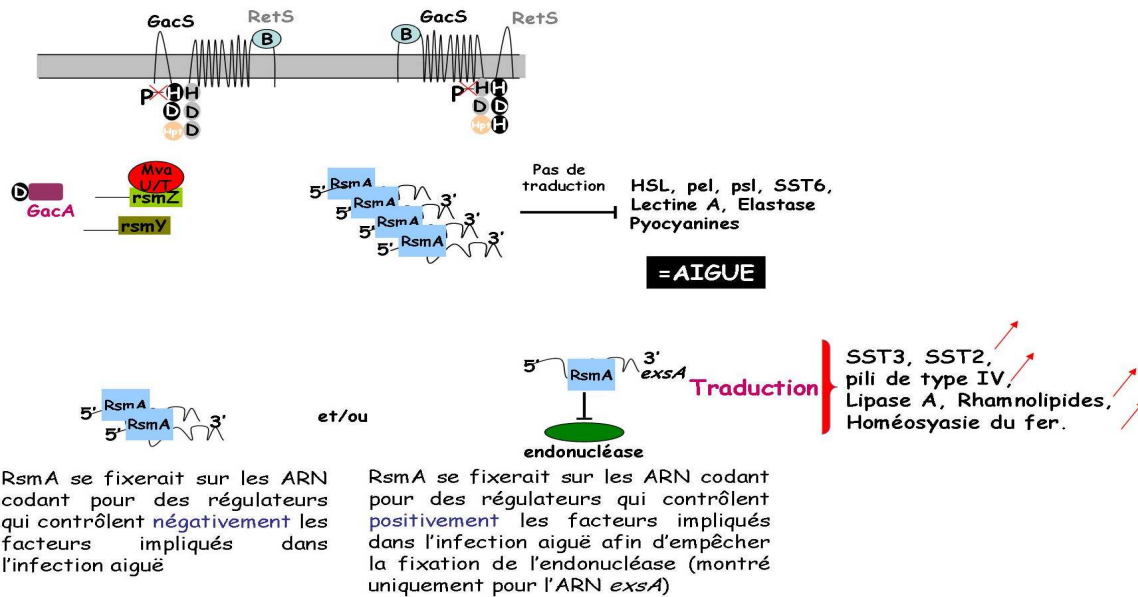


Figure 11. La voie de signalisation RetS/GacAS/RsmZY/RsmA

A. La séquestration de RsmA par RsmZ/Y permet la traduction des transcrits codant pour des facteurs de virulence impliqués dans l'infection chronique. B. La fixation de RsmA sur les ARN permet soit la traduction des transcrits codant pour des facteurs de virulence impliqués dans l'infection aiguë soit empêche la traduction des transcrits codant pour des régulateurs qui contrôlent négativement l'expression des facteurs de virulence impliqués dans l'infection aiguë. Pour RetS, LadS et GacS les domaines transmetteurs histidine kinase sont indiqués par un H ; les domaines receveurs des histidine kinase, par un D et le domaine transmetteur par Hpt. Les boucles périplasmiques comportant le motif 7TMR-DISMED2 sont représentées par un B.

Au sein de ce régulon, RsmA régule positivement les gènes codant pour des facteurs de virulence impliqués dans la phase aiguë, dont le SST3 (Brencic and Lory, 2009).

Deux mécanismes sont proposés pour expliquer l'effet positif de RsmA. Il a été montré que RsmA empêche la dégradation de l'ARN d'*exsA* en se fixant sur le site d'une endonucléase (Figure 11) (S.Lory, 2009, *Pseudomonas* congress). L'autre mécanisme impliquerait une régulation indirecte par RsmA : la protéine se fixerait sur des ARN codant pour des régulateurs qui contrôlent négativement les facteurs de virulence impliqués dans l'infection aiguë afin d'empêcher leur traduction (Figure 11) (Brencic *et al.*, 2009).

La voie GacA/GacS/RsmZY est également reliée aux histidine kinases non orthodoxes RetS et LadS. RetS et LadS font partie de la famille des régulateurs à deux composants comportant des domaines non classiques. Ils possèdent 8 segments transmembranaires, dont le premier et le deuxième sont reliés par un domaine périplasmique 7TMR-DISMED2 (7 TransMembrane Receptors with Diverse Intracellular Signalling Modules) qui serait capable de détecter des sources carbonées (Filloux and Ventre, 2006), un domaine transmetteur des histidine kinase et un (LadS) ou deux (RetS) domaines receveurs régulateurs de réponse (Ventre *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2004). RetS active l'expression des gènes du SST3, SST2, lipase A, endotoxine A, pili de type IV et inhibe la transcription des gènes codant pour des systèmes impliqués dans la formation du biofilm (les opérons *psl* et *pel*) ainsi que le SST6 (Figure 11) (Goodman *et al.*, 2004).

LadS agit à l'inverse de RetS (Ventre *et al.*, 2006). En effet, il est proposé que ces deux senseurs soient responsables de la transition entre la phase aiguë et la phase chronique (Filloux and Ventre, 2006). Récemment, il a été montré que RetS/GacS/GacA et RsmY/RsmZ/RsmA appartiennent à une même voie de régulation, car RetS interagit directement avec GacS afin de former un hétérodimère inactif au sein duquel GacS est incapable de s'autophosphoryler

(Figure 11) (Goodman *et al.*, 2009). L'influence positive de RetS sur le SST3 est donc fonction de son inhibition sur le système GacA/GacS.

Il est communément admis depuis des années que la formation du biofilm et l'activation du SST3 sont deux phénomènes mutuellement exclusifs car ils sont impliqués respectivement dans l'infection chronique et l'infection aiguë. Une étude récente vient cependant de remettre en cause cette exclusivité en démontrant la sécrétion active des toxines du SST3 au sein du biofilm (Mikkelsen *et al.*, 2009). La distinction entre les facteurs de virulence activés lors de l'infection aiguë ou de l'infection chronique n'est donc pas si claire.

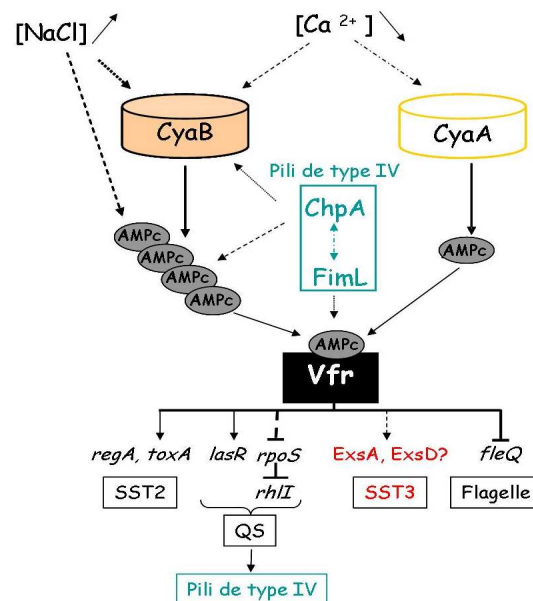
### II.1.2 Implication du régulateur global Vfr et de l'AMPC

Par des approches globales d'analyse transcriptomique, d'autres régulateurs du SST3 ont été identifiés. Ainsi, en utilisant les puces à ADN, Wolfgang *et al.* (Wolfgang *et al.*, 2003) ont démontré l'implication d'une adénylate cyclase de classe III, CyaB dans la réponse induite par la carence en calcium (condition d'induction du SST3 *in vitro*). Cette enzyme est essentielle à la synthèse d'AMPC (Adénosine Monophosphate cyclique) qui est un messager secondaire impliqué dans de nombreuses voies de transduction du signal dans *P. aeruginosa* (Wolfgang *et al.*, 2003). Une deuxième adénylate cyclase, CyaA, permet également la synthèse d'AMPC mais son activité de synthèse est plus faible que celle de CyaB (Wolfgang *et al.*, 2003). Le domaine catalytique de CyaB présente des caractères communs avec des adénylates cyclases qui sont régulées par le carbone inorganique ( $\text{CO}_2$  /  $\text{HCO}_3^-$ ) (Linder and Schultz, 2003). En détectant le  $\text{HCO}_3^-$ , CyaB permettrait donc à la bactérie de répondre aux variations de carbone inorganique extracellulaire en modulant la concentration intracellulaire en AMPC (Figure 12) (Yahr and Wolfgang, 2006).

Le mutant  $\Delta\text{cyaB}$ , qui présente une concentration en AMPC intracellulaire négligeable, ne possède plus d'activité cytotoxique SST3-dépendante : il existerait



donc un lien entre la concentration en AMPc et le SST3. (Smith *et al.*, 2004; Wolfgang *et al.*, 2003). Ce lien est conforté par le fait que des concentrations faibles en  $\text{Ca}^{2+}$  et élevée en NaCl entraînent une augmentation de la concentration cellulaire en AMPc et l'activation de la transcription des gènes du SST3 *in vitro* (Figure 12) (Rietsch and Mekalanos, 2006; Wolfgang *et al.*, 2003).



**Figure 12. Régulation de l'activité et de la synthèse de Vfr et facteurs régulés par Vfr**

L'AMPc influence l'expression des gènes en agissant en tant que régulateur allostérique de Vfr, l'homologue de CRP chez *E. coli* (Wolfgang *et al.*, 2003 ; Beatson *et al.*, 2002; Albus *et al.*, 1997; West *et al.*, 1994). Ce facteur se fixe sur la séquence consensus VCS 5'ANAWWTGNGAWNYAGWTCACAT 3' (Vfr Consensus Binding Sequence) sous forme de dimère en induisant une courbure de l'ADN (Kanack *et al.*, 2006). Vfr peut contrôler négativement ou positivement l'expression de facteurs de virulence en se fixant directement sur les promoteurs des gènes qu'il régule (*lasR, fleQ, regA, toxA*) ou indirectement à travers des mécanismes encore inconnus (Figure 12)(Kanack *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Dasgupta *et al.*, 2002; Albus *et al.*, 1997).

Dans le cas de la régulation du SST3, il a été montré que Vfr est requis à l'expression optimale du SST3 et que ce régulateur agit en amont ou au même niveau que ExsA au sein d'une voie de régulation dont les mécanismes ne sont pas connus (Wolfgang *et al.*, 2003). Vfr est mentionné dans la voie ExsC-indépendante mais son rôle reste peu clair. L'hypothèse d'une régulation directe de la synthèse d'ExsA par Vfr semble peu probable puisque Vfr ne se fixe pas sur le promoteur des gènes de régulation du SST3 (*pC*), mais cela reste à être démontré pour le promoteur *pA* (Shen *et al.*, 2006). Par contre, en absence de ExsD, Vfr n'est plus nécessaire à l'expression des gènes du SST3, ce qui suggère que Vfr influence la dérépression de ExsA en agissant sur l'anti-activateur ExsD (Dasgupta *et al.*, 2006).

Enfin, la synthèse d'AMPc et l'expression de *vfr* sont régulées positivement par des protéines impliquées dans la biogenèse et la fonction du pili de type IV, ChpA et FimL respectivement (Figure 12) (Whitchurch *et al.*, 2005; Whitchurch *et al.*, 2004; Darzins, 1995; Darzins, 1994). Bien que ces mécanismes de régulation soient peu compris, ils semblent relier directement l'expression du SST3 avec les pili de type IV qui sont indispensables à l'induction contact-dépendante du SST3 (Figure 12) (Yahr and Wolfgang, 2006).

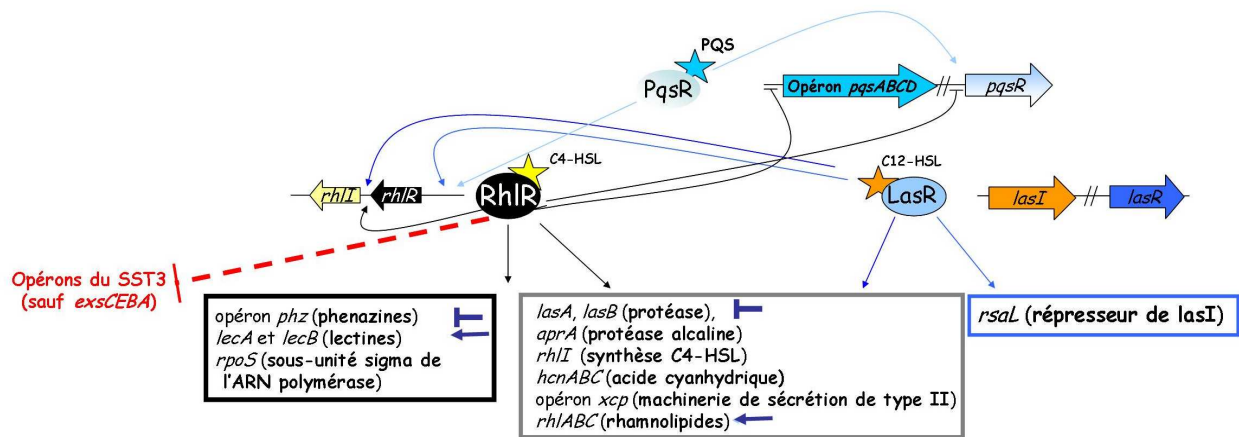
### II.1.3 Le Quorum -Sensing (QS)

Le quorum-sensing (QS) est un système de communication entre les bactéries qui leur permet de coordonner leur comportement. Ce système repose sur des molécules diffusibles, des N-acétyl-homosérine lactones, qui sont produites par chaque cellule. La concentration en N-acétyl-homosérine lactones augmente donc en fonction de la concentration cellulaire. Lorsqu'une certaine concentration est atteinte, ces molécules se fixent à des régulateurs transcriptionnels spécifiques qui vont alors activer la transcription des gènes régulés par ce système chez l'ensemble des bactéries. (Fuqua *et al.*, 1994; Kaplan, 1985).

Chez *P. aeruginosa*, coexistent deux principaux systèmes de QS, *las* et *rhl* (Pearson *et al.*, 1999; Pesci *et al.*, 1997; Latifi *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1995;

Gambello and Iglewski, 1991). Les deux molécules diffusibles principales, C12-HSL et C4-HSL, sont synthétisées par LasI et RhII et se lient à LasR et RhIR. Le complexe AHL/facteur de transcription ainsi formé va pouvoir activer la transcription de nombreux gènes : **6 à 10 % du génome est régulé par le QS**. Parmi ces gènes figurent ceux impliqués dans la virulence. Ceux-ci sont régulés positivement par le QS lorsque les bactéries sont à l'état planctonique (Williams *et al.*, 2007; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Le complexe LasR-C12-HSL active la transcription de *rhlR* et *rhlI*. LasR se place donc en amont de RhIR dans ce système (Figure 13). La transcription des gènes de virulence régulés par le QS peut être contrôlée par LasR, par RhIR ou par les deux (le plus commun) (Figure 13).

En 1999, un troisième auto-inducteur dont la structure est très différente des deux autres a été découvert (Pesci *et al.*, 1999) ; il s'agit du 2-heptyl-3-hydroxy-quinolone ou PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) qui appartient à la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) connues pour leur activité antimicrobienne. Dans ce système, les PQS se lient au régulateur PqsR et ce complexe permet la transcription de divers facteurs de virulence, incluant les élastases, les pyocyanines et la lectine LecA, et il affecte la formation de biofilm (Figure 13) (Dubern and Diggle, 2008). L'expression de *pqsR* est modulée par LasR et RhIR et le régulateur PqsR est lui-même nécessaire à l'expression de *rhlR* et *rhlI* (McGrath *et al.*, 2004; Pesci *et al.*, 1999) (Figure 13).



**Figure 13. Régulation des facteurs de virulence par les systèmes *las*, *rhl* et PQS.**

Les régulateurs transcriptionnels sont indiqués par des ronds, les molécules auto-inductrices par des étoiles et les gènes du QS par des flèches. Les cadres représentent l'ensemble des gènes régulés positivement par RhIR (en noir), RhIR et LasR (en gris), LasR (en bleu). Les flèches et les barres bleues dans les cadres indiquent des gènes qui sont aussi régulés par PqsR.

Deux régulateurs orphelins, QscR et VqsR (qui ne sont pas associés à leur propre AHL synthase), régulent la transcription des gènes *las* et *rhl* de manière négative et positive, respectivement (Williams and Camara, 2009). QscR agirait en tant que répresseur en formant des hétérodimères inactifs avec RhIR et LasR (Ledgham *et al.*, 2003). Il possède, de plus, son propre régulon composé d'environ 400 gènes et peut fonctionner en tant qu'activateur ou répresseur (Ledgham *et al.*, 2003).

Comme indiqué sur la Figure 13, les systèmes *las*, *rhl* et PQS exercent en général un effet positif sur l'ensemble des facteurs de virulence, sauf le SST3 (Bleves *et al.*, 2005). Le mécanisme par lequel le complexe RhIR-C4-HSL inhibe l'activité des promoteurs des gènes SST3 reste inconnu (Bleves *et al.*, 2005).

#### II.1.4 MvaU/MvaT

MvaT et MvaU sont deux régulateurs transcriptionnels de type H-NS, qui ont la capacité de former des structures « ADN/H-NS/ADN » entre deux molécules d'ADN séparées, aussi bien qu'entre deux portions de la même molécule d'ADN (Dorman, 2007). Ces protéines reconnaissent des séquences riches en A+T, et suite

à leur fixation sur l'ADN, le complexe nucléoprotéique formé inhibe la transcription en empêchant l'accès à l'ARN polymérase. Ces protéines sont qualifiées de « silencing foreign DNA elements » (Dame *et al.*, 2005). Dans *P. aeruginosa*, MvaU et MvaT régulent l'expression d'environ 150 gènes dont la majorité code pour des protéines associées à la surface cellulaire (de type fimbriae) qui jouent un rôle prépondérant dans la formation du biofilm (Castang *et al.*, 2008; Westfall *et al.*, 2006; Vallet *et al.*, 2004). Ces deux protéines fonctionnent de manière coordonnée et reconnaissent les mêmes séquences. La délétion des gènes *mvaT* et *mvaU* est létale pour la cellule tandis que la délétion simple de *mvaT* ou *mvaU* entraîne la surexpression de gènes impliqués dans le QS, le SST6, le cluster *cupA* (biofilm) ainsi que la surexpression de *exsA* (Castang *et al.*, 2008).

MvaU et MvaT se fixent sur *rsmZ*, *exsE* et *exsD* (Figure 8). L'implication de MvaT et MvaU dans la régulation du SST3 se ferait donc au niveau des voies globales, mais aussi au niveau des voies spécifiques, et peut être négative (*exsE*) ou positive (*rsmZ* et *exsD*).

### II.1.5 La voie SadA/SadR/SadS (RocA1/RocR/RocS)

Le système de régulation à trois-composants SadA/SadR/SadS (RocA1-RocR-RocS) semble aussi impliqué dans l'activation des facteurs de virulence en fonction du type d'infection, en régulant positivement la formation du biofilm et négativement l'expression des gènes du SST3 (Kuchma *et al.*, 2005). Ce système se compose d'une histidine kinase simple SadS (RocS) qui interagit avec deux régulateurs de réponse, SadA(RocA1) qui se fixe à l'ADN et SadR (RocR) qui contient un domaine EAL (pour Glu-Ala-Leu). SadSA (Roc SA1) active la transcription des opérons *cupB* et *cupC* et réprime celle des gènes du SST3 à travers un mécanisme inconnu (Ruer *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2005). Le régulateur de réponse SadR (RocR) réprime quant à lui l'expression des opérons *cup* en antagonisant la signalisation par SadSA (RocSA1). La présence d'un domaine EAL

au sein de SadR (RocR) suggère que cette protéine possède une activité phosphodiesterase lui permettant de dégrader le messenger secondaire di-GMPc (diguanylate monophosphate cyclique) (Ruer *et al.*, 2007; Kulasekara *et al.*, 2005). En plus de l'AMPc, le di-GMPc est donc un deuxième messenger secondaire impliqué dans la co-régulation du SST3 et des autres facteurs de virulence (Figure 8).

## II.2 Lien entre le stress, le métabolisme, RpoS et la régulation du SST3

Il est communément admis que, en réponse à un stress, l'expression des gènes non essentiels à la survie de l'organisme est inhibée ou diminuée afin de conserver toutes les ressources énergétiques disponibles pour « combattre » ce stress. Ce phénomène s'illustre par la répression de l'expression des gènes du SST3 en réponse à un stress métabolique, la présence d'antibiotique ou lors de dommages à l'ADN (Figure 8).

Chez *P. aeruginosa*, les dommages à l'ADN activent la réponse SOS qui résulte en l'induction des systèmes de réparation de l'ADN et de la production de pyocyanines (Michel-Briand and Baysse, 2002). Le gène codant pour la protéine PtrB est induit lors cette réponse et il a été montré que cette protéine agit en tant que répresseur de l'expression des gènes du SST3 (Figure 8) (Wu and Jin, 2005).

Les enzymes citrate synthétase (PrpC, GltA) et pyruvate déshydrogénase (AceA, AceB) sont impliquées respectivement dans le métabolisme et la synthèse d'acétyl-CoA. La délétion de *aceA* et *aceB* (Dacheux *et al.*, 2002) entraîne la diminution de l'expression des gènes du SST3 tandis que l'effet inverse est observé dans le cas de *prpC* et *gltA* (Rietsch and Mekalanos, 2006) ; ces résultats phénotypiques suggèrent un rôle prépondérant d'un dérivé de l'acétyl-CoA dans la régulation de l'expression des gènes du SST3 (Figure 8) (Rietsch and Mekalanos, 2006). Le lien entre la régulation du SST3 et une voie métabolique impliquant

l'acétyl-CoA vient aussi d'être mis en évidence chez *Yersinia enterocolitica* (Schmid *et al.*, 2009).

Récemment, la nécessité d'une nitrate réductase, NirS, dans la régulation de l'expression du SST3 de *P. aeruginosa* a été mise en évidence (Van Alst, 2009). En absence de cette enzyme, les protéines du SST3 ne sont plus synthétisées. Cette étude suggère que le monoxyde d'azote généré par cette enzyme contribue à la régulation de l'expression du SST3 (Van Alst, 2009). La délétion d'un régulateur de transport du glucose (*gltR*) (Wolfgang *et al.*, 2003), la surproduction de pompes à efflux MDR ou de systèmes impliqués dans le transport et le métabolisme de l'histidine inhibent l'expression des gènes du SST3 (Figure 8) (Linares *et al.*, 2005; Rietsch *et al.*, 2004).

De plus, une voie de régulation directe vient d'être mise en évidence et montre que l'expression des gènes du SST3 est réprimée en faveur de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (LCFA pour Long Chain Fatty Acid) (Kang *et al.*, 2008). Cette voie implique PsrA, un régulateur transcriptionnel dimérique de type TetR (Figure 8) (Kang *et al.*, 2008; Kojic *et al.*, 2002)). En fonction de la concentration intracellulaire en LCFA, limitante ou en excès, PsrA est capable d'activer ou d'inhiber la transcription du promoteur *pexsCBA* et du promoteur de *rpoS* (Kang *et al.*, 2009). Cependant le rôle direct de PsrA dans la régulation du SST3 est controversé (Gooderham *et al.*, 2008). En effet, la fixation *in vitro* de PsrA sur le promoteur de l'opéron *exsCEBA* requiert des concentrations élevées de PsrA, de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . (Kang *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2006). Il est possible que PsrA ne régule qu'indirectement l'expression du SST3 en contrôlant l'expression de RpoS. En effet, RpoS affecte négativement l'expression du SST3 (Figure 8) (Hogardt *et al.*, 2004).

RpoS est exprimé lors de la phase stationnaire de croissance et régule 40% des gènes du QS. Son expression est elle-même régulée positivement par RhIR (Dekimpe and Deziel, 2009; Hogardt *et al.*, 2004; Schuster *et al.*, 2004). A l'inverse, le SST3 est majoritairement exprimé en phase exponentielle de croissance et son

expression est inhibée par le QS (Hogardt *et al.*, 2004; Dacheux *et al.*, 2001b). Il est suggéré que RpoS est à l'interface de cette régulation SST3/QS mais cela reste à être démontré.

Enfin, l'expression du SST3 est inhibée en phase stationnaire de croissance par des catabolites du tryptophane (acide acétique-3-indole (IAA) et kynurérine) synthétisés par les bactéries lors du passage d'une densité cellulaire faible à élevée (Shen *et al.*, 2008). Cette régulation est indépendante des molécules de signalisation du QS.

### **La régulation des régulateurs.**

Les nombreuses études réalisées ces dix dernières années ont permis de mieux comprendre la régulation du SST3. Cette régulation se fait majoritairement au niveau transcriptionnel mais il existe aussi une régulation au niveau post-transcriptionnel impliquant la protéine RsmA. La délétion de *rsmA* entraîne la diminution de la quantité de transcrit *vfr* et *cyaB* et la surproduction de Vfr peut compléter un mutant  $\Delta retS$  (Wolfgang *et al.*, 2003). Ces observations démontrent que ces différentes voies de signalisation sont interconnectées à travers des liens qui restent inconnus.

L'ensemble des voies décrites dans ce chapitre composant le réseau de régulation du SST3 converge vers ExsA. Les régulations directes de l'activité de ExsA par ExsD et PtrA et de la synthèse de ExsA par RsmA et PsrA ont été mises en évidence. Il reste donc à déterminer à travers quels mécanismes directs ou indirects les autres voies de régulation contrôlent la synthèse et/ou l'activité de ce facteur de transcription afin de réguler l'expression du SST3. Dans les exemples de régulation par Vfr et MvaU/MvaT, il est proposé que ces régulateurs agissent sur l'activité de ExsA à son travers son anti-activateur ExsD.



### III. Les cascades de couplage « Sécrétion/ Synthèse » chez *Shigella Flexneri* et *Salmonella enterica* serovar typhimurium.

Chez *S. flexneri* et *S. enterica*, l'activité de sécrétion est également reliée à l'expression des gènes du SST3. Ce couplage « sécrétion/synthèse » permet à la bactérie de s'assurer du besoin de la sécrétion, en détectant la présence de la cellule eucaryote cible et de la fonctionnalité de l'injectisome, avant d'augmenter la transcription des gènes codant pour certains effecteurs et leurs chaperonnes chez *S. flexneri* ou pour l'ensemble des effecteurs, des translocateurs et leurs chaperonnes associées chez *S. enterica* chez du et du SST3, phénomène coûteux énergétiquement pour la bactérie. De façon générale, cette voie implique une protéine sécrétée et sa chaperonne spécifique. L'activation de la sécrétion a deux conséquences sur ce couple protéine/chaperonne, la sécrétion de la protéine et la libération de sa chaperonne. Ces deux évènements vont influencer l'expression des gènes du SST3 au niveau transcriptionnel en régulant l'activité d'un facteur de transcription de type AraC/XylS.

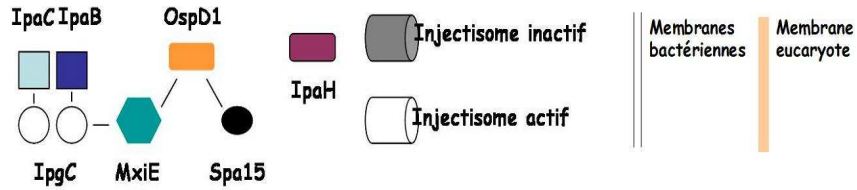
*Remarque: chez Y. pestis, il existe également un couplage entre « sécrétion/synthèse ». Cependant cette régulation s'effectue au niveau traductionnel et n'implique pas le régulateur de type AraC/XylS, VirF (homologue de ExsA, InvF et MxiE) (Olsson et al., 2004; Anderson et al., 2002; Cambronne and Schneewind, 2002; Neyt and Cornelis, 1999; Wattiau and Cornelis, 1993 ; Hoe et al., 1992).*

#### III.1 *Shigella flexneri*

*S. flexneri* est une bactérie intracellulaire responsable de la dysenterie bacillaire, ou shigellose. Les symptômes, crampes abdominales et diarrhées hémorragiques, sont provoqués par la destruction des épithéliums du colon et rectaux suite à l'invasion par les bactéries et à l'activation de la réponse inflammatoire de l'hôte (Labrec *et al.*, 1964); Sansonetti, 2000 #156; Parsot, 2005 #93; Phalipon, 2007 #92}). Au cours de l'infection, *Shigella* entre et dissémine dans les

cellules épithéliales non phagocytaires grâce aux effecteurs transportés par le SST3 (Blocker *et al.*, 2001; Blocker *et al.*, 1999; Parsot *et al.*, 1995; Allaoui *et al.*, 1993; Andrews and Maurelli, 1992; Venkatesan *et al.*, 1992).

La transcription des gènes du SST3 de *S. flexneri* est induite par deux stimuli différents : l'élévation de la température et le contact avec la cellule cible eucaryote. Tout d'abord, lorsque la température atteint 37°C le régulateur transcriptionnel de type AraC/XylS, VirF, active la transcription du gène *virB* codant pour un régulateur de type ParB (Beloin *et al.*, 2002; Adler *et al.*, 1989). La protéine VirB active alors la transcription des gènes codant pour les protéines de l'injectisome, les chaperonnes, les protéines de régulation et la première classe (« early ») des effecteurs (Tobe *et al.*, 1993). Les effecteurs ainsi synthétisés vont s'accumuler dans la cellule jusqu'à l'activation de la sécrétion. Suite au contact avec la cellule cible, la sécrétion est activée ce qui entraîne la transcription d'une quinzaine de gènes codant pour la deuxième classe (« late ») des effecteurs par MxiE, un régulateur de type AraC/XylS homologue de ExsA (Le Gall *et al.*, 2005; Menard *et al.*, 1994). L'activité de MxiE dépend de son co-activateur IpgC, la chaperonne de classe II des translocateurs IpaB et IpaC (Parsot *et al.*, 2005; Mavris *et al.*, 2002). L'interaction entre MxiE et IpgC n'est possible que lorsque l'activité sécrétoire est activée. La translocation hiérarchisée des translocateurs IpaB et IpaC puis de l'anti-activateur de MxiE, OspD1, permet l'activation de MxiE grâce à son interaction avec IpgC (Figure 14, d'après (Parsot *et al.*, 2005).



**A. En absence de sécrétion**, les translocateurs IpaB et IpaC sont associés indépendamment avec IpgC ce qui empêche l'interaction prématurée entre les deux translocateurs et permet la titration (non complète) de IpgC.

La protéine OspD1 est associée à Spa15 au sein d'un complexe qui la stabilise et la maintient dans un état compétent pour la sécrétion. Le complexe OspD1/Spa15 séquestre MxiE afin de le stabiliser et d'empêcher son activation par IpgC.

**B. Lors de l'activation de la sécrétion** suite au contact avec la cellule cible, IpaC et IpaB sont sécrétés. Ceci permet la libération de IpgC mais n'est pas suffisant pour activer MxiE qui reste séquestré par le complexe OspD1/Spa15.

**C. L'ouverture du canal et la mise en place de l'injectisome** permettent ensuite la translocation de OspD1. MxiE ainsi libéré peut alors interagir avec IpgC et le complexe se fixerait sur les promoteurs MxiE-dépendants des gènes codant pour certains effecteurs.

**D. Le complexe MxiE/ipgC active la transcription** des gènes codant pour les effecteurs, tel *ipaH*.

Les effecteurs ainsi nouvellement synthétisés sont transloqués dans la cellule cible afin de perturber la signalisation cellulaire.

**E. Suite à la fermeture du canal**, les molécules nouvellement synthétisées s'accumulent dans le cytoplasme

**F. L'augmentation de la concentration intracellulaire en complexe OspD1/Spa15** entraîne la dissociation du complexe MxiE/IpgC. De ce fait, La transcription des gènes MxiE-dépendant est de nouveau réprimée.

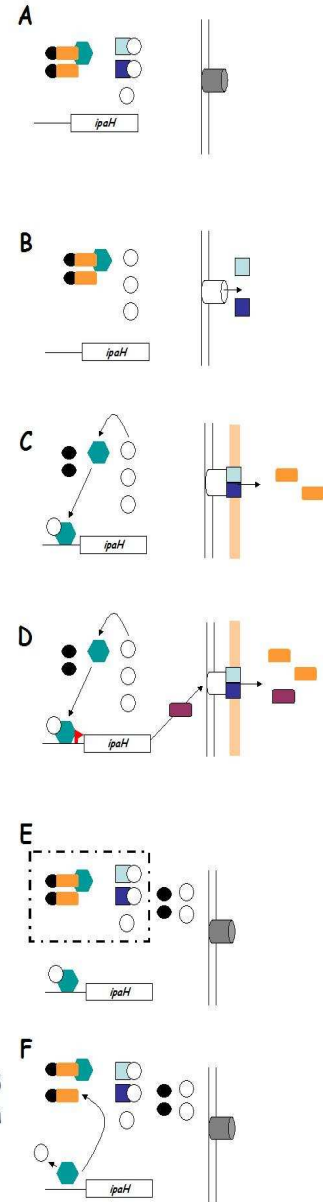


Figure 14. Modèle de régulation de la transcription par l'activité de sécrétion chez *S. flexneri* (d'après (Parsot *et al.*, 2005))

De façon similaire à la cascade « ADCE » de *P. aeruginosa*, les variations de concentration intracellulaire en protéines modifie les équilibres d'interaction. A des concentrations « seuil », la formation d'un complexe est favorisée par rapport à un autre, comme par exemple, la dissociation du complexe MxiE/IpgC en présence d'une concentration élevée de OspD1 lors de la désactivation (Parsot, 2005). Pour l'instant, l'état oligomérique au sein des différents complexes ainsi que les affinités d'interaction entre les protéines reste inconnus.

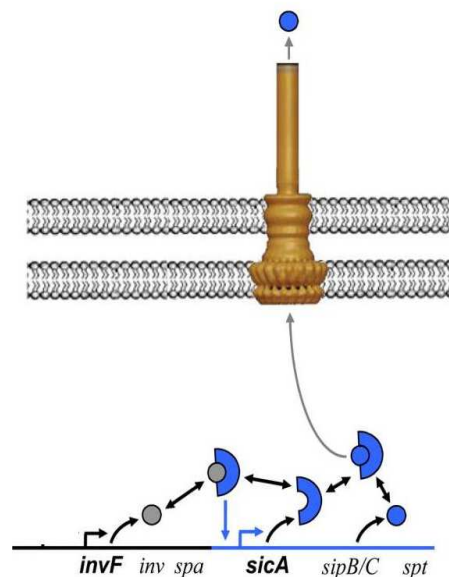
MxiE est codé par deux cadres de lecture qui se chevauchent sur une région de 9 A. La production de MxiE fait intervenir un mécanisme de glissement transcriptionnel dans lequel l'ARN polymérase incorpore, dans l'ARNm, un nucléotide supplémentaire lorsqu'elle transcrit cette région de 9 A. Alors que la matrice ADN comporte 9 A (sur le brin codant), l'ARNm comporte 10 U; les deux cadres de lecture codant respectivement pour les parties N et C-terminales de MxiE sont ainsi mis dans la même phase sur l'ARNm (Penno *et al.*, 2005). Le gène *mxiE* joue lui-même un rôle en *cis* dans la régulation car il module la transcription et la traduction du gène en aval, *mxiD*, qui code pour une protéine structurale de l'injectisome (Penno and Parsot, 2006).

### III.2 *Salmonella enterica* serovar typhimurium

*S. enterica* est responsable de la salmonellose, une maladie qui s'attaque au système digestif. Les symptômes comprennent la fièvre, des crampes abdominales et la diarrhée après la consommation d'aliments ou de boissons contaminés. *S. enterica* possède deux SST3, SPI1 et SPI2 (*Salmonella* Pathogeny Island 1 et 2), codés par deux îlots de pathogénicité. Lors de l'infection, l'expression des gènes du SST3 SPI-1 est induite suite au contact direct avec la cellule cible pendant la phase d'invasion afin de permettre l'entrée de la bactérie dans les cellules épithéliales. L'expression du SPI2 est quant à elle activée par des facteurs de l'environnement

intracellulaire. Ce système de sécrétion permet la survie dans les vacuoles et la réplication dans la cellule eucaryote (Faucher, 2006). (Porwollik *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Gallois *et al.*, 2001; Vazquez-Torres *et al.*, 2001; Zhou, 2001; Tsolis *et al.*, 2000; Wallis and Galyov, 2000; Baumler *et al.*, 1998).

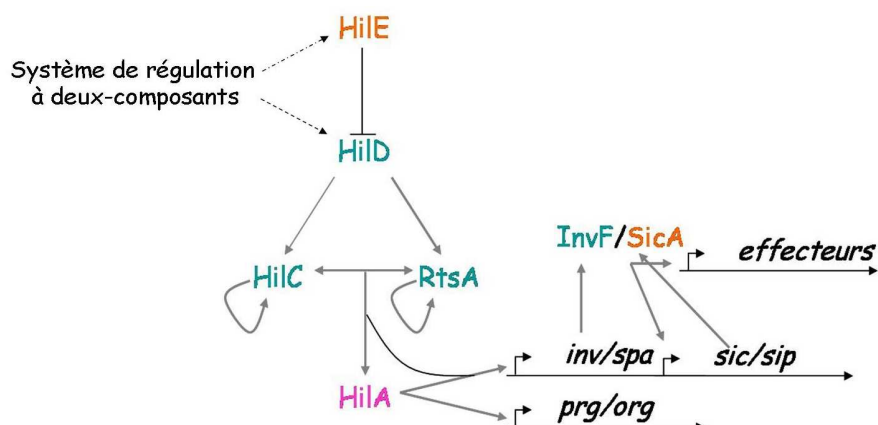
Dans le SST3 SPI1, l'activité d'InvF (le régulateur de type Arac/XylS) est régulée par l'activité de sécrétion à travers son interaction avec son co-activateur SicA, une chaperonne de classe II (Darwin and Miller, 2001; Darwin and Miller, 2000). En absence de sécrétion, SicA interagit préférentiellement avec les translocateurs, SipC et SipB. Dans ces conditions, InvF seul est capable de se fixer sur sa séquence cible mais est incapable d'activer la transcription. Suite au contact avec la cellule cible, l'ouverture du canal permet la sécrétion de SipC. Ainsi libérée, SicA interagit directement avec InvF et la fixation de ce complexe va alors permettre l'activation de la transcription des gènes codant pour les effecteurs et leurs chaperonnes (Figure 15) (Darwin and Miller, 2001; Darwin and Miller, 2000).



**Figure 15. Régulation de la transcription par le complexe InvF/SicA en fonction de la sécrétion de SipB/C (D'après, (Papezova *et al.*, 2007).**

Un réseau de régulation complexe contrôle la synthèse de InvF (Figure 16). En effet la transcription de *invF* est sous le contrôle de HilA, un régulateur

transcriptionnel de type OmpR/ToxR qui se fixe sur les promoteurs des opérons *prg/org* et *inv/spa* codant pour les gènes nécessaires à l'assemblage d'un injectisome fonctionnel (Lostro and Lee, 2001; Ahmer *et al.*, 1999; Bajaj *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1992). De plus, la transcription du gène *hilA* est sous le contrôle de trois facteurs de transcription de type AraC/XylS, HilD, RtsA et HilC (Figure 16) (De Keersmaecker *et al.*, 2005; Ellermeier and Slauch, 2003; Darwin and Miller, 1999; Eichelberg and Galan, 1999). Au sein de cette triade, HilD se situe au sommet de la hiérarchie (Ellermeier *et al.*, 2005) : il régule la transcription de *hilC* et *rtsA* qui sont considérés comme des amplificateurs du signal (HilC et RtsA régulent leur propre transcription et l'une est capable de réguler la synthèse de l'autre) (Figure 16) (Ellermeier *et al.*, 2005). De plus, HilD intègre les signaux environnementaux détectés en amont par des systèmes de régulation à deux-composants dont BarA/SirA, l'homologue de GacA/GacS. Cette intégration peut se faire soit au niveau de la régulation de *hilD* ou au niveau de son activité, suite à l'activation de l'expression de son anti-activateur, HileE (Figure 16) (Mizusaki *et al.*, 2008; Ellermeier *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2004; Ellermeier and Slauch, 2003; Lawhon *et al.*, 2003; Lucas and Lee, 2001).



**Figure 16. Les principaux activateurs transcritptionnels impliqués dans la régulation du SPI-1 de *S. enterica*. (Ellermeier and Slauch, 2007)**

Les régulateurs de type AraC/XylS sont indiqués en vert. SicA, le co-activateur de InvF, et HileE, l'anti-activateur de HilD, sont indiqués en orange.

De façon similaire au système ExsA/ExsD, l'activité de HilD est régulée négativement par un ligand protéique (HilE) qui n'est ni une chaperonne, ni une protéine sécrétée.

### III.3 Implication des régulateurs transcriptionnels de type AraC/XylS

Au sein des cascades de couplage « sécrétion/synthèse » de *P. aeruginosa*, *S. flexneri* et *S. enterica*, l'activation de la transcription des gènes du SST3 dépend de l'activation d'un régulateur de type AraC/XylS, suite à l'association (co-activateur) ou la dissociation (anti-activateur) de son ligand protéique (Figure 17).

Ces régulateurs ont été partiellement caractérisés et leurs séquences de fixation ont été définies (Figure 17) : elles sont généralement riches en A+T et chevauchent le signal -35 de fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur (Figure 17) (Brutinel *et al.*, 2008; Mavris *et al.*, 2002; Darwin and Miller, 2001; Darwin and Miller, 2000).

Régulateurs de type A/X	Inhibiteur protéique	Activateur protéique	Séquence consensus
MxiE	OspD1/Spa15	IpgC	<sup>-49</sup> GTATCGTTTTTTTAnAG <sup>-33</sup>
InvF		SicA	<sup>-51</sup> AttGGgCgTTT <sup>-41</sup> TTTgAAtGTT <sup>-33</sup>
ExsA	ExsD, PtrA		<sup>-57</sup> AaAAAnwnMyGrCynnmmYTGayAk <sup>-33</sup> (2008)

**Figure 17. Ligands protéiques et sites de fixation à l'ADN de MxiE, InvF et ExsA**

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de la transcription (propriétés de fixation à l'ADN, interaction avec l'ARN polymérase) et de la modulation de l'activité du régulateur par son ligand (changement

conformationnel ? séquestration ?) pour chacun de ces régulateurs restent inconnus. La connaissance de la littérature concernant d'autres régulateurs de type AraC/XylS peut apporter des éléments à propos de ces mécanismes.



## Chapitre III.

### Les régulateurs transcriptionnels de type AraC/XylS

Les régulateurs transcriptionnels de type AraC/XylS (A/X) possèdent en commun un domaine de fixation à l'ADN d'environ 100 acides aminés composé de deux motifs « Hélice-Tour-Hélice » (HTH) (Ibarra *et al.*, 2008; Egan, 2002; Gallegos *et al.*, 1997). En 2007, une étude *in silico* menée à partir de 212 génomes bactériens a identifié 1974 protéines de type A/X (Ibarra *et al.*, 2008).

La majorité (33,7%) de ces protéines régulent l'expression de gènes impliqués dans le catabolisme de source carbonée. Cette « sous-famille » inclue les protéines paradigmes AraC et XylS qui contrôlent respectivement le transport et le catabolisme du L-arabinose et la dégradation du toluène de *E. coli* (Ibarra *et al.*, 2008; Lobell and Schleif, 1990) (Zhou *et al.*, 1990). Nombreux de ces facteurs de transcription régulent d'autres processus métaboliques tels la réponse au stress (8,3%) et la virulence (11,7%) (Ibarra *et al.*, 2008). Les protéines MarA, SoxS et Rob sont les régulateurs impliqués dans la réponse au stress de *E. coli* les mieux caractérisées. Il s'agit de monomères qui régulent la résistance aux antibiotiques ainsi que la tolérance aux solvants organiques et au stress oxydant (Martin *et al.*, 2002). Les régulateurs A/X qui contrôlent la virulence bactérienne peuvent être divisés en deux groupes. Le premier groupe comprend les protéines qui contrôlent l'expression de plusieurs facteurs de virulence, comme ToxT qui régule l'expression de la toxine cholérique, de pilines et d'hémagglutinines de *Vibrio cholerae* et Rns qui régule l'expression de gènes codant pour 5 types de fimbriae et des protéines formant des vésicules contenant des toxines chez *E. coli* (Hsiao *et al.*, 2009; Nye and Taylor, 2003; Hulbert and Taylor, 2002; Munson and Scott, 1999). Le deuxième groupe comporte les protéines qui régulent un seul facteur de virulence, comme UreR qui active la transcription des gènes codant pour les sous-unités de l'uréase de *Proteus mirabilis* et ExsA, MxiE et InvF dont nous venons de voir le rôle

activateur uniquement dédié à l'expression des gènes du SST3 chez *P. aeruginosa*, *S. flexneri* et *S. enterica* (Mavris *et al.*, 2002; Eichelberg and Galan, 1999; Hovey and Frank, 1995; D'Orazio and Collins, 1993). Les autres processus impliquant des régulateurs de type AraC/XylS sont le métabolisme global (9,6%), le métabolisme de l'azote (8,3%) et la réponse adaptative (2,9%) (Ibarra *et al.*, 2008; Egan, 2002; Gallegos *et al.*, 1997).

A l'exception de MarA et SoxS, tous les régulateurs de type A/X possèdent un domaine associé au domaine de fixation à l'ADN, localisé en position N-terminal sauf pour la protéine Rob. Ce second domaine régule généralement l'activité de la protéine à travers des phénomènes de dimérisation et/ou d'interaction avec des ligands (Gallegos *et al.*, 1997). Ces ligands sont habituellement des petites molécules carbonées, tel l'arabinose ou l'urée (les ligands de AraC et UreR, respectivement) qui ont un effet positif sur l'activité du facteur de transcription (Gendlina *et al.*, 2002; Soisson *et al.*, 1997b). Seuls certains régulateurs de type A/X impliqués dans la virulence possèdent des ligands de nature protéique, qui peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'activité du régulateur (Plano, 2004).

L'objectif de ce chapitre est de décrire l'organisation structure/fonction de cette famille de régulateurs et de mettre en évidence la diversité de leurs modes d'action et de régulation.

## **I. Relation Structure/Fonction.**

### **I.1 Evolution**

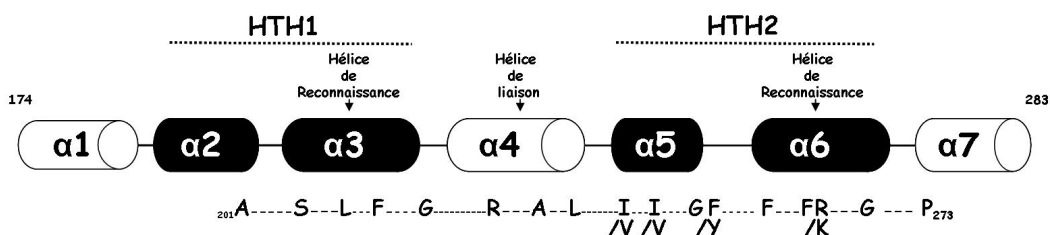
Les protéines de type A/X sont présentes principalement chez les Protéobactéries. Quelques-unes ont été identifiées chez les bactéries Gram-positif mais aucune chez les Archaeobactéries ou les eucaryotes. La grande distance génétique existant entre les procaryotes possédant des régulateurs de type A/X et

la grande différence du contenu en G+C de leur génome indiquent que leur ancêtre commun se situe très tôt dans la phylogénie. L'hypothèse proposée est que l'évolution de ces protéines s'est faite par recrutement du domaine N-terminal supplémentaire (Gallegos *et al.*, 1997). Cet exemple est illustré par la découverte en amont du gène *marA* d'une séquence codant pour le domaine N-terminal de XylS mais non traduite. La protéine XylS doit donc provenir de la fusion de *marA* avec cette séquence codant pour un domaine de réponse aux éléments aromatiques (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2008b).

## I.2 Le domaine caractéristique de liaison à l'ADN, « 2HTH »

### I.2.1 Organisation

Les domaines de fixation à l'ADN caractéristiques des protéines membres de cette famille possèdent au moins 20% d'identité de séquence sur les 100 résidus et une structure secondaire commune. Ils se composent de 7 hélices qui forment deux motifs HTH (HTH1 et HTH2) reliés par une hélice de liaison ( $\alpha 4$ ) (Figure 18). Dans au moins 60 % de ces protéines, 17 résidus communs ont été mis en évidence par alignement de séquence (Figure 18).

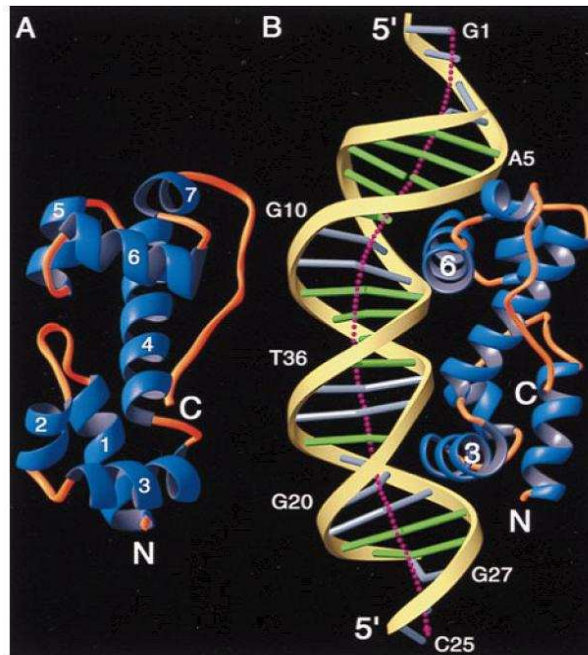


**Figure 18.** Représentation de la structure secondaire du domaine de liaison à l'ADN d'après la séquence de la protéine AraC (logiciel PSIPRED).

Les hélices sont représentées par des cylindres, colorés en noir lorsqu'elles appartiennent aux motifs HTH1 et HTH2. L'espacement des 17 acides aminés communs est indiqué par des tirets (de l'alanine en position 201 jusqu'à la proline en position 273).

Le motif « HTH » est présent dans 95% des protéines procaryotes qui se fixent à l'ADN, ce qui est de loin supérieur aux autres motifs connus: « doigts de zinc », « glissière à leucine » ou « Hélice-Boucle-Hélice ». Ce motif se compose en réalité de trois hélices  $\alpha$  mais seules les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  interagissent avec la séquence cible. L'hélice  $\alpha 3$ , dite de « reconnaissance », s'insère directement dans le grand sillon de l'ADN et reconnaît la séquence spécifique (Figure 18 et 19) (Maddocks and Oyston, 2008). Les deux motifs « HTH » sont généralement engagés dans la liaison avec l'ADN. Le motif HTH1 est le moins conservé car il est spécifique de la séquence cible du facteur de transcription. Le motif HTH2 interagit généralement avec l'ARN polymérase et sa fixation sur l'ADN permet de favoriser cette interaction. Cette interaction HTH2/ADN est donc généralement conservée entre les protéines (Gallegos *et al.*, 1997).

La résolution de la structure cristallographique à 2,3 Å de la protéine MarA, qui se compose uniquement du domaine « 2HTH », a permis d'observer pour la première fois l'organisation de ce domaine ainsi que la nature de son interaction avec l'ADN (Rhee *et al.*, 1998) (Figure 19). La structure de la protéine en interaction avec une séquence d'ADN de 22 paires de bases a mis en évidence deux sous-domaines structurellement homologues, N et C. Ils sont liés par l'hélice centrale  $\alpha 4$  dont la localisation impose l'orientation des hélices de reconnaissance  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$ . Ces deux hélices étant insérées dans deux grands sillons adjacents, elles se trouvent sur la même face de l'oligonucléotide, ce qui entraîne une courbure de l'ADN d'environ 34 Å (Rhee *et al.*, 1998).



**Figure 19. Structure tridimensionnelle de MarA en complexe avec l'ADN**

**A)** Représentation de la structure de MarA obtenue par rotation à 90° de celle résolue en complexe avec l'ADN présentée en **B)**. Les hélices sont indiquées en bleu et sont numérotées. Les hélices  $\alpha$  1, 2, 3 et 5, 6, 7 forment respectivement les sous-domaines, N et C, qui sont superposables. Les deux hélices de reconnaissance  $\alpha$  3 et  $\alpha$  6 qui sont au premier plan ne sont pas parallèles mais sont incurvées de 30° l'une par rapport à l'autre.

**B)** Structure de MarA en présence d'ADN montrant l'insertion des deux hélices de reconnaissance dans chacun des deux grands sillons adjacents, ce qui induit la courbure de l'ADN. Les extrémités sont clairement plus courbées que le centre de l'oligonucléotide. Le sous-domaine N est placé au plus près du +1 de la transcription. Les couleurs indiquent en jaune le squelette phosphate, en vert les appariements A-T et en gris les appariements G-C. La ligne en pointillée indique l'axe de l'hélice d'ADN calculée par le programme CURVE.

Cette structure a permis de mettre en évidence que les résidus de MarA interagissent avec les bases de l'ADN à travers des interactions van der Waals (exemple : Trp 42), des liaisons hydrogène (exemple : Arg 46) ou les deux (exemple : Arg 96). Les interactions entre MarA et le squelette phosphate impliquent majoritairement des liaisons hydrogènes (exemples : His 43 et Tyr 39).

Depuis 1998, d'autres structures de ce domaine « 2HTH » ont été résolues en présence ou non d'ADN, par diffraction aux rayons X mais aussi grâce à la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Rodgers and Schleif, 2009; Dangi *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2000). Les informations obtenues ont soit conforté, soit remis en cause les conclusions déduites à partir de la structure de MarA. Ainsi, la présence de deux sous-domaines, N et C, et l'organisation

tridimensionnelle des 7 hélices  $\alpha$  de MarA ont été confirmées par la structure du domaine C-terminal de AraC en absence d'ADN (Rodgers and Schleif, 2009). En revanche, la résolution de la structure de MarA en présence d'ADN par RMN a remis en cause les interactions ADN/protéine observées dans la structure aux rayons X en montrant que certains acides aminés (comme Arg46 et Arg96) ne sont pas essentiels à cette interaction (Dangi *et al.*, 2001). De plus, la structure du domaine « 2HTH » de Rob en complexe avec l'ADN montre qu'un seul motif HTH interagit avec l'ADN et, de ce fait, que la fixation de la protéine n'induit pas la courbure de l'ADN. Cette fixation particulière de Rob sur le promoteur *micF* a été confirmée par des expériences *in vitro* de fixation à l'ADN qui ont montré que le second motif n'est pas indispensable à cette interaction (Martin and Rosner, 2001). Cependant cette fixation à travers un seul motif HTH semble être spécifique au promoteur *micF* car la fixation de Rob sur les promoteurs *zwf* et *fumC* induit une courbure de l'ADN (Jair *et al.*, 1996).

## I.2.2 Activité.

### I.2.2.1 Fixation et courbure de l'ADN.

Les domaines « 2HTH » des protéines de type A/X sont donc les domaines de liaison à l'ADN, liaison induisant une courbure comme nous venons de le voir. Cette courbure engendrée par l'insertion des deux hélices de reconnaissance a été mis en évidence pour de nombreuses protéines dont MelR, AraC, UreR et ExsA (Brutinel *et al.*, 2008; Poore and Mobley, 2003; Saviola *et al.*, 1998; Bourgerie *et al.*, 1997). En dehors de Rob, le seul exemple connu d'une fixation à travers une seule hélice est celui d'un des monomères du dimère de AraC (Niland *et al.*, 1996).

### I.2.2.2 Activation de la transcription

Le domaine « 2HTH » permet généralement l'interaction avec l'ARN polymérase et l'activation de la transcription. Selon les protéines, le domaine « 2HTH » peut soit:

- **comporter tous les composants nécessaires à l'activation de la transcription.** Le domaine N-terminal peut alors avoir plusieurs effets sur ce domaine : i) il peut être nécessaire au positionnement correct du domaine "2HTH" sur l'ADN comme c'est le cas du monomère Rns (Basturea *et al.*, 2008) ; ii) la dimérisation du domaine N-terminal peut aussi permettre la fixation à l'ADN du domaine « 2HTH » et, dans ce cas, la surproduction du domaine est suffisante pour observer l'activation de la transcription (exemple du dimère AraC, (Bustos and Schleif, 1993)) ; iii) le domaine N-terminal peut aussi avoir un effet négatif sur l'activité du domaine « 2HTH » à travers des interactions intramoléculaires (exemples XylS et UreR, (Poore *et al.*, 2001; Kaldalu *et al.*, 2000)). L'ensemble de ces activités régulatrices du domaine N-terminal sur le domaine C-terminal seront décrites dans la partie III.2.
- **ne pas contenir tous les composants nécessaires à l'activation de la transcription,** tel ToxT (Prouty *et al.*, 2005), car des composants du domaine N-terminal sont impliqués dans l'interaction avec l'ARN polymérase.

Ces deux catégories de domaine « 2HTH » peuvent être distinguées expérimentalement en les fusionnant à un domaine de dimérisation artificiel à motif leucine zipper provenant de la protéine CAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP, un facteur de transcription eucaryote) (Landschulz *et al.*, 1988).

La dimérisation du domaine « 2HTH » de AraC a permis à ce domaine d'être aussi actif que la protéine entière, tandis que pour le domaine de ToxT, sa dimérisation lui permet de se fixer à l'ADN mais il n'est pas capable d'activer la transcription. Ces résultats indiquent que le défaut d'activité du domaine « 2HTH » de AraC est dû à un défaut de fixation et/ou de positionnement sur l'ADN alors que pour ToxT, son défaut d'activité est dû à la nécessité du domaine

N-terminal pour activer la transcription (Prouty *et al.*, 2005; Bustos and Schleif, 1993).

### **I.3 Le domaine régulateur non conservé**

Comme déjà mentionné, les protéines de type A/X possèdent généralement un domaine additionnel localisé en N-terminal. Sa taille peut varier de 100 à 200 acides aminés et sa séquence n'est pas conservée entre les protéines (Egan, 2002; Kwon *et al.*, 2000). Ce domaine possède généralement des propriétés de dimérisation et/ou d'interaction avec un ligand spécifique qui lui permettent de réguler l'activité du domaine C-terminal « HTH » en permettant sa fixation à l'ADN. Parfois il peut avoir un rôle plus direct dans l'activité transcriptionnelle en interagissant directement l'ARN polymérase.

#### **I.3.1 Fixation du ligand**

L'interaction entre ce domaine non conservé et le ligand ainsi que l'effet de cette fixation sur l'activité transcriptionnelle du régulateur seront traités dans la partie III.2.

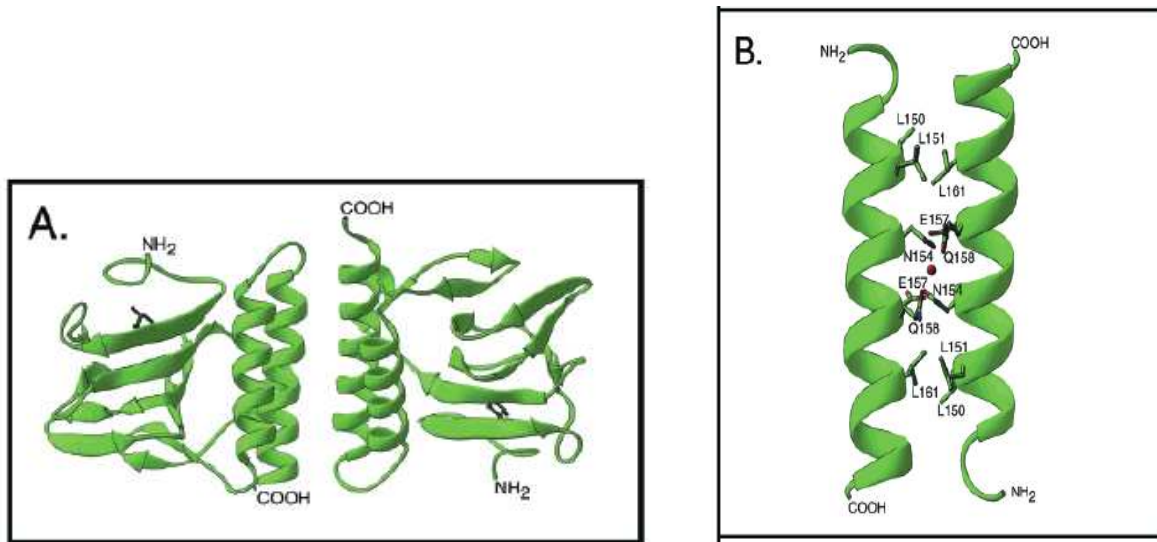
#### **I.3.2 La dimérisation**

Lorsque les protéines de type A/X sont dimériques, la dimérisation s'effectue généralement à travers leur domaine N-terminal. Ce phénomène a été particulièrement bien étudié pour la protéine AraC et décrit grâce à la résolution de la structure tridimensionnelle de son domaine N-terminal en présence d'arabinose (Figure 20) (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2000; Soisson *et al.*, 1997b).

Le domaine N-terminal de AraC se compose de 8 feuillets  $\beta$  suivi de 2 hélices  $\alpha$  et sa dimérisation s'effectue à travers la dernière hélice  $\alpha$  C-terminal de ce domaine qui forme un coiled-coil anti-parallèle (Figure 20 A et B). Un ensemble de



liaisons hydrogènes et d'interactions de type van der Waals stabilise ce dimère. Les leucines 150 et 151 d'un monomère interagissent avec la leucine 161 de l'autre monomère. Au centre de cette interface l'asparagine 154 et la glutamine 158 de chacun des monomères forment des liaisons hydrogènes médiées par une molécule d'eau. De plus, l'asparagine 154 forme une liaison hydrogène avec le glutamate 57 (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2000; Soisson *et al.*, 1997b).



**Figure 20. Structure tridimensionnelle du domaine de dimérisation et de l'interface de dimérisation de AraC (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2000).**  
 A) AraC dimérise via une structure de type coiled-coil en présence d'arabinose. B) Vue détaillée des interactions entre les chaînes latérales au sein du coiled-coil.

En absence d'arabinose, la structure générale de ce dimère est la même exceptée dans la région 1-18. Ces 18 résidus forment « le bras N-terminal » de AraC dont le rôle est crucial dans l'activité de la protéine (voir partie III.2.1) (Rodgers and Schleif, 2009).

Les leucines 193 et 194 et phénylalanines 151 et 152 de l'hélice  **$\alpha$**  C-terminale des domaines N-terminaux de XylS et ToxT sont indispensables à la dimérisation *in vitro* de ces protéines (Childers *et al.*, 2007; Prouty *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2003). Il semblerait donc que la dimérisation à travers une structure de type coiled-coil soit conservée entre les protéines.

La dimérisation de ce domaine peut être induite par la fixation de ligand. Ainsi, le domaine N-terminal de XylS dimérise uniquement en présence de son ligand, le 3 Méthyl-benzoate. Cette dimérisation entraîne ensuite une modification de l'orientation du domaine C-terminal (Voir partie III.2.1).

### I.3.3 Effet du domaine N-terminal sur la fixation à l'ADN du domaine « 2HTH ».

Bien que le domaine N-terminal n'interagisse pas avec l'ADN, il est parfois nécessaire à la fixation à l'ADN du domaine « 2HTH », soit parce que la dimérisation de la protéine est nécessaire à sa fixation (AraC et ToxT), soit parce que la fixation de ligand est nécessaire à la dimérisation (XylS) ou au repositionnement des protéines sur l'ADN (AraC). Le seul exemple identifié de domaine N-terminal nécessaire à la fixation d'une protéine monomérique de type A/X est celui de la protéine Rns : en absence de son domaine N-terminal, le domaine C-terminal « 2HTH » ne se fixe plus sur sa séquence cible *in vitro* (Basturea *et al.*, 2008). Une interaction entre les deux domaines est suggérée, impliquant deux résidus du domaine N-terminal identifiés par mutagenèse (Basturea *et al.*, 2008). Il s'agit également du seul exemple où une interaction intra-domaine est indispensable à la fixation sur l'ADN de la protéine.

### I.3.4 Interaction avec l'ARN polymérase.

Nous avons évoqué dans la partie I.2.2.2 que le domaine N-terminal de certaines protéines de type A/X semble être impliqué dans l'activation de la transcription. Il s'agit de régulateurs dont le domaine C-terminal se fixe à l'ADN seul mais n'est pas capable d'activer la transcription, tels ToxT et MelR (Prouty *et al.*, 2005; Howard *et al.*, 2002). Les domaines C-terminaux dimérisés artificiellement des protéines ToxT et UreR (fusion C/EBP) sont bien capables de se fixer à l'ADN, contrairement à leur forme monomérique, mais ils ne peuvent pas activer la transcription (Prouty *et al.*, 2005; Gendlina *et al.*, 2002; Poore *et al.*, 2001). Ceci

suggère que des composants du domaine N-terminal sont nécessaires à l'interaction avec l'ARN polymérase. Des mutations dans le domaine N-terminal de la protéine ToxT entraînent des phénotypes hyperactifs, ce qui renforce l'hypothèse du rôle crucial de ce domaine dans cette interaction (Childers *et al.*, 2007).

#### **I.4 La région charnière.**

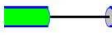



Le domaine N-terminal des protéines de type A/X est généralement relié au domaine C-terminal par une région charnière (communément appelée « linker »). Les linkers protéiques sont connus pour être de courtes séquences peptidiques (entre 5 et 30 résidus) reliant deux domaines structurés qui possèdent chacun une fonctionnalité précise (George and Heringa, 2002). Il en existe deux types : des linkers structurés en hélice  $\alpha$  qui ne contiennent généralement pas de proline et jouent le rôle de lien rigide en séparant deux domaines isolés, et les linkers non structurés qui possèdent une séquence riche en proline et peuvent soit empêcher soit permettre l'interaction entre deux domaines (George and Heringa, 2002). La longueur d'un linker est souvent plus importante pour sa fonction que l'identité de ses résidus. La modification de cette longueur affecte généralement la stabilité, le repliement et l'orientation des domaines (Robinson and Sauer, 1998)

Le linker de la protéine AraC a été défini en tant que région non nécessaire à la fixation à l'ADN et à l'induction par l'arabinose des domaines C-terminal et N-terminal respectivement. Ce linker n'est pas structuré et l'identité des résidus n'est pas cruciale à la fonctionnalité de cette région (Figure 21) (Eustance and Schleif, 1996).

Des régions linkers ont depuis été identifiées chez d'autres protéines de type A/X (Figure 21) Ainsi RhaS, RhaR et MelR, impliquées dans le métabolisme des sucres de *E. coli*, possèdent un linker non structuré comme AraC (Kolin *et al.*,

2007; Kahramanoglou *et al.*, 2006). Les linkers des protéines impliquées dans la virulence, telles Rns, UreR et ToxT, sont structurés en hélice  $\alpha$  (Basturea *et al.*, 2008; Prouty *et al.*, 2005; Poore *et al.*, 2001).

Cette région joue le rôle de **lien** entre les deux domaines pour les protéines AraC, Rns, RhaS et RhaR. De multiples substitutions (jusqu'à 5) ou des insertions (jusqu'à 19 aa) n'influent pas sur l'activité de la protéine (Basturea *et al.*, 2008; Kolin *et al.*, 2007; Eustance and Schleif, 1996). Les linkers des protéines MelR et UreR ont une fonction particulière puisqu'ils permettent le transfert du signal du domaine N-terminal vers le domaine C-terminal. En effet, des mutations dans cette région engendrent un défaut d'activation de la transcription malgré la présence du ligand (Kahramanoglou *et al.*, 2006; Poore *et al.*, 2001). Dans ces exemples, il ne semble pas exister de lien entre la structure d'un linker et son rôle dans l'activité de la protéine. Le rôle du linker de ToxT n'a pas été défini.

Protéine	Séquence	Structure secondaire prédite
AraC	NESL/HPPMDNR/	—
RhaS	LENSASR	—
RhaR	SLPPTSSETL	—
MelR	VNKTSRTHKNSVSRHA	
Rns	NACRSM SRKIMTTEVNKTLLEDLKNINSHDNA	
UreR	YDEPKNQAITHLITQDPQ	
ToxT	FFSGFFSKVEKKYNSIFITDDL	

**Figure 21. Séquences, structures secondaires prédites et rôles des linkers**

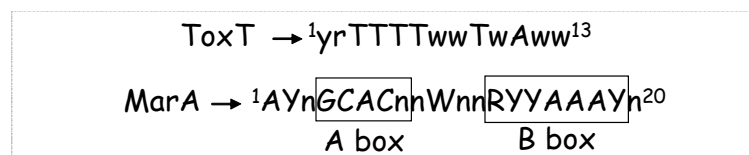
Les protéines en gris sont impliquées dans le métabolisme des sucres et en bleu dans la virulence. Les résidus sont colorés selon les structures secondaires prédites : noir = non structuré, vert = hélice  $\alpha$  prédite. Dans la séquence du linker de AraC, les barres rouge (/) encadrent la séquence minimale du linker. Cette prédiction de structure a été effectuée à partir des logiciels PSIPRD et Jpred et de la structure 3D de AraC (Rodgers *et al.*, 2009).

## II. Fonctions activatrice et/ou répressive

Les régulateurs de type A/X sont généralement des activateurs transcriptionnels. Cependant certains peuvent réprimer la transcription en absence de leur ligand. La seule protéine de cette famille qui jouerait uniquement le rôle de répresseur est le régulateur CelD impliqué dans le métabolisme des  $\beta$ -glucosides de *E.coli* (Parker and Hall, 1990).

### II.1 Les sites de fixation

Les sites de fixation de ces protéines sont asymétriques et leur taille varie entre 13 et 20 paires de bases, le minimum et le maximum étant ceux MarA et ToxT respectivement (Figure 22). Ces séquences correspondent au site de fixation d'un monomère et sont souvent divisées en A-box et B-box qui représentent respectivement les sites de liaison du premier motif et du second motif « HTH » (Figure III.V, MarA). Jusqu'à aujourd'hui, aucune homologie entre les séquences des sites de fixation des protéines de cette famille n'a été mise en évidence.



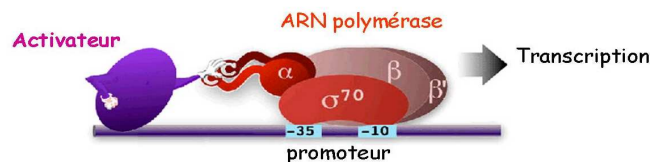
**Figure 22. Séquences de fixation des protéines ToxT et MarA**

W=A ou T ; Y=C ou T ; r=A ou G ; n = A ou G ou C ou T. Les bases indiquées en majuscules sont les déterminants de la séquence essentiels à l'interaction protéine/ADN. (Rhee *et al.*, 1998, Withey *et al.*, 2006)

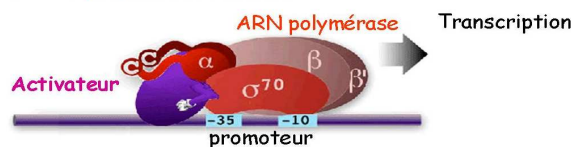
Les promoteurs régulés par les protéines de type A/X qui ne possèdent que le domaine « 2HTH » (MarA, Rob et SoxS) possèdent un seul site consensus (Martin *et al.*, 2008), tandis que ceux régulés par les protéines composées de deux domaines possèdent généralement plus d'un site de fixation dans leur séquence (Gallegos *et al.*, 1997). La position de ces sites par rapport au site -35 de fixation de

l'ARN polymérase varie selon que les régulateurs sont des activateurs de classe I ou II ou les deux (Figure 23).

• **Les activateurs de classe I** possèdent un site de fixation éloignés du signal -35 et interagissent avec le domaine C-terminal de la sous-unité  $\alpha$  de l'ARN polymérase ( $\alpha$ CTD)  
Exemple: **ToxT**



• **Les activateurs de classe II** possèdent un site de fixation proche ou qui chevauche le signal -35 et interagissent avec la sous-unité  $\sigma$  et parfois avec l' $\alpha$ CTD de l'ARN polymérase.  
Exemples: **XylS, RhaS et RhaR**



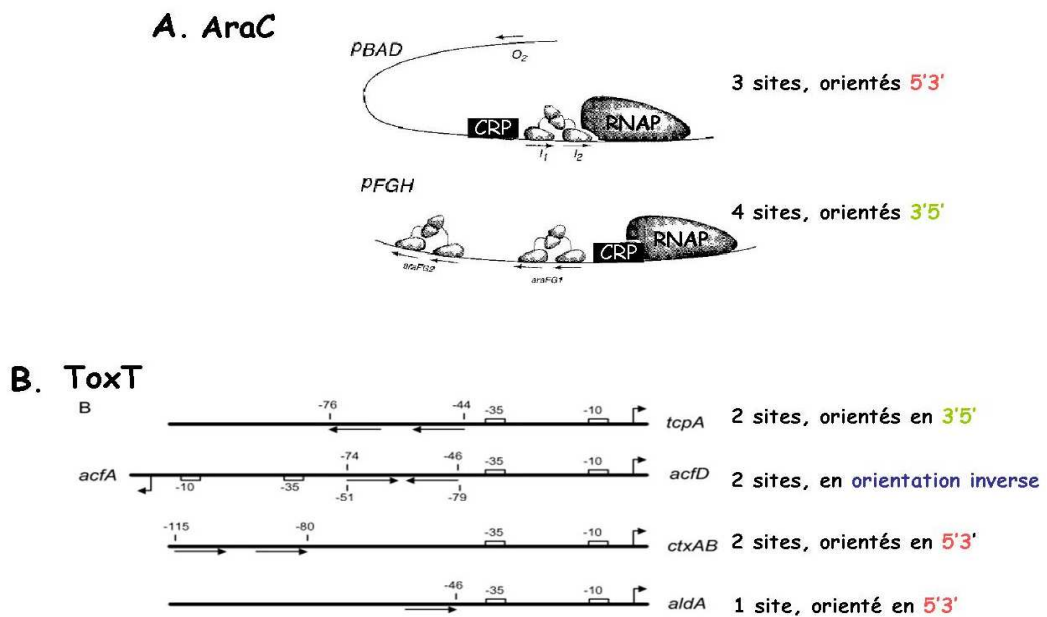
Exemple d'activateurs de Classe I et II: **MarA, SoxS, AraC**

### Figure 23. Les activateurs transcriptionnels de Classe I et/ou Classe II.

(Withey and DiRita, 2006; Egan *et al.*, 2000; Schleif, 2000; Fawcett *et al.*, 1999; Gonzalez-Perez *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1999)

La protéine Rns possède un site de fixation situé en aval du +1 de transcription de son propre gène, ce qui suggère un mécanisme de régulation particulier. Ce site est également requis par AggR et VirF, des régulateurs de type A/X qui sont aussi capables d'activer la transcription de *rns* (Munson *et al.*, 2001).

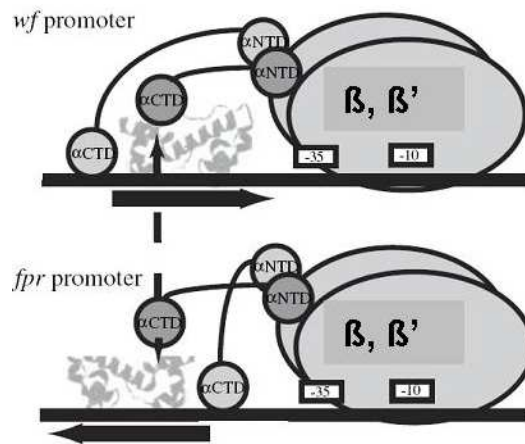
Pour un même régulateur, la position et l'orientation de ses sites de fixation peuvent varier selon les promoteurs. Cette diversité de sites montre qu'une même protéine peut posséder différentes propriétés de fixation à l'ADN selon les promoteurs. Ceci est illustré par les exemples des promoteurs régulés par ToxT et AraC (Figure 24).



**Figure 24. Orientation et localisation des sites de fixation sur différents promoteurs régulés par AraC (A) ou ToxT (B)(d'après, Johnson and Schleif, 2000, Withey et al, 2006).**

A) Orientation des sites de fixation de AraC, disposition de CRP et de l'ARN polymérase sur les promoteurs *pBAD* et *pFGH*. Dans le cas du *pBAD*, AraC est un activateur de Classe II et CRP un activateur de Classe I. Dans le cas du *pFGH*, AraC est un activateur de Classe I et CRP un activateur de Classe II. B) Les trois possibilités d'orientation des sites de fixation de ToxT sont présentées sur les différents promoteurs par des flèches.

Cette diversité de site fait qu'un régulateur va pouvoir interagir de plusieurs manières avec l'ARN polymérase selon les promoteurs, comme le montre l'étude structurale structurale par RMN de l'interaction entre l'ARN polymérase et MarA sur des promoteurs de classe I (Dangi et al., 2004). Les informations structurales obtenues montrent que les  $\alpha$ CTD de l'ARN polymérase se positionnent différemment selon le sens de fixation de la protéine afin de conserver les mêmes zones d'interaction (Figure 25). La position de l' $\alpha$ CTD qui interagit avec la face supérieure de la protéine (résidus Trp19 et Arg36 de MarA) ne varie pas tandis que l' $\alpha$ CTD qui interagit avec la séquence d'ADN se situe en amont de MarA sur le promoteur *zwf*, orienté 5'3', et en aval de MarA sur le promoteur *fpr*, orienté 3'5' (Figure 25) (Dangi et al., 2004).



**Figure 25. Interaction entre MarA et l'ARN polymérase sur des promoteurs *wzf* et *fpr* de Classe I (Dangi *et al.*, 2004).**

Selon le sens du site de fixation de MarA, les domaines  $\alpha$ CTD de l'ARN polymérase se positionnent de manière différente pour interagir avec MarA afin de conserver les sites d'interaction.

Pour augmenter la complexité, il a été proposé pour ToxT que l'état oligomérique de la protéine fixée à l'ADN dépendait de l'orientation et du nombre de sites présents sur les promoteurs. Ainsi ToxT activerait la transcription sous forme de dimère sur *tcpA* et de monomère sur *aldA*, tandis que deux monomères activeraient la transcription sur *acfD* (Bellair and Withey, 2008). Ces hypothèses remettent en cause le dogme selon lequel ToxT nécessite d'être dimérique pour activer la transcription (Prouty *et al.*, 2005).

Nous verrons dans la partie III que la diversité d'orientation et de position des sites de fixation influent sur la fonction du facteur de transcription (activateur ou répresseur) et sur son mécanisme d'activation de la transcription.

## II.2 Modèle d'activation de la transcription.

Les régulateurs de type A/X activent généralement la transcription en recrutant l'ARN polymérase mais ils peuvent aussi jouer le rôle d'anti-répresseur.



### II.2.1 Recrutement de l'ARN polymérase.

En recrutant l'ARN polymérase, un facteur de transcription favorise la fixation de celle-ci sur le promoteur qu'il active, plutôt que sur un autre pour lequel l'ARN polymérase aurait une meilleure affinité. Le facteur de transcription peut aussi favoriser la formation du complexe ouvert ARN polymérase/ADN et ceci en synergie avec la protéine CRP (Cyclic AMP Receptor Protein). Ce mode d'action a été démontré pour de nombreuses protéines impliquées dans le catabolisme du carbone telles AraC, XylS et MelR, à travers leur interaction avec la sous-unité  $\sigma^{70}$  de l'ARN polymérase (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2008a; Dominguez-Cuevas *et al.*, 2006; Grainger *et al.*, 2004b; Grainger *et al.*, 2004a; Belyaeva *et al.*, 2000). Les mêmes mécanismes d'activation sont aussi proposés pour le régulateur Rns. Mais, comme déjà mentionné, la présence d'un de ses sites de fixation à l'ADN en aval du +1 de transcription suggère que cette protéine pourrait aussi être impliquée dans l'élongation de la transcription (Munson and Scott, 2000). Ce mécanisme moléculaire reste à être confirmé et caractérisé.

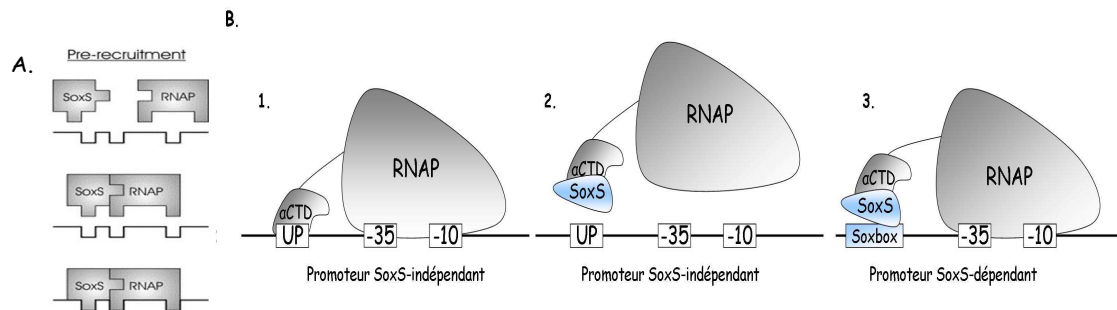
### II.2.2 Pré-recrutement de l'ARN polymérase.

Un mécanisme d'activation de la transcription moins classique est le mécanisme de pré-recrutement de l'ARN polymérase. Celui-ci implique l'interaction entre l' $\alpha$ CTD de l'ARN polymérase et un facteur de transcription avant leur fixation ensemble sur l'ADN (Figure 26).

Ce mode d'activation est retrouvé chez des facteurs de transcription présents en faible quantité dans la cellule et qui possède une séquence de fixation dégénérée présentes en très grande nombre dans le génome. Le pré-recrutement permet au facteur de transcription de former un complexe binaire avec l'ARN polymérase qui va « scanner » le chromosome afin de reconnaître et de se fixer uniquement sur les sites qui contiennent des séquences de fixation correctement orientées et

positionnées pour permettre l'activation de la transcription. L'activateur transcriptionnel joue alors le rôle de co-facteur sigma, il déplace l'ARN polymérase d'un élément UP (séquence de 5 à 6 adénines située en amont du signal -35) d'un promoteur pour lequel elle a plus d'affinité afin de la rediriger vers un promoteur qu'il contrôle (Figure 26).

Ce mécanisme de pré-recrutement est utilisé uniquement par les régulateurs monomériques de type A/X, tels que MarA, SoxS et Rob, qui reconnaissent les mêmes séquences dégénérées (Griffith *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2002). Il a été mis en évidence en surproduisant *in vivo* dans la souche sauvage des mutants de ces facteurs de transcription qui entraînent un effet dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle de la protéine endogène alors que ces facteurs sont monomériques et ne contiennent que le domaine « 2HTH ». L'hypothèse a ensuite été confirmée *in vitro* en montrant l'interaction entre le facteur de transcription et l'ARN polymérase en absence d'ADN (Griffith *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2002, Griffith, 2002 #418).



### II.2.3 Anti-répresseur

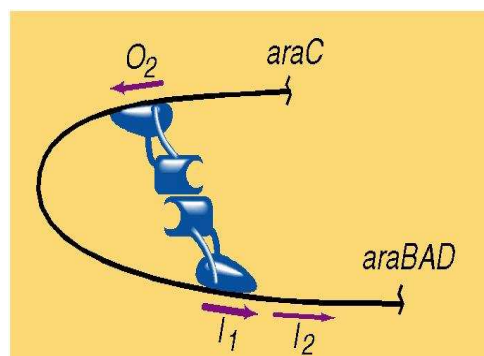
La relation antagoniste existant entre la nucléoprotéine H-NS et l'activateur ToxT est un des nombreux exemples pour lequel la fixation d'une protéine de type A/X

régule positivement l'expression de gènes réprimés par H-NS, par compétition pour la fixation à l'ADN (Stoebel *et al.*, 2008; Yu and DiRita, 2002). ToxT possède en plus la particularité d'exercer une influence positive sur l'activation du promoteur en absence du répresseur (Stoebel *et al.*, 2008; Hulbert and Taylor, 2002; Yu and DiRita, 2002).

## II.3 Activité de répression

### II.3.1 Formation d'une boucle d'ADN (DNA-looping)

Le DNA-looping est induit par la fixation d'une protéine dimérique, sur deux sites de fixation à l'ADN éloignés. La boucle d'ADN formée par cette fixation distale (Figure 27) empêche l'accès à l'ARN polymérase et, de ce fait, inhibe la transcription. Ce mécanisme de répression est utilisé par la protéine AraC en absence d'arabinose (Carra and Schleif, 1993b; Carra and Schleif, 1993a). Cette répression peut être levée par la fixation d'un ligand sur le régulateur. En effet, le ligand peut induire un changement conformationnel de la protéine qui lui permet de se fixer sur deux sites d'ADN proches. L'ADN ne forme donc plus de boucle et l'ARN polymérase est capable d'accéder à sa séquence cible. Ainsi, AraC se fixe sur deux sites éloignés *araO2* et *araI1* du promoteur *araBAD* (Figure 27) (Carra and Schleif, 1993b; Carra and Schleif, 1993a) et se repositionne sur deux sites proches *araI1* et *araI2* suite à la fixation d'arabinose (Schleif, 2003).



**Figure 27. DNA looping induit par AraC en absence d'arabinose.**

Le nom et l'orientation des sites de fixation sont indiqués ainsi que le nom des promoteurs.

L'hypothèse selon laquelle MelR utiliserait le même mécanisme pour inhiber la transcription fut longtemps émise. Cependant des études récentes ont montré que cette protéine induit une **courbure de l'ADN**, et non une boucle, suite à la fixation de quatre monomères sur 3 sites proches et un site situé 170 pb en amont qui empêche l'ARN polymérase de se fixer (Samarasinghe *et al.*, 2008).

### II.3.2 Encombrement stérique

La fixation du régulateur de type A/X peut également empêcher l'ARN polymérase de se fixer sur le promoteur par encombrement stérique. La protéine ToxT inhiberait ainsi la transcription de gènes codant pour des hémagglutinines en se fixant sur les promoteurs sous forme monomérique (Hsiao *et al.*, 2009). De façon intéressante, cette répression n'est pas dépendante de la position et de l'orientation des sites de fixation car les promoteurs qu'elle inhibe sont semblables à ceux qu'elle active. De plus cette répression est indépendante du domaine N-terminal de ToxT puisqu'une protéine ToxT $\Delta$ Nter est toujours capable d'inhiber la transcription. Etant donné le rôle uniquement activateur accordé à ToxT jusqu'à aujourd'hui, il reste à définir si sa fixation est différente selon que la protéine active ou inhibe la transcription (via 1 ou les deux HTH) ou si cette différence d'activité est due à l'absence d'activation par le domaine Nter (Hsiao *et al.*, 2009).

### II.3.3 Inhibition de l'étape d'isomérisation.

L'étape d'isomérisation de la transcription consiste en l'ouverture du complexe formé entre l'ARN polymérase et la séquence d'ADN. Certains régulateurs tels MarA et Rns sont capables d'inhiber l'ouverture de ce complexe sur les promoteurs *rob* et *nlpap* respectivement (Bodero *et al.*, 2007; Schneiders and Levy, 2006).

### III. Régulation des protéines de type A/X

#### III.1 Synthèse/dégradation

La transcription de tous les gènes codant pour des régulateurs de type A/X est régulée, à l'exception de *rob* (la protéine Rob représente le seul exemple de régulateur A/X synthétisé constitutivement) (Schneiders and Levy, 2006; Jair *et al.*, 1996). Cette transcription peut être régulée positivement ou négativement par la protéine elle-même (autorégulation), un autre facteur de transcription, ou les deux, comme le montrent les quelques exemples suivants.

L'autorégulation positive est principalement observée pour les protéines impliquées dans la virulence comme UreR, ExsA et Rns (Munson *et al.*, 2001; Yahr and Frank, 1994; Nicholson *et al.*, 1993). Certains facteurs impliqués dans le catabolisme des sucres s'autorégulent négativement ou positivement selon la fixation ou non de leur ligand, tels AraC et MelR (Bell *et al.*, 1989; Hahn and Schleif, 1983). Contrairement à leur homologue ExsA, la synthèse des régulateurs MxiE et InvF est contrôlée par deux facteurs de transcription de type ParB, respectivement VirB et HilA, qui sont eux-mêmes sous le contrôle de régulateurs de type A/X (Chapitre II) (Ellermeier and Slauch, 2007; Le Gall *et al.*, 2005). Enfin, la synthèse des protéines qui ne possèdent pas de domaine N-terminal est régulée au niveau transcriptionnel par les protéines elle-mêmes et un autre facteur de transcription : ceci permet de finement réguler la concentration en protéines actives puisque leur activité ne peut pas être régulée. Ainsi la transcription de *marA* est sous le contrôle de MarA et du régulateur MarR (Martin *et al.*, 2008). De plus, la quantité de protéine est contrôlée grâce à la protéase Lon qui va rapidement dégrader MarA lorsque la réponse au stress n'est plus nécessaire (Martin *et al.*, 1996).

L'implication de la protéase Lon dans la dégradation est retrouvée pour la protéine Rob. La synthèse de Rob est régulée au niveau transcriptionnel par l'inhibition de la transcription de *rob* par MarA et au niveau post-traductionnel par la protéase Lon (Griffith *et al.*, 2009; Schneiders and Levy, 2006). En absence de décanoate, le domaine C-terminal de Rob empêche l'accès au domaine N-terminal « 2HTH » à la protéase Lon. En présence de décanoate, le domaine N-terminal est libéré afin d'interagir avec l'ARN polymérase et devient alors accessible à la protéase Lon. Son domaine supplémentaire C-terminal permet donc à Rob de réguler sa protéolyse (Griffith *et al.*, 2009).

### **III.2 Fixation de ligands**

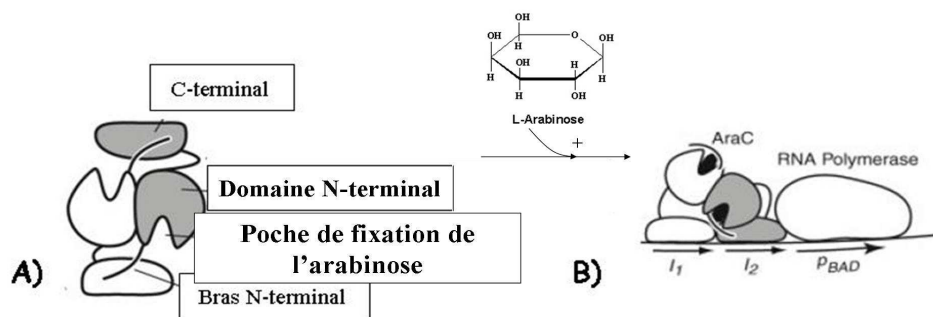
L'activité de la majorité des protéines de type A/X est régulée par la fixation d'un ligand sur leur domaine N-terminal. Etant donné le grand nombre de processus métaboliques dans lesquels ces protéines sont impliquées, il existe une grande diversité de ligands. A l'heure actuelle, les ligands de la plupart de ces protéines restent inconnus car leur interaction directe n'a jamais été mise en évidence. Ces ligands peuvent être de nature non protéique (de petites molécules carbonées tels l'arabinose, l'urée, le carbonate et le rhamnose) et ont un effet positif sur l'activité du régulateur. Dans le cas des activateurs ExsA, MxiE et InvF impliqués dans la régulation du SST3, les ligands identifiés sont de nature protéique et peuvent avoir un effet négatif ou positif sur l'activité du facteur de transcription.

#### **III.2.1 Les ligands non protéiques**

Ces ligands sont les plus fréquents et les mécanismes de régulation qu'ils induisent sont connus dans certains cas.

La fixation du ligand peut stabiliser ou permettre l'interaction ADN/facteur de transcription. Un exemple est celui de la protéine RegA dont la fixation à l'ADN est stabilisée par l'ajout de bicarbonate dans des expériences *in vitro* de retard sur gel et de la protéine RhaS qui se fixe à l'ADN uniquement en présence de rhamnose (Kolin *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008).

L'interaction domaine N-terminal/ligand peut permettre le réarrangement des deux domaines ce qui va modifier l'orientation du domaine « 2HTH » afin qu'il puisse se fixer sur deux sites proches sur l'ADN. Ce mécanisme est observé pour la protéine AraC, comme nous l'avons déjà mentionné (III.2.3.1); en absence d'arabinose, le bras N-terminal flexible de la protéine AraC (18 premiers acides aminés) interagit directement avec le domaine « 2HTH » et impose ainsi l'orientation des deux domaines C-terminaux à l'opposé l'un de l'autre (figure 28). Suite à la fixation de L-arabinose, le bras N-terminal va « recouvrir » la poche dans laquelle l'arabinose est fixé. Ceci permet la libération des domaines C-terminaux qui vont pouvoir se fixer sur deux sites proches et interagir avec l'ARN polymérase (Figure 28) (Schleif, 2003).



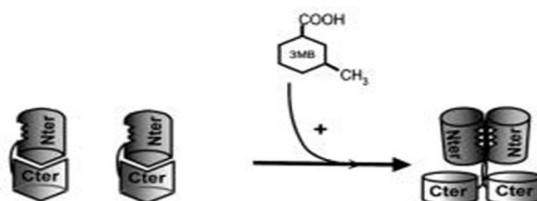
**Figure 28. Orientation des domaines de AraC et du bras N-terminal en absence ou présence d'arabinose (Rodgers and Schleif, 2009)**

Un monomère est représenté en gris et l'autre en blanc pour plus de clarté. **A)** En absence de ligand, le bras N-terminal interagit directement avec le domaine C-terminal. **B)** En présence d'arabinose, le bras N-terminal recouvre la poche de fixation du ligand et permet la fixation des monomères sur deux demi sites-proches.

Enfin, la fixation de ligand peut permettre la dimérisation du domaine N-terminal. Ceci est observé pour la protéine XylS : la fixation du 3-méthyl-benzoate (3MB) sur son domaine N-terminal permet de lever la répression intramoléculaire

exercée par le domaine N-terminal sur le domaine « 2HTH » en absence de ligand (Figure 29). En absence de 3MB, XylS se trouve sous forme de monomère au sein duquel ses deux domaines interagissent. La fixation du ligand induit un changement conformationnel qui va permettre la dimérisation des domaines N-terminaux, ce qui entraîne la réorientation des domaines C-terminaux dans un état compétent pour activer la transcription (Figure 29) (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2008b).

Il est intéressant de noter que la fixation de 3MB est nécessaire *in vivo* pour permettre la formation du dimère mais ne l'est pas *in vitro* à des concentrations élevées en protéines (Ruiz *et al.*, 2003).



**Figure 29. Modèle de répression intramoléculaire : le 3-méthyl-benzoate permet la libération du domaine C-terminal de XylS (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2008b).**

Le 3MB induit un changement conformationnel qui engendre l'exposition des zones d'interaction et favorise ainsi la dimérisation de XylS. Cette dimérisation entraîne la réorientation du domaine C-terminal qui peut alors se fixer sur l'ADN.

### III.2.2 Les ligands protéiques

A ce jour, les seuls exemples de protéines de la famille de type A/X dont l'activité est régulée par un ligand de nature protéique sont des protéines impliquées dans la régulation du SST3. Elles appartiennent à la catégorie des régulateurs dont les propriétés et les activités sont les moins bien connues (Plano, 2004).

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre II « Régulation du SST3 », à la différence des ligands non protéiques, les ligands peuvent jouer le rôle de co-activateurs (comme IpgC et SicA) mais aussi d'inhibiteurs (comme ExsD, Hile et OspD1) (Parsot *et al.*, 2005; Baxter *et al.*, 2003; McCaw *et al.*, 2002; Darwin and Miller, 2001). Les interactions directes entre les régulateurs et leurs ligands



protéiques n'ont été démontrées que pour les complexes InvF/SicA, Mxie/IpgC et MxiE/OspD1/Spa15 et ceci suite à la co-production et à la co-purification des deux protéines (Pilonieta and Munson, 2008; Parsot *et al.*, 2005; Darwin and Miller, 2001). Il a été montré que le co-activateur SicA est indispensable à l'activité transcriptionnelle de InvF mais pas à sa fixation sur l'ADN (Darwin and Miller, 2001). Cependant nous ne savons pas si SicA induit un changement conformationnel de InvF et/ou s'il est nécessaire à l'interaction avec l'ARN polymérase. Jusqu'à récemment aucun mécanisme moléculaire impliqué dans la régulation d'un facteur de transcription de type A/X par son ligand protéique n'a été identifié.



# Seconde partie

## Matériel et Méthodes



## Chapitre IV. Matériel et Méthodes

### I. Souches, plasmides et oligonucléotides.

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés pour réaliser les expériences décrites dans ce manuscrit sont décrits dans les tableaux I et II. Ceux qui n'ont pas été publiés sont référencés dans ces tableaux sous l'intitulé « laboratoire ».

Toutes les souches de *P. aeruginosa* utilisées dérivent de la souche CHA, un isolat clinique d'un patient atteint de la mucoviscidose (Toussaint *et al.*, 1993) qui est la souche sauvage de référence de ce travail.

Une souche d'*Escherichia coli* TOP10 a été utilisée pour les expériences de clonage. Toutes les surproductions de protéines ont été réalisées dans la souche *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen).

**Tableau I. Souches bactériennes utilisées dans cette étude**

Souches	Particularités	Référence
	<i>P. aeruginosa</i>	
CHA	Souche mucoïde isolée des voies broncho-pulmonaires d'un patient atteint de mucoviscidose.	(Toussaint <i>et al.</i> , 1993)
$\Delta$ exsA	CHA <i>exsA::Gm</i> : souche CHA contenant une cassette de résistance à la gentamycine insérée dans le gène <i>exsA</i> .	(Dacheux <i>et al.</i> , 1999)
CHA <i>pC<sup>+</sup>-lacZ</i>	CHA contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron de régulation <i>pC<sup>+</sup></i> (245 pb en amont du +1 de transcription) et le gène rapporteur <i>lacZ</i> insérée dans le chromosome.	Laboratoire
CHA <i>pG-lacZ</i>	CHA contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron de translocation <i>pG</i> (308 pb en amont du +1 de transcription) et le gène rapporteur <i>lacZ</i> insérée dans le chromosome.	Laboratoire
$\Delta$ exsA <i>pC<sup>+</sup>-lacZ</i>	$\Delta$ exsA contenant une fusion transcriptionnelle entre <i>pC<sup>+</sup></i> et le gène rapporteur <i>lacZ</i> insérée dans le chromosome.	Laboratoire
$\Delta$ exsA <i>pG-lacZ</i>	$\Delta$ exsA contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur <i>pG</i> et le gène rapporteur <i>lacZ</i> insérée dans le chromosome.	Laboratoire
CHA <i>pC<sup>+</sup>-gfp</i>	CHA contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur <i>pC<sup>+</sup></i> et le gène rapporteur <i>gfp</i> insérée dans le chromosome.	Laboratoire
	<i>E. coli</i>	
TOP10	Cellules traitées chimiquement pour être compétentes à la transformation.	Invitrogen
BL21 Star (DE3)	<i>F-ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>)gal dmc</i> (DE3)	Invitrogen

## Tableau II. Répertoire des plasmides

Antibiotique (AB), Ampicilline (Ap), carbénicilline (Cb), chloramphénicol (Cm), et kanamycine (Km), Tétracycline (Tc).

Vecteurs commerciaux			
Plasmide	AB <sup>r</sup>	Commentaires	Source
pCR-Blunt II-TOPO (pTOPO)	Km <sup>R</sup>	Vecteur de clonage contenant la séquence palindromique 5'CCCTTAAGGG3'. Cette séquence est reconnue par une topoisomérase I qui joue le rôle d'endonucléase et de ligase pour permettre l'insertion d'un fragment de PCR à bout franc.	Invitrogen
pET-15b	Ap <sup>r</sup>	Plasmide de surexpression permettant de fusionner une étiquette <b>hexa-histidine</b> en <b>N-terminal</b> de la protéine d'intérêt	Novagen
pET-22b(+)	Ap <sup>r</sup>	Plasmide de surexpression permettant de fusionner une étiquette <b>hexa-histidine</b> en <b>N-terminal</b> de la protéine d'intérêt	Novagen
pET-30b(+)	Km <sup>R</sup>	Plasmide de surexpression permettant de fusionner une étiquette <b>hexa-histidine</b> en <b>C-terminal</b> de la protéine d'intérêt	Novagen
pET-52b(+)	Ap <sup>r</sup>	Plasmide de surexpression permettant de fusionner une étiquette <b>deca-histidine</b> en <b>C-terminal</b> de la protéine d'intérêt	Novagen
pACYCDuet-1	Cm <sup>R</sup>	Plasmide de surexpression bicistronique permettant de fusionner une étiquette <b>hexa-histidine</b> en <b>C-terminal</b> de la première protéine d'intérêt et une étiquette <b>S-tag</b> (peptide de 15 aa) en <b>C-terminal</b> de la seconde protéine d'intérêt	Novagen
pMalc2X	Ap <sup>r</sup>	Plasmide de surexpression permettant de fusionner une étiquette Maltose Binding Protein en <b>N-terminal</b> de la protéine d'intérêt	English Biolabs

Vecteurs de surexpression dans <i>E. coli</i>			
Plasmides	AB <sup>r</sup>	Construction / Génotype	Source
pPES7	Ap <sup>r</sup>	pET-15b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-278</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,85 kb)	(Thibault <i>et al.</i> , 2009)
pET22b-ExsA	Ap <sup>r</sup>	pET-22b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-278</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,85 kb)	laboratoire
pPES20	Ap <sup>r</sup>	pET-22b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-278</sub> <i>NdeI-HindIII</i> (0,84 kb)	(Thibault <i>et al.</i> , 2009)
pPES21	Ap <sup>r</sup>	pET-22b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-183</sub> <i>NdeI-HindIII</i> (0,56 kb)	laboratoire
pET15b-14/43	Ap <sup>r</sup>	pET-15b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,51 kb)	(Thibault <i>et al.</i> , 2009)
pET22b-14/43	Ap <sup>r</sup>	pET-22b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,51 kb)	laboratoire
pET30b-14/44	Km <sup>r</sup>	pET-30b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,51 kb)	laboratoire
pET15b-14/45	Ap <sup>r</sup>	pET-15b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-157</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,48 kb)	laboratoire
pET22b-14/45	Ap <sup>r</sup>	pET-22b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-157</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,48 kb)	laboratoire
pET30b-14/46	Km <sup>r</sup>	pET-30b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-157</sub> <i>NdeI-HindIII</i> (0,48 kb)	laboratoire
pET52b-NExsA163	Ap <sup>r</sup>	pET-52b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-163</sub> <i>NcoI-SacI</i> (0,49 kb)	laboratoire
pET52b-NExsA132	Ap <sup>r</sup>	pET-52b, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-132</sub> <i>NcoI-SacI</i> (0,40 kb)	laboratoire
pPES27	Ap <sup>r</sup>	pET-15b, insertion de <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,35 kb)	(Thibault <i>et al.</i> , 2009)
pPES33	Km <sup>r</sup>	pET-30b, insertion de <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,35 kb)	laboratoire
pET15b-C/EBP-Cter	Ap <sup>r</sup>	pET-15b, insertion de <i>clebp</i> <sub>302-350</sub> - <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> <i>NdeI-BamHI</i> (0,53 kb)	<i>Ce travail</i>
pMBP-ExsA	Ap <sup>r</sup>	pMalc2x, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-278</sub> <i>EcoRI-HindIII</i> (0, 85 kb)	<i>Ce travail</i>
pMBP-Nter	Ap <sup>r</sup>	pMalc2x, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> <i>EcoRI-HindIII</i> (0, 51kb)	<i>Ce travail</i>
pMBP-Cter	Ap <sup>r</sup>	pMalc2x, insertion de <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> <i>EcoRI-HindIII</i> (0, 35 kb)	<i>Ce travail</i>

pMBP-C/EBP Cter	Ap <sup>r</sup>	pMalc2x, insertion de <i>c/ebp</i> <sub>302-350</sub> - <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> EcoRI-HindIII (0,53 kb)	<i>Ce travail</i>
pACYC-ExsD	Cm <sup>r</sup>	pACYCDuet-1, insertion de <i>exsD</i> NcoI-BamHI (0,84 kb)	(Thibault <i>et al.</i> , 2009)
<b>Vecteurs de surexpression dans <i>P. aeruginosa</i></b>			
pIApC <sup>+</sup>	Cb <sup>r</sup>	Fusion transcriptionnelle entre le promoteur pC <sup>+</sup> et le gène <i>gfpmut3</i> , porté sur un plasmide dérivé de pUCP20	laboratoire
pIApC <sup>+</sup> ExsA	Cb <sup>r</sup>	pIApC <sup>+</sup> , insertion de <i>exsA</i> <sub>1-278</sub> NdeI-EcoRV (0,98 kb) provenant de pPES7	laboratoire
pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-183</sub>	Cb <sup>r</sup>	pIApC <sup>+</sup> , insertion de <i>exsA</i> <sub>1-183</sub> NdeI-EcoRV (0,69 kb) provenant de pPES30	laboratoire
pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-83</sub>	Cb <sup>r</sup>	Généré par insertion par mutagenèse dirigée d'un codon stop en position 83 dans la séquence <i>exsA</i> <sub>1-183</sub> de pPES31 (primers PSE54/55)	laboratoire
pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-168</sub>	Cb <sup>r</sup>	pIApC <sup>+</sup> , insertion de <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> NdeI-EcoRV (0,65 kb) provenant de pET15b-14/43	<i>Ce travail</i>
pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1168*GC*</sub>	Cb <sup>r</sup>	Généré par substitution par mutagenèse dirigée des Cytosines 472 et 484 et Thymines 473 et 483 par des Guanines dans la séquence <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> de pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-168</sub> (primers ExsA-LinkGG F/R)	<i>Ce travail</i>
pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-157</sub>	Cb <sup>r</sup>	pIApC <sup>+</sup> , insertion de <i>exsA</i> <sub>1-157</sub> NdeI-EcoRV (0,61 kb) provenant de pET15b-14/45	<i>Ce travail</i>
pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-152</sub>	Cb <sup>r</sup>	Généré par insertion par mutagenèse dirigée d'un codon stop en position 153 dans la séquence <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> de pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-168</sub> (primers 152 F/R)	laboratoire
pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-132</sub>	Cb <sup>r</sup>	Généré par insertion par mutagenèse dirigée d'un codon stop en position 133 dans la séquence <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> de pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>1-168</sub> (primer 132 F/R)	laboratoire
pIApC <sup>+</sup> ExsA <sub>166-278</sub>	Cb <sup>r</sup>	pIApC <sup>+</sup> , insertion de <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> NdeI-EcoRV (0,49 kb) provenant de pPES27	laboratoire
pIApC <sup>+</sup> C/EBP Cter	Cb <sup>r</sup>	pIApC <sup>+</sup> , insertion de <i>c/ebp</i> <sub>302-350</sub> - <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> NdeI-EcoRV (0,62 kb) provenant de pET15b-C/EBP-Cter	<i>Ce travail</i>
pIApX2Δgfp	Cb <sup>r</sup>	pIApX2 ( <i>HindIII</i> + <i>XbaI</i> /Klenow) délété de la <i>gfp</i> (0,74 kb)	laboratoire
pX2-ExsA	Cb <sup>r</sup>	pIApX2, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-278</sub> <i>PvuI</i> /T4 DNA polymérase/ <i>XbaI</i> (1,12 kb) provenant de pIApC <sup>+</sup> ExsA	laboratoire
pX2-ExsA <sub>1-183</sub>	Cb <sup>r</sup>	pIApX2, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-183</sub> <i>PvuI</i> /T4 DNA polymérase/ <i>XbaI</i> (0,84 kb) provenant de pIApC ExsA <sub>1-183</sub>	laboratoire
pX2-ExsA <sub>1-168</sub>	Cb <sup>r</sup>	pIApX2, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> <i>PvuI</i> /T4 DNA polymérase/ <i>XbaI</i> (0,80 kb) provenant de pIApC ExsA <sub>1-168</sub>	laboratoire
pX2-ExsA <sub>1-157</sub>	Cb <sup>r</sup>	pIApX2, insertion de <i>exsA</i> <sub>1-168</sub> <i>PvuI</i> /T4 DNA polymérase/ <i>XbaI</i> (0,80 kb) provenant de pIApC ExsA <sub>1-157</sub>	laboratoire
pX2-ExsA <sub>166-278</sub>	Cb <sup>r</sup>	pIApX2, insertion de <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> <i>PvuI</i> /T4 DNA polymérase/ <i>XbaI</i> (0,64 kb) provenant de pIApC ExsA <sub>166-278</sub>	laboratoire
pX2- C/EBP Cter	Cb <sup>r</sup>	pIApX2, insertion de <i>c/ebp</i> <sub>302-350</sub> - <i>exsA</i> <sub>166-278</sub> <i>PvuI</i> /T4 DNA polymérase/ <i>XbaI</i> (0,64 kb) provenant de pIApC <sup>+</sup> C/EBP Cter	laboratoire
<b>Insertion chromosomique dans <i>P. aeruginosa</i></b>			
Mini-CTX1- <i>gfp</i>	Tc <sup>R</sup>	Vecteur de fusion transcriptionnelle avec la <i>gfp</i> et d'intégration chromosomique dans le site <i>attB</i> de <i>P. aeruginosa</i> ; <i>tet</i> , $\Omega$ -FRT- <i>attP</i> , <i>gfp</i> , <i>ori</i> , <i>oriT</i> , <i>int</i>	(Schweizer, 2001)
Mini-CTX pC <sup>+</sup> - <i>gfp</i>	Tc <sup>R</sup>	mini-CTX1- <i>gfp</i> , insertion du promoteur pC <sup>+</sup> BamHI (0,37 kb)	Laboratoire
pRK2013	Km <sup>r</sup>	ColE1 <i>mob</i> <sup>+</sup> <i>tra</i> <sup>+</sup> (RK2) plasmide « helper » mobilisateur	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)
pFLP2	Ap <sup>R</sup>	Source de la FLP recombinase, <i>sacB</i>	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)

Les oligonucléotides qui ont été utilisés pour générer les plasmides ainsi que pour réaliser des expériences de retard sur gel et de stabilisation de la protéine ExsA<sub>His6</sub> en solution sont décrits ci-dessous.

Nom	Séquences	Utilisation
PSE14 (F)	5' <u>CAT ATG</u> CAA GGA GCC AAA TCT CTT G (NdeI)	Surproduction 6HisExsA
PSE15 (R)	5'ACG TCA GTT ATT TTT AGC CCG GC	Surproduction 6HisExsA
PSE22 (R)	5' <u>AAG CTT</u> GTT ATT TTT AGC CCG GCA TTC (HindIII)	Surproduction ExsA <sub>6His</sub>
PSE23 (R)	5' <u>AAG CTT</u> GTT GAG GTA GTG CTT CTC C (HindIII)	Surproduction ExsA <sub>1-183 6His</sub>
PSE28 (R)	5' <u>AAG CTT</u> GTC GCA ACG CTC GAC TTC (HindIII)	Surproduction ExsA <sub>1-183 6His</sub>
PSE37 (R)	5' <u>GGA TCC</u> TCA GTT GAG GTA GTG CTT CTC C (BamHI)	Surproduction Nter <sub>1-168 6His</sub>
PSE43 (R)	5' <u>GGA TCC</u> TCA CCG GTT GCT CAG TTG CCG (BamHI)	Surproduction 6HisNter <sub>1-168</sub>
PSE44 (R)	5' <u>AAG CTT</u> CCG GTT GCT CAG TTG CCG (HindIII)	Surproduction Nter <sub>1-168</sub>
PSE45 (R)	5' <u>GGA TCC</u> TCA CAG CGG CCC CTG CGG AC (BamHI)	Surproduction 6HisNter <sub>1-157</sub>
PSE46 (R)	5' <u>AAG CTT</u> CAG CGG CCC CTG CGG AC (HindIII)	Surproduction Nter <sub>1-157 6His</sub>
PSE56 (F):	5' <u>CCA TGG</u> AAG GAG CCA AAT CTC TTG G (NcoI)	Surproduction Nter <sub>-1-163 10His</sub>
PSE61 (R):	5' <u>GAG CTC</u> CTC ATG CAC AAG CAA TTC CTT C (SacI)	Surproduction Nter <sub>-1-132 10His</sub>
PSE34 (F) :	5' <u>CAT ATG</u> AGC AAC CCG CAT GTC GAG (Nde)	Surproduction 6HisCter
PSE36 (R)	5' <u>GGA TCC</u> ACG TCA GTT ATT TTT AGC CCG (BamHI)	Surproduction 6HisCter
PJT1 (F)	5' <u>CAT ATG</u> AAA GCC AAA CAG CGC AAC GTG GAG (NdeI)	Surproduction 6His C/EBP-Cter
PJT2 (R)	5'CCG CAG GAC CGA CAT CAG CAA GGA GCT CTC AGG CAG	Surproduction 6His C/EBP-Cter
PJT3 (F) :	5'CTG ATG TCG GTC CTG CGG	Surproduction 6His C/EBP-Cter
PSE54 (F)	5'CCA TTA TCT GCC TGA TTT CTA CAA GGC	Surproduction ExsA <sub>1-82</sub>
PSE55 (R) :	5'GCC TTG TAG AAA TCA GGC AGA TAA TGG	Surproduction ExsA <sub>1-82</sub>
ExsA-LinkGG (F)	5'CAG GGG CCG CTG GGG ATG TCG GTC GGG CGGCAA CTG AGC	Surproduction ExsA <sub>1-168</sub> « GG »
ExsA-LinkGG (R)	5'GCT CAG TTG CCG CCC GAC CGA CAT CCC CAGCGG CCC CTG	Surproduction ExsA <sub>1-168</sub> « GG »
F 132 (F)	5'TTG CTT GTG CAT GAG TGA CCG CCG ATG CTC GCC	Surproduction ExsA <sub>1-132</sub>
R 132 (R)	5'GGC GAG CAT CGG CGG TCA CTC ATG CAC AAG CAA	Surproduction ExsA <sub>1-132</sub>
F 152 (F)	5'CTC TTC GCG TTC AGT TGA CAG GGG CCG CTG CTG	Surproduction ExsA <sub>1-152</sub>
R 152 (R)	5'CAG CAG CGG CCC CTG TCA ACT GAA CGC GAA GAG	Surproduction ExsA <sub>1-152</sub>
MBP ExsA (F)	5'CGG <u>GAA TTC</u> ATG CAA GGA GCC AAA TCT CTT (EcoRI)	Surproduction MBP-ExsA
MBP ExsA (R)	5'CGG <u>AAG CTT</u> TCA GTT ATT TTT AGC CCG GCA (HindIII)	Surproduction MBP-ExsA
MBP Nter (R)	5'CGG <u>AAG CTT</u> TCA CAG TTG CCG CAG GAC CGA (HindIII)	Surproduction MBP-Nter
MBP Cter (F)	5'CGG <u>GAA TTC</u> AAA GCC AAA CAG CGC AAC GTG (EcoRI)	Surproduction MBP-Cter
MBP C/EBP (F)	5'CGG <u>GAA TTC</u> AGC AAC CCG CAT GTC GAG (EcoRI)	Surproduction MBP-C/EBP Cter
PExsC-Stab.F	5'CCG CGC GGG AGG AAA AGG CCA CAG CGA TGT GGC TTT TTT CTT AAA AGA AAA GTC TCT CAG	Stabilisation de ExsA <sub>His6</sub>
PExsC-Stab.R	5'CTG AGA GAC TTT TCT TTT AAG AAA AAA GCC ACA TCG CTG TGG CCT TTT CCT CCC GCG CCG	Stabilisation de ExsA <sub>His6</sub>
PcrG stab 2.F	5'GCC TGC GAA AAC GAC AAA AAC CCG ACC GTG CCT GAC AGG CTCCGG	Stabilisation de ExsA <sub>His6</sub>
PcrG stab 2.R	5'CCG GAG CCT GTC AGG CAC GGT CGG GTT TTT GTC GTT TTC GCA GGC	Stabilisation de ExsA <sub>His6</sub>
pC EMSA F	5'CGG ATG TGG CTT TTT TCT TAA AAG AAA AGT CTC TCA GTG ACA AAA GCG ATG CAT AGC CCG	Biotinylé en 5', retard sur gel
pC EMSA R	5'CGG GCT ATG CAT CGC TTT TGT CAC TGA GAG ACT TTT CTT TTA AGA AAA AAG CCA CAT CGC	Biotinylé en 5', retard sur gel
Sonde "non-spécifique" F	5'CCC AGA GCC ATA ACC AGG CCT GGC GTG CGG CGG CCG GAG TGG TCT GAG CCG TCT CCG CGC 3'	Biotinylé en 5', retard sur gel
Sonde "non-spécifique" R	5'GCG CGG AGA CGG CTG AGA CCA CTC CGG CCG CCG CAC GCC GCC AGG CCT GGT TAT GGC ACA GGG 3'	Biotinylé en 5', retard sur gel



### Tableau III. Récapitulatif des oligonucléotides utilisés.

Les sites de restriction insérés dans les amorces sont soulignés et nommés entre parenthèse, et les bases non complémentaires insérées dans les amorces sont indiquées en gras.

## II. Microbiologie et biologie cellulaire

### II.1 Conditions de culture

Les cultures liquides de *E. coli* et *P. aeruginosa* sont réalisées en milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C et sous agitation à 300 rpm.

Composition du milieu LB :

- Bacto-tryptone 10 g/l
- Bacto-Yeast extract (extrait de levure) 5 g/l
- NaCl 10 g/l

Les cultures en milieu solide de *E. coli* sont réalisées sur milieu LB gélosé (+15g/l agar). Le milieu gélosé PIA (*Pseudomonas* Isolation Agar ; DIFCO) a été utilisé pour cultiver et sélectionner *P. aeruginosa* à 37°C.

### II.2 Utilisation d'antibiotiques

Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes en milieu liquide et solide :

Antibiotiques	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicilline	100 µg/ml	
Carbénicilline		500 µg/ml
Kanamycine	25 µg/ml	
Chloramphénicol	35 µg/ml	
Tétracycline	10 µg/ul	200 µg/µl

### II.3 Induction *in vitro* du SST3 par déplétion en calcium

Pour induire *in vitro* le SST3, des cultures de *P. aeruginosa* de la nuit sont diluées à une DO<sub>600</sub> de 0,1 dans du milieu LB déplété en calcium contenant 5 mM d'EGTA, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 8, et l'antibiotique approprié. 5 mM de CaCl<sub>2</sub> sont

ajoutés dans les cultures non induites. L'incubation est prolongée environ trois heures jusqu'à ce que les cultures atteignent une  $DO_{600}$  de 1,0. Ces cultures sont utilisées pour les préparations suivantes :

#### **II.4 Préparation d'extraits cytosoliques de *P. aeruginosa*.**

Pour vérifier la synthèse des protéines du SST3, 25 ml de culture ( $DO_{600}=1$ , en conditions induite ou non induite du SST3) sont centrifugés pendant 10 min à 6000 rpm à 4°C. Le culot obtenu est repris dans 600  $\mu$ l de tampon 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8, puis soniqué 4 fois 30 secondes. Les cellules lysées sont ultracentrifugées à 80000 rpm dans le rotor TLA 120.2 (Beckman) à 4°C pendant 30 min pour séparer la fraction soluble (extrait cytosolique) de la fraction insoluble (extrait membranaire). 20  $\mu$ l de surnageant est prélevé pour analyse.

#### **II.5 Préparation du surnageant de culture *P. aeruginosa*.**

Pour vérifier la sécrétion des translocateurs PopB et PopD et de PcrV, 1 ml de culture est centrifugé 10 min à 6000 rpm et à 4°C. 10  $\mu$ l du surnageant est prélevé pour analyse.

#### **II.6 Cytotoxicité SST3-dépendante envers les macrophages.**

Environ 24h avant l'infection, 3 à  $5 \cdot 10^5$  macrophages (J774) dans du DMEM complétement sont déposés par puits dans une boîte 48 puits puis incubés toute la nuit à 37°C, 5%  $CO_2$ . Trois heures avant l'infection, les macrophages sont mis dans 300  $\mu$ L de DMEM complétement neuf. L'infection est réalisée à une MOI de 10 (10 bactéries pour un macrophage) à partir de cultures de *P. aeruginosa* à une  $DO_{600} = 1$  (soit  $6 \cdot 10^8$  bactéries/ml) et cultivées en condition non induite du SST3. 30  $\mu$ l de surnageant sont prélevés dans chaque puits toutes les heures pendant trois heures. La cytotoxicité est estimée en mesurant l'activité lactate deshydrogénase (LDH) en utilisant le « Cytotoxicity detection kit » (Roche Diagnostique). 115  $\mu$ l de solution du

kit de dosage sont ajoutés dans chaque puits. Après quelques minutes de réaction dans le noir, la plaque est lue à 480 nm grâce un lecteur de plaque 96 puits, Multiskan EX THERMO®. Le témoin négatif correspond à la mesure de l'activité LDH des macrophages incubés sans bactérie (niveau basal de relargage de LDH par les macrophages). Le témoin qui correspond à la lyse totale des macrophages est réalisé en ajoutant 300 µl de Triton X-100 2 % en fin de test.

### **III. Techniques de biologie moléculaire**

#### **III.1 Construction des plasmides**

Les fragments d'ADN d'intérêt sont amplifiés par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) au moyen d'une ADN polymérase (BD Advantage, Clontech) à partir de deux amorces oligonucléotidiques complémentaires aux extrémités opposées du fragment (Tableau III) et d'une matrice ADN, génomique ou plasmidique.

Les fragments obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide 5 %. Après coloration du gel d'acrylamide au BrET, le fragment d'ADN à récupérer est visualisé sous UV, découpé puis incubé à 37°C dans 500 µl de TE/NaCl (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8, contenant 1 M NaCl), sous agitation pendant une nuit. L'ADN est ensuite précipité à l'alcool par ajout de deux volumes d'éthanol absolu froid. La précipitation s'effectue à -20°C pendant une heure. L'ADN est récupéré par centrifugation à 12000 rpm à 4°C pendant 10 min. le culot est lavé de ses sels par un mélange éthanol/TE (70/30 v/v), séché puis repris dans 10 µl d'eau. Pour liguer le fragment dans le vecteur de clonage, 0,5 à 4 µl de fragment sont incubés avec 2 µl de mélange réactionnel contenant le vecteur de clonage pTOPO® et une solution saline (kit Zero blunt-end TOPO®, Invitrogen), qsp 6 µl. La ligation dure 15 min à 23°C.

Ensuite, la transformation est réalisée en ajoutant 2  $\mu\text{l}$  du mélange de ligation à 40  $\mu\text{l}$  de cellules compétentes TOP10. Après 30 min d'incubation dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique de 30 secondes à 42°C puis un refroidissement de 2 min dans la glace. 200  $\mu\text{l}$  de milieu SOC sont ajoutés puis les bactéries transformées sont ensuite incubées 1h à 37°C à 200 rpm, puis étalées sur milieu gélosé contenant l'antibiotique de sélection.

Après une nuit d'incubation à 37°C, 10 des colonies obtenues sont ensemencées dans 3ml de culture sur la nuit. A partir de ces cultures, l'ADN plasmidique de chacun des clones est extrait par lyse alcaline (Birnboim and Doly, 1979) puis digéré par des endonucléases. Ces enzymes sont utilisées selon les instructions du fabricant. La digestion est arrêtée par inactivation à la chaleur ou ajout du tampon de charge.

La présence du fragment est ensuite analysée par gel d'agarose 0,8 % ou d'acrylamide 5 % afin d'identifier les clones positifs. Le produit de PCR cloné est ensuite vérifié par séquençage double brin (COGENICS).

Le clone contenant l'insert est ensemencé dans 30 ml de culture sur la nuit, puis la purification d'ADN plasmidique en grande quantité est ensuite réalisée en utilisant le kit QIAGEN Midiprep®. Le fragment d'intérêt est extrait du plasmide par une étape d'hydrolyse avec des endonucléases (les enzymes utilisées pour chaque fragment sont indiquées dans le tableau II), puis analysé par électrophorèse sur gel d'acrylamide 5 %, élué et précipité à l'éthanol comme indiqué ci-dessus. En parallèle, le vecteur de surexpression est hydrolysé avec des enzymes de restriction qui permettront l'insertion du fragment. Le vecteur doit être déphosphorylé afin d'éviter qu'il ne se referme sur lui-même. Pour cela, le vecteur est incubé avec une phosphatase alcaline (1 à 2 U/ $\mu\text{g}$  d'ADN) (Roche) et 1  $\mu\text{l}$  de tampon 10X dans un volume de 10  $\mu\text{l}$  pendant 10 min à 37°C. La réaction est inactivée à 65°C pendant 15 min.

Le vecteur hydrolysé et le fragment d'ADN sont ensuite ligués par une ADN ligase suivant un rapport moléculaire de 1/2 à 1/5 (Quick Ligation Kit –

Biolabs). La transformation puis l'analyse des clones positifs sont réalisés comme indiqués ci-dessus.

### III.2 SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension- Polymerase Chain Reaction)

La SOE-PCR permet de fusionner deux fragments d'ADN (A et B) par PCR et sans enzyme de restriction (Figure 30). Chaque fragment est tout d'abord amplifié lors d'une première PCR: l'amorce en 3' utilisée pour amplifier le fragment A doit posséder une séquence complémentaire à l'amorce 5' du fragment B. Ainsi, quand les 2 fragments sont mélangés, les fragments s'hybrident et sont étendus par l'ADN polymérase; puis ils sont amplifiés en utilisant les amorces externes des deux fragments ce qui résulte en la production de l'ADN de fusion.

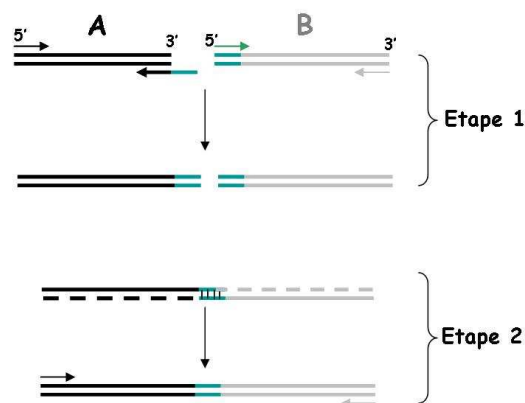


Figure 30. Principe de la SOE-PCR

La séquence codant pour la protéine hybride C/EBP-Cter a ainsi été générée par la technique SOE-PCR. Le fragment *c/ebp* 302-350, codant pour le domaine leucine zipper de la protéine C/EBP, a été amplifié par PCR en utilisant l'ADN polymérase Vent (BioLabs) à partir du vecteur pKEK544 (Pastor *et al.*, 2005) et les amorces pJT1 et pJT2 générant un fragment dont une partie de la séquence 3' terminale est identique au début de la séquence *exsA* 156-278 (Cter). Cette dernière a été aussi amplifiée par PCR à partir de la matrice pPES7 en utilisant les amorces

pJT3 et pPSE36. Les deux produits de PCR ont été élués et précipités à l'éthanol puis utilisés comme matrice d'une troisième PCR réalisée avec les amorces pJT1 et pSE36 afin de générer le produit de PCR final, *c/ebp* 302-350 -*exsA* 156-278.

### III.3 Mutagenèse dirigée.

Le kit « Quick change Mutagenesis » (Stratagène) a été utilisé pour générer des mutations ponctuelles dans la séquence de *exsA*. Ce procédé utilise la PCR, avec l'ADN plasmidique contenant le gène d'intérêt comme matrice et deux amorces oligonucléotidiques mutagéniques. Les amorces, chacune complémentaire des brins opposés du plasmide, sont étendues lors de la réplication des brins par l'ADN polymérase *PfuTurbo* pendant la PCR. L'incorporation des amorces génère alors un plasmide contenant les mutations voulues. Le produit de réaction obtenu est ensuite traité par *DpnI*. Cette endonucléase est spécifique de l'ADN méthylé et est utilisée pour digérer l'ADN plasmidique matrice « parental » afin de sélectionner l'ADN plasmide contenant la mutation synthétisé par la PCR. En effet, l'ADN isolé des souches de *E. coli* est dam méthylé et donc susceptible à la digestion par *DpnI*.

Pour effectuer des mutations sur des plasmides avec ce kit, les réactifs suivant sont utilisés :

- 30-50 ng d'ADN plasmidique matrice
- 125 ng de chaque amorce (séquences fournies dans le tableau III)
- 200  $\mu$ M de dNTP
- Tampon de réaction 1X
- 2,5 unités de Pfu polymérase Ultra II
- Qsp 50  $\mu$ l

Les 50  $\mu$ l de mélange réactionnel sont placés dans un thermocycler et la mutagenèse est effectuée selon le programme suivant:

- 95°C pendant 30 s
  - 95 °C pendant 1 min
  - 55°C pendant 1 min
  - 68°C pendant \* nb kb du plasmide
- } x 18

Les produits de la réaction sont ensuite digérés pendant 1 nuit à 37°C avec 10 unités de *DpnI*. 1 µl du mélange réactionnel traité est utilisé pour transformer les bactéries compétentes TOP10. Puis, 3 clones sont choisis pour être séquencés afin de vérifier la présence de la mutation.

#### **III.4 Transformation de *P. aeruginosa*.**

Cette technique consiste à rendre *P. aeruginosa* compétente pour la transformation chimique. 1 ml d'une culture de la nuit de *P. aeruginosa* est centrifugé 30 sec à 13000 g, à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 1ml de 0,1 M MgCl<sub>2</sub> froid, puis centrifugé 30 sec à 13000 g. Les bactéries sont ensuite reprises dans 1 ml d'une solution TG-salts froide (75 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 % glycérol (m/v)) puis incubées dans la glace pendant 10 min. Après cette incubation, les bactéries sont centrifugées 30 s à 13000 g. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est repris dans 200 µl de TG-salts froid. Les cellules sont prêtes pour la transformation.

100 µl de cette suspension de bactéries compétentes sont transférées dans un tube eppendorf refroidi dans la glace, et mélangés avec 100 à 200 ng d'ADN plasmidique. Ce mélange est incubé 25 min dans la glace puis subit un choc thermique de 2 min à 37°C. Le mélange est immédiatement repris dans 500 µl de LB puis incubé 1h à 37°C sous agitation ménagée (200 rpm). Les transformants sont sélectionnés sur milieu PIA contenant l'antibiotique approprié.

#### **III.5 Conjugaison triparentale**

La conjugaison bactérienne est un processus parasexuel permettant de transférer du matériel génétique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse.

Dans notre cas, le plasmide transféré mini-CTX1 (Hoang, 2000) possède les particularités suivantes :

- une MCS (Multi Cloning Site) flanquée par deux séquences de terminaison de transcription T4 ( $\Omega$ )
- deux sites FRT, de part et d'autre des sites  $\Omega$ , cibles de la recombinaise Flp
- le gène *int* codant pour l'intégrase du phage CTX et un site d'attachement *attP* de ce même phage.

Le mini-CTX peut être mobilisé dans *E. coli* et introduit par conjugaison triparentale dans *P. aeruginosa* lorsqu'il est mis en présence des éléments de transfert portés par le plasmide « helper » pRK2013. Il ne se réplique pas dans *P. aeruginosa* mais il peut être intégré dans le chromosome au niveau d'un site *attB* d'attachement du phage CTX, grâce à son site *attP* et à la présence de l'intégrase pour lequel il code. La recombinaise Flp (codée par le plasmide pFLP2) permet ensuite d'exciser les parties du plasmide non souhaitées (incluant *int* et *tet*, le gène de résistance à la tétracycline) par le système de recombinaison « sites-spécifiques » « Flp-FRT ».

La conjugaison triparentale fait intervenir les 3 souches bactériennes suivantes:

- une souche receveuse de *P. aeruginosa*,
- une souche donneuse d'*E. coli* portant le plasmide mini-CTX1,
- une souche mobilisatrice d'*E. coli* portant le plasmide helper pRK2013.

Une culture de la nuit de *P. aeruginosa* est incubée pendant 2 h à 42°C dans un bain-marie. En parallèle, 30  $\mu$ l de chacune des souches de *E. coli* (culture de la nuit, en LB) sont déposées sur boîte de LB sèche pour former « une goutte ». La boîte est mise à l'étuve pendant 2 h à 37°C. Puis 30  $\mu$ l de la culture de *P. aeruginosa* est ajoutée sur la goutte de *E. coli* et la boîte est remise à incuber pendant 4 à 6h à 37°C. La goutte est reprise dans 300  $\mu$ l de LB dans un eppendorf stérile et agitée



pendant 10 min dans un thermomixer à 37°C. 50 µl de cette suspension est étalée sur PIA TC<sub>200</sub>.

Des clones (transconjugants) résistants à la tétracycline sont sélectionnés et ensemencés sur la nuit avec l'antibiotique. Ils sont rendus compétents chimiquement pour la transformation (voir ci-dessus), transformés avec 200 ng de plasmide pFLP2 et étalés sur boîte PIA Cb<sub>500</sub>. Les clones résistants sont striés sur boîte PIA saccharose 5% afin de sélectionner les bactéries ayant perdu le plasmide pFLP2 portant le gène *sacB*. Les clones qui ont excisé la partie du mini-CTX contenant le gène *tet* et perdu le plasmide pFLP2 sont sélectionnés pour leur sensibilité à la tétracycline et à la carbénicilline.

## IV. Techniques de biochimie.

### IV.1 Mesure de l'activité β-galactosidase

500 µl de bactéries sont perméabilisées par ajout de 20 µl de SDS 0,1 % et 20 µl de CHCl<sub>3</sub> puis vortexées pendant 1 min. Des volumes de 25 µl à 100 µl sont prélevés et ajustés à 1 ml avec du tampon Z (0,06 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,04 M β-mercaptoéthanol, pH 7). La réaction est initiée à 28°C par ajout de 0,2 ml d'ONPG (orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside) à 4 mg/ml. Lorsque la coloration est suffisamment jaune, la réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml de 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10). Après sédimentation des débris cellulaires, la DO (entre 0,6 et 0,9) est lue à 420 nm en utilisant comme blanc le témoin sans cellule. L'activité est exprimée en Unités Miller d'après la formule :

$$(1000 \times DO_{420}) / (t_{\min} \times V_{\text{ml}} \times DO_{600})$$

où *V* est le volume de culture, *t* est le temps de la réaction et DO<sub>600</sub> est la mesure d'absorbance de la culture.

## IV.2 Mesure de la fluorescence par cytométrie en flux.

Pour sédimenter les bactéries, 1 ml de culture est centrifugé 10 min à 6000 rpm à température ambiante. Le culot est resuspendu dans 1 ml de PBS puis l'analyse de la fluorescence de chacun des échantillons a été réalisée en comptant 50000 bactéries par échantillon en utilisant le système FACS Calibur (BD Biosciences).

## IV.3 Séparation des protéines par SDS-PAGE et immunodétection

### IV.3.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les échantillons protéiques à analyser sont additionnés de tampon de charge (1X: 50 mM Tris/HCl, 2 % SDS, 10 % Glycérol, 100 mM dithiothréitol, 0,1 % Bleu de Bromophénol, pH 6,8), puis dénaturés 5 min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) 15 % en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), soit en système Tris/Glycine, soit en Tris/Tricine si les protéines d'intérêt sont inférieures à 15 kDa. La composition des gels est décrite dans le tableau IV :

Tableau IV. Composition des gels d'acrylamide utilisés.

	Tris/Glycine		Tris/Tricine	
	Gel de concentration (5%)	Gel de séparation (15%)	Gel de concentration (4%)	Gel de séparation (15%)
H <sub>2</sub> O (ml)	6,8	2,3	1,5	0,2
Acrylamide 30 %, bisacrylamide 0,8 % (ml)	1,7	5	0,4	5,8
Glycérol (gr)				2
3 M Tris/HCl, 10 mM SDS, pH 8,45			0,6	4
1 M Tris/HCl, pH 6,8 (ml)	1,25			
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)		2,5		
SDS 10 % (ml)	0,1	0,1		
Persulfate d'ammonium 10 % (ml)	0,1	0,1	0,05	0,12
TEMED (µl)	10	10	10	10

Pour les gels Tris/Glycine, la migration s'effectue pendant 2h (40 mA) dans le tampon de migration (25 mM Tris/HCl, 250 mM Glycine, 0,1 % SDS, pH 8,5).

Pour les gels Tris/Tricine, la migration dure environ 4h (30 mA) et elle est réalisée avec des tampons de migration réservés à l'anode (200 mM Tris/HCl, pH 8,9) et la cathode (100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricine, 0,1 % SDS, pH 8,25). Après migration, les protéines sont colorées au bleu de Coomassie (solution acide acétique/éthanol/eau (1/5/5), contenant 0,25 % (p/v) de bleu de Coomassie R250) ou transférées sur une membrane de nitrocellulose.

#### IV.3.2 Transfert des protéines et immunodétection

La membrane est préalablement équilibrée quelques minutes dans du tampon de transfert (48 mM Tris, 39 mM glycine, 20 % éthanol, 0,03 % SDS, pH 8,1-8,5). Le gel de polyacrylamide est également équilibré dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du fabricant (Invitrogen). Le transfert s'effectue pendant 1h30 dans une cuve Invitrogen® (20 V, 100 mA). Après lavage en tampon 0,1 % Tween 20 dans PBS 1X (T-PBS), la membrane est incubée pendant 1 h dans du tampon de blocage (T-PBS 1X-Lait 5%) afin de saturer les sites aspécifiques. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois en T-PBS avant d'être incubées une heure avec les anticorps primaires (Tableau V) dilués dans le T-PBS. Remarque : Toutes ces étapes d'immunodétection se font à température ambiante sous agitation.

**Tableau V. Nature et dilution des anticorps utilisés en Western Blot**

Nom	Dilution	Remarque	Référence
$\alpha$ -Nter (ExsA)	1/2000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux purifiés par affinité (voir ci-dessous) à partir de sérum total de lapin. (Eurogentec)	<i>Ce travail</i>
$\alpha$ -Cter (ExsA)	1/2000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux de cochon d'inde (Eurogentec)	<i>Ce travail</i>
$\alpha$ -ExsD	1/2000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux de cochon d'inde (Eurogentec)	<i>Ce travail</i>
$\alpha$ -PcrV	1/3000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux purifiés par affinité à partir de sérum total de lapin (Eurogentec)	(Gouré et al, 2005)
$\alpha$ -PopB	1/3000 <sup>ème</sup>	Anticorps polyclonaux purifiés par affinité à partir de sérum total de lapin (Eurogentec)	(Gouré et al, 2005)

Après incubation, les membranes sont lavées 3 fois dans du tampon T-PBS avant d'être incubées 1 h avec les anticorps secondaires polyclonaux anti-IgG conjugué à la HRP (Horseradish peroxydase) (anticorps anti-IgG de lapin au 1/5000 ou de cochon d'inde au 1/4000 dans T-PBS; Sigma). Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire.

La révélation est réalisée par une réaction de chimioluminescence en utilisant le système ECL™ (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Pharmacia Biotech) et les membranes sont exposées à un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) selon la technique donnée par le fabricant.

Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration de marqueurs de poids moléculaires connus (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen).

#### **IV.4 Purification des anticorps**

⇒ Concentration des IgG sur colonne de protéine A.

Le sérum final du programme d'immunisation est décongelé à 37°C puis mis dans la glace. Le sérum est ensuite dilué d'un facteur 1,25 dans le tampon phosphate 100 mM pH 7 puis passé sur un filtre 0,45 µm. Il est ensuite chargé en boucle, pendant 4 h à 0,5 ml/min et à 4°C, sur une colonne de protéine A (Hitrap Protein A HP 1ml, GE Healthcare), préalablement équilibrée avec 10 volumes de tampon phosphate 20 mM, pH 7. La colonne chargée est ensuite lavée par passage de 30 volumes de tampon phosphate 20 mM, pH 7, à 1ml/min. Les anticorps sont élués avec 5 ml d'acide citrique 0,1 M, pH 4, et des fractions de 500 µl sont récoltées dans des tubes collecteurs qui contiennent un volume de tampon Tris/HCl 1 M, pH 9 (à déterminer avant l'expérience, généralement 170 µl pour 500 µl) qui permet de neutraliser le pH de la solution.

⇒ Purification sur membrane avec la protéine d'intérêt.

Au moins 2 mg de protéine purifiée sont chargés sur SDS-PAGE, migrés et transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane est lavée 10 min sous agitation avec du PBS -Tween 0,1 % (T-PBS) puis colorée au Rouge Ponceau S 0,1% (dans acide acétique 5 %). Les bandes d'intérêt sont notées sur la membrane puis le colorant est rapidement éliminé par deux lavages au T-PBS. Les bandes sont découpées puis placées au fond d'un puit d'une plaque de 12 puits et 500 µl d'anticorps élués de la colonne de protéine A sont ajoutés. Les anticorps et la membrane sont agités doucement toute la nuit à 4°C puis quelques heures le lendemain à température ambiante. La membrane est lavée deux fois au T-PBS puis découpée en tout petits morceaux qui sont placés dans une colonne Spin-X 0, 22 µM (Costar). La colonne est posée sur un tube eppendorf contenant du Tris/HCl 1 M, pH 9 (décrit ci-dessus) puis 200 µl de tampon d'éluion Glycine 100 mM, pH 2, sont ajoutés. Après 30 s de centrifugation à 7000 rpm, l'éluât est rapidement mélangé avec le Tris/HCl pour neutraliser le pH.

#### **IV.5 Co-immunoprécipitation**

Cette technique permet de précipiter des protéines qui sont associées *in vivo* à l'aide d'anticorps spécifiques fixés sur un support (généralement des billes).

Une étape de couplage anticorps/protéine A est réalisée avec 40 µl d'anticorps ( $\alpha$ Nter) et 20 µl de billes protéine A (Santa Cruz Biotechnology) dans 1 ml de PBS pendant 3 h à 4°C avec agitation sur une roue. Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec 1 ml de PBS. Les anticorps ainsi couplés sur les billes sont ensuite incubés avec 300 µl d'extrait cytosolique de *P. aeruginosa* et 700 µl de tampon RIPA (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 1% NP40, 0,5 % Sodium Deoxycholate, pH 8) complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche). L'incubation dure 1 h à 4°C avec agitation sur une roue. Après 4 lavages de 1 ml avec du tampon RIPA, les billes sont centrifugées 5 min à 2500 rpm à 4°C et le surnageant est éliminé. Les protéines fixées sur les anticorps, seules ou associées à d'autres protéines, sont

éluées par ajout de 40 µl de tampon de charge 1X et chauffage 10 min à 100°C. 10 µl d'éluât sont déposés puis séparés sur gel SDS-PAGE. Le gel est ensuite soit coloré au bleu de Coomassie, soit révélé à l'argent, soit transféré sur une membrane de nitrocellulose pour immunodétection.

#### IV.6 Dosages des protéines

⇒ Dosage colorimétrique.

Les protéines totales d'un échantillon sont dosées par une technique colorimétrique faisant intervenir l'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode est basée sur la réactivité stœchiométrique des ions  $\text{Cu}^{2+}$  à l'égard des liaisons peptidiques. Les ions libérés vont réagir avec le BCA pour former un complexe stable de couleur pourpre. Les protéines à doser (100 µl final) sont incubées pendant 30 min à 30°C en présence de 1 ml de réactif préparé extemporanément par le mélange d'un volume de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 4 % (m/v) avec 50 volumes de la solution commerciale de BCA (Pierce) et 10 µl de 10 % SDS. L'absorbance à 562 nm de l'échantillon (directement proportionnelle à la quantité de protéine) est ensuite mesurée. La concentration en protéine de l'échantillon est déterminée par comparaison avec une gamme d'albumine de sérum de bœuf (BSA), de 0 à 100 µg de protéines, dosées dans les mêmes conditions.

⇒ Mesure de l'absorbance.

Les protéines purifiées peuvent être dosées par une autre technique qui utilise les propriétés d'absorbance des protéines à 280 nm pour mesurer leur concentration. Pour cela on réalise un spectre d'absorption entre 240 et 320 nm avec le tampon seul (**T**) puis avec la protéine (**P**) dans le tampon, ce qui permet notamment de vérifier si la protéine est dans un état agrégé.

La concentration molaire de l'échantillon est mesurée selon la formule suivante:

$$\frac{(DO_{280}^P - DO_{280}^T) - (DO_{320}^P - DO_{320}^T)}{\epsilon} = [P] M$$

où  $\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire de la protéine en  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **IV.7 Surproduction des protéines et purification par chromatographie.**

Les productions des différentes protéines de cette étude ont été réalisées dans des cellules *E. coli* BL21 Star (DE3) cultivées dans 1 litre de LB. Les cultures sont inoculées à une  $DO_{600}$  de 0,1 avec une pré-culture de la nuit, puis la production des protéines est induite à une  $DO_{600}$  de 0,6 par ajout de 0,1 mM d'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside). Après 20 h à 16°C et sous agitation à 120 rpm (sauf pour la protéine Nter<sub>1-168His6</sub>: 3h à 37°C sous agitation à 250 rpm), les bactéries sont centrifugées à 6000g pendant 10 min, reprises dans 25 ml de tampon de lyse (indiqué dans le Tableau V) contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete, Roche), et lysées par trois passages successifs à la presse de French. Les débris cellulaires et les protéines membranaires sont sédimentés par ultracentrifugation à 200000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubles est ensuite déposé sur une colonne de chromatographie préalablement équilibrée dans le tampon de lyse des bactéries (Tableau VI). Les purifications sont réalisées à température ambiante.

**Tableau VI. Répertoire des pI, tampons de lyse et méthode de purification par chromatographie.**

<b>Protéine</b>	<b>pI</b>	<b>Tampon de lyse</b>	<b>Chromatographie</b>
<b>His6ExsA</b> <b>/ExsAHis6</b>	8,8	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % Tween 20; 10 mM imidazole, pH 8	affinité sur colonne de Ni <sup>2+</sup>
<b>Nter<sub>1-168</sub>His6</b>	7,7	25 mM tampon sodium phosphate, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole, 10 % glycérol, pH 6,8	affinité sur colonne de Ni <sup>2+</sup>
<b>Cter</b>	9,5	25 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8	affinité sur colonne d'héparine
<b>His6Cter</b>	9,6	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, 10 mM imidazole, pH 8	affinité sur colonne de Ni <sup>2+</sup>
<b>His6C/EBP-Cter</b>	9,8	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, 10 mM imidazole, pH 8	affinité sur colonne de Ni <sup>2+</sup>
<b>MBP-ExsA</b>	6,4	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8	affinité sur colonne de dextrine sépharose
<b>MBP-Cter</b>	6	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8	affinité sur colonne de dextrine sépharose
<b>ExsD</b>	5,1	20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8,5	échangeuse d'anions et exclusion de taille
<b>ExsAHis6/ExsD;</b> <b>His6 ExsA/ExsD;</b> <b>His6 Nter/ExsD;</b> <b>His6 Cter/ExsD.</b>		20 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8,0	affinité sur colonne de Ni <sup>2+</sup> et exclusion de taille
<b>MBP-ExsA/ExsD</b>		20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4	affinité sur colonne d'amylose et exclusion de taille

Les étapes de lavage et d'élution qui permettent la purification de la protéine d'intérêt et qui dépendent du type de chromatographie sont indiquées dans le tableau VII (débit= 1 ml/min ou 3 ml/min pour les colonnes de 1 ml et 5 ml respectivement).

La chromatographie sur colonne d'exclusion de taille (SEC) est spécifiée après car cette technique a été utilisée pour effectuer d'autres analyses en plus des purifications.



**Tableau VII. Protocoles d'utilisation des différentes colonnes de chromatographie utilisées pour la purification des protéines**  
(Tampon de lyse =TL).

Colonne	Préparation de la matrice	Equilibration	Lavage	Elution
<b>Affinité au Ni<sup>2+</sup></b> (HisTrap <sup>TM</sup> HP 5 ml, GE Healthcare)	50 mM NiSO <sub>4</sub> (5 vol)	TL (5 vol)	TL + 50 mM <b>imidazole</b> (5 vol) puis TL + 100 mM <b>imidazole</b> (5 vol)	TL + 250 mM <b>imidazole</b> (5 vol)
<b>Affinité à la dextrine sépharose</b> (MBPTrap <sup>TM</sup> HP 5 ml, GE Healthcare)		TL (5 vol)	TL (10 vol)	TL + 10 mM <b>maltose</b> (5 vol)
<b>Affinité à l'héparine</b> (Hitrap Heparin <sup>TM</sup> 1 ml, GE Healthcare)		TL (5 vol)		TL puis <b>gradient de NaCl jusqu'à 1M</b> , sur 10 vol
<b>Echangeuse d'anions</b> (Q FF <sup>TM</sup> 5 ml, GE Healthcare)	TL (5 vol) puis TL +1M NaCl (5 vol)	TL (5 vol)	TL (5 vol)	TL puis <b>gradient de NaCl jusqu'à 1M</b> , sur 10 vol

#### IV.8 Chromatographie sur colonne d'exclusion de taille (SEC)

Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont chargées sur une colonne d'exclusion préparative (Superdex<sup>TM</sup> 200 Hiload 16/60, GE Healthcare) ou analytique (Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL, GE Healthcare) préalablement équilibrée dans le tampon d'élution indiqué le Tableau VIII. Les protéines sont éluées par le passage d'1 volume de colonne de tampon à 1 ml/min (préparative) ou 0,4 ml/min (analytique). Cette technique a été utilisée soit pour ajouter une étape de purification, soit pour analyser l'état oligomérique des protéines en solution, observer la formation de complexe (ExsA/ExsD ou ExsA/ADN) et l'effet d'ADN spécifique sur la solubilité ExsA.

**Tableau VIII. Récapitulatif des tampons d'éluion utilisés en fonction des protéines purifiées et de l'analyse par SEC**

Les tampons utilisés pour ajouter une étape de « purification » sont représentés en souligné ; ceux utilisés pour analyser la « formation de complexe » sont représentés en gras et ceux utilisés pour déterminer « l'état oligomérique » en italique.

<b>Protéine</b>	<b>Analyse</b>	<b>Tampon d'éluion</b>
<b>His<sub>6</sub>ExsA</b> <b>/ExsA<sub>His6</sub></b>	<b>Etat oligomérique et formation du complexe ExsA/ADN</b> (protéine:pC=1:2 ; 30 min à 25°C ; volume final de 500µl)	- 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 7,4 - 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, pH 7,4 - 20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % glycérol, pH 8
<b>Nter</b> 1-168His6	<i>Etat oligomérique</i>	- 25 mM tampon Sodium Phosphate, 500 mM NaCl, 10% glycérol, pH 6,8 - 25 mM tampon Sodium Phosphate, 250 mM NaCl, pH 6,8 - 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, pH 7,4
<b>Cter</b>	<i>Etat oligomérique</i>	25 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8
<b>His<sub>6</sub>Cter</b>	<i>Etat oligomérique</i>	- 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, pH 7,4 - 25 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8
<b>His<sub>6</sub>C/EBP-Cter</b>	<i>Etat oligomérique</i>	- 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, pH 7,4 - 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 7,4
<b>MBP-ExsA</b>	<i>Etat oligomérique</i>	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
<b>ExsD</b>	<u>Purification</u> et <i>Etat oligomérique</i>	- 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8,5 - 20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % glycérol, pH 8
<b>ExsA<sub>His6</sub>/ExsD</b> , <b>His<sub>6</sub>ExsA/ExsD</b> .	<u>Purification</u> , <i>Etat oligomérique et formation du complexe ExsA/ADN</i> (protéine:pC=1:2; 30 min à 25°C; volume final de 500µl)	- 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8 - 20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 25 mM NaCl, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % glycérol, pH 8
<b>MBP-ExsA/ExsD</b>	<u>Purification</u>	<u>20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4</u>
<b>ExsA<sub>His6</sub>+ExsD</b>	<b>Formation du complexe</b> (Différents ratio protéiques et temps d'incubation, indiqués dans le chapitre VI)	- 20 mM tampon Sodium Phosphate, 200 mM NaCl, 10 % glycérol, 50 mM imidazole, pH 7 - 20 mM tampon Sodium Phosphate, 500 mM NaCl, 10 % glycérol, 50 mM imidazole, pH 7 - 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8 - 20 mM tampon Sodium Phosphate, 500 mM NaCl, pH 6
<b>Nter</b> <sub>1-168His6</sub> <b>+ExsD</b>	<b>Formation du complexe</b> (Différents ratio protéiques et temps d'incubation, indiqués dans le chapitre VI)	- 20 mM tampon Sodium Phosphate, 200 mM NaCl, 10 % glycérol, 50 mM imidazole, pH 7 - 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 % glycérol, 1mM DTT, pH 8 - 50 mM imidazole, 100 mM NaCl, 10 % glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7 - 50 mM Glycine/NaOH, 200 mM NaCl, pH 9
<b>Cter+ExsD</b>	<b>Formation du complexe</b>	- 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 % glycérol, 1 mM DTT, pH=8 - 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8

#### IV.9 Analyse des protéines surproduites dans le lysat cellulaire total puis dans les fractions solubles et insolubles.

=> **Fraction totale:**  $7,2 \cdot 10^7$  bactéries sont prélevées (150  $\mu$ L pour une  $DO_{600}=0,6$ ) avant induction (non induit) et à la fin (induit) de la surproduction de la protéine d'intérêt dans la culture bactérienne de *E. coli* BL21 Star (DE3). Les bactéries sont centrifugées 10 min à 6000 rpm et chaque culot est repris dans 20  $\mu$ l de tampon 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8. Les échantillons non induit et induit sont déposés et séparés sur gel SDS-PAGE puis colorés au bleu de Coomassie. La quantité de protéine surproduite est établie en fonction de l'intensité de la bande correspondant à la protéine dans l'échantillon induit.

=> **Fraction soluble/insoluble :** après ultracentrifugation du lysat cellulaire, 50 ng de protéines provenant soit de la fraction soluble, soit de la fraction insoluble, sont déposées et séparées sur gel SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie. La quantité des protéines solubles et insolubles est établie en fonction de l'intensité de la bande correspondant à la protéine dans les deux fractions.

#### IV.10 Solubilité de la protéine purifiée

Dans cette étude, une protéine est considérée soluble dans un tampon, lorsqu'elle reste en solution après une centrifugation de 10 min à 14000 rpm à 4°C qui permet de sédimenter les agrégats. Pour déterminer le niveau de solubilité (soluble, peu soluble, très peu soluble), la concentration de protéine qui reste en solution est comparée à la quantité de protéine avant la centrifugation. Ces concentrations sont mesurées par BCA et UV.

Lorsque cette concentration est :

-  $\geq 90\%$  à la concentration initiale mesurée, la protéine est considérée stable en solution (++)

- $\geq 50\%$  à la concentration initiale la protéine est considérée peu stable en solution (+)
- $\leq 50\%$  à la concentration initiale, la protéine est considérée très peu stable (-).

#### IV.11 Retard sur gel

La sonde ADN *pC* a été générée en mélangeant les oligonucléotides biotinylés en 5' *pC* EMSA F et *pC* EMSA R (Tableau III) dans le tampon 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8, à une concentration finale de 1  $\mu$ M. Le mélange réactionnel est chauffé 10 min à 95°C dans un bain marie puis le système de chauffage est éteint. Pour que la température de la réaction diminue lentement, le mélange est laissé toute la nuit.

L'analyse du retard sur gel a été réalisée grâce à un kit Lightshift<sup>®</sup> Chemiluminescent EMSA (PIERCE). 1  $\mu$ l de protéine (ExsA<sub>His6</sub>, His6ExsA, His6Cter, ExsA<sub>His6</sub>/ ExsD, His6ExsA/ExsD, ou ExsD) dans le tampon "ExsA, Cter" (20 mM Tris/HCl 20 mM, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 % Tween 20, pH=7,4) ou dans le tampon "Complexe, ExsD" (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8) est ajoutée au 19  $\mu$ l de mélange réactionnel contenant 0,2 nM de sonde *pC* biotinylée, 10 ng/ $\mu$ l poly(dI.dC) (x 1,250), 20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 10 % glycérol, 0,1 mg/ml BSA, 2 mM EDTA. La réaction est incubée à 25°C pendant 15 min.

Lorsque deux protéines ont été testées en même temps, soit 1  $\mu$ l de chacune a été ajoutée au mélange réactionnel 15 min avant l'ajout de l'ADN spécifique biotinylé, puis la réaction a été incubé 15 minutes supplémentaires à 25°C, soit 1  $\mu$ l d'une des protéines a été préincubée 15 min dans le mélange réactionnel en présence de l'ADN spécifique, puis la deuxième protéine a été ajoutée durant 15 min supplémentaires.

Pour identifier les protéines responsables du retard de la sonde, 2  $\mu$ l d'anticorps ont été ajoutés à la fin de la réaction et l'incubation a été prolongée de 5 min.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 5 % Tris/glycine/EDTA (TGE) natif ; les sondes libres sont séparées des complexes protéines-sonde par électrophorèse en conditions natives par migration à 180 mA pendant 30 min dans du tampon TGE 1X (Tris-Borate-Acétate) froid.

Les protéines et les sondes sont ensuite électrotransférées sur une membrane de nylon (Biodyne<sup>®</sup> B Nylon membrane, PIERCE) en présence de tampon TBE 0,5X. La membrane est ensuite séchée et l'ADN est fixé par exposition aux UV dans un four à hybridation (Biolinker BLX-E254 UV cross-linker - Vilber Lourmat).

La membrane est ensuite bloquée puis incubée en présence de streptavidine couplée à la HRP (Lightshift<sup>®</sup> Chemiluminescent EMSA, PIERCE). La révélation se fait par incubation de la membrane dans un réactif de chimiluminescence puis par exposition sur un film autoradiographique.



# Troisième partie

## Résultats et Discussion





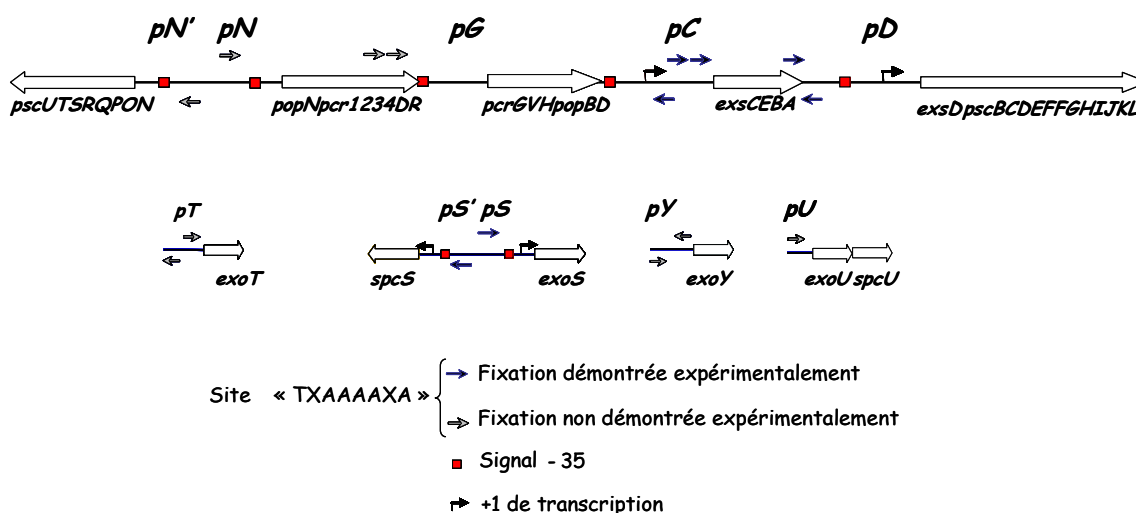
## Chapitre V.

### Etude de la fonctionnalité de ExsA et de ses domaines

ExsA est un régulateur de type AraC/XylS indispensable à la synthèse du SST3 (Dacheux *et al.*, 2001a) qui se compose d'un domaine C-terminal « 2HTH », commun à toutes les protéines de cette famille, et d'un domaine N-terminal dont le rôle reste à définir.

En 1995, la fixation de la protéine de fusion MBP-ExsA a été démontrée *in vitro* sur les promoteurs *pC*, *pD* et *pS*. Cette étude a mis en évidence une séquence consensus de fixation à l'ADN de ExsA, « TXAAAAXA », qui est présente en nombre et orientation variables sur les différents promoteurs du SST3 (Hovey and Frank, 1995) (Figure 31). Nous verrons que cette séquence a été revue bien plus tard, en 2008 (Brutinel *et al.*, 2008). Selon les auteurs, l'absence de séquence palindromique et de sites consensus répétés indiquait qu'un monomère de ExsA se fixait sur chacun des promoteurs (Hovey and Frank, 1995). Cependant, il existe toujours au moins deux sites positionnés en amont du signal -35 prédit, sauf pour les promoteurs *pC* et *pU* (Figure 31) : le promoteur *pC* possède trois sites qui ont la particularité d'être situés en aval du +1 de transcription et le promoteur *pU* possède un site unique en amont des gènes codant pour ExoU et sa chaperonne SpcU.

Quand j'ai débuté ma thèse, rien d'autre n'était connu concernant les rôles des deux domaines de ExsA et son mécanisme d'activation de la transcription (Brutinel *et al.*, 2009; Brutinel *et al.*, 2008). La présence de plusieurs sites d'orientations variables laissait présager un mécanisme plus complexe que la fixation d'un monomère. De plus, l'homologue de ExsA chez *Yersinia* spp, VirF, a été proposé être une protéine dimérique (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992).



**Figure 31. Les promoteurs du SST3 régulés par ExsA.**

Les opérons du « locus de type III » et les gènes codant pour les toxines et leurs chaperonnes sont représentés par des flèches blanches et les promoteurs sont indiqués en italique en amont de chaque opéron. Les +1 de transcription indiqués ont été déterminés par extension d’amorce. Les signaux -35 ont été identifiés par homologie de séquence et en fonction de leur distance par rapport au + 1 de transcription. (Yahr, 2006; Hovey and Frank, 1995; Yahr *et al.*, 1995; Yahr and Frank, 1994).

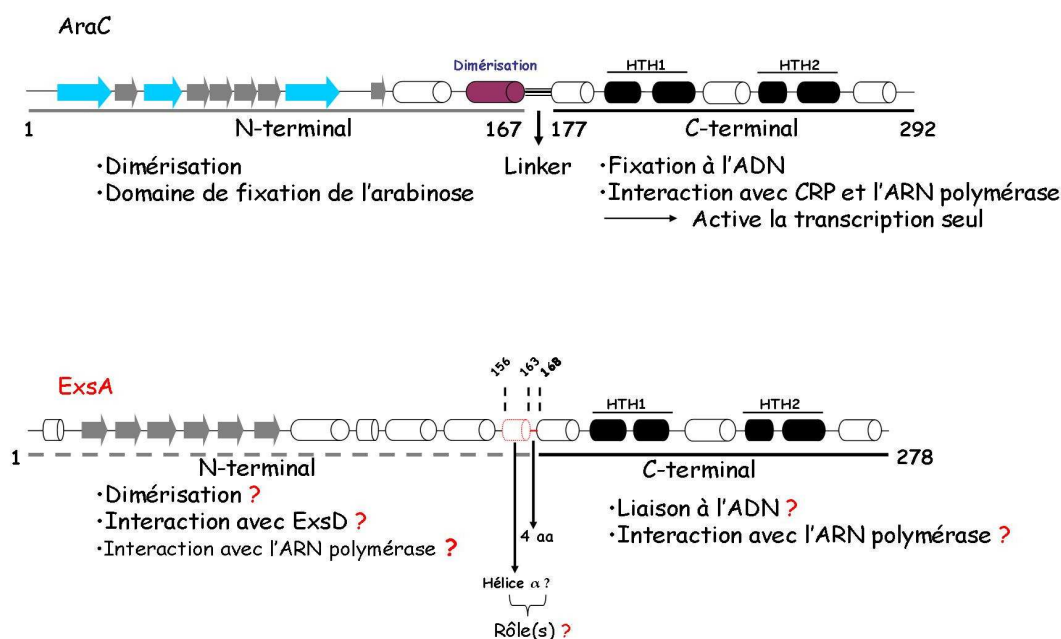
Dans cette partie de ma thèse, nous avons entrepris de caractériser le rôle des deux domaines dans l’activité transcriptionnelle de ExsA à travers des approches *in vivo* et *in vitro*.

En parallèle, une approche structurale a été menée afin de déterminer la structure du domaine N-terminal de ExsA. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l’équipe de Jean-Pierre Simorre dans le Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire (LRMN) de l’Institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble.

## I. Découpage de ExsA en domaines fonctionnels.

Avant de commencer l’étude des domaines, nous devons clairement les définir au sein de la séquence protéique de ExsA. Pour effectuer ce découpage, nous avons comparé la structure secondaire prédite de ExsA (278 acides aminés)

avec celle résolue (PDB ID: [2K9S](#) ; [2ARC](#)) de la protéine paradigme AraC (292 acides aminés) (Figure 32).



**Figure 32. Identification des domaines de ExsA et hypothèses sur leurs fonctionnalités d'après la structure et les fonctions connues des domaines de la protéine paradigme AraC.**

Les hélices  $\alpha$  sont représentées par des cylindres. Les cylindres noirs spécifient les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  du motif « HTH1 » et  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  du motif « HTH2 ». Le cylindre violet indique l'hélice de dimérisation de AraC. Les brins  $\beta$  sont indiqués par des flèches. Les flèches bleues dans la séquence de AraC spécifient les brins  $\beta$  qui forment la poche de fixation de l'arabinose. Les régions non structurées sont représentées par des lignes. Les frontières des domaines sont représentées par des traits en dessous de la séquence avec les résidus numérotés.

Il est à noter que nous avons modifié sur cette figure le premier résidu de la première hélice  $\alpha$  du domaine C-terminal par rapport à la prédiction effectuée avec le logiciel PSIPRED. En effet, les structures tridimensionnelles de MarA et du domaine C-terminal de AraC ont montré que cette hélice débute deux résidus après celui prédit (pour AraC : en position 177 au lieu de 175 et pour ExsA : en position 168 au lieu de 166) (Rodgers and Schleif, 2009; Rhee *et al.*, 1998). La composition en hélice  $\alpha$  et brin  $\beta$  du domaine C-terminal de AraC a aussi été modifiée d'après la structure de ce domaine (Soisson *et al.*, 1997a; Soisson *et al.*, 1997b).

Nous avons tout d'abord déterminé les limites du **domaine C-terminal (C-ter)** « 2HTH » commun à toutes les protéines de type A/X, car il était facilement identifiable au sein de la structure secondaire de ExsA : il s'agit des 7 hélices  $\alpha$  situées à l'extrémité C-terminale (C-ter= 168-278). Ce domaine serait le domaine de fixation à l'ADN et d'interaction avec l'ARN polymérase.

L'identification du domaine N-terminal (N-ter) s'est révélée plus difficile car : i) il n'existe pas d'homologie de séquence ou de structure secondaire entre les domaines N-ter des protéines de type A/X et ii) nous n'avons pas clairement identifié de région linker (logiciels de prédiction Dom-Cut et DLP-SVM).

La protéine AraC possède un linker de 10 aa non structuré, en amont de la première hélice  $\alpha$  du domaine C-ter, qui joue le rôle de lien flexible entre les deux domaines (Eustance and Schleif, 1996) (Figure 32). Dans la séquence de ExsA, la région en amont du domaine C-ter se compose de 4 aa non structurés et d'une **hélice  $\alpha$**  (156-163) prédite avec un **faible indice de probabilité** par le logiciel PSIPRED (Figure 32).

Il est possible que cette région 156-163 dans la séquence de ExsA:

- ⇒ ne soit pas structurée en réalité et qu'elle joue le rôle de linker,
- ⇒ soit structurée en hélice  $\alpha$  et qu'elle joue le rôle de linker **ou** qu'elle fasse partie intégrante du domaine N-ter.

Dans un premier temps, nous avons donc défini le domaine **N-ter** depuis le premier résidu de la protéine jusqu'au résidu 163 (**Nter= 1-163**) et le rôle exact de la région 156-163 dans l'activité de ExsA a été étudié par une approche fonctionnelle (Figure 31).

Le **domaine N-ter** serait impliqué dans la dimérisation/oligomérisation potentielle de ExsA ainsi que dans l'interaction avec son ligand protéique ExsD. Nous pouvons aussi envisager que le domaine N-ter soit impliqué dans l'interaction avec l'ARN polymérase, si le domaine C-ter seul n'est pas suffisant pour activer la transcription.

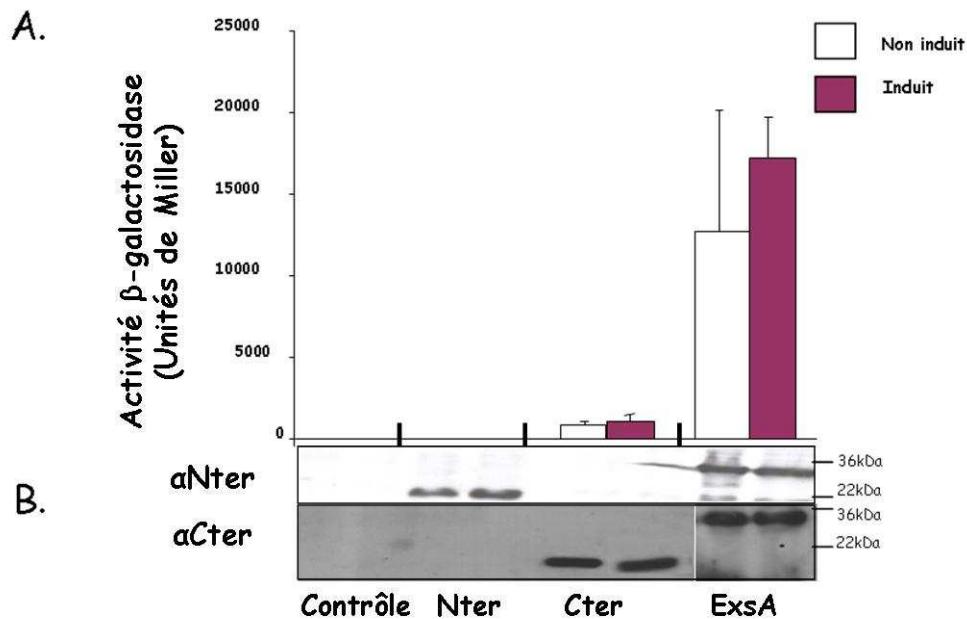
## II. Etude de la fonctionnalité de ExsA et de ses domaines par une approche *in vivo*

### II.1 Surproduction de ExsA et de ses domaines dans le mutant $\Delta exsA$ .

Afin de déterminer le rôle des domaines N- et C- terminaux dans l'activité de ExsA, nous avons évalué leur activité transcriptionnelle sur un promoteur régulé par ExsA en les surproduisant dans la souche de *P. aeruginosa*  $\Delta exsA$ .

Pour cela, les séquences codant pour la protéine entière (ExsA), le N-ter et le C-ter ont été clonées dans des vecteurs d'expression qui permettent leur surexpression sous le contrôle du promoteur *pC* (promoteur de l'opéron de régulation *exsCEBA*) ExsA-dépendant (plasmide *pIApC+*). Ces différents plasmides de surproduction ont ensuite été transformés dans la souche  $\Delta exsA$  dans laquelle une fusion transcriptionnelle entre un promoteur régulé par ExsA, *pG* (promoteur de l'opéron de translocation *pcrGVHpopBD*), et le gène rapporteur *lacZ* a été insérée dans le chromosome (souche  $\Delta exsA$  *pG-lacZ*).

L'activité transcriptionnelle de chacun des domaines et de la protéine entière a été déterminée par mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase et la présence des protéines surproduites a été confirmée par Western-Blot. Ces activités ont été mesurées en conditions non induites et induites du SST3 par ajout ou déplétion en calcium du milieu de culture respectivement (Figure 33).



**Figure 33. Activité transcriptionnelle des protéines Nter, Cter et ExsA, surproduites dans la souche  $\Delta$ exsA *pG-lacZ*.**

**A.** Les protéines Nter<sub>1-168</sub>, Cter<sub>166-278</sub> et ExsA, ont été surproduites à partir des plasmides pIApC<sup>+</sup>-Nter<sub>1-168</sub>, pIApC<sup>+</sup>-Cter<sub>166-278</sub> et pIApC<sup>+</sup>-ExsA. La souche contrôle a été transformée avec le plasmide pIApC<sup>+</sup>. L'activité  $\beta$ -galactosidase a été dosée et reportée en Unités Miller. Les écarts-types ont été mesurés à partir de 3 clones différents pour chaque souche et dans trois expériences différentes.

**B.** Les extraits cytosoliques de chacune des souches indiquées ont migré sur gel de polyacrylamide puis ont été transférés sur membrane de nitrocellulose. Les protéines Nter<sub>1-168</sub>, Cter<sub>1-166</sub> et ExsA ont été immunodétectées avec des anticorps dirigés soit contre le domaine N-ter ( $\alpha$ Nter) soit contre le domaine C-ter ( $\alpha$ Cter) de ExsA. Les poids moléculaires des protéiques standards sont indiqués.

Aucune activité transcriptionnelle n'est mesurée dans la souche contrôle  $\Delta$ exsA *pG-lacZ* en conditions non induite et induite; ceci s'explique par l'absence de protéine ExsA et confirme l'activation ExsA-dépendante du promoteur *pG* (Figure 33 A et B).

Lorsque la protéine ExsA est surproduite, l'activité mesurée est comprise entre 13000 et 18000 Unités Miller en conditions non induite et induite (Figure 33.A). Cette activité est beaucoup plus élevée que celle mesurée dans la souche sauvage induite (voir la Figure 35.A) car la quantité de protéine ExsA produite est beaucoup plus importante que celle de la protéine endogène. La surproduction de ExsA entraîne donc une suractivation du système et cette activité est indépendante de l'induction du SST3.

Comme attendu, aucune activité transcriptionnelle n'est mesurée lorsque le domaine N-ter seul est surproduit (Figure 33.A), alors que la surproduction de la protéine N-ter a bien été confirmée par Western Blot (Figure 33.B,  $\alpha$ Nter).

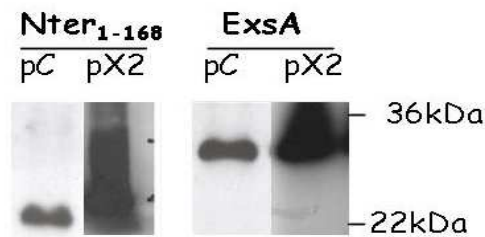
*Remarque : cette protéine Nter<sub>1-168</sub> est présente alors que sa synthèse est sous le contrôle d'un promoteur ExsA-dépendant. Cette synthèse résulte donc de l'activité basale du promoteur pC porté par un plasmide présent en 10 à 12 copies dans la cellule.*

L'activité  $\beta$ -galactosidase observée en présence du domaine C-ter surproduit est en moyenne de 1200 Unités Miller dans les deux conditions (Figure 33.A). Cette activité est 10 fois plus faible que celle observée lorsque la protéine entière est surproduite. Cette différence n'est pas due à une quantité inférieure de protéine C-ter car le Western Blot indique qu'elle est surproduite en quantité qui semble équivalente à celle de la protéine ExsA (Figure 33. B). Le domaine C-ter de ExsA est donc bien le domaine d'activation transcriptionnelle de ExsA mais il semble moins actif que la protéine entière. Ce résultat suggère que le domaine C-ter se fixe sur la séquence cible et/ou interagit avec l'ARN polymérase avec moins d'affinité que la protéine entière. Le domaine N-ter de ExsA serait donc nécessaire à l'un, ou ces deux processus.

L'activité transcriptionnelle des deux domaines et de ExsA surproduits a aussi été mesurée sur un autre promoteur du SST3, le promoteur pC, en utilisant la souche  $\Delta$ exsA pC-lacZ. Les résultats obtenus sont similaires à ceux décrits pour la souche  $\Delta$ exsA pG-lacZ.

Nous avons également réalisé la même expérience en surexprimant les gènes non plus sous le contrôle d'un promoteur ExsA-dépendant mais sous celui d'un promoteur ExsA-indépendant et constitutif: pX2. Cependant, dans ces conditions, la surproduction de ExsA ou de son domaine C-ter a engendré des problèmes de croissance que nous avons déjà remarqués avec pC, mais encore plus marqués.

Pour comprendre l'origine de ces effets sur la croissance, nous avons comparé la quantité de protéines surproduites lorsque l'expression des gènes est sous le contrôle des promoteurs *pC* ou *pX2* (Figure 34)



**Figure 34. Comparaison de la quantité de protéines Nter et ExsA surexprimées sous le contrôle des promoteurs *pC* et *pX2*.**

Les mêmes quantités d'extraits cytosoliques provenant des souches CHA *pG-lacZ* contenant les plasmides *pIApC<sup>+</sup>-ExsA*, *pIApC<sup>+</sup>-Nter*, *pIApX2-ExsA* ou *pIApX2-Nter*, ont migré sur gel de polyacrylamide puis ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été révélées par immunodétection avec des anticorps  $\alpha$ Nter.

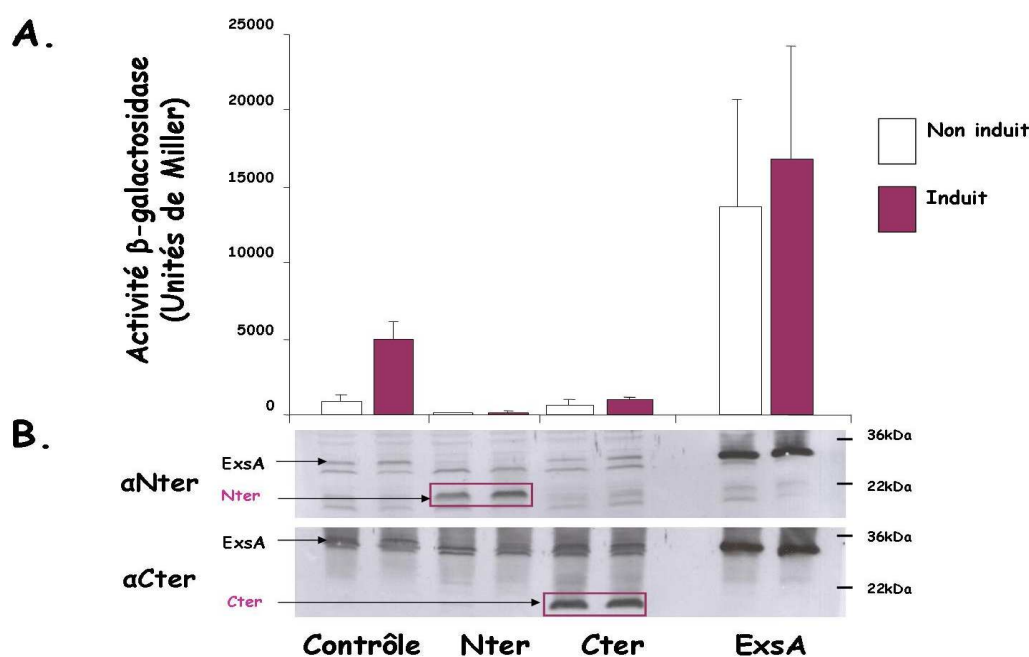
La Figure 34 montre clairement que la quantité de protéine surproduite lorsque l'expression des gènes est sous le contrôle du promoteur *pX2* est environ **5 fois plus élevée** que sous le contrôle du promoteur *pC*. Ceci nous indique que la grande quantité des protéines ExsA et C-ter surproduites a un effet délétère sur la croissance. Ce phénomène a été observé pour d'autres facteurs de transcription de type A/X tel SoxS (Shah and Wolf, 2004). A des concentrations intracellulaires élevées, ce facteur de transcription serait capable de se fixer sur des sites aspécifiques et cette fixation abusive interférerait dans des processus vitaux pouvant induire la mort de la cellule. Ceci est un autre argument tendant à montrer que le C-ter est bien capable de se fixer sur l'ADN.

Nous avons obtenu les mêmes valeurs d'activité  $\beta$ -galactosidase que les gènes soient surexprimés sous le contrôle de *pX2* ou de *pC* (non montrés). Nous pouvons donc envisager que la quantité de protéine surproduite, ExsA ou Cter, sous le contrôle de *pC* est suffisante pour saturer tous les sites de fixation.



## II.2 Surproduction de ExsA et de ses domaines dans la souche sauvage CHA

L'objectif de cette seconde expérience était de déterminer l'effet de la surproduction de ExsA et des domaines sur l'activité transcriptionnelle de la protéine ExsA endogène, c'est-à-dire dans la souche sauvage CHA. En effet, ce type d'expérience peut permettre de mettre en évidence des interférences entre la protéine sauvage et ses domaines surproduits. Pour cela, ExsA et ses deux domaines ont été surproduits (sous le contrôle du promoteur *pC*) dans la souche sauvage CHA *pG-lacZ*. De manière similaire à l'expérience précédente, l'activité transcriptionnelle a été déterminée par mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase et la présence des protéines surproduites a été confirmée par Western-Blot (Figure 35).



**Figure 35. Activité transcriptionnelle des protéines Nter, Cter et ExsA, surproduites dans la souche CHA *pG-lacZ*.**

**A.** Les protéines Nter<sub>1-168</sub>, Cter<sub>166-278</sub> et ExsA, ont été surproduites à partir des plasmides *pIApC<sup>+</sup>-Nter<sub>1-168</sub>*, *pIApC<sup>+</sup>-Cter<sub>166-278</sub>* et *pIApC<sup>+</sup>-ExsA*. La souche contrôle a été transformée avec le plasmide *pIApC<sup>+</sup>*. L'activité  $\beta$ -galactosidase a été dosée et reportée en Unités Miller. Les écarts-types ont été mesurés à partir de 3 clones différents pour chaque souche et dans trois expériences différentes. **B.** Pour plus de clarté, les bandes correspondantes aux protéines surproduites sont indiquées par des flèches et encadrées dans le cas des domaines.

L'activité du promoteur *pG* mesurée dans la souche sauvage est de 900 Unités Miller en conditions non induite et de 5000 Unités Miller en conditions induites du SST3 (Figure 35.A). L'activité transcriptionnelle de *pG* est donc augmentée d'un facteur 5 suite à l'induction du SST3.

Lors de la surproduction de la protéine entière, l'activité transcriptionnelle mesurée est la même en condition induite et en condition non induite (Figure 35.A). Les valeurs d'activité  $\beta$ -galactosidase (14000 et 17000 Unités Miller) sont similaires à celle mesurée lorsque ExsA est surproduite dans la souche  $\Delta$ *exsA pG-lacZ* ; il s'agit du même phénomène de **suractivation** (Figure 35).

Lorsque le domaine N-ter de ExsA est surproduit dans la souche sauvage, l'activité  $\beta$ -galactosidase mesurée est très faible (200 Unités Miller) en conditions induite et non induite (Figure 35.A), ce qui s'explique au niveau protéique par l'absence de la protéine ExsA endogène (Figure 35.B). Le domaine N-ter semble donc agir négativement sur ExsA et inhiber son activité ; ExsA régulant positivement sa propre expression, ceci expliquerait l'absence de la protéine. Des résultats similaires ont été obtenus quand les gènes codant pour les protéines ExsA et N-ter sont surexprimés sous le contrôle de *pC* dans la souche CHA *pC-lacZ* (non montré), indiquant que l'effet observé ne dépend pas du promoteur utilisé.

Ce résultat nous a surpris car nous nous attendions au résultat inverse : l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de ExsA. En effet, comme le domaine N-ter est supposé interagir avec l'inhibiteur ExsD, nous pensions que sa surproduction entrainerait la titration de ExsD.

Cette perte d'activité induite par la surproduction du domaine N-ter ressemble à un « effet dominant négatif ». Ce phénomène est classiquement observé chez les facteurs de transcription dimériques : la surproduction du domaine de dimérisation entraîne la formation *in vivo* d'hétérodimères entre la protéine endogène et le domaine surproduit, hétérodimères incapables d'activer la transcription. Ce phénomène impliquerait que ExsA active la transcription sous

forme dimérique et, que cette dimérisation s'effectue à travers le domaine N-ter. Cet effet dominant négatif peut aussi être observé pour des facteurs de transcription monomériques qui activent la transcription en « pré-recrutant » l'ARN polymérase (voir le chapitre III: Les régulateurs de type AraC/XylS). Dans cette seconde hypothèse, le domaine N-ter de ExsA interagirait avec l'ARN polymérase et sa surproduction entrainerait la titration de l'ARN polymérase; en absence d'ARN polymérase disponible, la protéine ExsA endogène ne serait alors plus capable d'activer la transcription du promoteur *pG*. Cependant, cette seconde hypothèse est peu probable car ce mécanisme d'activation de la transcription n'est utilisé que par des facteurs de transcription présents en quantité très faible dans la cellule et qui se fixent sur des séquences dégénérées présentes en très grand nombre dans le génome bactérien.

Concernant le domaine C-ter, sa surproduction en présence de la protéine ExsA endogène en condition induite du SST3 entraine une diminution de l'activité transcriptionnelle d'un facteur 5 par rapport à l'activité mesurée dans la souche sauvage où seule la protéine ExsA endogène est produite (Figure 35.A). Nous n'observons plus d'augmentation significative de l'activité transcriptionnelle de ExsA en conditions induites. Cette diminution de l'activité transcriptionnelle pourrait s'expliquer par une **compétition** entre la protéine ExsA endogène et le domaine C-ter surproduit, présent à une concentration au moins 5 fois plus élevée, pour la fixation sur les sites du promoteur *pG* (Figure 35.B). Néanmoins, la fixation du domaine C-ter sur le promoteur *pG* à la place de ExsA endogène entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle, ce qui indiquerait que ce domaine surproduit est **moins actif** que la protéine entière. Le domaine N-ter de ExsA serait donc nécessaire à la pleine activité transcriptionnelle de la protéine.

Notons que l'analyse du Western Blot montre que la protéine ExsA endogène semble présente à des quantités équivalentes dans la souche sauvage et dans la souche surproduisant le domaine C-ter (Figure 35.B). Pourtant, la

diminution de l'activité transcriptionnelle devrait se traduire au niveau protéique par une diminution de la quantité de protéine ExsA endogène puisque le facteur de transcription s'autorégule positivement. De plus, l'effet négatif du C-ter a également été observé dans la souche CHA *pC-lacZ* sur le promoteur de l'opéron *exsCEBA* (non montré), ce qui doit conduire à une diminution de la synthèse de ExsA. Il est donc possible que l'immunodétection des protéines ne soit pas suffisamment quantitative pour observer les faibles différences de quantité de protéine mises en jeu (Figure 35.B).

Comme pour l'expérience réalisée dans le mutant  $\Delta$ ExsA, les gènes ont été surexprimés sous le contrôle du promoteur constitutif *pX2* dans les souches CHA *pG-lacZ* et CHA *pC-lacZ*; les mêmes effets que ceux rapportés ci-dessus ont été observés. De plus, les surexpressions des gènes codant pour le domaine C-ter et pour ExsA sous le contrôle de ce promoteur *pX2* ont engendré les mêmes problèmes de croissance décrits précédemment.

L'ensemble de ces résultats suggère que le domaine N-ter de ExsA est impliqué dans la dimérisation de ExsA car il induit un effet dominant négatif sur ExsA endogène lorsqu'il est surproduit.

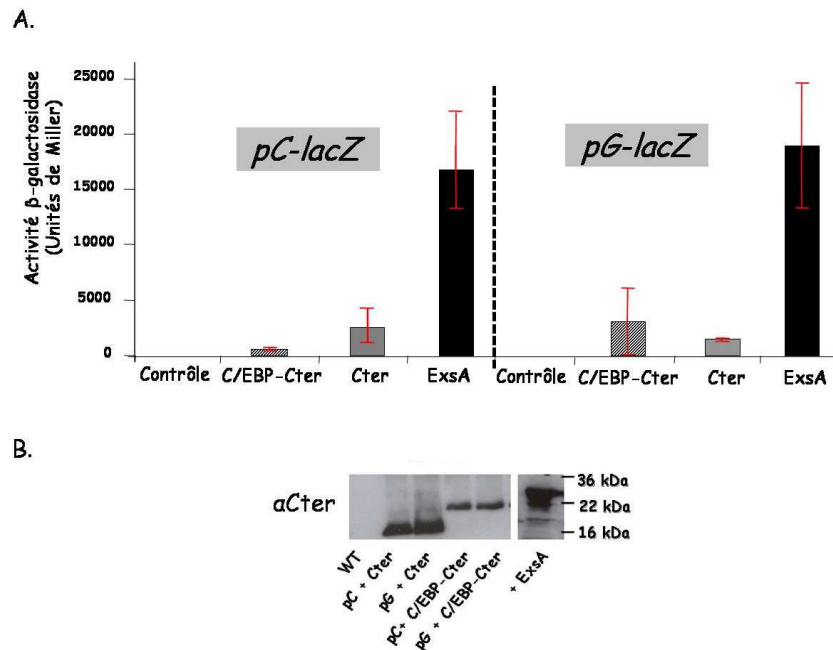
Le domaine C-ter de ExsA serait capable de se fixer à l'ADN lorsqu'il est surproduit mais sans restaurer l'activité transcriptionnelle sauvage.

Nous pouvons donc envisager que la dimérisation de la protéine ExsA à travers son domaine N-ter est nécessaire à la pleine activité transcriptionnelle du facteur de transcription. Le domaine N-ter serait donc impliqué dans la fixation à l'ADN du Cter et probablement dans l'interaction avec l'ARN polymérase.

### II.3 Effet de la dimérisation artificielle du domaine C-terminal sur son activité

Il semblerait que l'activation de la transcription nécessite la dimérisation de ExsA à travers son domaine N-ter. Nous avons donc voulu déterminer si une dimérisation artificielle du C-ter était suffisante pour lui conférer une activité transcriptionnelle identique à celle de la protéine entière (comme cela a été observé pour AraC) ou si le domaine N-ter possède des composants nécessaires à l'interaction avec l'ARN polymérase (comme observé pour ToxT) (Voir Chapitre III: Les régulateurs de type AraC/XylS).

Pour cela, la séquence codant pour le domaine « leucine-zipper » de la protéine C/EBP (Voir Chapitre III: Les régulateurs de type AraC/XylS) a été fusionnée par SOE-PCR en amont de la séquence codant pour le domaine C-ter . Cette fusion a ensuite été clonée dans les vecteurs pIAPC<sup>+</sup> et pIAPX2, ce qui a permis de surproduire la protéine de fusion C/EBP-Cter sous le contrôle de ces deux promoteurs. L'effet de cette dimérisation sur l'activité du domaine C-ter a été analysée en comparant les activités transcriptionnelles des protéines ExsA, Cter et C/EBP-Cter dans les souches  $\Delta exsA$  pG-lacZ et  $\Delta exsA$  pC-lacZ en condition induite du SST3 (Figure 36).



**Figure 36. Activité transcriptionnelle des protéines C/EBP-Cter, Cter et ExsA, surproduites dans les souches  $\Delta exsA$  *pC-lacZ* et  $\Delta exsA$  *pG-lacZ***

**A.** Les protéines C/EBP-Cter, Cter et ExsA, surproduites à partir des plasmides pIApC<sup>+</sup>-C/EBP-Cter, pIApC<sup>+</sup>-Cter et pIApC<sup>+</sup>-ExsA, sont indiquées en dessous des histogrammes correspondants. La souche contrôle a été transformée avec le plasmide pIApC<sup>+</sup>. Les protéines ont été surproduites soit dans  $\Delta ExsA$  *pC-lacZ*, soit dans  $\Delta ExsA$  *pG-lacZ*, comme indiqué. Les écarts-types ont été calculés à partir de 3 clones différents pour chaque souche et l'expérience a été répétée 3 fois. **B.** Les extraits cytosoliques de chacune des souches ont été séparés sur gel de polyacrylamide puis transférés sur membranes de nitrocellulose. Les protéines C/EBP-Cter, Cter et ExsA ont été immunodétectées avec des anticorps dirigés contre le domaine C-ter ( $\alpha$ Cter) de ExsA. Les promoteurs fusionnés au gène rapporteur et les protéines surproduites sont indiqués en dessous des pistes correspondantes. Les poids moléculaires des protéines standard sont indiqués à droite du Western Blot en kDa.

Nous observons sur la Figure 36.A que les protéines C/EBP-Cter et Cter possèdent une activité transcriptionnelle qui représente au maximum 20% de l'activité de ExsA surproduit, et ceci sur les promoteurs *pC* et *pG*.

L'immunodétection des protéines montre que la protéine C/EBP-Cter (20 kDa) est présente en quantité plus faible que les protéines Cter<sub>166-278</sub> (13 kDa) et ExsA (31 kDa) (Figure 36.B) : il est possible que cette protéine de fusion soit moins stable.

Sur cette figure, les écart-type calculés sont représentés en rouge afin de mettre en évidence leurs valeurs très importantes. J'ai en effet rencontré une grande hétérogénéité dans les mesures que j'ai effectuées.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec les gènes sous contrôle de *pX2* mais étant donné les problèmes de croissance rencontrés, nous n'avons pas pu conclure à propos des activités mesurées. La protéine C/EBP C-ter surproduite engendre des défauts de croissance similaires à ceux observés lors de la surproduction des protéines C-ter et ExsA: ceci nous indique que cette protéine de fusion serait bien capable de se fixer à l'ADN.

Etant donné les problèmes de croissance de ces souches, l'hétérogénéité des mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase et le fait que la protéine C/EBP-Cter est moins exprimée que le C-ter ou ExsA, il n'est pas possible de définir clairement l'activité transcriptionnelle de la protéine de fusion. Ne pouvant pas conclure sur la nécessité de cette dimérisation dans l'activité transcriptionnelle de ExsA, nous essaierons de vérifier *in vitro* la dimérisation de la protéine **C/EBP-Cter** et de comparer ses propriétés de fixation à l'ADN à celles de la protéine Cter. Malheureusement, les résultats obtenus, traités dans la partie III.2.4 de ce chapitre, n'ont pas été concluants.

#### **II.4 Identification de la région du domaine N-terminal impliquée dans l'effet dominant négatif**

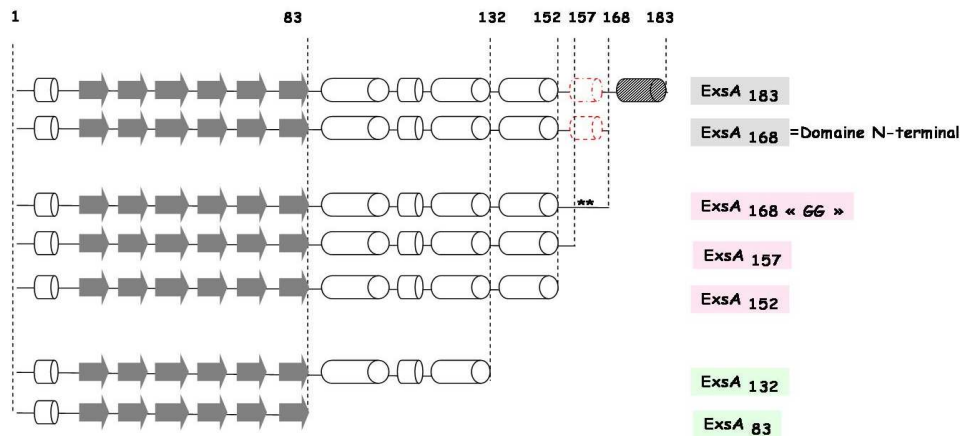
Nous avons observé que la surproduction du domaine N-ter a un effet dominant négatif sur l'activité de la protéine ExsA endogène, ce qui suggère que ce domaine est impliqué dans la dimérisation de ExsA (Figure 36). Afin de définir la région du domaine N-ter responsable de cet effet, nous avons généré par mutagenèse dirigée différentes protéines possédant les caractéristiques suivantes (Figure 37) :

⇒ **ExsA 183** : correspond au domaine N-ter prédit de ExsA additionné de la première hélice  $\alpha$  du domaine C-ter ( $\alpha 1$ )

⇒ La dernière hélice  $\alpha$ , prédite avec un faible indice de confiance et pouvant jouer le rôle de linker, a été soit enlevée (**ExsA 152**), soit tronquée (**ExsA 157**), soit mutée (**ExsA 168 « GG »**). Pour ExsA 168 « GG », les leucines

en position 158 et 162 ont été substituées par des glycines (« **GMSVGRQLSNR** ») afin d'obtenir une région potentiellement non structurée.

⇒ les deux dernières hélices  $\alpha$  ont été coupées (**ExsA 132**) ou seule la sous-partie du domaine N-ter qui ne contient que des brins  $\beta$  a été conservée (**ExsA 83**).



**Figure 37. Structures secondaires du domaine N-terminal de ExsA et des différentes protéines mutées correspondantes.**

La structure secondaire a été prédite par le logiciel PSIPRED. Les brins  $\beta$  sont représentés par des flèches. Les hélices  $\alpha$  prédites du domaine N-ter sont représentées par des cylindres blancs, la dernière hélice du domaine N-ter, prédite avec un faible indice de confiance, est représentée en pointillés rouges. La première hélice  $\alpha$  du domaine C-ter est hachurée. Les deux étoiles indiquent la position des mutations par substitutions des leucines 158 et 162 en glycine.

L'effet sur l'activité transcriptionnelle de la protéine ExsA endogène de chacune des protéines surproduites a ensuite été analysé en conditions induites du SST3 dans la souche CHA *pG-lacZ* (Figure 38). En parallèle, leur présence a été confirmée par immunoblot (Figure 38).

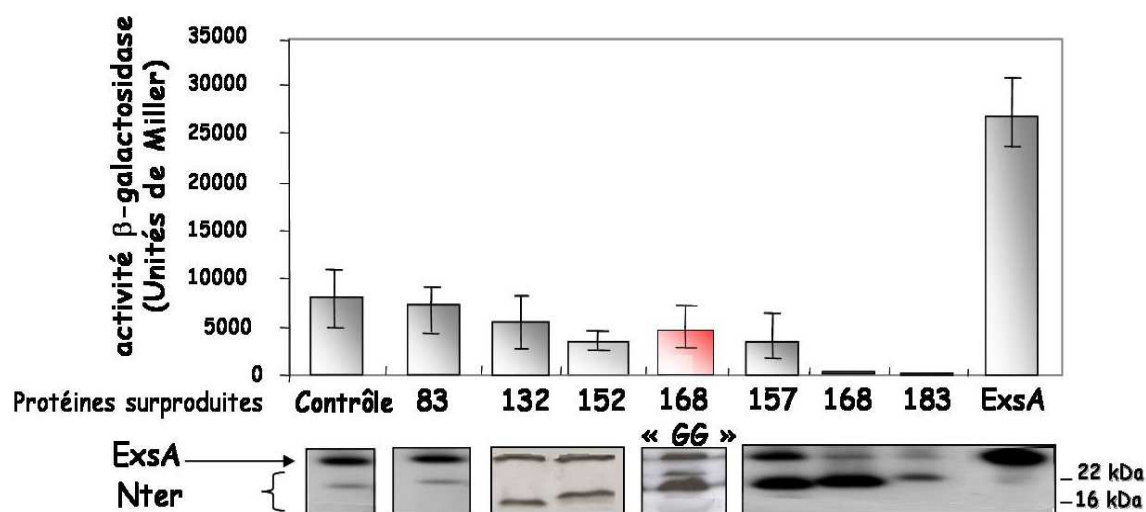
Dans la souche contrôle, l'activité sauvage du promoteur *pG* mesurée en condition induite du SST3 est de 7500 Unités Miller. Cette activité est multipliée par un facteur 4 lorsque la protéine ExsA entière est surproduite (Figure 38).

Le domaine N-ter (ExsA 168) induit un effet dominant négatif sur l'activité de la protéine ExsA endogène comme nous l'avions précédemment observé (Figure 38). Cet effet est également observé lorsque la protéine ExsA 183, plus longue, est surproduite. Dans les deux cas, la protéine ExsA endogène est absente



(Figure 38). Comme l'indique le Western-Blot, la protéine ExsA 183 est moins produite que la protéine ExsA 168; ceci pourrait s'expliquer par un défaut de stabilité de cette protéine qui contient une hélice  $\alpha$  du domaine C-ter (Figure 38).

Nous observons ensuite que toutes les autres protéines surproduites, ExsA 157, 168 « GG », 152 et 132 n'induisent plus d'effet dominant négatif, alors qu'elles sont toutes produites (Figure 38). Notons toutefois que l'activité du promoteur *pG* est un peu plus faible dans ces souches que celle mesurée dans la souche Contrôle. Seule la protéine ExsA 83 n'est pas détectée : soit elle est instable, soit elle ne possède pas d'épitope reconnu par les anticorps.



**Figure 38. Effets des mutations du domaine N-terminal sur l'activité de la protéine ExsA endogène dans la souche CHA *pG-lacZ*.**

Les construits codant pour les protéines ExsA 183, 168, 168 GG, 157, 152, 132 et 83 ont été surexprimées sous le contrôle du promoteur constitutif *pC*<sup>+</sup>. Le contrôle correspond à la souche CHA *pG-lacZ* transformée avec le plasmide *pIApC*<sup>+</sup>. Les protéines surproduites et la protéine ExsA endogène ont été immunodétectées dans le cytosol avec les anticorps  $\alpha$ Nter. Les écarts-types ont été mesurés à partir de 3 clones différents pour chaque souche et l'expérience a été répétée 3 fois.

La perte de structure secondaire en hélice  $\alpha$  de la région de 156-163 entraîne la levée de l'effet dominant négatif (Figure 38). Bien que prédite avec un faible indice de confiance, il est très probable qu'il s'agisse bien d'une hélice  $\alpha$ , car les mutations qui l'affectent modifient l'effet du domaine N-ter sur la protéine ExsA. Cette hélice  $\alpha$  156-163 en amont du domaine C-ter est indispensable à l'effet

dominant négatif induit par la surproduction du domaine N-ter de ExsA dans la souche sauvage. Dans l'hypothèse où cet effet est dû à la formation d'hétérodimères inactifs, cette l'hélice  $\alpha$  serait donc essentielle à la formation de cet hétérodimère et serait probablement impliquée dans la dimérisation de la protéine.

Les écarts-types indiqués sur la Figure 38 montrent cette fois-ci encore l'hétérogénéité des activités  $\beta$ -galactosidase mesurées. Par exemple, les activités  $\beta$ -galactosidase mesurées à partir de trois clones provenant de la souche contrôle CHA *pG-lacZ* (pIApC<sup>+</sup>), dans laquelle aucune protéine n'est surproduite, sont de 5200, 7000 ou 10300 Unités Miller ( $\Delta \approx 2$ ). Ceci nous suggère que l'hétérogénéité des mesures ne peut pas être attribuée à l'instabilité ou à la quantité des protéines surproduites dans les différents clones, bien que le phénomène semble plus marqué dans les souches surproduisant les protéines ExsA ou ses domaines. En effet, à partir de trois clones de la souche CHA *pG-lacZ* (pIApC<sup>+</sup> ExsA<sub>132</sub>), nous avons mesuré trois activités différentes de 1800, 4200 ou 8500 Unités Miller ( $\Delta \approx 4,7$ ).

Nous avons donc souhaité comprendre ce phénomène qui a rendu difficile l'exploitation de nos résultats.

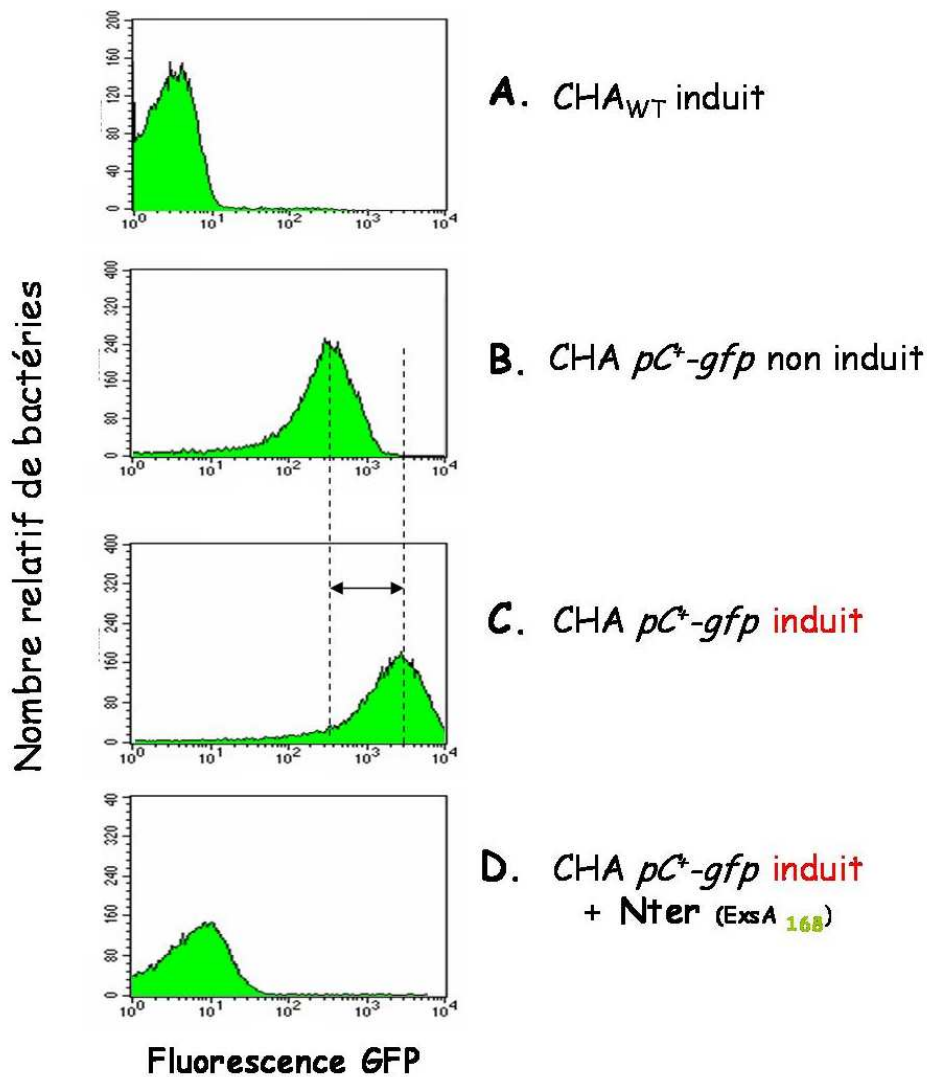
## II.5 Analyse l'activité transcriptionnelle de ExsA par cytométrie en flux (FACS).

Nous nous sommes demandé si l'hétérogénéité de nos résultats était due au fait que l'activité des promoteurs *pC* (ou *pG*) n'était pas induite de manière homogène dans l'ensemble de la population bactérienne. En effet, il a été montré lors de l'analyse par FACS de l'activité transcriptionnelle d'un autre promoteur régulé par ExsA, *pS* fusionné à la *gfp*, qu'il existe deux sous-populations bactériennes en condition induite du SST3 : une qui répond à l'induction et l'autre pas (Urbanowski *et al.*, 2007; Rietsch and Mekalanos, 2006). Ce phénomène, appelé « bistabilité », dépend de fluctuations stochastiques qui déterminent deux états cellulaires différents engendrant ainsi deux sous-populations bactériennes distinctes (Dubnau and Losick, 2006). Cette « bistabilité » pourrait s'expliquer par

une boucle d'auto-régulation positive de ExsA, avec une activation de la transcription non-linéaire (coopérativité).

Pour répondre à cette question, nous avons inséré dans la souche CHA une fusion transcriptionnelle entre le promoteur *pC* et le gène rapporteur *gfp* (souche CHA *pC<sup>+</sup>-gfp*) : ceci permet de suivre par FACS l'activité transcriptionnelle qui résulte directement de la fluorescence de chaque bactérie et non pas une valeur moyenne résultant de la population bactérienne totale, comme c'est le cas des mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase.

Nous avons tout d'abord analysé la distribution de l'activité transcriptionnelle du promoteur *pC* au sein des bactéries CHA *pC<sup>+</sup>-gfp* (*pIApC<sup>+</sup>*) en conditions non induite et induite du SST3, puis dans la souche CHA *pC<sup>+</sup>-gfp* (*pIApC<sup>+</sup> ExsA 168*) pour observer l'effet de la surproduction de ExsA 168 (Figure 39).



**Figure 39. Analyse de l'activité transcriptionnelle de  $pC^+$ -gfp par cytométrie en flux**

**dans les souches CHA, CHA  $pC^+$ -gfp et CHA  $pC^+$ -gfp (pIAPC<sup>+</sup> ExsA<sub>168</sub>).**

Le nombre relatif de bactérie est indiqué sur l'axe des ordonnées et la fluorescence GFP relative est indiquée en échelle logarithmique sur l'axe des abscisses. Mesures de la fluorescence GFP par cytométrie en flux des souches, **A.** CHA, **B** et **C.** CHA  $pC^+$ -gfp et **D.** CHA  $pC^+$ -gfp (pIAPC<sup>+</sup> Nter<sub>1-168</sub>), en condition non induite (-EGTA) et /ou induite (+EGTA) du SST3.

La fluorescence intrinsèque de la souche CHA en condition induite du SST3 est indiquée sur la Figure 39 : il s'agit de la mesure témoin pour cette expérience (cette mesure est similaire en condition non induite).

En comparant les profils de fluorescence en conditions non induite et induite de la souche CHA  $pC^+$ -gfp, nous observons que l'induction *in vitro* du SST3 entraîne l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur  $pC$  d'une

intensité de fluorescence d'environ 1 log (Figure 39.B et C). Contrairement à ce qui a été décrit pour le promoteur *pS*, l'expression du promoteur *pC* est induite de manière homogène dans l'ensemble de la population bactérienne dans nos conditions expérimentales (Figure 39 B et C) : nous n'observons pas deux populations distinctes. Néanmoins, il serait nécessaire d'analyser cette expression au cours du temps pour confirmer qu'il ne s'agit pas d'un phénomène de bistabilité.

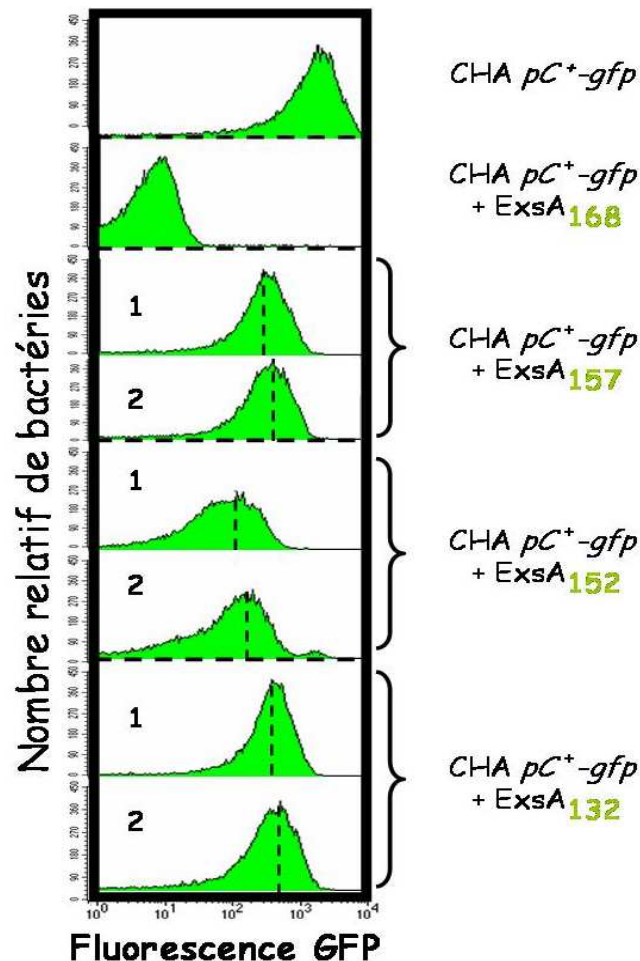
Lorsque le domaine Nter (ExsA 168) est surproduit dans la souche *CHA pC<sup>+</sup>-gfp*, l'intensité de fluorescence observée est plus faible qu'en condition non induite du SST3 ; elle se rapproche de la fluorescence intrinsèque de la souche *CHA* (Figure 39 A et D), ce qui traduit une activité transcriptionnelle très faible. Cette expérience de cytométrie en flux permet ainsi de confirmer l'effet dominant négatif observé à travers les mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase, l'activité du promoteur *pC<sup>+</sup>* étant inhibée dans l'ensemble de la population (Figure 39.D).

Nous avons ensuite comparé les moyennes de fluorescence entre différents clones (4 clones au total mais seuls 2 sont représentés pour plus de clarté) d'une même souche. Cette analyse a été réalisée à partir des souches *CHA pC<sup>+</sup>-gfp* surproduisant ExsA 157, 152 et 132. Les profils de fluorescence montrés Figure 40 nous indiquent deux choses:

- nous observons que la surproduction des 3 protéines tronquées ExsA 157, 152 et 132 dans la souche sauvage ne permet pas la pleine activité de la protéine ExsA endogène et n'induit pas d'effet dominant négatif comparable à ExsA 168.

- de manière similaire à la souche sauvage, l'activité du promoteur *pC* est induite de manière homogène dans les souches dans lesquelles les protéines tronquées sont surproduites. Par contre, nous avons mesuré les moyennes de fluorescence et ainsi mis en évidence une différence significative entre les valeurs obtenues pour chacun des clones, d'un facteur entre 1,2 et 1,7 (alors que nous

avons bien vérifié par western-blot que les quantités de protéines surproduites sont similaires entre deux clones). Il y a donc bien des différences d'activité du rapporteur *gfp* comme nous l'avons observé avec les souches *CHA pC<sup>+</sup>-lacZ* surproduisant les protéines.



**Figure 40. Comparaison de l'activité transcriptionnelle entre la souche *CHA pC<sup>+</sup>-gfp* contrôle et les souches *CHA pC<sup>+</sup>-gfp* surproduisant le domaine Nter +/- tronqué et comparaison entre deux clones d'une même souche.**

Profils de fluorescence des souches *CHA pC<sup>+</sup>-gfp*, *CHA pC<sup>+</sup>-gfp* (pIApC<sup>+</sup> Nter<sup>1-168</sup>), *CHA pC<sup>+</sup>-gfp* (pIApC<sup>+</sup> Nter<sup>1-157</sup>), *CHA pC<sup>+</sup>-gfp* (pIApC<sup>+</sup> Nter<sup>1-152</sup>) et *CHA pC<sup>+</sup>-gfp* (pIApC<sup>+</sup> Nter<sup>1-132</sup>) en condition induite du SST3. Pour les trois dernières souches, les profils de deux clones sont représentés.

Pour conclure, ces analyses par FACS nous ont confirmé les résultats obtenus précédemment. De plus, elles montrent clairement que deux clones d'une même souche peuvent avoir des activités transcriptionnelles significativement différentes : il s'agit d'une hétérogénéité entre les clones et non pas d'une

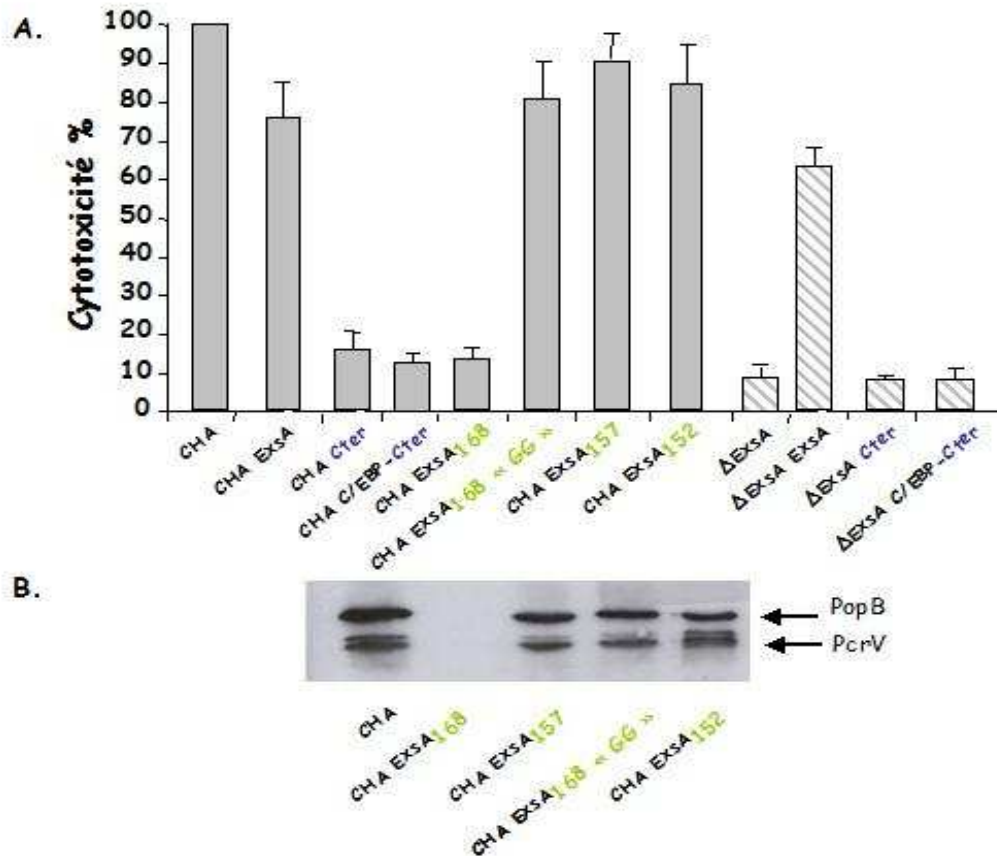
hétérogénéité de l'expression au sein de la population bactérienne. Nous n'avons pas de réponse claire pour expliquer cette hétérogénéité.

## **II.6 Effet de la surproduction des domaines des ExsA sur la cytotoxicité SST3-dépendante de *P. aeruginosa*.**

ExsA induit l'expression des gènes du SST3, et par voie de conséquence la synthèse de l'appareil de sécrétion du type 3 et des effecteurs. Jusqu'ici, nous avons regardé l'effet direct de la surproduction de ExsA et de ses domaines (sauvages ou mutés) sur la transcription des gènes du SST3, dans les souches CHA et  $\Delta exsA$ . Pour compléter cette étude, nous avons souhaité analyser l'effet « plus » global de ces surproductions sur l'appareil de sécrétion et la cytotoxicité.

Pour cela, nous avons étudié la capacité des différentes souches à insérer dans les membranes de macrophages un pore de translocation et à sécréter dans le milieu extracellulaire les protéines PopB et PcrV. L'insertion des pores de translocation composés des protéines PopB et PopD dans les membranes cellulaires des macrophages entraîne la fuite du cytosol dans le milieu extracellulaire. Le test de cytotoxicité que nous avons utilisé permet de mesurer l'activité de l'une des enzymes cytosoliques relarguées, la lactate déshydrogénase (LDH), comme marqueur de l'insertion des pores et donc de l'activité cytotoxique SST3-dépendante envers les macrophages (voir Chapitre IV, Matériel et Méthodes).

Pour cela, les macrophages ont été infectés pendant 3h soit avec les souches contrôle CHA et  $\Delta exsA$ , soit avec les différentes souches décrites dans cette étude, puis l'activité de la LDH relarguée dans le milieu extracellulaire a été mesurée (Figure 41.A).



**Figure 41. A. Effet de la surproduction de ExsA et de ses domaines sur la cytotoxicité envers les macrophages des souches CHA et  $\Delta exsA$ .**

**B. Effet de la surproduction du domaine N-terminal de ExsA**

**(sauvage ou muté dans l'hélice  $\alpha$  156-163) sur l'activité de sécrétion.**

A. La quantité de LDH détectée est rapportée à un pourcentage de cytotoxicité en prenant pour référence le résultat obtenu pour la souche CHA sauvage. Les histogrammes pour les souches CHA sont en gris plein et pour les souches  $\Delta exsA$  en gris hachuré. Les souches sont indiquées en dessous des histogrammes correspondants. Les gènes codant pour les différentes protéines surproduites sont sous le contrôle du promoteur  $pC^+$  B. La sécrétion des protéines PopB et PcrV a été analysée par Western Blot à partir des surnageants de culture après induction du SST3. Les protéines ont été immunodétectées avec les anticorps anti-PcrV et anti-PopB. Les souches sont indiquées en dessous des profils de sécrétion correspondants.

Une cytotoxicité de 100% envers les macrophages est attribuée à la valeur mesurée pour la souche sauvage CHA (Figure 41.A). Cette cytotoxicité est bien SST3-dépendante car la valeur mesurée en présence de la souche  $\Delta exsA$  est équivalente à celle mesurée à partir de macrophages non infectés (8%).

Contrairement au résultat attendu, les souches CHA et  $\Delta exsA$  dans lesquelles la protéine ExsA est surproduite (CHA ExsA et  $\Delta exsA$  ExsA) ne possèdent pas 100% de cytotoxicité (Figure 41.A) : ceci pourrait peut être s'expliquer par le



problème de croissance de ces souches, ou par l'accumulation dans le cytosol des protéines du SST3 surproduites, ce qui interférerait dans la biogenèse et/ou le fonctionnement du SST3. Le même problème de croissance a été rencontré avec les souches CHA et  $\Delta exsA$  surproduisant les protéines **C/EBP-Cter** et **Cter**.

La surproduction des protéines **C/EBP-Cter** et **Cter** entraîne une diminution de la cytotoxicité de la souche CHA (Figure 41.A). Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle le domaine C-ter entre en compétition pour la fixation à l'ADN avec la protéine ExsA endogène mais n'est pas pleinement actif. En revanche, les protéines **C/EBP-Cter** et **Cter** surproduites ne rendent pas cytotoxiques la souche  $\Delta exsA$  (Figure 41.A) ce qui conforte une fois de plus l'idée que le domaine C-ter de ExsA n'est que faiblement actif par rapport à la protéine entière.

*Remarque : l'activité transcriptionnelle du Cter serait trop faible pour permettre la synthèse de la quantité de protéines nécessaire à la biogenèse et à la fonctionnalité du SST3.*

La surproduction de la protéine ExsA 168 dans la souche CHA entraîne une diminution de la cytotoxicité SST3-dépendante qui est en accord avec la faible activité transcriptionnelle des promoteurs *pC* et *pG* mesurée dans cette souche lors des expériences précédentes (Figure 41.A) : l'effet dominant négatif conduit donc à la perte de cytotoxicité de la souche sauvage.

Les cytotoxicités des souches CHA ExsA 157, CHA ExsA « 168 GG » et CHA ExsA 152 nous indiquent que si l'on touche à l'hélice  $\alpha$  156-163 du domaine N-ter, celui-ci n'a plus d'effet sur la cytotoxicité de la souche sauvage (Figure 41.A). Ce résultat est en accord avec la perte de l'effet dominant négatif observé lors des mesures d'activités  $\beta$ -galactosidases.

En absence de macrophages, l'induction du SST3 par déplétion en calcium, conduit à la sécrétion dans le surnageant de culture des translocateurs et des

effecteurs. La capacité de sécrétion d'une souche peut donc être déterminée en immunodéTECTANT les protéines PopB et PcrV dans son surnageant.

L'immunoblot de la Figure 41.B conforte la mise en évidence de l'effet dominant négatif induit par le domaine N-ter car la souche CHA ExsA 168 ne sécrète pas de translocateurs. Cette fois-ci encore, nous observons que les mutations dans l'hélice 156-163 permettent de lever cet effet (Figure 41.B).

Cette analyse de la cytotoxicité confirme que le domaine N-ter de ExsA surproduit en présence de la protéine ExsA endogène a un effet dominant négatif, comme nous l'avons observé par mesures de l'activité  $\beta$ -galactosidase et par FACS. Les cytotoxicités similaires des souches CHA, CHA 157, CHA 168 « GG » et CHA 152 confortent le rôle crucial attribué à l'hélice  $\alpha$  156-163 dans cet effet dominant négatif.

Enfin la faible activité transcriptionnelle du domaine C-ter, seul ou fusionné à C/EBP, est confirmée par la faible cytotoxicité des souches dans lesquelles il est surproduit. Son activité n'est pas suffisante pour permettre l'expression en quantité suffisante des protéines nécessaires à la synthèse d'un SST3 fonctionnel.

## II.7 Conclusions de l'étude de la fonctionnalité de ExsA et de ses domaines par une approche *in vivo*

Les domaines N- et C-terminaux de ExsA que nous avons défini possèdent les fonctionnalités suivantes *in vivo*:

Le **domaine C-ter** de ExsA semble capable de se fixer seul à l'ADN puisqu'il est doué d'activité transcriptionnelle ( $\Delta exsA$ ) et serait capable d'entrer en compétition avec la protéine ExsA endogène lorsqu'il est surproduit (CHA). En revanche, ce domaine possède une activité transcriptionnelle plus faible que la protéine entière ( $\Delta exsA$ ), qui n'est pas compensée par sa surproduction.

Ces observations suggèrent donc que le domaine N-ter serait nécessaire à l'activité transcriptionnelle de ExsA en permettant la fixation à l'ADN du domaine Cter (dimérisation ?) et/ou il pourrait participer à l'activation transcriptionnelle en interagissant également avec l'ARN polymérase.

La surproduction du domaine N-ter de ExsA, tel que nous l'avons défini (1-163), induit un effet dominant négatif sur l'activité de la protéine ExsA endogène dans la souche sauvage. L'hélice  $\alpha$  (156-163) située à l'extrémité C-terminale de ce domaine est responsable de cet effet.

Si cet effet s'explique par le fait que ExsA active la transcription sous forme de dimère, nos résultats suggèrent que cette dimérisation s'effectue à travers cette hélice  $\alpha$ . Il s'agit de la fonction attribuée aux hélices  $\alpha$  situées à l'extrémité C-terminale des domaines N-ter des protéines AraC et XylS. Cette hélice  $\alpha$  (156-163) ne serait donc pas uniquement un lien flexible permettant de relier les deux domaines mais ferait partie intégrante du domaine N-ter.

### **III. Etude de la fonctionnalité de ExsA et de ses domaines par une approche *in vitro***

Fort des résultats obtenus à travers l'approche *in vivo* qui nous ont permis d'émettre des hypothèses quant à la fonctionnalité des domaines de ExsA, nous avons entrepris de poursuivre cette étude fonctionnelle à travers une approche *in vitro* afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

Dans ce but, la protéine ExsA et les domaines C- et N-terminaux ont été purifiés indépendamment afin de déterminer:

- ⇒ L'état oligomérique de ces protéines en solution (seule ainsi qu'en présence d'ADN pour ExsA et le domaine C-ter),
- ⇒ Les propriétés de fixation à l'ADN de ExsA et du domaine C-ter,

⇒ Le rôle du domaine N-ter dans la fixation à l'ADN du C-ter. Les propriétés d'interaction du domaine N-ter avec l'anti-activateur ExsD ont été analysées à travers des expériences de biochimie qui sont décrites dans le Chapitre VI.

Dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe de Jean-Pierre Simorre du laboratoire LRMN (laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire) de l'IBS de Grenoble, nous avons entrepris de résoudre la structure tridimensionnelle du domaine N-ter de ExsA, le domaine non conservé entre les protéines de type AraC/XylS. Grâce à cette approche structurale, nous avons pour objectif de caractériser les interactions moléculaires permettant la dimérisation du domaine N-ter ainsi que d'étudier l'interaction entre ce domaine et ExsD.

### III.1 Stratégie de purification

Nous avons tout d'abord entrepris de surproduire la protéine ExsA sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG et de la fusionner à une étiquette hexa-histidine afin de permettre sa purification par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Pour éviter que cette étiquette interfère dans l'interaction ExsA/ADN, celle-ci a été fusionnée au domaine N-ter de la protéine ( $_{\text{H}}\text{ExsA}$ ). Malheureusement, la protéine  $_{\text{H}}\text{ExsA}$  a été surproduite majoritairement sous forme de corps d'inclusion en système bactérien. Ce résultat n'était pas étonnant car les facteurs de transcription, sont généralement des protéines dont la solubilité est très faible (Ruiz *et al.*, 2003).

Afin d'obtenir cette protéine sous forme soluble et en quantités suffisantes pour entreprendre les expériences envisagées, nous avons essayé d'empêcher la formation de corps d'inclusion en diminuant la quantité de protéines surproduites. Pour cela, la température de croissance des cultures bactériennes a été abaissée de 37°C à 16°C et la concentration en IPTG a été diminuée de 1 mM à 0,1 mM. Malgré ces modifications, nous ne sommes pas parvenus à obtenir la protéine en quantité suffisante.

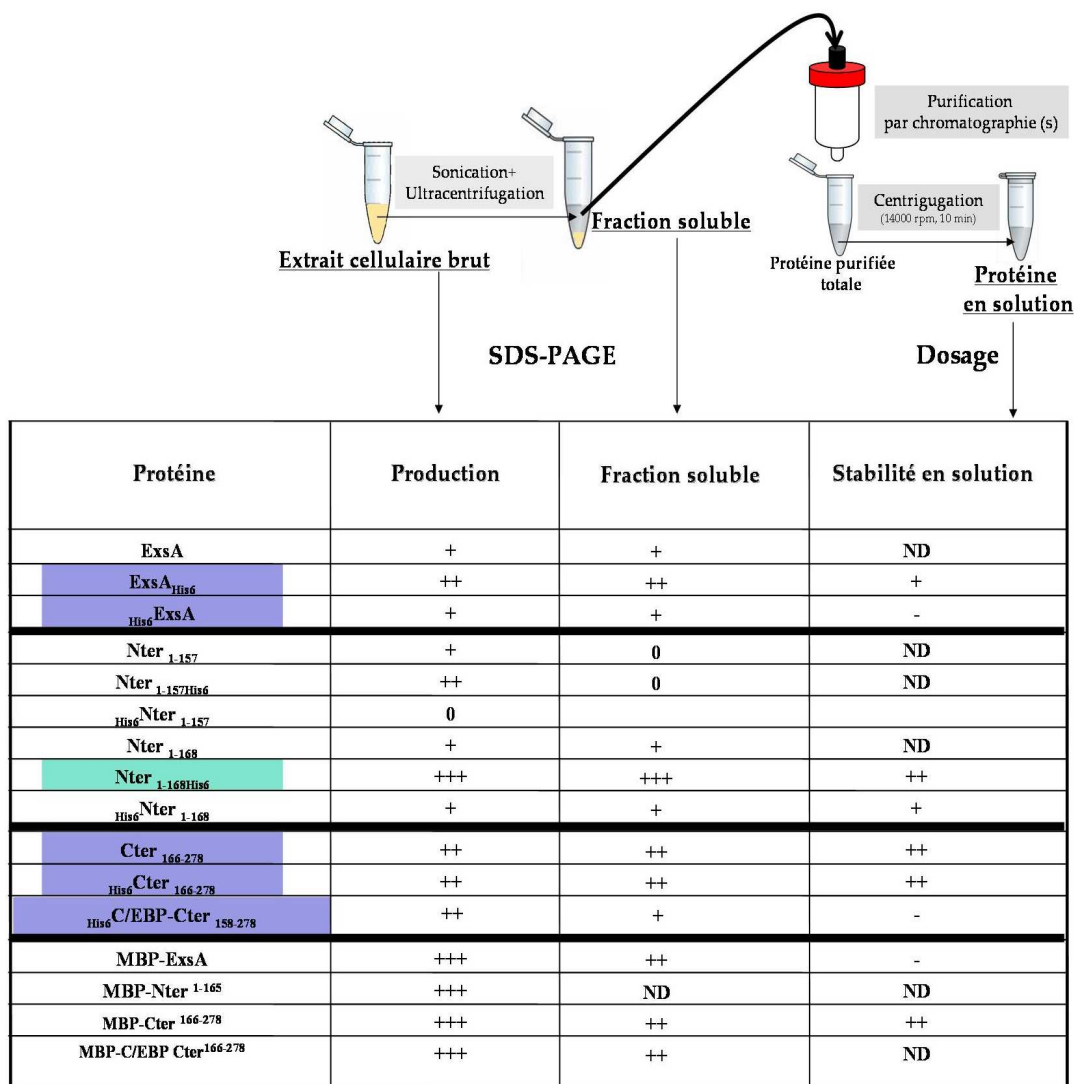
La stratégie suivante a donc été de déterminer si la *présence*, la *nature* et la *position* de l'étiquette de fusion peuvent améliorer la solubilité de la protéine. Pour cela nous avons généré de nombreux vecteurs d'expression qui ont permis de surproduire et purifier la protéine, soit sous forme native, soit en positionnant l'étiquette hexa-histidine en C-ter, soit en la fusionnant à la Maltose-Binding-Protein (MBP) en position N-terminal. Cette étiquette est couramment utilisée afin d'augmenter la solubilité de la protéine à laquelle elle est fusionnée (Austin *et al.*, 2009). Le rôle exact de la MBP dans cette stabilisation n'est pas clairement défini.

Puisque nous souhaitons aussi étudier la fonctionnalité *in vitro* des domaines de ExsA indépendamment, et en particulier la structure du domaine N-ter, de nombreux vecteurs d'expression ont aussi été créés afin de surproduire et purifier les domaines N-ter (Nter 1-168) et C-ter (Cter 166-278) de ExsA tels que nous les avons définis. Suite aux résultats obtenus *in vivo*, le domaine N-ter sans l'hélice  $\alpha$  156-163 (Nter 1-158) a aussi été surproduit ainsi que la protéine de fusion C/EBP-Cter afin de comparer leurs fonctionnalités *in vitro* à celles des domaines Nter 1-168 et Cter 166-278, respectivement.

Les différentes conditions testées pour la protéine ExsA, décrites ci-dessus, ont aussi été testées lors de la surproduction des domaines afin d'augmenter leur solubilité.

Pour chacune des protéines étudiées, les propriétés suivantes ont été déterminées : i) la quantité surproduite (colonne « Production »), ii) la fraction soluble lors de la surproduction, iii) la stabilité en solution lorsqu'elle est purifiée. Les techniques utilisées pour définir ces propriétés sont décrits dans le Chapitre III « Matériel et Méthodes ».

Les résultats obtenus sont regroupés au sein de la Figure 4.



**Figure 42. Schéma du protocole expérimental et tableau récapitulatif des propriétés *in vitro*, des protéines étudiées**

Colonne « protéine » : Le nom de chacune des protéines correspond : à la protéine entière ou à un domaine (ExsA, Nter, ou Cter), aux premiers et derniers résidus des protéines (en indice), à la présence, l'identité et la position de l'étiquette de fusion (His6, C/EBP, ou MBP, en N-ter ou en C-ter; indiqué en indice). La coloration bleue indique que la protéine a été utilisée dans des expériences de fonctionnalité *in vitro* et en vert dans des expériences de fonctionnalité *in vitro* et des études structurales.

Colonne « production »: 0 indique que la protéine n'est pas surproduite. Le nombre de signe + classe les quantités de protéine observées par analyse SDS-PAGE depuis la quantité la plus faible (+) jusqu'à la quantité la plus élevée (+++).

Colonne « solubilité lors de la surproduction »: 0 indique que la protéine est présente uniquement dans la fraction insoluble (voir Matériel et Méthode). Le nombre de signe + classe la quantité de protéine observée par analyse SDS-PAGE de la fraction soluble (Voir matériel et méthode) depuis la quantité la plus faible (+) jusqu'à la quantité la plus élevée (+++). Le signe (+) indique que la quantité de protéine présente dans la fraction soluble est très faible. ND =non déterminé

Colonne « solubilité de la protéine purifiée »: Le nombre de signe + classe les quantités de protéines purifiées par chromatographie et restant en solution après différents temps, depuis la plus faible (-) jusqu'à la plus élevée (++). ND =non déterminé.

Comme indiqué sur la Figure 42, la solubilité de la protéine purifiée ExsA<sub>H</sub> (ExsA<sub>His6</sub>) est supérieure à celle de la protéine <sub>H</sub>ExsA et la solubilité de la protéine purifiée Nter 1-168<sub>His6</sub> (Nter<sub>H</sub>) est supérieure à celle de la protéine His6Nter 1-168 (<sub>H</sub>Nter). Les propriétés différentes de ces protéines indiquent bien que la position de l'étiquette hexa-histidine peut influencer sur la solubilité des protéines purifiées.

Les protéines fusionnées à une étiquette MBP (MBP-ExsA, MBP-Cter, MBP-Nter et MBP-C/EBP-Cter) sont produites en quantité très élevée par rapport aux protéines sous forme native ou fusionnées à une étiquette hexa-histidine, particulièrement dans le cas de la protéine ExsA entière (Figure 42). Des quantités plus importantes sont également obtenues dans la fraction soluble. Cependant, nous observons que la protéine purifiée fusionnée à la MBP n'est pas plus stable en solution *in vitro* que la protéine fusionnée à une étiquette hexa-histidine. Dans ces exemples, la présence de l'étiquette MBP permet d'augmenter les quantités de protéines surproduites et d'améliorer leur solubilité *in vivo* mais n'améliore pas leur solubilité *in vitro*.

Il est intéressant de noter que la protéine Nter 1-157<sub>His6</sub> est totalement insoluble lorsqu'elle surproduite tandis que la protéine Nter 1-168<sub>His6</sub> est la protéine qui présente la meilleure solubilité parmi toutes celles étudiées (Figure 42). La délétion de la dernière hélice  $\alpha$  156-163 du domaine N-ter a donc un effet drastique sur la solubilité de ce domaine. Cette observation suggère que cette région a un rôle structurant et qu'elle appartient bien au domaine N-ter.

Enfin si nous comparons la solubilité de l'ensemble des protéines étudiées, les protéines purifiées les plus solubles sont : HisNter 1-168 (<sub>H</sub>Nter), Nter 1-168<sub>His6</sub> (Nter<sub>H</sub>), Cter 166-278 (Cter), HisCter 166-278 (<sub>H</sub>Cter) et MBP-Cter. Cette observation confirme que les domaines N- et C-terminaux des protéines de type AraC/XylS purifiés indépendamment sont généralement plus solubles que la protéine entière

(Rodgers and Schleif, 2009; Soisson *et al.*, 1997b). De plus, ceci suggère que le découpage que nous avons réalisé n'a pas altéré la structure des deux domaines. Cependant, seule l'étude de la fonctionnalité *in vitro* de ces domaines permettra de confirmer si tous les résidus essentiels à leur activité sont présents.

Nous avons donc choisi les protéines les plus solubles/stables pour étudier leur fonctionnalité *in vitro* et leur rôle dans l'état oligomérique de ExsA : les protéines  $_{\text{H}}\text{ExsA}$  et  $\text{ExsA}_{\text{H}}$ , les protéines  $\text{Cter}_{166-278}$  (**Cter**),  $_{\text{H}}\text{Cter}_{166-278}$  (**H**Cter****) et  $_{\text{H}}\text{C/EBP-Cter}$  (par défaut) et la protéine  $\text{Nter}_{1-168\text{H}}$  (**N**ter**<sub>H</sub>**).

## III.2 Etude de l'état oligomérique de ExsA et de ses domaines

### III.2.1 Analyse des protéines purifiées par chromatographie d'exclusion de taille

Afin de déterminer si les protéines d'intérêt purifiées existent sous une ou plusieurs espèces en solution et d'identifier leur(s) état(s) oligomérique(s), ces protéines ont tout d'abord été analysées par chromatographie d'exclusion de taille (SEC). Cette technique permet de séparer différentes espèces protéiques en solution en fonction de leur rayon hydrodynamique ( $R_{\text{H}}$ ). Dans le cas des protéines globulaires, le  $R_{\text{H}}$  peut être alors directement associé à la masse moléculaire de la protéine. Lorsqu'une protéine d'intérêt est analysée par SEC, il est rare de savoir si cette protéine est globulaire ou non, mais par extension il est communément admis qu'on définit par cette technique « la masse moléculaire apparente » d'une protéine en solution.

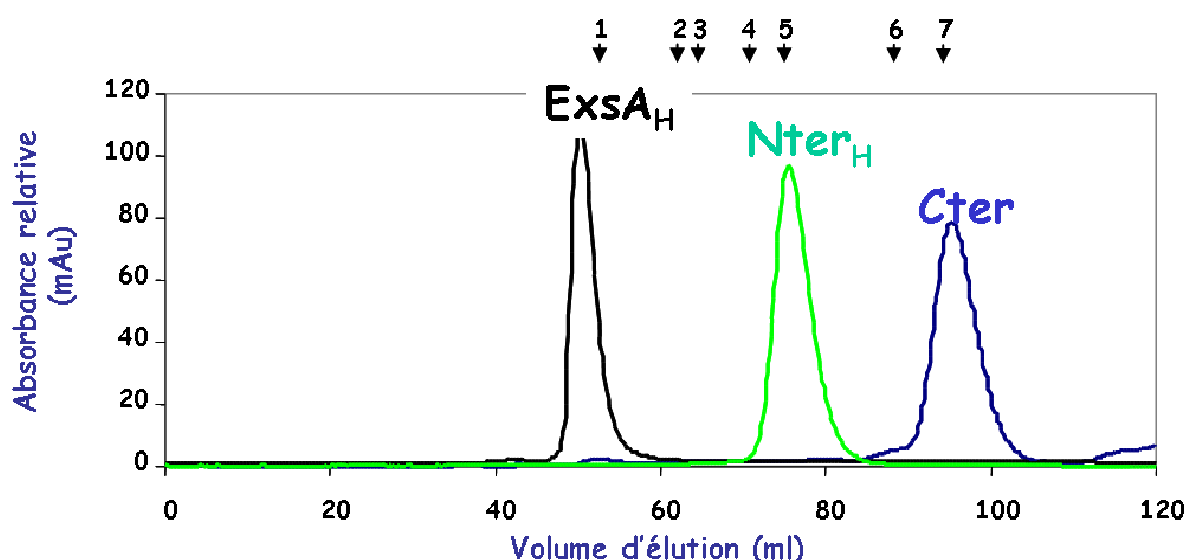
Afin d'effectuer l'analyse des protéines par SEC, les protéines  $\text{ExsA}_{\text{H}}$ ,  $_{\text{H}}\text{ExsA}$  (33 kDa),  $\text{Nter}_{\text{H}}$  (20 kDa),  $_{\text{H}}\text{Cter}$  (14,5 kDa) et  $\text{Cter}$  (13 kDa) ont été utilisées dans le tampon : 20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1mM DDT, pH=7,8. La concentration élevée en sel de ce tampon permet de stabiliser la protéine ExsA ( $\text{ExsA}_{\text{H}}$  et  $_{\text{H}}\text{ExsA}$ ) grâce à la force ionique qu'elle induit dans le solvant. A une concentration



inférieure en sel, la protéine ExsA se trouve entièrement dans la fraction insoluble lors de sa surproduction et précipite très rapidement en solution.

Pour plus de clarté, seules les expériences réalisées à partir des protéines Cter, Nter<sub>H</sub> et ExsA<sub>H</sub> sont décrites.

Des échantillons de 5 ml ont été injectés sur la colonne pour chacune des protéines aux concentrations suivantes ExsA<sub>H</sub>= 0,4 mg/ml, Nter<sub>H</sub>= 0, 5 mg/ml et Cter = 0, 7 mg/ml. Les profils d'élution des protéines sont représentés sur la Figure 43.



**Figure 43. Profil d'élution des protéines ExsA<sub>H</sub>, Nter<sub>H</sub> et Cter sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Superdex 200, Hiload 10/60)**

Les profils d'élution des protéines sont indiqués en noir pour ExsA<sub>H</sub>, en vert pour Nter<sub>H</sub> et en bleu pour Cter. Les flèches numérotées indiquent les protéines standards de masse moléculaire et de rayon hydrodynamique connus: 1, Ferritine (440 kDa, 61 Å); 2, Catalase (232 kDa, 52,2 Å); 3, Aldolase (158 kDa, 48,1 Å); 4, Albumine de sérum bovin (67 kDa, 35,5 Å); 5, Ovalbumine (43 kDa, 30,5 Å); 6, Chymotrypsinogène (25 kDa, 20,9 Å); 7, Ribonucléase A (13,7kDa, 16,4 Å).

La protéine ExsA<sub>H</sub> élué au volume de 51 ml (Figure 43); ce volume est proche du volume d'élution de la ferritine (52 ml) dont le poids moléculaire est de 440 kDa. Ce volume d'élution indique que ExsA<sub>H</sub> se trouverait sous une forme oligomérique composée de 16 unités, ce qui est improbable. En réalité, la protéine ExsA<sub>H</sub> doit se trouver dans un état agrégé mais elle n'élue pas dans la volume mort

(40 ml) car son élution est probablement retardée à cause d'interactions aspécifiques avec la matrice de la colonne. L'agrégation de ExsA<sub>H</sub> a été confirmée lors de l'étude de la protéine par Blue Native-PAGE (gel natif qui permet de charger négativement les protéines grâce au bleu de Coomassie, sans les dénaturer).

Le profil d'élution de la protéine Nter<sub>H</sub> montre que celle-ci se trouve sous une seule forme en solution et qu'elle élue à un volume (75 ml) compris entre ceux de la BSA (71 ml) et de l'ovalbumine (77 ml) dont les poids moléculaires sont de 67 kDa et 43 kDa respectivement (Figure 43). Etant donné le poids moléculaire de 20 kDa du monomère de ce domaine, ce volume d'élution suggère que le domaine N-ter de ExsA est un dimère en solution.

Enfin le profil d'élution de la protéine Cter présente un seul pic d'élution à un volume de 95 ml (Figure 43), proche de celui de la ribonucléase (13,7 kDa) ; ceci suggère que le domaine C-ter de ExsA est monomérique en solution (13 kDa).

De plus, nous avons pu mettre en évidence que la concentration des protéines n'influe ni sur le nombre d'espèces en solution ni sur le volume d'élution. Les états oligomériques observés sont donc indépendants de la concentration en protéine. D'autres approches biochimiques ont ensuite été entreprises afin de confirmer l'état de dimère du domaine N-ter et de découvrir l'état oligomérique de la protéine ExsA entière.

### III.2.2 Etude de l'état oligomérique de la protéine ExsA<sub>H</sub>

Afin d'étudier l'état oligomérique de ExsA, la protéine purifiée ExsA<sub>H</sub> a été utilisée car celle-ci est produite en plus grande quantité que la protéine <sub>H</sub>ExsA. De

plus nous avons montré que la position de l'étiquette Histidine en C-terminal n'interfère pas dans l'interaction ExsA/ADN (voir paragraphe III.3.1).

Afin de stabiliser cette protéine en solution et ainsi permettre l'étude de son état oligomérique, nous avons utilisé deux approches :

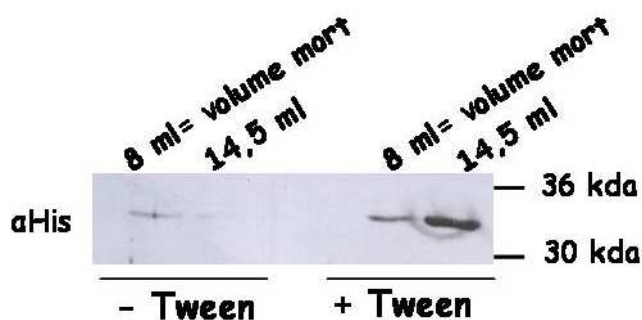
⇒ Modification du tampon de la protéine (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 1mM DDT, pH=7,8),

⇒ Stabilisation de la protéine en solution à travers son interaction avec une séquence d'ADN spécifique : ceci a été réalisé avec succès pour la protéine MarA lors de sa co-cristallisation avec sa séquence ADN cible (Rhee *et al.*, 1998).

Pour la première approche, nous avons tout d'abord analysé l'effet du pH sur la solubilité de la protéine. En effet, la protéine ExsA possède un pI basique de 8,5 et pour qu'une protéine soit soluble en solution, il faut généralement au moins une différence de 1,5 entre le pI de la protéine et le pH du tampon. Nous avons donc testé une gamme de tampon (voir Chapitre IV « Matériel et Méthode ») permettant de faire varier le pH de 5 à 7. Cette approche n'a pas permis de résoudre les problèmes d'agrégation, à des concentrations en protéines comprises entre 0,2 mg/ml et 0,4 mg/ml (comme visualisé par SEC, résultats non montrés). L'effet stabilisateur d'agents tels que le glycérol et le saccharose a aussi testé, en les ajoutant au tampon de la protéine à des concentrations variant de 1% à 10% (v/v). Nous n'avons pas souhaité augmenter cette concentration car à une concentration supérieure à 10%, la viscosité du tampon interfère dans les analyses par SEC.

Par contre, dans une étude récente, les auteurs ont purifié la protéine  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  en présence de 0,5% de Tween 20 afin de la solubiliser puis étudier sa fonctionnalité (Brutinel *et al.*, 2008). Nous avons donc reproduit ce protocole de purification au laboratoire pour la protéine  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  ainsi que pour  $\text{ExsA}_{\text{H}}$ . Afin

d'étudier l'effet du Tween sur la solubilité de  $\text{hExsA}$ , la protéine a été éluée en présence ou absence du détergent sur colonne de SEC préalablement équilibrée dans le tampon adéquat, puis les fractions correspondantes au pic d'éluion ont été analysées par Western-Blot (Figure 44).



**Figure 44. Analyse par immunoblot de l'éluion de la protéine  $\text{hExsA}$  par SEC, en absence ou en présence de Tween 20.**

La protéine  $\text{hExsA}$  purifiée (500  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon sans ou avec 0,5% de Tween 20 a été injectée sur une colonne de SEC (GL 10/300, Superdex 200) équilibrée dans le même tampon que celui de la protéine. 20  $\mu\text{l}$  des fractions d'éluion, aux volumes indiqués, ont été analysés par SDS-PAGE puis électrotransférés sur membrane de nitrocellulose. La protéine a été révélée avec des anticorps anti-HisTag.

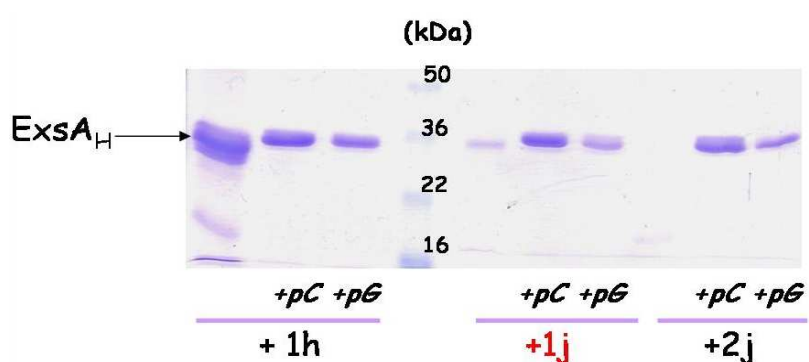
Comme l'indique la Figure 44, la présence de détergent permet clairement d'augmenter la quantité de protéine  $\text{hExsA}$  éluée à un volume de 14,5 ml. Le Tween 20 permet donc bien d'augmenter la solubilité de la protéine.

*Remarque : la même quantité de protéine a été préparée pour l'injection sur la colonne dans ces deux expériences. Cependant, si on additionne les quantités de protéines observées lors des éluions, il semble que cette quantité est inférieure en absence de Tween 20. Ceci est probablement dû à l'adsorption de la protéine sur les parois de la seringue d'injection, de la tubulure ou sur la matrice de la colonne. Ce phénomène a été observé plusieurs fois.*

Ce volume d'éluion (14,5 ml) est faiblement supérieur à celui du complexe  $\text{hExsA/ExsD}$  (65kDa, 14,1 ml ; décrit dans le Chapitre VI). La masse molaire théorique du dimère de  $\text{hExsA}$  étant de 66 kDa, ce volume d'éluion pourrait correspondre à celui d'un dimère de  $\text{ExsA}$ .

Le Tween 20 augmente aussi la solubilité de la protéine  $_{H}C_{ter}$  mais n'a pas d'effet sur la protéine  $N_{terH}$  (non montré).

Dans la seconde approche, nous avons analysé l'effet de la présence d'ADN spécifique sur la stabilité de la protéine  $ExsA_H$  *in vitro*. Pour cela, les séquences d'ADN double-brin «  $pC$  » et «  $pG$  » (de 40 et 60 paires de bases comportant les sites de fixation de  $ExsA$  sur les promoteurs respectivement  $pC$  et  $pG$ ) ont été ajoutées à la protéine purifiée  $ExsA_H$ . L'effet sur la stabilité en solution de la protéine est montré sur la Figure 45.



**Figure 45. Stabilité *in vitro* de  $ExsA_H$ , en présence ou en absence d'ADN.**

Analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de 10  $\mu$ l de surnageant obtenu après centrifugation (14 000 rpm, 10 min) au bout de 1h, 1 jour ou 2 jours d'incubation de la protéine  $ExsA_H$  (1mg/ml) soit seule soit en présence de  $pC$  ou  $pG$  (ratio protéine/ADN=1/1,2). Les temps d'incubation sont indiqués en dessous du gel +1h, +1j, +2j. Les échantillons contenant la protéine  $ExsA_H$  en présence de  $pC$  ou  $pG$  sont indiqués en dessous du gel par + $pC$  et + $pG$  respectivement.

Nous observons sur cette figure que la protéine  $ExsA_H$  est présente dans le surnageant après 1h d'incubation dans les 3 conditions testées (sans ADN, + $pC$ , + $pG$ ), la présence de bandes en dessous de la bande majoritaire indique la dégradation de la protéine. Après une et deux journées d'incubation, l'analyse des surnageants montre clairement que la protéine est maintenue en solution grâce à l'ADN car elle est présente à une concentration plus élevée lorsqu'elle est incubée avec soit  $pC$ , soit  $pG$  (Figure 45). L'analyse par SDS-PAGE des culots correspondants nous a indiqué la précipitation de la protéine seule (non montré).

La présence d'ADN spécifique empêche donc la précipitation de la protéine (+1, +2 jours).

Nous avons ensuite tenté de déterminer l'état oligomérique de ExsA par pontage chimique en présence de glutaraldéhyde ou d'EDC (1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride), et de déterminer l'effet de l'ADN sur cet état. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu de résultats interprétables. Une autre approche possible pour étudier l'état oligomérique de la protéine en présence d'ADN aurait été de définir la masse molaire du complexe ADN/ExsA par Ultracentrifugation Analytique (AUC) et/ou par SEC/MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering).

L'analyse par SEC de l'effet de l'ADN sur la solubilité de ExsA nous a permis de montrer que la présence de *pC* augmente bien la solubilité de  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$ . Ce résultat est décrit dans la partie III.4.1 du Chapitre VI.

### III.2.3 Etude de la protéine Nter<sub>H</sub>

Comme l'analyse par SEC semblait indiquer que le domaine N-ter serait un dimère en solution, nous avons donc entrepris à travers des approches biochimiques et structurales de déterminer l'état oligomérique de ce domaine.

De plus, l'effet dominant négatif induit par la surproduction du domaine N-ter sur l'activité de la protéine ExsA nous suggérait que ces deux protéines sont capables de former des hétérodimères. Nous avons donc essayé de visualiser *in vitro* la formation de cet hétérodimère

### III.2.3.1 Etude de l'état oligomérique et approche structurale.

Afin de visualiser la forme dimérique du domaine N-ter, nous avons décidé d'observer sa dimérisation en présence de deux agents pontants, l'EDC et le glutaraldéhyde. Comme pour la protéine entière, nous n'avons pas obtenu de résultats permettant de mettre en évidence l'état dimérique de la protéine Nter<sub>H</sub> purifiée *in vitro*.

En collaboration avec l'équipe de Jean-Pierre Simorre du LRMN (IBS), nous avons tenté d'étudier la structure du domaine N-ter de ExsA. La RMN est une technique puissante pour analyser la structure de petites protéines solubles, jusqu'à 50 kDa. La masse moléculaire de 40 kDa du dimère prédit permettait donc son étude structurale par cette technique.

La résolution de la structure d'une protéine par RMN nécessite une quantité élevée de protéine et à une concentration élevée. Typiquement pour étudier la structure d'une protéine de 20 kDa, cette technique nécessite que la protéine se trouve à une concentration d'au moins 100  $\mu$ M (2 mg/ml) dans un volume inférieur à 250  $\mu$ l. Enfin, la protéine doit se trouver dans un solvant contenant une concentration en sel inférieure à 500 mM et de préférence en absence de détergent : la présence de sel affecte la susceptibilité magnétique de l'échantillon tandis que la fixation de détergent sur la protéine peut entraîner la formation d'un objet deux fois plus gros que la protéine seule et /ou perturber le spectre.

Pour respecter ces contraintes, nous avons tenté d'obtenir la protéine purifiée Nter<sub>H</sub> à la concentration de 2 mg/ml exigée pour cette expérience, en concentrant un échantillon issu d'une analyse par SEC de la protéine (0,5 mg/ml dans le tampon suivant: 20 mM NaHPO<sub>4</sub>, 250 mM NaCl, 1 mM DTT, pH=8) par ultrafiltration. La concentration a été atteinte, mais la protéine a rapidement précipitée.

Pour poursuivre cette étude, nous devons donc obtenir une protéine plus soluble. Pour cela, nous avons entrepris d'une part d'identifier un tampon dans laquelle la protéine Nter<sub>H</sub> est soluble dans les conditions exigées par la technique, et d'autre part de définir la région la plus stable de cette protéine lorsqu'elle est surproduite.

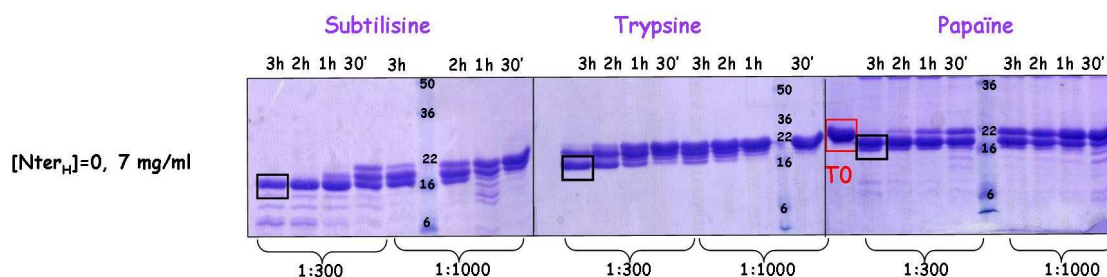
Pour la première approche, un robot permettant d'analyser l'effet de 99 tampons sur la solubilité de la protéine a été mis à notre disposition. Malgré les nombreuses conditions testées et la présence dans certains de ces tampons de molécules permettant de stabiliser la protéine, tel le glycérol ou le saccharose, et même de détergent, tel le CHAPs ou le SDS à de faibles concentrations, nous n'avons identifié aucun tampon ayant la propriété de stabiliser la protéine Nter<sub>H</sub> sous sa forme soluble à la concentration de 2 mg/ml.

Pour déterminer si l'instabilité de ce domaine purifié était due à un découpage incorrect de ce domaine lorsque nous avons identifié les domaines de ExsA, nous avons testé en collaboration avec Isabel Ayala du LRMN la solubilité de protéines plus courtes. Pour cela, soit une, soit deux, soit trois hélices  $\alpha$  prédites situées à l'extrémité N-terminale ont été éliminées de la séquence protéique. La solubilité des protéines purifiées *in vitro* correspondantes, Nter<sub>H</sub> 1-132, Nter<sub>H</sub> 1-152 et Nter<sub>H</sub> 1-162, a ensuite été testée comme précédemment. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats qu'avec la protéine Nter<sub>H</sub> 1-168.

Enfin, notre dernière tentative a été de définir une partie de la protéine repliée de façon plus compacte, en effectuant des tests de protéolyse ménagée en présence de plusieurs protéases dans le but de couper les zones flexibles. Nous avons incubé la protéine purifiée Nter<sub>H</sub> avec différentes protéases (trypsine, chymotrypsine, élastase, subtilisine, thermolysine et papaïne) selon des rapports protéine:enzyme de 1:300 et 1:1000 à température ambiante et sur des durées de 30 min à 3h. La digestion a été arrêtée en ajoutant du tampon Laemmli 1X et en chauffant les échantillons, qui sont ensuite analysés par SDS-PAGE. Parmi les protéases, la



chymotrypsine, l'élastase et la thermolysine n'ont pas affecté la protéine alors que la trypsine, la subtilisine et la papaïne ont conduit à un fragment protéolytique stable qui a pu être analysé par spectrométrie de masse dénaturante et séquençage N-terminal (Figure 46).



**Figure 46. Profils de digestion de la protéine Nter<sub>H</sub> en fonction des protéases, du ratio protéine:protéase et du temps d'incubation.**

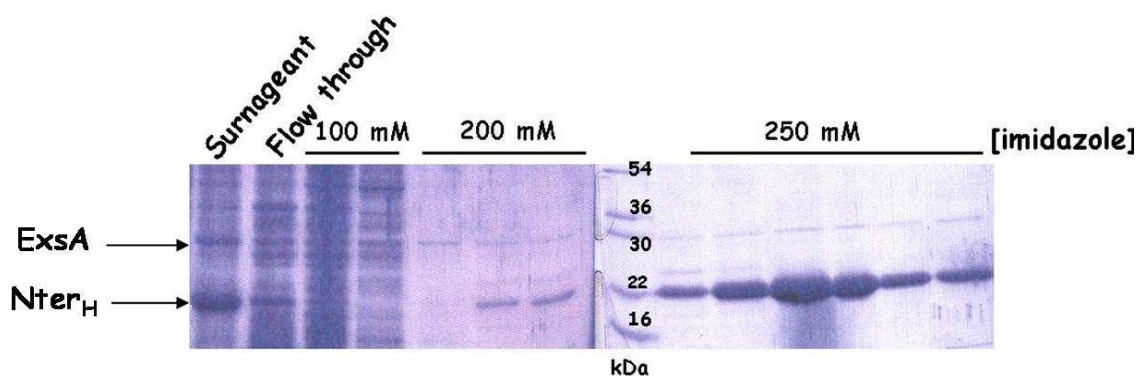
Les protéases utilisées et les temps d'incubation sont indiqués au dessus des gels, les ratios protéine:protéase au dessus des pistes correspondantes. Le cadre rouge indique la protéine non protéolysée et les cadres noirs les échantillons choisis pour effectuer le séquençage N-terminal. Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués sur chacun des gels en kDa.

Cette expérience a permis de mettre en évidence que la région 1-168 de ExsA était résistante à la protéolyse (Figure 46, encadré noir). Seul le tag histidine a été sensible à la digestion par les protéases.

Ce résultat indique le bon repliement et la forme compacte de cette protéine qui correspond exactement au domaine N-ter que nous avons défini. Le découpage que nous avons effectué pour définir les domaines semble donc correct. Cependant, la tendance à l'agrégation de la protéine à la concentration élevée requise par la RMN nous a forcés à stopper nos expériences.

### III.2.3.2 Interaction ExsA/Nter<sub>H</sub>

Les expériences *in vivo* nous ont suggéré la formation d'un hétérodimère entre le domaine N-ter surproduit et la protéine ExsA endogène que nous avons tenté de visualiser *in vitro*. Pour cela, les protéines ExsA et Nter<sub>H</sub> ont été co-produites dans *E. coli*. L'extrait cellulaire contenant les deux protéines a ensuite été chargé sur une colonne de chromatographie d'affinité de nickel afin d'éluer la protéine Nter<sub>H</sub> seule ou en complexe avec ExsA.



**Figure 47. Analyse par SDS-PAGE de l'élution des protéines Nter<sub>H</sub> et ExsA sur colonne de chromatographie d'affinité au nickel**

Les fractions issues de la purification ont migré sur SDS-PAGE puis ont été colorées au bleu de Coomassie. Les protéines sont indiquées par des flèches. La nature des échantillons déposés est indiquée au dessus des pistes : Surnageant= surnageant après ultracentrifugation, Flow Through= les protéines chargées mais non retenues sur la colonne, et X mM= fraction d'élution à la concentration indiquée en imidazole (en mM). Les poids moléculaires standard sont indiqués en kDa sur le gel.

Seule la protéine Nter<sub>H</sub> est retenue sur la colonne de chromatographie d'affinité (Figure 47). Cette protéine est majoritairement éluée à une concentration de 250 mM d'imidazole (Figure 47).

Puisque cette co-purification n'a pas fonctionné, nous avons testé la combinaison inverse : la protéine ExsA fusionnée à l'étiquette hexa-histidine et le domaine Nter sous forme native. Les deux protéines ont éluées indépendamment.

Nous ne sommes donc pas parvenus à observer l'hétérodimère présumé, ExsA/Nter.

### III.2.4 Etude des protéines <sub>H</sub>Cter et C/EBP-Cter

Les structures de la protéine MarA et des domaines « 2HTH » de AraC et Rob indiquent que ce domaine conservé entre les protéines de type AraC/XylS est un monomère en solution (Rodgers and Schleif, 2009; Kwon *et al.*, 2000; Rhee *et al.*, 1998). Cette forme monomérique est en accord avec le volume d'élution du domaine C-ter de ExsA analysé par SEC (Figure 43).

Lors des expériences *in vivo*, nous avons analysé l'activité transcriptionnelle de la protéine C/EBP-Cter afin de déterminer si la dimérisation du domaine C-ter de ExsA était la condition nécessaire pour qu'il soit aussi actif que la protéine

entière (Figure 36). L'ajout de l'étiquette C/EBP ne semblait pas augmenter l'activité transcriptionnelle de ce domaine mais, pour pouvoir conclure, nous nous étions demandé si la protéine fusion était effectivement dimérique et si elle était stable.

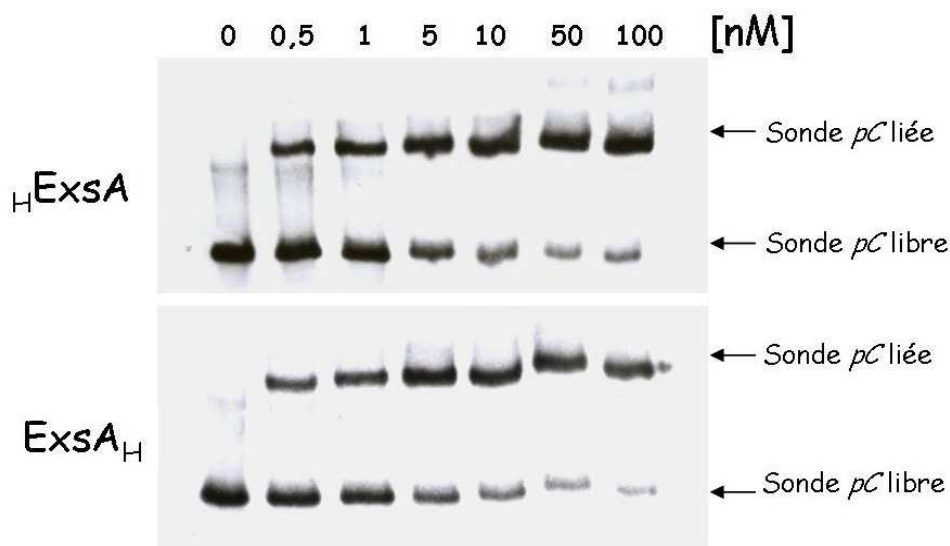
Nous avons donc surproduit et purifié la protéine  ${}_{\text{H}}\text{C/EBP-Cter}$  par chromatographie d'affinité comme décrit pour les protéines  $\text{ExsA}_{\text{H}}$  et  $\text{Nter}_{\text{H}}$ . Cependant lors de l'analyse de la protéine C/EBP-Cter par SEC, nous n'avons jamais observé l'élution de la protéine. Cette expérience a été réalisée de nombreuses fois et met en cause le repliement correct et la stabilité de la protéine *in vitro*. Puisqu'il nous est impossible de conclure sur l'état oligomérique et la stabilité de la protéine  ${}_{\text{H}}\text{C/EBP-Cter}$  *in vitro*, nous ne pouvons pas conclure sur l'activité de cette protéine *in vivo*.

L'ensemble de ces travaux ne nous a pas permis de conclure sur la nécessité de la dimérisation du C-ter pour qu'il soit aussi actif que la protéine ExsA entière.

### III.3 Caractérisation fonctionnelle

#### III.3.1 Propriétés de fixation à l'ADN des protéines $\text{ExsA}_{\text{H}}$ et ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$

Ayant obtenu la protéine ExsA sous forme soluble en présence de détergent, les propriétés de fixation à l'ADN des protéines  $\text{ExsA}_{\text{H}}$  et  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  ont été comparées; pour cela, des expériences de retard sur gel ont été réalisées en présence de la sonde *pC* comportant dans sa séquence les sites de fixation de ExsA sur le promoteur *pC* (Figure 48). Dans cette expérience, la fixation de la protéine ExsA sur la sonde *pC* entraîne la formation d'un complexe nucléoprotéique qui migre plus lentement que la sonde *pC* libre (retard).



**Figure 48. Analyse *in vitro* de la fixation sur la sonde *pC* des protéines ExsA<sub>H</sub> et <sub>H</sub>ExsA**

Retard sur gel du promoteur *pC* en présence des protéines ExsA<sub>H</sub> et <sub>H</sub>ExsA. Le fragment *pC* biotinylé (60 mer, 0,2 nM) et du polydIdC (250 nM, ADN non spécifique) ont été incubés 15 min à 25°C en présence de concentrations croissantes en protéines. Les échantillons ont migré sur gel de polyacrylamide non dénaturant puis ont été électrotransférés sur une membrane de nylon. La révélation a été réalisée avec le kit de gel retard « Lightshift chemiluminescent ».

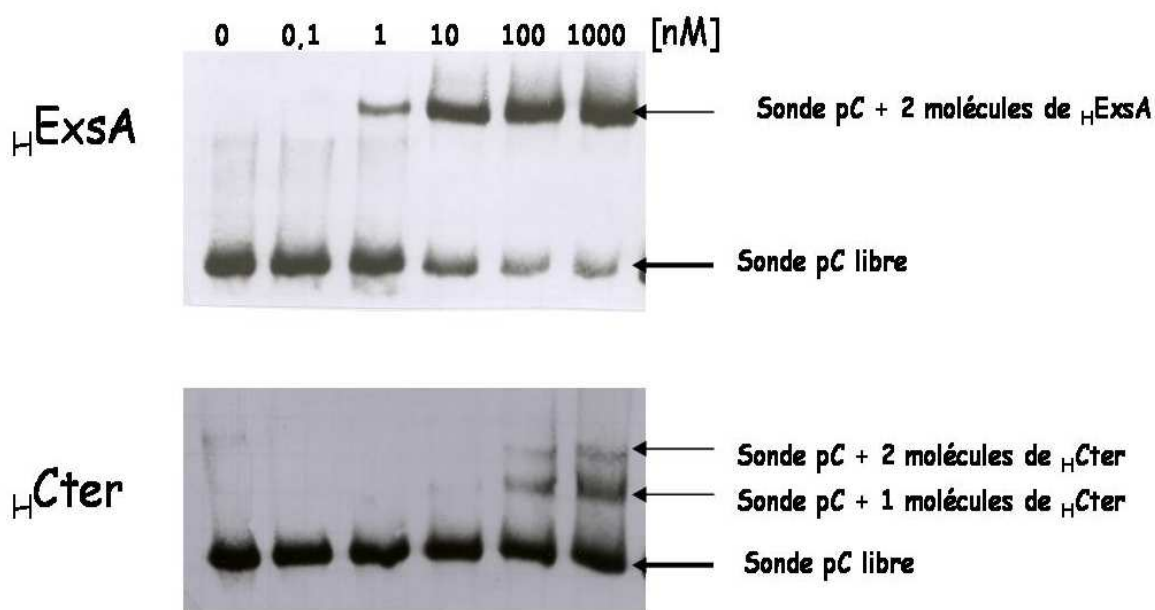
La Figure 48 montre que les deux protéines purifiées se fixent dès une concentration de 0,5 nM sur la sonde *pC*. A des concentrations équivalentes, les deux protéines induisent un retard similaire de la sonde, et une seule bande est observée.

Ce résultat indique qu'une seule molécule de ExsA (monomère ou dimère ?) se fixe sur le promoteur. De plus, les protéines purifiées ExsA<sub>H</sub> et <sub>H</sub>ExsA sont capables de se fixer à l'ADN avec une affinité similaire *in vitro* (indépendamment de la position de l'étiquette).

### III.3.2 Propriétés de fixation à l'ADN des protéines Cter et <sub>H</sub>Cter

L'étude de la fonctionnalité des protéines *in vivo* a suggéré que le domaine C-ter seul serait capable de se fixer sur l'ADN mais n'activerait pas pleinement la transcription. Afin de déterminer si cette différence d'activité entre le domaine

isolé et la protéine entière était due à un défaut de fixation à l'ADN du domaine seul, nous avons comparé *in vitro* la fixation des protéines  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  et  ${}_{\text{H}}\text{Cter}$  sur la sonde  $pC$ .



**Figure 49. Fixation *in vitro* sur le promoteur  $pC$  des protéines  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  et  ${}_{\text{H}}\text{Cter}$**   
Retard sur gel du promoteur  $pC$  en présence des protéines  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  et  ${}_{\text{H}}\text{Cter}$ . Le fragment  $pC$  biotinylé (60 mer; 0,2 nm) et du polydIdC (250 nM, ADN non spécifique) ont été incubés 15 min à 25°C en présence de concentrations croissantes en protéines. Les échantillons ont été analysés et traités comme décrit dans la légende de la Figure 48.

La Figure 49 nous montre que le domaine  ${}_{\text{H}}\text{Cter}$  isolé est capable de se fixer à l'ADN, mais à la différence de  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$ , 2 bandes retardées sont visibles: un premier retard apparaît à partir d'une concentration de 10 nM tandis qu'un second retard, moins intense, est visible dès une concentration de 100nM.

Ceci nous suggère que deux monomères du domaine  ${}_{\text{H}}\text{Cter}$  sont capables de se fixer sur cette séquence  $pC$ , et par voie de conséquence, le retard observé en présence de  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  doit correspondre à la fixation d'un dimère de ce facteur de transcription.

Bien que capable de se fixer seul sur la sonde, le domaine C-ter possède beaucoup moins d'affinité que  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  pour ses cibles ADN (au moins 100 fois moins) (Figure 49). Les constantes d'affinité pour  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  et le domaine C-ter n'ont

pas pu être déterminées précisément avec notre technique de retard sur gel, qui n'est pas assez quantitative du fait de l'étape d'électrotransfert.

En conclusion, cette expérience montre que le domaine N-ter est nécessaire à la formation d'un dimère de ExsA requis pour une fixation efficace à l'ADN.

### III.3.3 Fonctionnalité de la protéine Nter<sub>H</sub>

L'étude de la fonctionnalité des domaines *in vivo* nous a suggéré que le domaine Nter était nécessaire à la dimérisation de ExsA, et l'analyse par SEC peut nous laisser penser que ce domaine serait un dimère en solution. Malheureusement, nous n'avons observé ni la formation d'hétérodimère après co-production des deux protéines en système hétérologue, ni la dimérisation claire de la protéine ou du domaine N-ter.

Nous avons donc émis une autre hypothèse pour comprendre la diminution de l'activité transcriptionnelle dans la souche CHA lorsque le N-ter est surproduit : ce domaine surproduit interférait dans la fixation à l'ADN de la protéine ExsA endogène. Pour tester cette hypothèse, une expérience de retard sur gel a été effectuée, dans des conditions similaires à celles décrites sur la figure 48, en ajoutant la protéine Nter<sub>H</sub> à des concentrations croissantes (de 0 à 20  $\mu$ M) avant ou après l'incubation de ExsA<sub>H</sub> et <sub>H</sub>ExsA avec la sonde pC afin d'analyser son effet sur la formation du complexe nucléoprotéique. Aucun effet du domaine N-ter sur la fixation à l'ADN des protéines ExsA<sub>H</sub> et <sub>H</sub>ExsA *in vitro* n'a été observé (résultat non montré).

Enfin, l'étude des propriétés d'interaction de ce domaine avec l'anti-activateur ExsD est traitée dans le chapitre VI « Etude de l'interaction ExsA-ExsD ». Les résultats obtenus nous ont indiqué que ce domaine est nécessaire, mais pas suffisant, à cette interaction protéine/protéine qui régule l'activité du facteur de transcription ExsA.

## IV. Discussion

### IV.1 Rôles des domaines de ExsA et dimérisation de la protéine

En débutant cette étude, nous souhaitions déterminer si ExsA activait la transcription en tant que monomère ou dimère, et quels étaient les rôles des domaines N-et C-terminaux dans son activité.

ExsA appartient à la famille des régulateurs de type A/X qui possèdent en commun un domaine « 2HTH ». Comme nous l'avons vu dans le Chapitre III, certains de ces régulateurs possèdent un domaine « 2HTH » qui contient tous les composants nécessaires à l'activité transcriptionnelle. Par exemple, les domaines C-ter des protéines dimériques RhaS et XylS, lorsqu'ils sont surproduits, activent la transcription de façon similaire à la protéine entière *in vivo* (Wickstrum *et al.*, 2007 ; Kaldalu *et al.*, 2000)). Bien qu'ayant une affinité inférieure pour la séquence cible à celle de la protéine entière, la surproduction du domaine C-ter *in vivo* permet de pallier ce défaut d'affinité par une concentration élevée en protéine. Par contre, d'autres régulateurs de type A/X possèdent un domaine « 2HTH » qui ne contient pas tous les composants nécessaires à l'activité transcriptionnelle du régulateur : leur domaine N-ter est directement impliqué dans cette activité. Pour exemple, la dimérisation du domaine N-ter de ToxT permet la fixation sur l'ADN du domaine C-ter et serait directement engagé dans l'interaction avec l'ARN polymérase (Prouty *et al.*, 2005). Par conséquent le domaine C-ter de ToxT, surproduit et dimérisé artificiellement, n'est pas capable d'activer seul la transcription.

#### Le domaine C-ter de ExsA

A travers notre approche *in vivo*, nous avons pu observer que le domaine C-ter de ExsA surproduit possède une activité transcriptionnelle inférieure à celle de la protéine entière dans la souche  $\Delta exsA$  et qu'il entraîne une diminution de

l'activité du promoteur *pC* dans la souche CHA. La surproduction du C-ter ne pallie donc pas à son défaut d'activité transcriptionnelle.

Nous avons confirmé *in vitro* que le C-ter de ExsA est bien capable de se fixer seul sur l'ADN en montrant que deux monomères se fixent sur le promoteur *pC*. En revanche, ce domaine seul possède une affinité pour *pC* au moins 100 fois inférieure à celle de la protéine ExsA (Figure 49).

Cette grande différence d'affinité entre les deux protéines pour *pC* remet en question l'hypothèse selon laquelle le domaine C-ter surproduit dans la souche sauvage entrerait en compétition avec la protéine ExsA endogène pour la fixation à l'ADN. En effet, la quantité de domaine C-ter surproduit dans cette souche ne semble pas 100 fois supérieure à celle de la protéine endogène. Il est donc peu probable que ce domaine surproduit occupe tous les sites et empêche ExsA de se fixer. Nous pouvons donc envisager deux possibilités : la diminution d'activité transcriptionnelle observée en présence du C-ter surproduit est due à un autre mécanisme moléculaire qu'un phénomène de compétition, soit la technique d'immunodétection utilisée n'est pas suffisamment quantitative pour rendre compte des différences réelles de quantité de protéine.

L'activité transcriptionnelle du domaine C-ter surproduit dans la souche  $\Delta exsA$  nous indique que ce domaine est bien capable d'activer la transcription malgré sa très faible affinité pour le promoteur *pC* ; il était donc probable que ce domaine possède tous les composants nécessaires à l'activation de la transcription. Pour déterminer si le défaut d'activité du C-ter était dû à un défaut de dimérisation (dimérisation via les domaines N-ter et nécessaire à une bonne fixation sur l'ADN), nous avons entrepris de fusionner ce domaine à un motif « leucine zipper ». Les activités des domaines monomérique et « dimérique » ont ensuite été comparées. Malheureusement, l'hétérogénéité des résultats et l'instabilité de la protéine C/EBP-Cter ne nous ont pas permis de déterminer si la dimérisation du domaine C-ter permettait d'augmenter son activité. Pour tenter d'obtenir une protéine plus stable que C/EBP-Cter et ainsi répondre à cette question, une possibilité aurait été



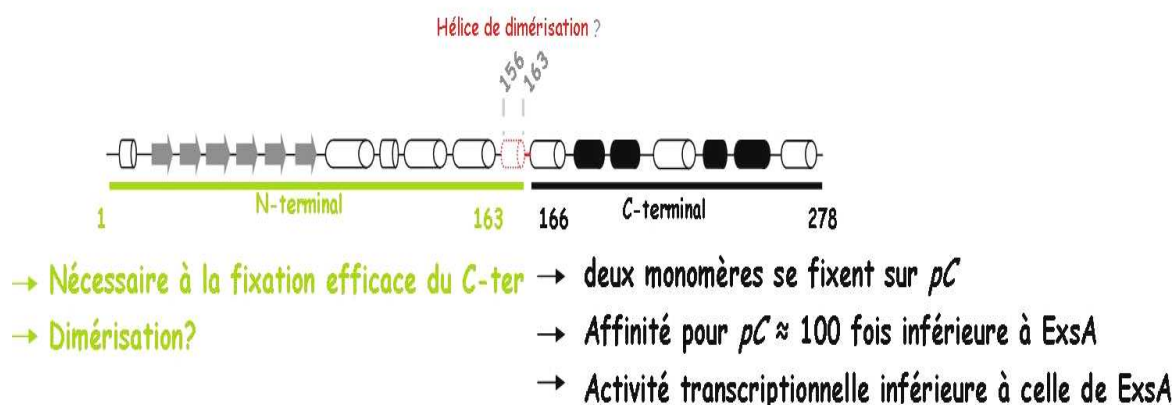
de fusionner le C-ter à un autre domaine de dimérisation, comme par exemple celui du bactériophage  $\lambda$  comme cela a été réalisé pour XylS (Kaldalu *et al.*, 2000).

Il est à noter malgré tout que la dimérisation artificielle d'un domaine de fixation à l'ADN ne permet pas toujours de reproduire les interactions qui permettent le bon positionnement de ce domaine sur l'ADN. En effet, alors que la protéine XylS active la transcription sous forme dimérique, son domaine C-ter dimérisé artificiellement possède une activité transcriptionnelle inférieure à celle du domaine monomérique (Kaldalu *et al.*, 2000).

### Le domaine N-ter

En raison de l'effet « dominant négatif » observé *in vivo* sur l'activité de la protéine ExsA endogène lorsque le domaine **N-ter** est surproduit, nous avons émis l'hypothèse de la formation *in vivo* d'hétérodimères inactifs entre ExsA et ce domaine. De plus, nous avons montré que l'hélice  $\alpha$  156-163 du domaine N-ter était responsable de cet effet. Ces résultats *in vivo* suggéraient donc que ExsA est un **dimère**. De plus, cette dimérisation s'effectuerait à travers le domaine N-ter et impliquerait en particulier l'hélice  $\alpha$  156-163.

*In vitro*, nous avons ensuite observé que deux monomères du domaine C-ter se fixent sur le promoteur *pC* tandis qu'une seule molécule de ExsA se fixe. Un dimère de ExsA se fixerait donc bien sur le promoteur *pC* et le domaine N-ter de ExsA permettrait la fixation efficace de la protéine sur l'ADN (Figure 50).



**Figure 50. Conclusion de notre étude à propos de la fonctionnalité des domaines de ExsA**

Des expériences de transcription *in vitro* pourraient permettre de déterminer si le domaine N-ter est aussi impliqué dans l'interaction avec l'ARN polymérase ou si ce domaine Cter isolé comporte tous les composants nécessaires à l'activation de la transcription.

### **Production/surproduction**

Notre approche *in vivo* a été d'étudier la surproduction de ExsA et ses domaines dans les souches sauvage et  $\Delta$ ExsA. Néanmoins, il aurait été aussi très informatif de voir l'effet de la production de ces domaines, notamment pour déterminer si le domaine C-ter produit en concentration physiologique était toujours capable de diminuer l'activité transcriptionnelle de ExsA dans la souche CHA et si il était doué d'activité transcriptionnelle dans la souche  $\Delta$ ExsA. Ces expériences auraient permis de mieux comparer les affinités pour l'ADN et les activités transcriptionnelles de ExsA et du domaine seul à des quantités identiques *in vivo*. Malheureusement, l'insertion de la fusion  $pC^+$ -*exsA* dans le chromosome de la souche  $\Delta$ ExsA n'a pas permis de compléter pleinement le mutant (problème de stabilité de l'ARN, nécessité du promoteur *pA* ?). Il n'a donc pas été possible de réaliser ces expériences.

## **IV.2 Etude de l'état oligomérique *in vitro***

Pour confirmer notre hypothèse à propos de la dimérisation de ExsA à travers son domaine N-ter, de nombreuses approches biochimiques et/ou structurales ont été utilisées pour étudier l'état oligomérique des protéines purifiées ExsA<sub>H</sub> et Nter<sub>H</sub> et mettre en évidence une interaction entre ces deux protéines.

L'analyse par SEC de la protéine Nter<sub>H</sub> a montré une protéine soluble dont le volume d'élution pouvait correspondre à un dimère d'une protéine globulaire en solution. Par contre, aucune autre expérience de biochimie n'a permis d'observer

l'existence d'un dimère. De plus, des analyses préliminaires de la protéine purifiée Nter<sub>H</sub> par AUC et par spectroscopie RMN ont été menées et ont suggéré que cette protéine serait un monomère en solution. Je n'ai pas décrit ces expériences dans ce chapitre, car la majorité de la protéine était agrégée lors de l'analyse par AUC ce qui a empêché d'obtenir toutes les données (mesures d'interférence et d'absorbance) nécessaires pour clairement définir la masse molaire de la protéine en solution. Concernant l'étude par RMN, seul un spectre 1D a été réalisée ; un spectre en 2D aurait été nécessaire pour confirmer qu'il s'agissait bien d'un monomère en solution et nous apporter des informations sur la structure. Malheureusement, les propriétés d'agrégation de la protéine ont stoppé ces études préliminaires.

Le volume d'élution de la protéine ExsA<sub>H</sub> en présence de Tween 20 lors de son analyse par SEC pouvait correspondre à un dimère en solution. Cependant, l'équipe de T. Yahr a montré récemment à travers une expérience de centrifugation sur gradient de sucrose que, dans ces conditions, ExsA est un monomère en solution (Brutinel *et al.*, 2008).

Enfin, nous n'avons pas observé d'interaction entre ExsA et le domaine N-ter, ni *in vivo* suite à la co-production des deux protéines dans *E. coli*, ni *in vitro* à travers des tests ELISA (difficilement interprétables du fait de l'adsorption aspécifique des protéines sur la plaque 96 puits).

Puisqu'à travers toutes ces expériences, nous n'avons observé ni la dimérisation de ExsA, ni du N-ter, nous avons émis l'hypothèse que ExsA dimérise uniquement sur l'ADN. Cela a précédemment été montré pour RsaL, un répresseur qui se fixe sur le promoteur de *lasI* afin d'inhiber sa transcription (Rampioni *et al.*, 2007). Pour savoir si l'état oligomérique de ExsA était fonction de la présence d'ADN, j'ai entrepris de ponter chimiquement la protéine ExsA<sub>H</sub> en présence ou absence d'ADN. De plus, afin de démontrer que cette dimérisation était dépendante du N-ter, la même expérience a été réalisée avec le domaine C-ter seul. Malheureusement, dans l'ensemble de ces expériences, j'ai observé la

formation de nombreux oligomères aspécifiques en présence d'agent pontant dus à l'agrégation des protéines.

Enfin, pour montrer que l'hélice  $\alpha$  156-163 du domaine N-ter de ExsA est impliquée dans cette dimérisation et donc dans la fixation efficace de ExsA sur l'ADN, nous voulions comparer les propriétés de fixation à l'ADN de la protéine ExsA sauvage et de la protéine ExsA « GG » mutée (mêmes mutations que la protéine ExsA<sub>168</sub> »GG», les leucines 158 et 162 substituées par des glycines « GMSVGRQLSNR »). Nous ne sommes pas parvenus à surproduire cette protéine afin de la purifier. Il est possible que la modification de cette hélice  $\alpha$  ait rendue instable la protéine entière contrairement au domaine N-ter.

Malgré toutes ces expériences, nous n'avons pas pu déterminer les états oligomériques de ExsA et du N-ter et par conséquent il n'a pas été possible de confirmer *in vitro* que ExsA est un dimère et que le N-ter est bien le domaine de dimérisation. Notons que de manière similaire au N-ter de ExsA, un phénomène d'« effet dominant négatif » est observé *in vivo* sur l'activité de la protéine ToxT endogène lorsque son domaine N-ter est surproduit dans la souche sauvage. Pourtant, la formation de cet hétérodimère n'a jamais été démontrée et la dimérisation de ToxT sur les différents promoteurs qu'il régule prête encore à discussion (Bellair and Withey, 2008; Shakhnovich *et al.*, 2007; Prouty *et al.*, 2005 ).

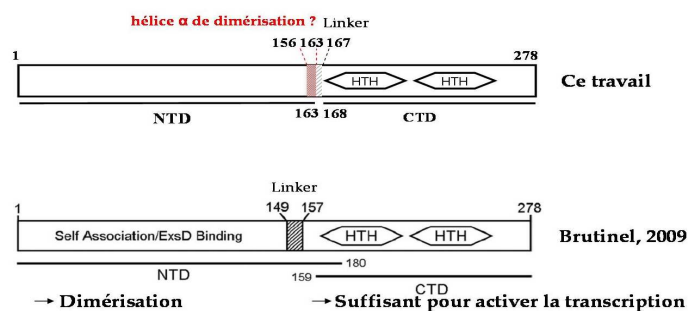
En 2008, l'équipe de T. Yahr a montré que la protéine <sup>H</sup>ExsA purifiée est un monomère en solution (Brutinel *et al.*, 2008). De plus, la séquence consensus de fixation de ExsA sur les promoteurs du SST3 a été redéfinie (voir chapitre VII « Conclusions et Perspectives ») et il a été montré que deux monomères de ExsA se fixent sur cette séquence. Les propriétés de fixation à l'ADN de ExsA pourrait différer selon les promoteurs du SST3 (Brutinel *et al.*, 2008): de coopérative avec une forte courbure de l'ADN observée pour *pC*, la fixation pourrait être non coopérative avec faible courbure d'ADN sur les promoteurs *pT* et *pD* (Brutinel *et al.*, 2009; Brutinel *et al.*, 2008). Cette fixation coopérative sur le promoteur *pC* implique qu'un monomère de ExsA se fixe sur un premier site du promoteur et

recrute un second monomère sur le second site du promoteur, grâce à des interactions se faisant à travers leur domaine N-ter (Brutinel *et al.*, 2009).

Cette étude est en accord avec nos résultats, à savoir que ExsA active la transcription sous forme dimérique sur le promoteur *pC* et que cette dimérisation nécessite le domaine N-ter de la protéine. Par contre, cette dimérisation ne s'effectuerait que sur l'ADN entre deux monomères.

Le domaine C-ter de ExsA a également été étudié en détail par la même équipe (Brutinel *et al.*, 2009). Il induit une courbure de l'ADN identique à celle de la protéine ExsA entière. Par contre, les expériences de retard sur gel et de transcription *in vitro* montrent que le C-ter nécessite seulement une concentration 4 fois plus élevée pour induire un retard similaire à celui de ExsA et qu'il possède une activité transcriptionnelle *in vitro* seulement 4 fois inférieure à celle de ExsA. Le domaine C-ter de ExsA possède donc une affinité pour l'ADN qui n'est que très faiblement inférieure à celle de la protéine entière et il contiendrait tous les composants nécessaires à l'activation de la transcription. Étonnamment, dans leur expérience de complémentation *in vivo* dans la souche  $\Delta exsA$ , l'activité transcriptionnelle du domaine C-ter surproduit est 40 fois inférieure à celle de la protéine ExsA surproduite (Brutinel *et al.*, 2009), ce qui est plus en accord avec nos résultats. Les auteurs expliquent cette différence d'activité par une quantité inférieure de domaine seul surproduit par rapport à ExsA. Dans nos expériences ces quantités sont équivalentes.

Pour expliquer cette différence quant à la fonctionnalité que nous avons accordé au domaine C-ter, les limites des 2 domaines de ExsA que nous proposons sont représentées et comparées à celles décrites dans la littérature (Brutinel *et al.*, 2009) (Figure 51):



**Figure 51. Comparaison de l'organisation et de la fonction des domaines de ExsA entre les deux études.**

Pour « découper » ExsA, nous avons donc dans un premier temps identifié ce domaine « 2HTH » au sein de sa structure secondaire (168-278). N'ayant pas identifié de région en amont de ce domaine qui possédait les caractéristiques d'un linker, le domaine N-ter a été défini comme étant l'autre partie de la protéine (1-163), incluant l'hélice  $\alpha$  156-163. Nous pouvons justifier notre découpage de la protéine ExsA par les résultats *in vitro*. En effet, nous avons pu observer *in vitro* que les **deux** domaines sont plus solubles que la protéine entière et la protéolyse de la protéine N-ter<sub>H</sub> nous a indiqué que la région de cette protéine repliée de manière compacte correspond exactement au domaine N-ter. Finalement, la région de 164-167 de 4 aa non structurée est proposée comme linker entre les deux domaines, mais seule une étude fonctionnelle permettra de le confirmer.

Le découpage de la protéine proposée par l'équipe de T. Yahr a été effectué à l'inverse de notre approche. Les auteurs ont tout d'abord identifié un **linker flexible** dans la **région 149-157** grâce à un logiciel de prédiction (Figure 51) (Tanaka *et al.*, 2006). Ensuite, le domaine N-ter a été défini comme étant la région **1-148** et le C-ter **158-278** (Figure 51).

Nous ne pouvons pas exclure que la différence de 11 aa entre les deux domaines prédits selon les études comme étant le C-ter de ExsA soit responsable de la différence d'activité transcriptionnelle attribuée à ce domaine que nous avons observé. Par contre, le fait que ces 11 aa incluent en partie l'hélice  $\alpha$  156-163, qui est

responsable de l'effet dominant négatif d'après nos résultats, rend difficile la compréhension du rôle exact de cette hélice dans l'activité de ExsA. Notons que la protéine utilisée dans leurs expériences *in vitro* et *in vivo* pour étudier le rôle du N-ter ne correspond pas au domaine qu'ils ont défini : région 1-180 au lieu de 1-149. Nous rediscuterons de cette différence de 31 aa dans le chapitre VI « Etude de L'inhibition de ExsA par son anti-activateur ExsD ».

Le découpage des domaines d'une protéine est donc une étape cruciale lorsqu'on débute ce type d'étude. Tous les acides aminés indispensables à la fonction du domaine doivent être présents, au risque de perdre des informations.

### **IV.3 L'effet dominant négatif.**

Cet effet « dominant négatif » est à l'origine de notre hypothèse selon laquelle ExsA est un dimère car nous l'expliquions par la formation d'hétérodimères inactifs entre ExsA et le N-ter. N'ayant pas observé d'interaction entre les deux protéines *in vitro*, ni leur dimérisation, nous avons émis d'autres hypothèses pour comprendre comment le N-ter surproduit était capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de ExsA dans la souche sauvage. Le phénomène de pré-recrutement de l'ARN polymérase nous a semblé peu probable car ExsA ne possède pas les caractéristiques des protéines qui utilisent ce mécanisme d'activation de la transcription (partie II.2 et Chapitre III). Nous avons ensuite émis l'hypothèse que le domaine N-ter pouvait interférer dans la fixation sur l'ADN de ExsA endogène. Mais dans nos expériences de retard sur gel, la protéine Nter<sub>H</sub> n'a pas d'effet sur la fixation de ExsA *in vitro*.

Lorsque le domaine N-ter est surproduit dans la souche sauvage, la protéine ExsA endogène n'est plus présente dans la cellule. Comme la transcription de l'opéron *exsCEBA* est autorégulée par ExsA, il n'était pas possible de déterminer si l'effet dominant négatif du N-ter s'exerçait au niveau transcriptionnel ou post-

transcriptionnel. Pour répondre à cette question, ExsA et le domaine N-ter ont été exprimés sous le contrôle d'un promoteur constitutif ExsA-indépendant, soit seul, soit ensemble en système hétérologue *E. coli*. Puis, la synthèse de ExsA a été analysée par immunodétection, en présence ou en absence du domaine N-ter. Dans ce modèle aussi, le niveau d'expression de ExsA est presque nul en présence du domaine N-ter surproduit (résultat S. Elsen). L'effet dominant négatif se déroule donc au niveau post-transcriptionnel. Le domaine N-ter interagirait avec la protéine ExsA entière ce qui affecterait sa stabilité. Notons que l'équipe de T. Yahr a aussi observé ce phénomène et est parvenue à la même conclusion (Brutinel *et al.*, 2009).

Ceci conforte une fois de plus la formation d'un complexe Nter/ExsA. Pourquoi n'avons-nous pas observé ce complexe ? Est-il trop instable lorsque ExsA n'est pas fixé à l'ADN et de ce fait il est très rapidement protéolysé dans la cellule ? La protéolyse de ExsA représente-t-elle un mécanisme de régulation spécifique qui permet de contrôler sa concentration intracellulaire ? Observons-nous seulement un phénomène artéfactuel qui permet juste de dégrader un complexe en concentration trop élevée ?

#### **IV.4 Phénotype intermédiaire**

Nous avons remarqué que les protéines ExsA 157, 168 « GG », 152 et 132 n'induisent plus d'effet dominant négatif contrairement à ExsA 1-168 lorsqu'elles sont surproduites dans CHA. Par contre l'activité mesurée dans ces souches n'atteint jamais l'activité transcriptionnelle mesurée dans la souche sauvage. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en absence de l'hélice  $\alpha$  156-163 ou de sa « déstructuration », le domaine N-ter était toujours capable d'interagir avec la protéine ExsA endogène mais pas de manière assez stable pour inhiber complètement son activité ou pour induire sa protéolyse. Puisque nous n'avons



pas de contrôle positif de l'interaction entre ExsA et le domaine N-ter *in vitro*, il n'a pas été possible de confirmer cette hypothèse.

#### IV.5 **Activité des promoteurs**

Nous avons observé une hétérogénéité de l'activité  $\beta$ -galactosidase des fusions *pC-lacZ* et *pG-lacZ*. L'analyse par FACS de la distribution de l'activité de *pC-gfp* au sein de la population bactérienne a montré que cette hétérogénéité n'était pas due à un phénomène de « bistabilité », phénomène rapporté pour le promoteur *pS* (Rietsch and Mekalanos, 2006). En effet, d'après les mesures de fluorescence et d'activité  $\beta$ -galactosidase, deux clones d'une même souche *pC-gfp* peuvent avoir deux activités différentes. Ceci nous a donc forcé à étudier un grand nombre de clones pour réussir à définir une valeur moyenne représentative. Cette hétérogénéité a aussi été observée lors de l'étude d'autres promoteurs régulés par ExsA, *pN* et *pD*, nous ne pouvons pas fournir d'explication à ce phénomène à l'heure actuelle.

Toutefois, cette hétérogénéité nous a freiné dans nos expériences. Nous avons généré des mutants dans les deux motifs « HTH » de ExsA afin d'étudier, par une approche *in vivo*, le rôle de chacun des motifs dans l'activité transcriptionnelle et puis, par une approche *in vitro*, leur rôle dans la fixation à l'ADN. Etant donné les difficultés rencontrées pour interpréter nos résultats lors de l'étude de mutants ponctuels, nous avons stoppé ce projet.



## Chapitre VI

### Etude de l'inhibition de ExsA par son anti-activateur ExsD.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le modèle de la cascade de couplage « sécrétion/synthèse » du SST3 de *P.aeruginosa* propose qu'en absence de sécrétion, ExsC interagit avec ExsE et ainsi ExsD inhibe l'activité de ExsA. L'ouverture du canal de sécrétion permet la translocation de ExsE, ainsi ExsC interagit avec ExsD et ExsA active la transcription des gènes du SST3 (Chapitre II : Régulation du SST3) (Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005; Dasgupta *et al.*, 2004; McCaw *et al.*, 2002)

Au cours de ma thèse, les constantes d'affinité entre ExsC et ExsE et entre ExsC et ExsD ont été définies ainsi que l'état oligomérique de chacune des protéines au sein des complexes ExsC/ExsE et ExsC/ExsD (Zheng *et al.*, 2007). Les valeurs de Kd mesurées, 1 et 18 nM, supportent un modèle pour cette voie de régulation où ExsC interagit préférentiellement avec ExsE ce qui permet l'interaction ExsA/ExsD et résulte en l'inhibition de la transcription des gènes du SST3.

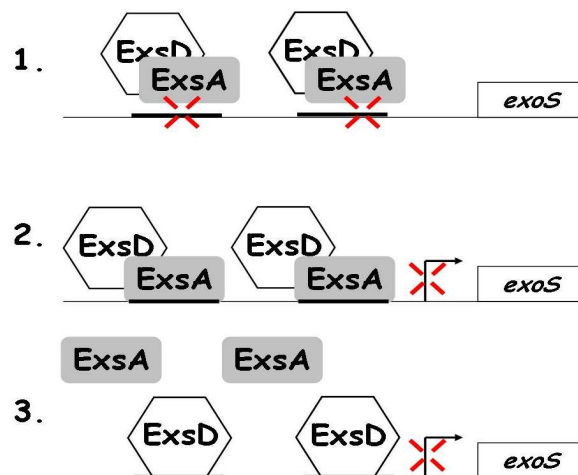
Pour compléter ce modèle, il fallait répondre aux questions suivantes :

- Comment ExsA et ExsD interagissent-ils ?
- Comment ExsD empêche-t-il ExsA d'activer la transcription ?

En 2002, l'interaction entre ExsA et ExsD avait uniquement été mise en évidence par la technique double hybride et rien n'était connu à propos du mécanisme moléculaire grâce auquel ExsD empêche ExsA d'activer la transcription (McCaw *et al.*, 2002). De plus, il n'existait aucune information concernant l'inhibition d'autres régulateurs de type AraC/XylS par des ligands protéiques, tel MxiE chez *S. flexneri* ou HilD chez *S. enterica* (Parsot *et al.*, 2005; Baxter *et al.*, 2003). Cependant, basé sur les connaissances concernant d'autres

facteurs de transcription, nous pouvons envisager trois mécanismes moléculaires d'inhibition (Figure 52):

1. ExsD empêcherait ExsA de se fixer sur les promoteurs et par conséquent d'activer la transcription. Un exemple pour ce mécanisme est celui de l'interaction entre la chaperonne FlhT et FlhDC qui empêche l'expression FlhDC-dépendante des gènes codant pour des protéines de classe 2 du flagelle de *S. enterica* serovar *Typhimurium* (Yamamoto and Kutsukake, 2006).
2. Le complexe ExsD/ExsA se fixerait à l'ADN mais ne serait pas compétent pour activer la transcription. Ce mécanisme a été décrit pour le complexe FleQ-FleN chez *P. aeruginosa* (Dasgupta and Ramphal, 2001). FleN interagit directement avec le facteur de transcription FleQ sans affecter sa fixation à l'ADN. Au sein de ce complexe, FleQ n'est cependant plus capable d'activer la transcription (Dasgupta and Ramphal, 2001).
3. Enfin, ExsD occuperait les sites de fixation de ExsA sur les promoteurs du SST3 et empêcherait la fixation de ce dernier. Cette hypothèse d'occlusion des sites semble peu probable car une interaction directe entre ExsA et ExsD a été montrée. De plus, ExsD ne possède pas de motif de fixation à l'ADN.



**Figure 52. Hypothèses proposées pour le mécanisme d'inhibition.**

Le complexe ExsA/ExsD est représenté de manière schématique par une molécule de chaque protéine. En effet, la stœchiométrie des protéines au sein du complexe n'était pas connue au début de cette étude. La flèche indique le site +1 de la transcription en amont de *exoS*. Seul le promoteur (*pS*) est représenté pour plus de clarté.

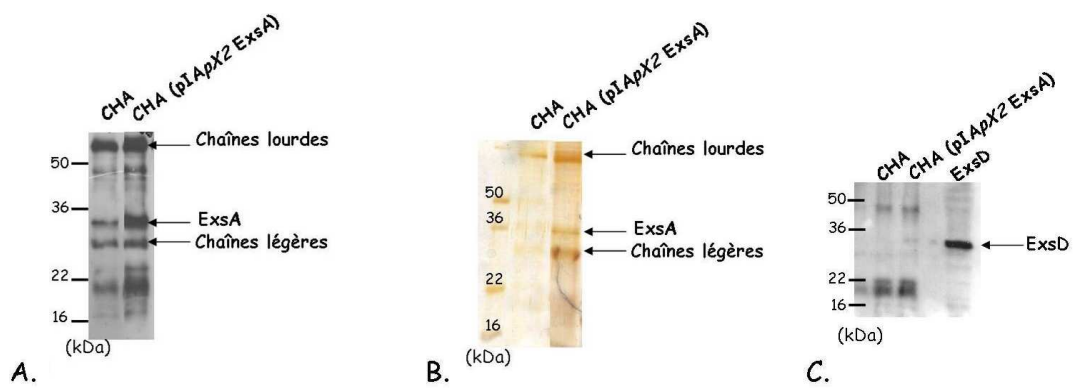
Ce chapitre décrit les expériences que j'ai mises en œuvre pour caractériser l'interaction entre ExsA et ExsD *in vitro* et identifier ce mécanisme moléculaire d'inhibition.

## **I. Mise en évidence de l'interaction directe entre ExsD et ExsA.**

Avant de débiter l'étude de l'interaction entre ExsA et ExsD à partir des protéines purifiées *in vitro*, il était important de confirmer l'interaction directe entre les deux protéines à travers une autre technique que celle du double hybride et de déterminer si ExsD est suffisant pour inhiber l'activité de ExsA.

Tout d'abord, au sein du laboratoire, l'activité transcriptionnelle de ExsA a été analysée dans le système hétérologue *E. coli*, soit seule soit en présence de ExsD. Ces expériences ont permis de mettre en évidence que ExsA seule est capable d'activer la transcription et que ExsD est suffisant pour inhiber cette activité en dehors de toutes autres protéines de *P. aeruginosa* (Thibault *et al.*, 2009).

Ensuite, nous avons entrepris d'étudier l'interaction directe entre ExsA et ExsD en co-immunoprécipitant les deux protéines à partir de souches de *P. aeruginosa*. Des extraits cytosoliques provenant de la souche sauvage CHA et de la souche (CHA (pIA<sub>pX2</sub> ExsA)) surproduisant ExsA ont été incubés avec des billes de protéine G préalablement couplées à des anticorps anti-ExsA ( $\alpha$  Nter). Dans ces conditions expérimentales, les anticorps se fixent à la protéine ExsA seule ou en complexe avec une (des) molécule(s) avec laquelle elle interagit dans le cytoplasme. Afin d'éliminer les interactions non spécifiques, quatre lavages successifs ont ensuite été réalisés. Les protéines spécifiquement fixées aux anticorps anti-ExsA sont ensuite éluées, séparées par SDS-PAGE, puis révélées par coloration à l'argent ou Western-Blot (Figure 53 A, B et C).



**Figure 53. Co-immunoprécipitation d'ExsA et ExsD à partir de la souche CHA sauvage et de la souche CHA surproduisant ExsA.**

Les protéines des souches CHA et CHA(pIApX2 ExsA) éluées lors de l'immunoprécipitation avec des anticorps anti-ExsA sont séparées par SDS-PAGE puis révélées par coloration à l'argent (A) ou transférées sur membrane de nitrocellulose puis immunodétectées avec des anticorps anti-ExsA (B) ou anti-ExsD (C). La protéine ExsD purifiée (60 ng) a été déposée comme contrôle pour l'immunodétection (C). Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués à gauche en kDa.

La révélation par coloration à l'argent et l'immunodétection avec des anticorps anti-ExsA des protéines éluées indiquent que la protéine ExsA a été immunoprécipitée en plus grande quantité à partir de la souche CHA (pIApX2 ExsA) qu'à partir de la souche sauvage (Figure 53 A et B). Ceci nous indique que ExsA est bien surproduite dans la souche pIApX2.

Lors de la révélation à l'argent, nous n'avons pas observé de seconde bande pouvant correspondre à ExsD (Figure 53.B) ce qui peut s'expliquer de deux manières: soit la protéine n'a pas été co-immunoprécipitée avec ExsA, soit elle est présente en trop faible quantité pour être détectée. Pour répondre à cette question, l'immunodétection de la protéine avec des anticorps spécifiques a été réalisée à partir de ce même échantillon (Figure 53.C). Ce western blot révèle une bande correspondant à la bande témoin ExsD uniquement dans la souche CHA (pIApX2 ExsA) et non dans la souche sauvage (Figure 53.C). Ceci pourrait s'expliquer par deux raisons : i) une quantité de ExsD plus élevée dans la souche CHA (pIApX2 ExsA) que dans la souche sauvage car la protéine ExsA surproduite active d'autant plus l'expression de *exsD* et ii) la quantité plus élevée de ExsA dans la souche CHA

(pIApX2 ExsA) entraîne l'immunoprécipitation d'une plus grande quantité de ExsD.

La co-élution de ExsA et ExsD dans la souche CHA (pIApX2 ExsA) indique que les deux protéines interagissent dans *P. aeruginosa*.

## II. Etude de l'interaction ExsA/ExsD *in vitro* à partir des protéines purifiées indépendamment.

Nous avons ensuite voulu caractériser cette interaction entre ExsA et ExsD à travers des approches *in vitro*. L'objectif était de comprendre la formation du complexe entre les deux partenaires (constante d'affinité d'interaction, stœchiométrie, domaines d'interaction) et le mécanisme utilisé par ExsD pour inhiber l'activité de ExsA.

Pour cela, il a tout d'abord fallu purifier les deux partenaires ainsi que les domaines N- et C terminaux de ExsA indépendamment.

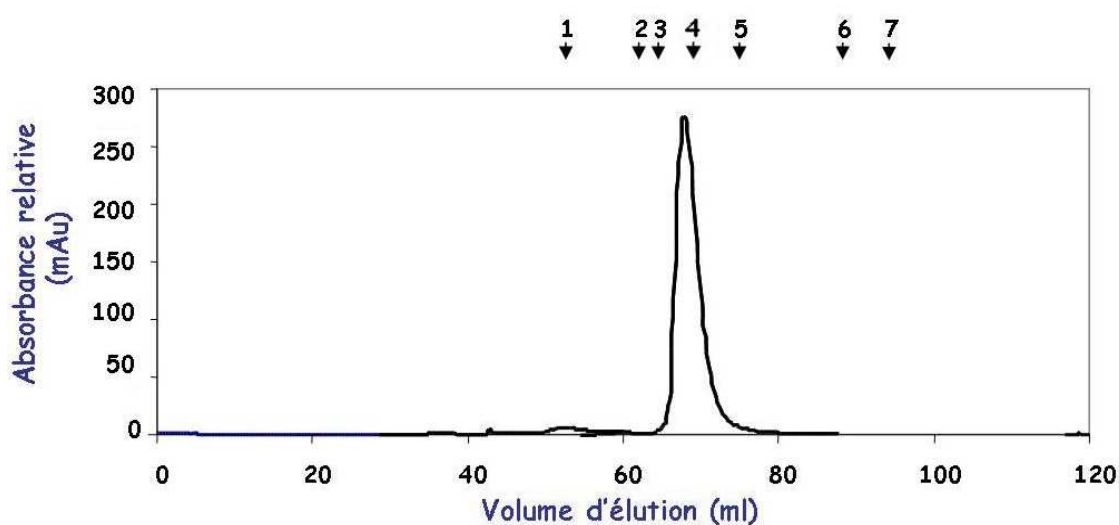
### II.1 Purification des partenaires

#### II.1.1 Purification de ExsA et de ses domaine N- et C-terminaux.

Les protéines  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$ ,  $\text{ExsA}_{\text{H}}$ ,  $\text{Nter}_{\text{H}}$  et  ${}_{\text{H}}\text{Cter}$  ont précédemment été surproduites et purifiées lors de l'étude de la fonctionnalité d'ExsA et de ses domaines (voir Chapitre V: Etude de la fonctionnalité de ExsA et de ses domaines). Dans ce cadre, nous avons montré que les protéines  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  et  $\text{ExsA}_{\text{H}}$  se fixent de manière similaire sur la sonde *pC* dans des expériences de retard sur gel *in vitro*. La position de l'étiquette six-histidine n'interfère donc pas dans l'interaction ExsA/ADN.

## II.1.2 Purification de ExsD.

Dans des conditions classiques de surproduction dans *E. coli*, la protéine ExsD est surproduite en très grande quantité dans la fraction soluble ce qui nous a permis de la purifier sous sa forme native sans étiquette. Grâce à deux étapes successives de chromatographie échangeuse d'anions et d'exclusion de taille (SEC), la protéine ExsD a été obtenue en grande quantité, soit 30 mg/litre de culture à une concentration finale de 5mg/ml, et pure à 95% (Figure 54).



**Figure 54. Analyse par SEC de la protéine ExsD purifiée.**

La protéine purifiée ExsD (4 ml à 3 mg/ml) dans le tampon 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH=8.5 a été éluée sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille de type préparative (Superdex 200, Hiload 16/60). Les flèches numérotées indiquent les protéines standards connus qui ont permis d'établir une courbe de calibration et qui possèdent les masses moléculaires et les rayons hydrodynamiques suivants: 1, Ferritine (440 kDa, 61 Å); 2, Catalase (232 kDa, 52,2 Å); 3, Aldolase (158 kDa, 48,1 Å); 4, Albumine de sérum bovin (67 kDa, 35,5 Å); 5, Ovalbumine (43 kDa, 30,5 Å); 6, Chymotrypsinogène (25 kDa, 20,9 Å)

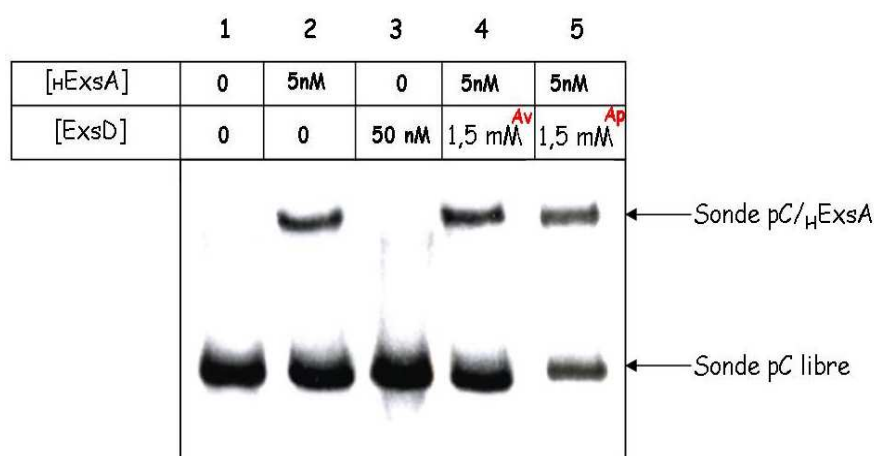
Comme indiqué sur la Figure 54, la protéine ExsD purifiée élue à un volume de 69 ml. D'après la courbe de calibration, ce volume d'élution est celui d'une protéine dont la masse molaire est comprise entre 158 et 67 kDa. En accord avec la résolution de la structure aux rayons X de ExsD et l'analyse de son état oligomérique par Ultracentrifugation Analytique, dans des conditions similaires à



celles utilisées dans cette expérience, il s'agit d'un trimère en solution (Bernhards *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2007).

## II.2 Effet de la protéine purifiée ExsD sur la fixation à l'ADN de $\mu$ ExsA et ExsA $\mu$ *in vitro*.

Afin de déterminer l'effet de ExsD sur l'activité de fixation à l'ADN de ExsA, nous avons entrepris d'analyser par retard sur gel la fixation de la protéine  $\mu$ ExsA sur la sonde *pC* en présence de concentrations croissantes de la protéine purifiée ExsD. L'anti-activateur a été ajouté soit avant soit après l'incubation de  $\mu$ ExsA avec la sonde *pC* (Figure 55).



**Figure 55. Fixation à l'ADN de  $\mu$ ExsA *in vitro* seule ou en présence de ExsD.**

Retard sur gel du promoteur *pC* en présence de la protéine  $\mu$ ExsA et/ou de ExsD. Les protéines ont été incubées aux concentrations indiquées pendant 15 min à 25°C avec la sonde *pC* (60 mer, 0,2 nM) et du polyIdC (ADN non spécifique, 250 nM). La protéine ExsD a été ajoutée à une concentration 300 fois plus élevée que  $\mu$ ExsA soit 15 min avant (<sup>Av</sup>) soit après 15 min (<sup>Ap</sup>) d'incubation de  $\mu$ ExsA avec la sonde *pC* (ligne 4 et 5). Les échantillons ont migré sur gel de polyacrylamide non dénaturant puis ont été électrotransférés sur une membrane de nylon de type Biodyne B. La révélation a été réalisée avec le kit de retard sur gel « Lightshift chemiluminescent ».

Le retard de migration observé en présence de 5nM de protéine indique la fixation de  $\mu$ ExsA sur la sonde (Figure 55, ligne 2).

Aucun retard n'est observé lorsque la protéine ExsD est incubée avec la sonde *pC* à une concentration 10 ou 300 fois plus élevée que  $\mu$ ExsA (Figure 55, ligne 3 ; non montré) confirmant ainsi que l'anti-activateur ne se fixe pas sur le promoteur *pC*.

L'addition de ExsD, même à des concentrations 300 fois plus élevées que  ${}^H$ ExsA, n'a aucun effet sur la fixation du facteur de transcription, qu'il soit incubé avant ou après la formation du complexe  ${}^H$ ExsA/pC (Figure 55, lignes 4 et 5). Notons que dans la cellule, des concentrations similaires pour les deux partenaires ont été proposées : 40 nm (Lykken *et al.*, 2006).

Nous pouvions supposer que les conditions expérimentales n'étaient pas favorables à l'interaction *in vitro* entre les deux protéines. De nombreux paramètres ont donc été modifiés pendant l'incubation des deux protéines afin de favoriser cette interaction :

- le temps d'incubation a été rallongé de 15 min à 2H (à 4 et 37°C)
- la concentration en Tween 20 a été diminuée de 0,025 % à 0,0025% (aux différents temps et températures indiqués ci-dessus). Il est en effet possible que la présence de détergent interfère dans cette interaction même si elle stabilise  ${}^H$ ExsA en solution.

Malgré la modification de ces paramètres et l'utilisation de la protéine ExsA<sub>H</sub> avec l'étiquette histidine positionnée en C-terminal, nous n'avons pas observé d'effet de ExsD sur la fixation à l'ADN de ExsA (Figure 55).

La protéine purifiée ExsD ne semble pas affecter la fixation à l'ADN de  ${}^H$ ExsA et ExsA<sub>H</sub> *in vitro*.

### **II.3 Tests d'interaction à partir des protéines purifiées indépendamment.**

Nous avons donc souhaité déterminer si les protéines purifiées  ${}^H$ ExsA et ExsD sont capables d'interagir *in vitro* et de former un complexe, et pour cela plusieurs approches ont été utilisées :

1. La Résonance Plasmonique de Surface (SPR).
2. La technique ELISA « sandwich ».
3. L'observation par chromatographie d'exclusion de taille de la formation du complexe ExsA/ExsD.

### II.3.1 SPR et ELISA

Ces deux techniques permettent de mettre en évidence l'interaction directe entre deux protéines et de mesurer les constantes d'affinité de cette interaction.

La **SPR** permet de visualiser en temps réel l'interaction entre deux protéines. La protéine A est fixée sur la surface métallique d'un prisme au dessus duquel circule une solution contenant la protéine B. Le système de détection est basé sur la variation de l'indice de réfraction suite au changement de composition de la surface engendrée par la fixation de la protéine B sur la protéine A. Grâce aux mesures obtenues, on peut déterminer la cinétique de l'interaction et établir les constantes d'association et de dissociation entre les protéines A et B. Nous avons eu accès à cette technique grâce à une collaboration établie avec Yann Roupioz, chercheur du groupe CREAB (Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude d'Assemblage Biologiques) dirigé par Thierry Livache au CEA de Grenoble.

La technique **ELISA** nécessite l'adsorption de la protéine A sur une surface (de type plaque 96 puits Maxisorp), puis l'incubation en présence de la protéine B. Dans ce type d'expérience l'interaction est mise en évidence en détectant la fixation spécifique de la protéine B sur la protéine A grâce à des anticorps dirigés contre la protéine B.

Lors des expériences de SPR la protéine ExsD a été fixée sur le support sur lequel la solution contenant ExsA<sub>H</sub> a été injectée. En revanche, pour les tests ELISA nous avons testé les deux combinaisons : ExsA<sub>H</sub> adsorbée puis incubée avec ExsD ou ExsD adsorbée puis incubée avec ExsA<sub>H</sub>. Dans ces deux types d'approches, les études ont été gênées par l'agrégation de ExsA<sub>H</sub> ce qui nous a empêchés d'observer l'interaction entre les deux protéines. En effet, nous avons observé la précipitation de la protéine avant et au cours de son injection lors expériences de SPR.

Concernant les tests ELISA, l'agrégation de la protéine a entraîné sa fixation aspécifique sur le support en présence ou en absence de ExsD.

### II.3.2 Analyse par SEC de la formation du complexe ExsA/ExsD.

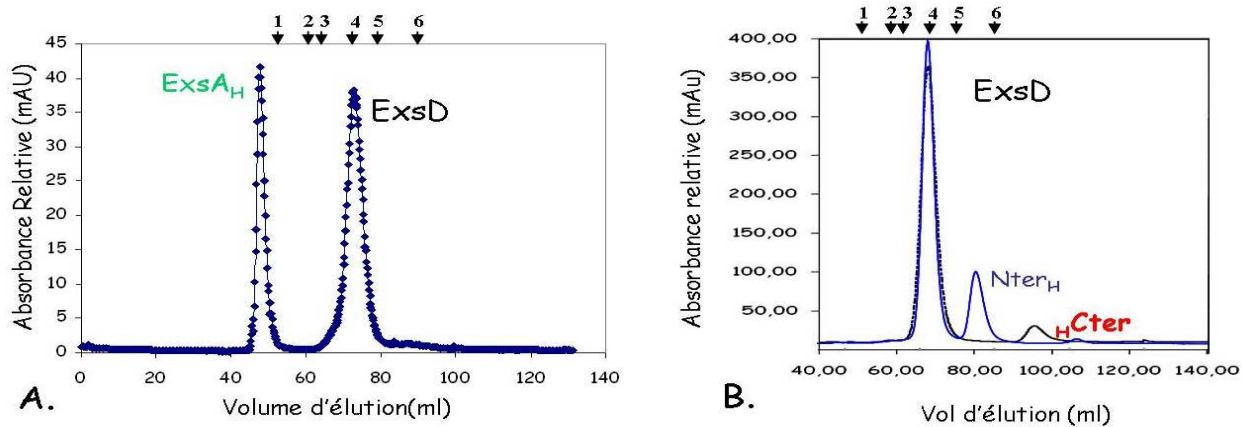
#### ➤ ExsA<sub>H</sub>+ExsD

La troisième approche a consisté à visualiser la formation du complexe par SEC, suite à l'incubation des deux protéines purifiées. Cette approche nous semblait adéquate car nous nous attendions à une affinité similaire entre ExsA et ExsD, à celles qui ont été mesurées pour les complexes ExsC/ExsD et ExsC/ExsE (de l'ordre du nM).

Voici les différents tampons et conditions d'incubation entre les deux protéines qui ont été testés (Figure 56):

Tampon	20 mM Tris/HCl			20 mM Sodium Phosphate		50mM imidazole
pH	7			6		8
Concentration en NaCl (mM)	100	250	500	250	500	250
1 mM EDTA			+/-			+
1 mM DTT	+/-		+/-	+	+	+
10% Glycérol	+/-		+/-	+		+
Temps et Température	16h à 4°C	1h à 37°C	1h à 37°C ou 16h à 4°C	16h à 4°C	1h à 37°C ou 16h à 4°C	16h à 4°C
Ratio ExsA <sub>H</sub> :E xsD	1:2	1:1 1:2	1:1 1:2	1:2	1:2	1:2 2:1

Figure 56. Récapitulatif des conditions d'interaction testées.



**Figure 57. A et B Profils d'élution des protéines ExsA<sub>H</sub> ou H<sub>C</sub>ter ou Nter<sub>H</sub> après leur incubation avec ExsD.**

(A) La protéine ExsD (0.25 mg/ml) a été incubée avec ExsA<sub>H</sub> (0.5 mg/ml) (ratio 1 :2) ; (B) La protéine ExsD (2 mg/ml) a été incubée avec soit H<sub>C</sub>ter (0.5 mg/ml) ou Nter<sub>H</sub> (0.6 mg/ml) (ratio 2 :1) (superposition des chromatogrammes). Chaque mélange (4ml) a été injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille de type préparative (Superdex 200, Hiload 16/60). Les flèches numérotées indiquent les protéines standards décrites dans la figure 54.

Dans toutes les conditions testées, les deux protéines éluent indépendamment comme le montrent les deux pics distincts sur le chromatogramme d'élution de la Figure 57. La protéine ExsA<sub>H</sub> est éluée seule à un volume (46 ml) proche de celui du volume mort (40 ml), indiquant son état d'agrégation (Figure 57.A). ExsD est éluée seule et au même volume, qu'il soit incubé avec ExsA ou seul (Figure 57.A).

Comme la protéine ExsA<sub>H</sub> semble se trouver sous forme agrégée en solution, il est possible qu'elle ne soit pas repliée correctement ce qui empêcherait son interaction avec ExsD. Pour pallier ce problème, nous avons entrepris de déplier complètement la protéine en présence d'un agent chaotropique. Puis, cet agent est rapidement dilué en présence de la protéine ExsD afin de permettre le repliement correct de ExsA<sub>H</sub> dénaturée, grâce à l'effet stabilisateur des interactions intermoléculaires entre les deux protéines.

La protéine ExsA<sub>H</sub> (2mg/ml dans 1ml) a été complètement dépliée en présence de Guanidine 6M. Puis, 6 ml de la protéine ExsD purifiée (1mg/ml) dans le tampon 20 mM Tris/HCl, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH=8, a été ajoutée à la protéine

dénaturée afin d'atteindre une concentration non dénaturante en Guanidine de 0,8 M.

Malgré la présence de ExsD en excès (concentration 3 fois plus élevée) pendant cette étape de dénaturation/renaturation, l'analyse par chromatographie d'exclusion de taille des deux protéines a révélé le même profil que celui de la Figure 57.A.

➤ **Nter<sub>H</sub>+ExsD ou <sub>H</sub>Cter+ExsD**

De manière similaire à l'expérience réalisée avec la protéine ExsA et partant de l'hypothèse que le domaine N-terminal de ExsA serait le domaine d'interaction avec ExsD, nous avons décidé d'utiliser la SEC pour évaluer l'interaction entre les deux protéines, en incubant le domaine N-terminal purifié (Nter<sub>H</sub>) avec ExsD. Dans ce cas, l'incubation a été réalisée pendant 16h à 4°C avec un ratio ExsD/Nter<sub>H</sub> de 2/1, et deux tampons ont été testés (50 mM Glycine/NaOH, 200 mM NaCl, pH=9 ou 20 mM Sodium Phosphate, 200 mM NaCl, 10 % Glycérol, 50 mM imidazole, pH=7).

Contrairement à la protéine entière ExsA<sub>H</sub>, le domaine N-terminal purifié ne se trouve pas dans un état agrégé en solution (Figure 46). Bien que plus soluble que ExsA, ce domaine ne forme pas de complexe *in vitro* avec ExsD comme l'indique le chromatogramme de la Figure 57.B.

Comme nous nous y attendions, nous n'avons pas non plus observé la formation de complexe entre ExsD et le domaine C-terminal de ExsA (Figure 57.B)

### III. Etude du complexe ExsA/ExsD et du mécanisme moléculaire d'inhibition.

#### III.1 Co-production et co-purification de ExsA et ExsD.

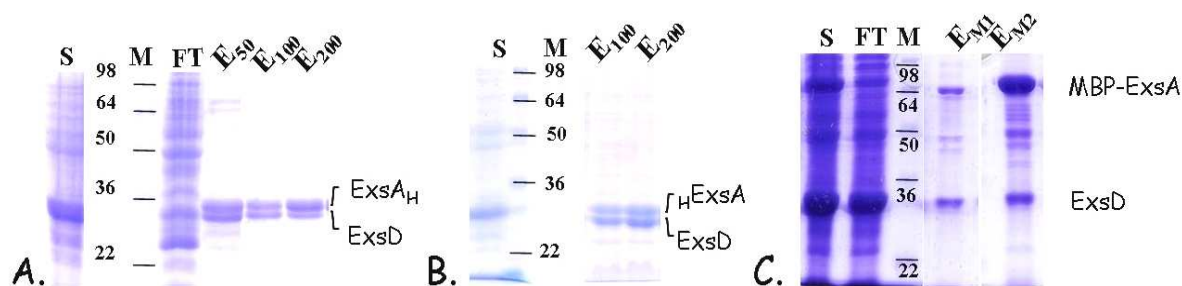
Etant donné les difficultés que nous avons rencontrées pour observer l'interaction entre ExsA et ExsD à partir des protéines purifiées indépendamment, nous avons co-produit ces deux protéines dans la même souche de *E. coli*, comme cela a précédemment été effectué pour MxiE et son co-activateur IpgC (Pilonieta and Munson, 2008).

Dans un premier temps, les protéines,  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$ ,  $\text{ExsA}_{\text{H}}$  et MBP-ExsA ont été co-produites chacune avec ExsD dans *E. coli*. Après la lyse et l'ultracentrifugation des cultures bactériennes, les surnageants obtenus ont été chargés soit sur une colonne de chromatographie d'affinité au Nickel ( $\text{His}_6$ ) soit sur une colonne d'amylose (MBP). Dans ces trois expériences, seule la protéine ExsA est fusionnée à une étiquette ( $\text{His}_6$  ou MBP) et possède donc une affinité pour les matrices des deux types de colonne utilisés (Nickel et Amylose). La protéine ExsD seule ne présente quant à elle aucune affinité. Lorsqu'elle est chargée seule sur ce type de matrice, elle se trouve dans le « Flow-through » (FT), parmi les protéines du surnageant non retenues sur la colonne (montré plus loin dans cette partie sur la Figure 61).

Deux résultats étaient envisageables: soit ExsA est éluée seule en présence de compétiteur (imidazole ou maltose) car il n'y pas eu de formation de complexe *in vivo* et dans ce cas ExsD est élué dans le FT ; soit les protéines interagissent *in vivo* en formant un complexe stable et co-éluent en présence du compétiteur.

Les figures 58 A) et B) montrent que ExsD co-élue avec  ${}_{\text{H}}\text{ExsA}$  et  $\text{ExsA}_{\text{H}}$ ; la position de l'étiquette histidine n'interfère donc pas dans cette interaction. A partir d'une concentration de 50 mM en imidazole, les protéines commencent à être éluées ensemble et à des quantités qui semblent équivalentes. Les protéines MBP-ExsA et ExsD co-éluent aussi parfaitement (Figure 58.C), mais les fractions  $\text{E}_{\text{M1}}$  et  $\text{E}_{\text{M2}}$  montrent la présence d'autres protéines. L'analyse par Western Blot de ces

fractions a montré qu'il s'agit de produit de dégradation de la protéine MBP-ExsA (résultat non montré)



**Figure 58. Analyse par SDS-PAGE des protéines chargées sur les colonnes de chromatographie d'affinité et des fractions d'élution.**

Analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la composition des surnageants obtenus après ultracentrifugation de la culture de surproduction (S), des protéines chargées mais non retenues sur la colonne (FT), des fractions d'élutions (E). Le marqueur de poids moléculaire (M) indique des valeurs en kDa. Sur les figures A) et B) la concentration en imidazole des étapes d'élution est indiquée (en mM) E : 50, 100, 200. Sur la Figure C) EM1 et EM2 indiquent les deux fractions issues de l'élution par ajout de maltose.

A) Co-élution de ExsA<sub>H</sub> et ExsD par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.

B) Co-élution de <sup>h</sup>ExsA et ExsD par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.

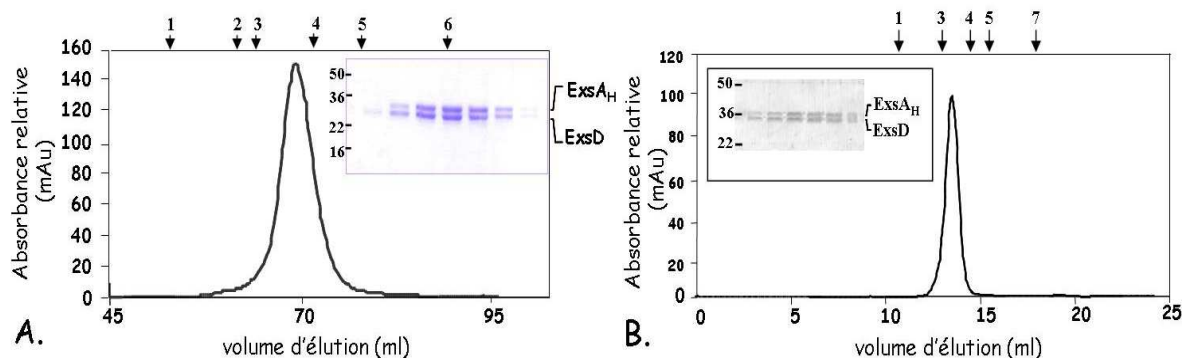
C) Co-élution de MBP-ExsA et ExsD par chromatographie d'affinité sur colonne d'amylose.

Ces trois expériences indiquent clairement que ExsD et ExsA forment un complexe *in vivo* lorsqu'elles sont coproduites dans la même cellule.

Ainsi, un complexe ExsA/ExsD a été mis pour la première fois en évidence *in vitro*.

Les fractions les plus pures et les plus concentrées issues de ces trois copurifications ont ensuite été analysées par SEC de type préparative puis analytique, afin de confirmer la co-élution des deux protéines suite à une seconde étape de purification (seuls les profils d'élution du complexe ExsA<sub>H</sub>/ExsD sont indiqués car des profils identiques ont été obtenus avec le complexe <sup>h</sup>ExsA/ExsD, Figure 59).





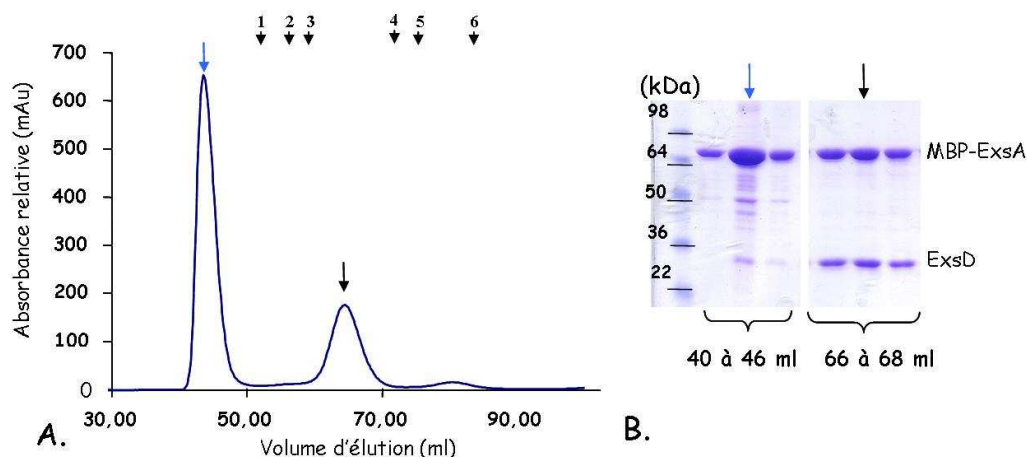
**Figure 59. Profils et analyses par SDS-PAGE des éluions par SEC préparative puis analytique du complexe ExsA<sub>H</sub>/ExsD.**

Chromatogrammes d'élution du complexe ExsA<sub>H</sub> /ExsD sur une colonne de SEC: **A**) Préparative (HiLoad 16/60, Superdex 200) puis **B**) Analytique (GL 10/300, Superdex 200). Les flèches numérotées indiquent les protéines standards suivantes de masse moléculaire et de rayon hydrodynamique connus : 1, Ferritine (440 kDa, 61 Å); 2, Catalase (232 kDa, 52,2 Å); 3, Aldolase (158 kDa, 48,1 Å); 4, Albumine de sérum bovin (67 kDa, 35,5 Å); 5, Ovalbumine (43 kDa, 30,5 Å) 6, Chymotrypsinogène (25 kDa, 20,9 Å), 7, Ribonucléase A (13,7kDa, 16,4 Å) **A** et **B**. Les encarts montrent l'analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des fractions de purification. Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués en kDa.

A la différence des profils d'élution des protéines ExsA<sub>H</sub> et ExsD purifiées indépendamment, un seul pic est observé sur chacun des profils d'élution des protéines ExsA<sub>H</sub> et ExsD co-produites et co-purifiées, à des volumes de 69,13 ml et 14,1 ml respectivement (Figure 59 A et B). Ces volumes correspondent à ceux de molécules aux rayons hydrodynamiques théoriques de 40,97 Å et 39,9 Å et d'un poids moléculaire apparent compris entre 158 et 67 kDa. Ces deux profils d'élution montrent clairement que ExsA et ExsD co-éluent ensemble au sein d'une espèce unique et homogène (Figure 59 A et B).

L'analyse par SDS-PAGE confirme que ExsA<sub>H</sub> et ExsD co-éluent parfaitement et à des quantités qui semblent équimolaires, comme nous l'avions précédemment observé lors de l'étape de purification par chromatographie d'affinité (Figure 58 A, B et C).

L'analyse par SEC des fractions issues de la co-élution de MBP-ExsA avec ExsD a aussi été réalisée (Figure 60 A et B).



**Figure 60 A et B. Profil et analyse par SDS-PAGE de l'élution par SEC préparative de MBP-ExsA et ExsD après leur co-purification.**

**A.** Chromatogramme d'élution sur colonne d'exclusion de taille (Superdex 200, Hiload 16/60) des fractions issues de la co-purification de MBP-ExsA et ExsD. Les pics d'élution à 43 ml et 67 ml indiqués par une flèche ont été analysés sur gel de polyacrylamide. **B.** Analyse SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des fractions d'élution comprises entre 40 et 46 ml et 66 et 68 ml de 2 et 1 ml respectivement.

Nous observons sur le chromatogramme de la figure 60.A, la présence de deux pics d'élution distincts, à des volumes de 43 ml et 67 ml respectivement. Leur analyse par SDS-PAGE indique que le premier pic d'élution (43 ml) se compose majoritairement de la protéine MBP-ExsA (Figure 60.B). Ce volume d'élution est très proche de celui du volume mort de la colonne (40 ml), indiquant que la protéine se trouve probablement sous forme agrégée. L'étiquette MBP n'a donc pas eu l'effet solubilisateur attendu sur la protéine ExsA purifiée *in vitro*.

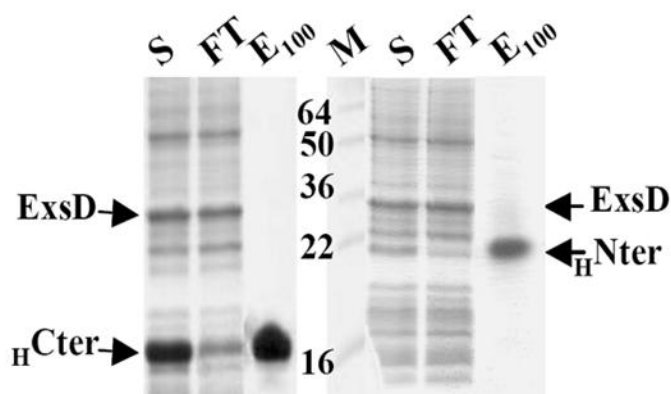
Le second pic correspond à l'élution des deux protéines, MBP-ExsA et ExsD, probablement en complexe (Figure 60.B). La protéine MBP-ExsA est **donc stabilisée** par ExsD.

La taille (40 kDa) et la position de l'étiquette MBP pouvant interférer dans l'interaction entre ce complexe et l'ADN et/ou ExsC que nous envisagions d'étudier, nous avons décidé de poursuivre l'étude avec les complexes ExsA<sub>H</sub>/ExsD et <sub>H</sub>ExsA/ExsA.

### III.2 Etude de l'interaction entre ExsD et les domaines N- et C- terminaux de ExsA

Une des problématiques de cette étude était de définir le domaine de ExsA impliqué dans l'interaction avec ExsD. Afin de déterminer s'il s'agissait du domaine N-terminal comme nous le supposions, nous avons reproduit le même protocole de co-production et de co-purification qui nous a permis d'observer le complexe entre ExsA et ExsD mais cette fois-ci avec seulement le domaine N-terminal. La même expérience a été réalisée avec le second domaine (C-terminal) de ExsA.

Ainsi les protéines  $_{\text{H}}\text{Nter}_{1-168}$  ou  $_{\text{H}}\text{Cter}_{166-278}$  ont été co-produites et co-purifiées avec ExsD comme précédemment indiquée avec la protéine ExsA entière (Figure 61).



**Figure 61. Analyse par SDS-PAGE de l'éluion des domaines N-terminal ou C-terminal de ExsA co-produits avec ExsD, sur une colonne de chromatographie d'affinité au nickel.**

Analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des surnageants obtenus après ultracentrifugation de la culture de surproduction (S), des protéines chargées mais non retenues sur la colonne (FT), des fractions d'éluion ( $E_{100}$ ) à une concentration de 100 mM en imidazole. Le marqueur de poids moléculaire (M) indique des valeurs en kDa. La co-purification de  $_{\text{H}}\text{Cter}$  et ExsD est indiquée à gauche du marqueur de poids moléculaire et celle de  $_{\text{H}}\text{Nter}$  et ExsD à droite.

Nous observons sur la Figure 61 que les deux protéines  $_{\text{H}}\text{Nter}$  et  $_{\text{H}}\text{Cter}$  sont bien co-produites avec ExsD dans les souches de *E. coli* (S). Cependant, la protéine  $_{\text{H}}\text{Nter}$  est produite à une quantité plus faible que la protéine  $_{\text{H}}\text{Cter}$ , ce qui est en accord avec ce que nous avons observé lors de l'étude de la production et de la

solubilité de ces deux protéines *in vitro* (Chapitre V, Figure 42). Les deux protéines fusionnées à une étiquette histidine ( $_{\text{H}}\text{Cter}$  et  $_{\text{H}}\text{Nter}$ ) sont retenues sur la colonne, tandis qu'ExsD n'est pas retenue (FT). De ce fait, les protéines  $_{\text{H}}\text{Cter}$  et  $_{\text{H}}\text{Nter}$  sont éluées seules à une concentration de 100 mM d'imidazole. Contrairement à l'expérience réalisée avec la protéine entière, il n'y a donc pas eu de co-élution des deux domaines avec ExsD.

Cette expérience a infirmé notre hypothèse de départ, le domaine N-terminal de ExsA seul n'interagit pas avec ExsD. Les deux domaines de ExsA seraient donc nécessaires à son interaction avec ExsD.

### III.3 Stœchiométrie du complexe ExsA/ExsD.

D'après l'analyse SDS-PAGE des complexes  $\text{ExsA}_{\text{H}}/\text{ExsD}$  et  $_{\text{H}}\text{ExsA}/\text{ExsD}$  (Figure 61 A et B), il semblerait que les protéines se trouvent à des quantités équimolaires au sein du complexe. Afin de définir la stœchiométrie exacte des deux protéines, les fractions les plus pures et les plus concentrées issues de la SEC préparative ont été analysées à travers des expériences d'Ultracentrifugation Analytique (AUC) par Christine Ebel et Aline Appourchaux au sein d'une collaboration (Laboratoire de Biophysique Moléculaire, IBS). Les résultats obtenus sont décrits en détail dans le manuscrit en Annexe.

Pour déterminer la masse molaire des complexes  $\text{ExsA}_{\text{H}}/\text{ExsD}$  et  $_{\text{H}}\text{ExsA}/\text{ExsD}$ , deux techniques permettant d'analyser la sédimentation de ces complexes par AUC ont été utilisées :

1. La mesure de la Vitesse de sédimentation permet de déterminer le coefficient de sédimentation  $S$  d'une molécule.  $S$  est lié à la forme, la masse, et l'hydratation de la molécule. Il est donc possible de définir la masse d'une molécule à partir de cette valeur de  $S$  et du rayon hydrodynamique de la molécule mesuré par SEC. La densité du solvant et la viscosité du milieu sont intégrées dans cette mesure.

Les valeurs obtenues lors de l'expérience de vitesse de sédimentation réalisée à partir des complexes purifiés ExsA<sub>H</sub>/ExsD et ExsA<sub>H</sub>/ExsD, associées à la valeur du R<sub>H</sub> de 39,9 Å, ont permis de mesurer une masse molaire de **65 kDa** qui est la valeur théorique attendue pour un complexe composé d'un monomère de ExsD et d'un monomère de ExsA (31 + 33 kDa respectivement).

Cette expérience a été réalisée à partir des deux complexes purifiés et dans une gamme de concentration comprise entre 0,95 et 0,45 mg/ml. Pour chacune de ces conditions la même masse molaire a été mesurée. Ceci indique que les deux complexes possèdent la même stœchiométrie et qu'ils ne se dissocient pas à de faibles concentrations.

2. Des expériences d'équilibre de sédimentation ont ensuite été effectuées afin de confirmer l'état d'association du complexe. Cette centrifugation est réalisée à basse vitesse et pendant un temps long, afin d'atteindre un équilibre où la force de sédimentation devient égale à celle de la diffusion. Dans ces conditions, la masse molaire est déterminée **indépendamment de la forme** de la molécule.

Grâce à cette expérience, la masse molaire déterminée du complexe ExsA<sub>H</sub>/ExsD est de **70 kDa**. Cette valeur est similaire à celle mesurée par la technique de sédimentation.

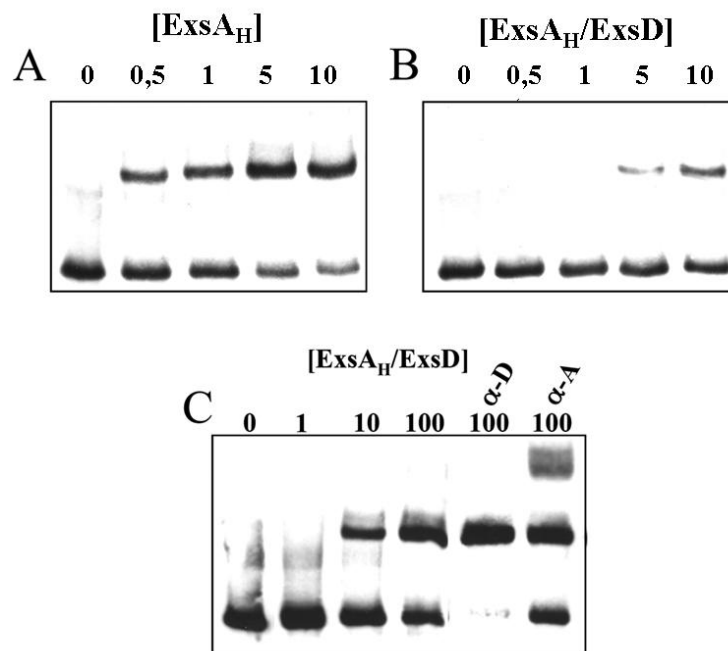
Ces expériences d'AUC montrent clairement que ExsA et ExsD forment un complexe de **stœchiométrie 1:1**.

### III.4 Etude du mécanisme d'inhibition

#### III.4.1 Propriétés de fixation à l'ADN du complexe ExsA/ExsD

Nous avons jusqu'ici démontré que ExsD interagit avec ExsA et qu'ensemble ces protéines forment un complexe 1:1; il restait donc à déterminer le rôle exact de l'inhibiteur au sein de ce complexe.

L'interaction entre les deux protéines étant clairement démontrée, nous avons décidé de comparer *in vitro* les activités de fixation à l'ADN de la protéine ExsA<sub>H</sub> seule ou en complexe avec ExsD (Figure 62).



**Figure 62. Activité de fixation à l'ADN de ExsA seule ou en complexe avec ExsD.** Retard sur gel du promoteur *pC* en présence de hExsA (A), du complexe hExsA-ExsD (B), ou du complexe ExsA<sub>H</sub>/ExsD (C). La sonde biotinylée *pC* (0,2 nM) a été incubée 15 min avec les concentrations de protéines indiquées (en nM). Après électrophorèse et électrotransfert sur une membrane de nylon de type Biodyne B, l'ADN marqué a été révélé avec le kit « Lightshift chemiluminescent EMSA ». C, aux concentrations les plus élevées du complexe ExsA<sub>H</sub>-ExsD, les anticorps dirigés contre ExsD (αD) ou ExsA (αA) ont été ajoutés 5 min avant l'électrophorèse.

La protéine hExsA se fixe dès une concentration de 0,5 nM sur la sonde *pC* comme indiqué sur la Figure 62.A. Cette fixation est spécifique car l'addition de sonde *pC* non marquée, à une concentration 200 fois plus élevée que celle de la

sonde marquée, entraîne une forte diminution de l'intensité de la bande retardée (non montré).

Lorsque le complexe purifié ExsA<sub>H</sub>-ExsD (obtenus par SEC) est utilisé, un retard de la sonde *pC* est également observé avec une mobilité électrophorétique similaire à celle observée en présence de <sub>H</sub>ExsA. Cependant celui-ci requiert au moins dix fois plus de protéines (Figure 62, B et C). La même observation a été faite, quand un autre promoteur cible de ExsA, le promoteur de l'opéron *pcrGVHpopBD*, a été utilisé comme sonde (résultat non montré).

Comme mentionné, le retard de la sonde *pC* en présence du complexe présente une mobilité électrophorétique identique au retard induit par la fixation de <sub>H</sub>ExsA sur *pC*. Ceci suggère que ce retard est dû à la fixation de ExsA seule et donc qu'une partie de ExsA se serait libérée du complexe et interagirait avec l'ADN. Nous ne pouvons cependant pas exclure que le complexe ExsA-ExsD se fixe à l'ADN.

Afin de discriminer l'existence d'un complexe tripartite sonde-ExsA-ExsD, ou d'un complexe sonde-ExsA, nous avons donc décidé d'identifier les protéines présentes au sein du complexe nucléoprotéique en les détectant grâce à des anticorps spécifiques : la présence de la protéine est indiquée par la formation d'un « super-complexe » (supershift) « ADN/protéine/Anticorps » qui migre plus lentement que le complexe « ADN/protéine ».

Comme observé sur la figure 62.C, les anticorps anti-ExsA forment un 'super-complexe' avec le complexe ExsA-sonde, tandis que l'addition d'anticorps anti-ExsD entraîne la disparition complète de sonde libre et augmente parallèlement la quantité de sonde retardée (Figure 62.C). ExsD ne serait donc pas fixé sur l'ADN. Il semblerait qu'en se fixant sur ExsD, les anticorps déstabilisent partiellement le complexe (il est possible que la fixation des anticorps sur ExsD diminue l'affinité entre les deux protéines) ce qui augmenterait la portion de ExsA capable d'interagir avec l'ADN.

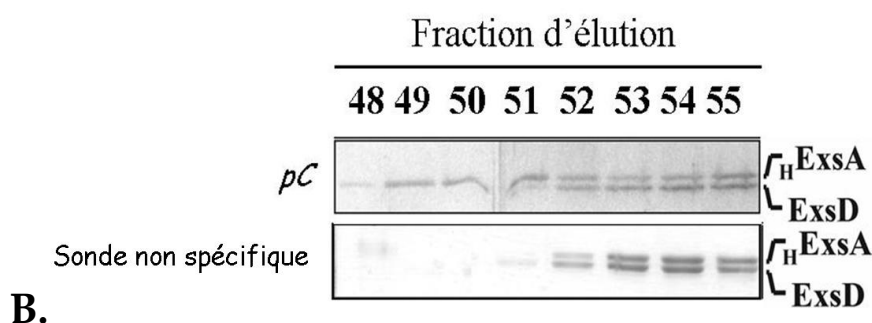
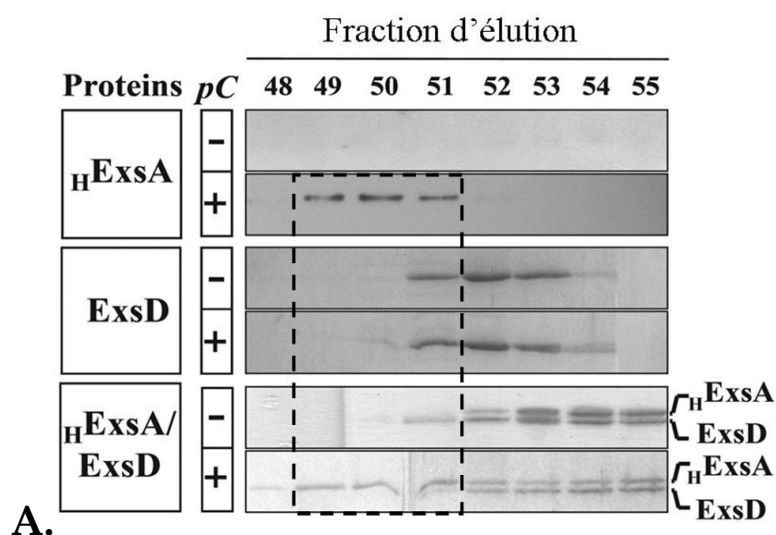
Tous ces résultats suggèrent que le complexe ExsA-ExsD ne se fixe pas à l'ADN et que le retard observé en présence du complexe est dû à la protéine ExsA seule car elle est capable d'interagir avec ExsD ou l'ADN.

#### III.4.2 Analyse en solution de l'effet de la sonde *pC* sur le complexe ExsA-ExsD.

Pour confirmer que le complexe ExsA-ExsD ne se fixe pas l'ADN, nous avons analysé le comportement en solution de ExsA soit seule soit en interaction avec ExsD, en présence ou en absence d'ADN

Pour cela, les protéines ont été incubées soit en absence, soit en présence de la sonde *pC*, et les espèces formées ont ensuite été analysées par SEC de type analytique (Superdex 200 10/300 GL). Les profils d'élution ont été suivis par gel de protéine et/ou Western blot (Figure.63), car la sonde *pC* 60-mer possède une absorbance élevée qui couvre les spectres des protéines et des complexes nucléoprotéiques.





**Figure 63. Analyse par SDS-PAGE et Western Blot des éluions par SEC des protéines  $_{\text{H}}$ ExsA, ExsD et du complexe ExsA-ExsD seuls ou en présence d'ADN.** (A) Les échantillons  $_{\text{H}}$ ExsA (3 $\mu$ M), ExsD (4 $\mu$ M), et le complexe  $_{\text{H}}$ ExsA-ExsD (4 $\mu$ M) ont été incubés 30 min à 25 °C dans le « binding buffer » (Matériel et Méthodes), soit seul soit avec la sonde *pC* dans un ratio 1:2 ratio (protéine/ADN). (B) Le complexe a été incubé comme précédemment indiqué avec soit la sonde *pC*, soit avec une sonde « non spécifique » (séquence en amont du site de fixation de ExsA sur *pC*). A et B Les échantillons ont été chargés sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille analytique (Superdex 200 10/300 GL). 60  $\mu$ l de chacune des fractions indiquées (de 12,25 à 14,25 ml) ont été analysés par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie pour le complexe et ExsD et par immunoblot avec des anticorps anti-His couplés à la peroxydase pour  $_{\text{H}}$ ExsA.

L'analyse par SEC de la protéine  $_{\text{H}}$ ExsA seule montre qu'elle est éluée dans le volume mort, probablement agrégée (résultat non montré). En présence de *pC*, nous observons sur le Western blot qu'une faible quantité de  $_{\text{H}}$ ExsA est éluée à un volume de 13 ml (fraction 50, Figure 63.A), montrant ainsi qu'une partie de la protéine est stabilisée en solution par la présence d'ADN.

ExsD seule, qui est un trimère en solution (Zheng *et al.*, 2007), est éluée au même volume que ce soit en présence ou en absence de *pC*, ce qui confirme son incapacité à se fixer à l'ADN (Figure 63.A).

Le complexe  ${}^H\text{ExsA-ExsD}$  est élué à un volume de 14,1 ml comme nous l'avions déjà observé (Figure 63.A). Après incubation avec la sonde *pC*, une modification claire du profil d'éluion est observée: une fraction de  ${}^H\text{ExsA}$  est éluée avant le complexe à un volume de 13 ml, ce qui correspond à l'éluion du complexe nucléoprotéique *ExsA/pC* décrit précédemment (Figure 63.A). Cette dissociation est dépendante d'une séquence cible de *ExsA* car un fragment non-spécifique n'est pas capable de dissocier *ExsA* du complexe (Figure 63.B).

*ExsA* est donc en équilibre entre son interaction avec *ExsD* et sa fixation sur *pC*, il ne peut pas interagir avec les deux en même temps.

## IV. Discussion

### IV.1 Le complexe *ExsA/ExsD* ne se fixe pas à l'ADN.

Lors de cette étude, nous voulions déterminer si *ExsD* inhibe l'activité transcriptionnelle de *ExsA* en l'empêchant de se fixer à l'ADN. Pour cela, j'ai entrepris de comparer l'activité de liaison à l'ADN de *ExsA* seule ou complexée à *ExsD* en réalisant des expériences de retard sur gel. Un retard de la sonde *pC* a été observé en présence du complexe *ExsA/ExsD*, qui possédait la même mobilité électrophorétique que celui induit par la fixation de  ${}^H\text{ExsA}$  sur *pC* (Figure 62). Ce retard résultait probablement de la fixation de *ExsA* (2 monomères) libérée du complexe avec *ExsD*. Cependant, le complexe *ExsA-ExsD* (65kDa) présentant une masse molaire proche de celle correspondant à 2 monomères de *ExsA* (66 kDa), nous ne pouvions pas exclure que le retard observé soit dû à la fixation sur la sonde d'un complexe *ExsA/ExsD*. Notons cependant que comme chaque monomère de *ExsA* induit une courbure de l'ADN, la fixation sur l'ADN d'un

monomère de ExsA (en complexe) ou de deux monomères devrait engendrer des retards différents.

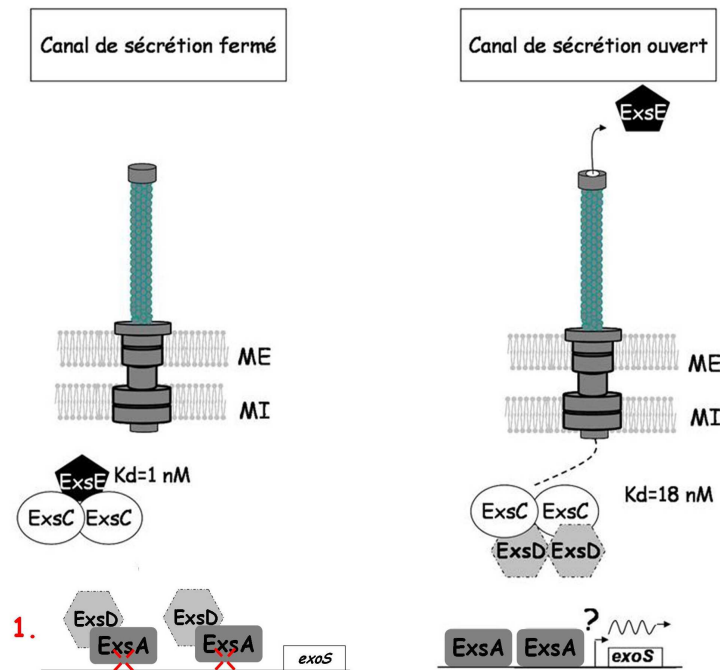
Pour s'assurer que le retard observé était bien dû à la fixation de deux ExsA et non à celle d'un complexe ExsA-ExsD, nous avons utilisé deux approches : i) identifier les protéines présentes au sein du complexe nucléoprotéique en les détectant grâce à des anticorps spécifiques, ii) visualiser le comportement en solution de ExsA soit seule, soit en interaction avec ExsD, en présence de la sonde *pC*. Nous avons ainsi pu montrer que i) ExsA est la seule protéine présente au sein du complexe nucléoprotéique observé par retard sur gel (Figure 62), ii) ExsA interagit soit avec la sonde *pC*, soit avec ExsD (Figure 63).

L'ensemble de ces résultats indique clairement que

- ExsD empêche ExsA de se fixer sur l'ADN car le complexe ExsA/ExsD ne se lie pas à la sonde *pC*,

- ExsA est en équilibre entre son interaction avec ExsD et sa fixation sur *pC*.

Ces conclusions nous ont permis d'établir un modèle d'inhibition qui montre pour la première fois le mécanisme moléculaire grâce auquel un ligand de type protéique inhibe l'activité d'un facteur de transcription de type AraC/XylS (Figure 64).



**Figure 64. L'anti-activateur ExsD inhibe la fixation sur l'ADN de ExsA au sein d'un complexe de ratio 1 :1**

Les constantes d'affinité mesurées *in vitro* pour les complexes ExsE/ExsC et ExsC/ExsD sont indiquées en nM **A)** En absence d'activité de sécrétion ExsC et ExsE forment un complexe de ratio 2:1 et ExsD séquestre ExsA au sein d'un complexe 1:1 afin d'empêcher sa fixation sur l'ADN. **B)** Suite à l'activation du SST3, ExsE est transloquée, ExsD et ExsC forment un complexe de ratio 2 :2. ExsA se fixe sous forme de deux monomères sur ses séquence cibles (de manière coopérative sur certains promoteurs) afin d'activer la transcription.

Dans ce modèle, l'équilibre « normal » entre les complexes ExsE/ExsC, ExsC/ExsD, ExsD/ExsA et ExsA/ADN, favorise la formation des complexes ExsE/ExsC et ExsD/ExsA, car ExsC interagit préférentiellement avec ExsE (Zheng *et al.*, 2007). La sécrétion de ExsE permettrait de déplacer les équilibres de ces interactions, ce qui engendre la formation du complexe ExsD/ExsC dont l'interaction est thermodynamiquement moins favorable que celle entre ExsC et ExsE (Zheng *et al.*, 2007).

Pour que ces équilibres soient modifiés rapidement (induction ou répression de la transcription des gènes du SST3 en fonction de la présence de cellules cibles potentielles), les interactions entre les différentes protéines de cette cascade doivent être dynamiques et pour cela, les affinités qui les relie, ainsi que l'affinité de ExsA pour l'ADN, doivent s'inscrire dans le même ordre de grandeur. Les

affinités mesurées *in vitro* le montre bien ; le  $K_d$  entre ExsE et ExsC et entre ExsC et ExsD sont tous deux de l'ordre du nM et les  $K_D$  apparents de ExsA pour les promoteurs  $p_C$ ,  $p_D$  et  $p_T$  se situent dans ce même ordre, 11 et 5 nM (Brutinel *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007). Il est donc très probable que l'affinité entre ExsA et ExsD soit de l'ordre du nM.

#### **IV.2 Les protéines purifiées indépendamment n'interagissent pas, pourquoi ?**

Alors que ExsA et ExsD forment un complexe stable lorsqu'elles sont co-produites *in vivo*, nous ne sommes pas parvenus à observer d'interaction entre les protéines purifiées produites séparément.

Nous pensons que ce défaut d'interaction est dû à la protéine purifiée ExsA pour deux raisons. Tout d'abord, ExsA est sous forme agrégée lorsqu'elle est purifiée seule ; il est donc probable qu'elle soit mal repliée, ce qui empêcherait son interaction avec ExsD. De plus, dans des conditions expérimentales similaires à celles que nous avons utilisées, la protéine ExsD purifiée interagit parfaitement *in vitro* avec ExsC; l'anti-activateur ne serait donc pas la protéine « limitante » (Zheng *et al.*, 2007).

Pourtant, la protéine ExsA purifiée est capable de se fixer sur ses promoteurs cibles et d'être stabilisée en solution en présence d'ADN (chapitre IV) : une partie de la protéine peut donc interagir avec son « partenaire ADN » *in vitro*. De plus, nous avons essayé de former le complexe ExsD/ExsA en incubant ExsD avec les deux domaines purifiées Nter et Cter de ExsA, qui eux ne se trouvent pas sous forme agrégé ; le défaut d'interaction ne semble donc pas être entièrement dû à l'état agrégé de la protéine ExsA.

Notons qu'à partir d'extraits cytosoliques de *E. coli* contenant soit la protéine ExsA surproduite, soit ExsD, il a été montré au laboratoire (Figure II du manuscrit en annexe) que ExsD interfère dans la fixation à l'ADN de ExsA, observation en

accord avec les résultats obtenus avec le complexe pré-formé. Il s'agit de l'unique fois où nous avons observé une « interaction » entre les deux protéines non co-produites. Par contre, cela a nécessité une quantité très élevée de protéine ExsD par rapport à ExsA (Figure II du manuscrit en annexe). Peut-être que l'interaction entre ExsA et ExsD nécessite un co-facteur que nous n'avons pas identifié (comme un cation divalent ?) et qui serait perdu au cours de la purification de ExsA. Cette hypothèse pourrait être vérifiée, et la nature du co-facteur identifié, par la résolution aux rayons X de la structure du complexe. S'il s'agit d'un co-facteur de nature cationique, celui-ci pourra être détecté par des expériences de spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique.

La difficulté d'observer l'interaction entre un ligand protéique et une protéine de type AraC/XylS à partir des protéines purifiées *in vitro* est un cas commun. En effet, les interactions entre MxiE/IpgC, MxiE/OspD1-Spa15 et InvF/SicA (Pilonieta and Munson, 2008; Parsot *et al.*, 2005; Darwin and Miller, 2001) ont uniquement été observées suite à la co-production des deux protéines *in vivo*. Nous pouvons penser que les deux protéines nécessitent d'être co-traduites pour interagir et /ou que la protéine ExsA ne se trouve jamais seule « dans la cellule » : elle est soit avec ExsD soit avec l'ADN. Ainsi, en absence de ses ligands, la protéine produite seule ne pourrait pas se replier correctement. Pourtant, ce défaut ne l'empêche pas d'interagir avec la sonde *pC* et l'expérience de dénaturation/renaturation de ExsA en présence d'ExsD n'a pas fonctionné. L'ADN posséderait t'il un effet stabilisateur *in vitro* sur la protéine ExsA purifiée que ExsD ne possède pas?

#### **IV.3 Etat oligomérique de la protéine ExsD.**

Il semblerait que la protéine ExsD possède une grande flexibilité au niveau de son état oligomérique. En effet, nous avons montré que ExsD est un monomère en interaction avec ExsA. Le complexe ExsC/ExsD a une stoechiométrie de 2:2, mais nous ne savons pas si au sein de ce complexe, ExsD se trouve sous forme de

deux monomères ou d'un dimère. Enfin, la protéine ExsD seule en solution est trimérique (Zheng *et al.*, 2007).

Etonnamment, l'activité d' « auto-association » de ExsD n'est pas nécessaire à son activité de régulateur (Lykken *et al.*, 2006). Nous pouvons donc nous demander si la forme trimérique existe réellement physiologiquement. De plus, si ExsD se trouve sous forme de deux monomères avec ExsC, l'idée de cette flexibilité pourrait être réfutée. Ainsi l'anti-activateur n'existerait que sous une seule forme, monomérique. Seule la résolution de la structure du complexe ExsC/ExsD permettra de répondre à cette question.

La structure du trimère en solution a récemment été résolue par diffraction aux rayons X. Elle montre que l'auto-association de ExsD ne s'effectue pas à travers les régions coiled-coil de la protéine (Bernhards *et al.*, 2009). Il est possible que ces régions soient uniquement dédiées à l'interaction avec ses partenaires et non à son auto-association.

Dans cette étude, les auteurs proposent que ExsD possède des homologies structurales avec une protéine qui se fixe à l'ADN, le répresseur KorB (Bernhards *et al.*, 2009). Pour conforter cette hypothèse, l'interaction entre ExsD et les séquences cibles de ExsA a été démontrée par fluorimétrie, mais avec une affinité très faible (Bernhards *et al.*, 2009). Il est à noter que les auteurs n'ont pas vu d'effet de la protéine ExsD purifiée sur la fixation à l'ADN de ExsA, ni même la fixation de ExsD sur l'ADN dans leurs expériences de retard sur gel. La possibilité que ExsD se fixe sur les promoteurs du SST3 va à l'encontre de nos résultats et de ceux obtenus pour l'homologue de ExsD chez *V. parahaemoliticus* (Zhou *et al.*, 2008).

#### **IV.4 Comment ExsD empêche ExsA de se fixer à l'ADN ?**

Lors de cette étude, nous avons conclu, contrairement à notre hypothèse de départ, que le domaine N-terminal de ExsA (1-168) n'est pas suffisant à l'interaction avec ExsD.

Dans une étude récente, l'équipe de T. Yahr propose que le domaine N-terminal de ExsA se termine en position **149**, et montre que suite à leur co-production, la protéine  ${}^H\text{ExsA 1-180}$  co-élue avec ExsD sur résine de nickel (Brutinel *et al.*, 2009). Etonnamment, les auteurs concluent de ce résultat que le domaine N-ter de ExsA est suffisant pour interagir avec ExsD.

Suite à cette publication, j'ai réalisé la co-production et la co-purification de la protéine  ${}^H\text{ExsA 1-183}$  avec ExsD. Dans mes conditions expérimentales, je n'ai pas observé la co-élution des deux protéines sur colonne de chromatographie au nickel. De plus, par la technique du double hybride bactérien, nous n'avons pas observé d'interaction entre ExsD et les protéines ExsA **1-168** et ExsA **1-183** (non montré).

ExsD inhiberait donc l'activité de ExsA en agissant sur son domaine N-terminal et sur son domaine C-terminal. Cette hypothèse est confortée par une expérience préliminaire de protéolyse que j'ai récemment réalisée (non montrée). Au sein du complexe, ExsA résiste à des concentrations élevées de protéases, tandis qu'au moins les 30 premiers acides aminés de ExsD sont coupés. Ce résultat nous suggère qu'aucun des deux domaines de ExsA, n'est accessible au protéase. Les deux domaines seraient enfouis dans la structure du complexe et seraient donc nécessaires à l'interaction avec ExsD.

Nous savons maintenant que ExsD empêche ExsA de se fixer à l'ADN, il reste cependant à déterminer les mécanismes impliqués dans cet inhibition. Il est possible que ExsD empêche la dimérisation du domaine N-terminal impliqué dans la fixation coopérative et/ou qu'il masque le ou les motifs HTH du domaine C-terminal. L'interaction avec le Nter peut également affecter l'orientation du domaine Cter l'empêchant d'interagir correctement avec ses cibles ADN. Nous ne sommes qu'au début de la compréhension du mécanisme d'inhibition qui nécessite de mieux redéfinir les zones d'interaction.



# Quatrième Partie

## Conclusion et Perspectives



# Chapitre VII Conclusion et Perspectives

## I. Conclusion

L'expression des gènes du SST3 de *P. aeruginosa* est finement régulée en fonction des conditions environnementales. Les deux signaux qui induisent l'expression de ces gènes sont *in vivo*, le contact direct avec la cellule cible et *in vitro*, la déplétion en calcium du milieu extracellulaire. A l'inverse, le stress métabolique, les dommages à l'ADN, une faible osmolarité du milieu extracellulaire et l'activation de facteurs de virulence associés à une infection chronique sont autant de conditions qui vont entraîner la répression des gènes du SST3.

Cette activation « conditionnelle » du SST3 est avantageuse pour *P. aeruginosa* ; elle lui permet de conserver ses ressources énergétiques et de limiter l'expression des antigènes du SST3 afin d'éviter son élimination par le système immunitaire de l'hôte. Près de 10% des gènes de *P. aeruginosa* sont dédiés à la régulation ce qui s'illustre, pour les opérons du SST3, par les nombreuses voies de signalisation qui sont impliquées dans le contrôle de leur expression.

L'objectif de mon projet de thèse était d'étudier le facteur de transcription vers lequel toutes ces voies de régulation convergent et qui contrôle directement la transcription de la totalité des opérons de SST3, ExsA. En effet, malgré son rôle primordial, cette protéine n'était plus étudiée depuis 1995.

La première phase de mon travail a été de déterminer les rôles respectifs des domaines C-ter et N-ter d'ExsA, puis de regrouper les informations obtenues pour définir les propriétés d'activation de la transcription de ExsA sur ses promoteurs cibles. L'approche *in vivo*, par surproduction de ces domaines dans la souche sauvage et dans la souche mutante  $\Delta$ ExsA, a soulevé de nombreuses hypothèses qui ont ensuite été confirmées par une approche *in vitro*. Nous avons ainsi montré

que le domaine C-terminal de ExsA est bien le domaine de fixation à l'ADN et que deux monomères se fixent sur le promoteur des gènes de régulation, *pC*. En revanche, ce domaine isolé possède une affinité pour *pC* et une activité transcriptionnelle inférieure à celle de la protéine entière. En effet, la fixation efficace de ExsA sur le promoteur *pC* requiert sa dimérisation à travers son domaine N-terminal. Enfin, nous proposons que l'hélice  $\alpha$  (156-163) en C-ter de ce domaine N-ter est nécessaire à cette interaction.

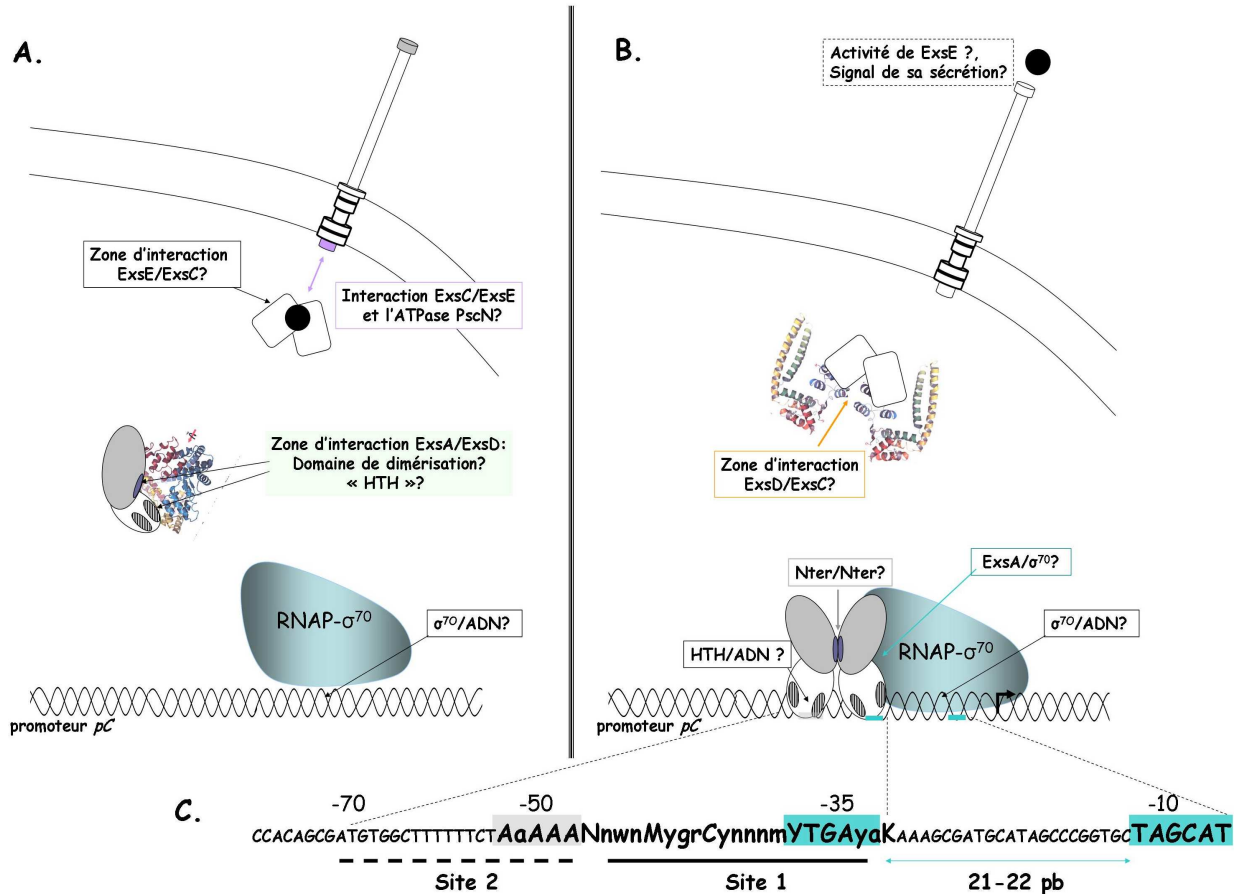
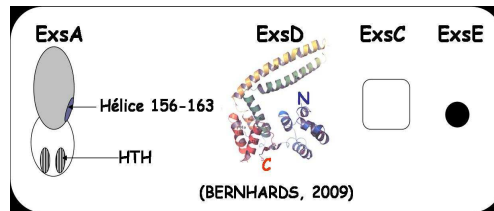
L'autre partie de ma thèse a consisté en l'étude de l'interaction entre ExsA et son anti-activateur ExsD pour découvrir le mécanisme moléculaire de l'inhibition de la transcription exercé par ExsD. La co-production des deux protéines *in vivo* nous a permis d'obtenir le complexe ExsA/ExsD et de montrer qu'il s'agit d'un complexe hétérodimérique incapable de se fixer à l'ADN. ExsD inhibe donc l'activation de la transcription des gènes du SST3 en empêchant ExsA de se fixer sur ses séquences cibles. Contrairement à ce qui pouvait être attendu, nous proposons que les domaines N-ter et C-ter de ExsA sont nécessaires à cette interaction avec ExsD.

Simultanément à nos travaux, le mécanisme d'activation de la transcription de ExsA a été élucidé par une équipe aux USA. La séquence consensus de fixation a été redéfinie et repositionnée depuis le -33 jusqu'au -57 en amont du +1 de la transcription sur l'ensemble des promoteurs du SST3 (Figure 65) (Brutinel *et al.*, 2008). De plus, les auteurs ont montré que ExsA est un activateur de classe II  $\sigma$ 70-dépendant qui facilite le recrutement de l'ARN polymérase sur les promoteurs (Vakulskas *et al.*, 2009). L'espacement inhabituel de 21/22 pb entre les sites -35 et -10 (au lieu des 17 pb habituelles pour les promoteurs  $\sigma$ 70-dépendant) et la présence d'un site de fixation de ExsA qui chevauche la séquence -35 nous suggèrent que ExsA agirait de manière similaire à l'activateur SpoOA de *Bacillus subtilis* (Kumar and Moran, 2008). Cet activateur permet de repositionner l'ARN

polymérase 4 pb en aval de la région -35, de telle manière que la sous-unité  $\sigma^{70}$  puisse interagir avec la séquence -10 (Vakulskas *et al.*, 2009).

Les conclusions de mon travail de thèse s'intègrent dans le modèle proposé pour la cascade de couplage « ADCE » qui permet de relier l'activité de sécrétion à l'activité transcriptionnelle de ExsA (Bernhards *et al.*, 2009; Thibault *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2007; Lykken *et al.*, 2006; Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005; Dasgupta *et al.*, 2004; McCaw *et al.*, 2002). De plus, nos résultats complètent les connaissances récentes concernant le mécanisme d'activation de la transcription des opérons du SST3 par ExsA (Brutinel *et al.*, 2009; Vakulskas *et al.*, 2009; Brutinel *et al.*, 2008).

Les perspectives proposées à l'issue de ces travaux se fondent donc sur l'ensemble de ces découvertes qui sont regroupées sur la Figure 65



**Figure 65. Modèle des interactions protéines/protéines de la cascade de couplage sécrétion/synthèse et du mécanisme d'activation de la transcription par ExsA et l'ARN polymérase sur le promoteur *pC*.**

A. Canal de sécrétion fermé. B. Canal de sécrétion ouvert. C. Séquence du promoteur *pC*: Les séquences (putatives) -10 et -35 sont indiquées en bleu et la séquence consensus de fixation sur l'ADN de ExsA est marquée en gras. Les sites de fixation 1 et 2 de ExsA sont indiqués par des traits plein ou en pointillé respectivement. La double flèche l'espacement entre le -10 et -35.

## II. Perspectives.

### II.1 Etude des interactions protéine/protéine.

Comme les deux domaines de ExsA sont nécessaires à l'interaction avec ExsD, nous pouvons donc envisager deux mécanismes moléculaires qui

permettraient à ExsD d'empêcher la fixation de ExsA sur ses cibles ADN : l'inhibiteur « cache » les motifs « HTH » afin d'empêcher leur fixation sur l'ADN et/ou inhibe l'homodimérisation du domaine N-ter de ExsA sur l'ADN.

Pour définir les régions d'interactions entre les deux protéines, nous avons entrepris de résoudre la structure du complexe ExsA/ExsD par diffraction aux rayons X. Pour cela, des tests de cristallogénèse du complexe ont été effectués en collaboration avec Viviana Job, dans l'équipe d'Andréa Dessen (IBS de Grenoble). Malgré les 400 conditions testées, et ceci pour les deux complexes purifiés ExsA<sub>H</sub>/ExsD et <sub>H</sub>ExsA/ExsD, aucun cristal n'a été obtenu. Ces tests seront reproduits à partir du complexe comportant une forme de ExsD tronquée (30-276), condition établie par nos expériences de protéolyse ménagée.

Une autre approche serait tout d'abord d'identifier par la technique du double hybride, des mutations dans ExsA et ExsD qui engendrent un défaut d'interaction. Les mutants d'intérêt seront confirmés pour leur capacité, diminuée ou abolie, à interagir par coproduction et purification comme cela a été fait pour les protéines sauvages. Pour ExsD, il serait judicieux de générer des mutants dans les aa qui sont conservés chez ses homologues dans *A. hydrophila*, *P. luminescens* et *V. parahaemolyticus* et qui se situent dans son motif coiled-coil, supposé impliqué dans les interactions avec ses partenaires protéiques (voir Annexe). Concernant ExsA, sa séquence est bien conservée avec celle de ses homologues chez les espèces décrites ci-dessus (voir Annexe), ce qui ne nous permet pas d'identifier facilement des aa d'intérêt. Nous utiliserons donc une approche plus globale, en générant des mutations ponctuelles de manière aléatoire dans l'ensemble de la séquence.

Il est intéressant de noter que ExsC et ExsA semblent interagir avec deux régions distinctes de ExsD. En effet, la région N-terminale de ExsD (aa 18-21) est essentielle à son interaction avec ExsC (Lykken *et al.*, 2006) tandis que la protéolyse de cette région par la trypsine au sein du complexe ExsA<sub>H</sub>/ExsD n'influe pas sur la stabilité du complexe (non montré). Nous pouvons alors envisager que ExsC se

fixe sur le complexe ExsA/ExsD afin de permettre la libération de ExsA par son anti-activateur. Pour étudier cette hypothèse, il faudrait analyser par SEC l'effet de la protéine purifiée ExsC sur le comportement du complexe en solution. Nous pourrions ainsi observer s'il existe un complexe tripartite ou si ExsD interagit de manière mutuellement exclusive avec ExsA ou ExsC. Enfin, il a été montré que l'interaction ExsC/ExsE serait très largement hydrophobe, contrairement à l'interaction ExsC/ExsD (reflétées par la différence des valeurs d'enthalpie mesurées durant la formation des complexes *in vitro* (Zheng *et al.*, 2007)). Ensemble, ces observations nous suggèrent que, pour deux partenaires, il existe deux régions distinctes d'interaction ; il ne s'agirait donc pas d'un phénomène de compétition mais plutôt d'allostérie.

## II.2 Les rôles particuliers de ExsE, ExsC et ExsD.

ExsE est le premier substrat du SST3 à être transloqué dans la cellule cible. Aucune activité cytotoxique ne lui a été attribué jusqu'à aujourd'hui. Sa translocation permettrait uniquement de déplacer les équilibres d'interaction. A l'heure actuelle, le signal qui permet de déclencher la translocation de ExsE et le mécanisme permettant la hiérarchisation de la sécrétion ne sont pas connus. Une des hypothèses pour ce mécanisme est la reconnaissance du complexe substrat/chaperonne par l'ATPase PscN (ou le complexe protéique associé). En effet, il est envisageable que le complexe ExsC/ExsE interagisse avec l'ATPase qui permettrait le dépliement du complexe puis la translocation d'ExsE avant les effecteurs, mais après les translocateurs. Cette ATPase est actuellement en cours d'étude au laboratoire. Il serait intéressant de comparer son activité sur la stabilité du complexe ExsC/ExsE par rapport à d'autres complexes dont nous disposons et dont les substrats sont sécrétés avant ou après ExsE, tels PopB/PcrH ou ExoS/SpcS.

Contrairement à *S. flexneri* et *S. enterica*, l'activité du régulateur de type A/X (ExsA) chez *P. aeruginosa* n'est pas directement régulée par la chaperonne (ExsC)



du substrat sécrété (ExsE) et ne nécessite pas de co-activateur, mais elle est contrôlée négativement par une quatrième protéine, ExsD.

La présence de ExsD nous indique que la cascade de couplage « sécrétion/synthèse » de *P. aeruginosa* serait plus complexe que celles connues chez d'autres bactéries. De plus, on ne retrouve pas de protéines possédant les caractéristiques de ExsD dans les autres cascades de régulation. Une hypothèse serait que ExsD soit capable d'intégrer des signaux extérieurs à la cascade de couplage « sécrétion/synthèse ». Cette hypothèse est confortée par la mise en évidence d'une voie de régulation qui permet d'induire la transcription des gènes du SST3 suite au contact avec certains types cellulaires (cellules épithéliales et lignées « macrophage-like ») de manière ExsA-dépendante mais ExsC-indépendante (Dasgupta *et al.*, 2006). Pour expliquer que ExsA puisse être libérée de ExsD malgré l'absence de ExsC, les auteurs proposent que l'activité de ExsD soit directement régulée par une autre protéine qui n'a aucun lien avec la cascade de couplage. D'après cette étude, le régulateur global Vfr serait cette protéine car en son absence la voie ExsC-indépendante n'est plus activée (Dasgupta *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que Vfr n'a aucun effet direct sur la synthèse de ExsA. La mise en évidence d'un lien direct entre Vfr et ExsD, par exemple par double hybride, montrerait que ExsD est bien capable d'intégrer des signaux provenant de voies de régulation dites globales. Bien sur, nous ne pouvons pas exclure que ExsD n'interagisse pas directement, ou uniquement, avec Vfr. Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier « l'Interactome de ExsD ». Pour cela, des cellules qui déclenchent soit la voie ExsC-dépendante (cellules CHO), soit la voie ExsC-indépendante (cellules épithéliales) seront infectées avec la souche CHA. Après l'infection, des expériences de co-immunoprécipitation seront réalisées à partir des extraits cytosoliques bactériens avec des anticorps anti-ExsD dont nous disposons. Les partenaires co-précipités avec ExsD seront ensuite identifiés par spectrométrie de masse.

### II.3 Régulation de ExsA

Jusqu'à récemment, nos connaissances concernant la régulation directe de la synthèse et de l'activité de ExsA se limitaient à son auto-régulation par contrôle de l'opéron *exsCEBA* et son inhibition par ExsD. Mais il vient d'être montré qu'il existe un deuxième promoteur permettant la transcription de *exsA*, situé en amont même du gène, dont l'activité serait  $\sigma^{70}$ -dépendante et ExsA-indépendante (non publié, S. Lory, *Pseudomonas* Congress 2009). De plus, il existe un autre niveau de régulation dans la synthèse de ExsA; la stabilité des transcrits de *exsA* est régulée par la protéine RsmA, dont le rôle serait d'inhiber l'action hydrolytique d'une endonucléase sur ces transcrits (non publié, S. Lory, *Pseudomonas* Congress 2009). Cette découverte montre pour la première fois **un lien direct** entre une voie de régulation globale, RetS/LadS/GacSA/RsmZY/RsmA, et ExsA, voie de régulation qui joue un rôle essentiel dans la régulation réciproque infection aiguë/chronique.

Nous avons observé que la protéine ExsA est absente des souches de *P. aeruginosa* et *E. coli* dans lesquelles son domaine N-ter est surproduit, suggérant que cette surproduction du N-ter entraînerait la protéolyse de ExsA. Nous pouvons donc envisager que la concentration intracellulaire de ExsA soit régulée par l'activité d'une protéase, comme cela a précédemment été montrée pour d'autres régulateurs de type A/X. Nous pourrions, dans un premier temps, comparer la concentration intracellulaire de ExsA dans la souche CHA et dans des souches de *P. aeruginosa* et *E. coli*, déficientes pour des protéases comme Lon ou ClpXP, des protéases à large spectre.

En 2004, la protéine PtrA a été identifiée comme le second inhibiteur protéique de ExsA (Ha *et al.*, 2004). Cette protéine serait spécifique du SST3 et synthétisée uniquement en réponse à un stress cuivrique. Étonnamment, toutes les expériences qui ont été menées au laboratoire pour observer l'interaction directe

entre ExsA et PtrA (co-production et purification, co-immunoprécipitation, double hybride ; S. Elsen, non publié) n'ont pas permis de confirmer ces résultats. Pourtant, nous ne pouvons pas exclure que ExsA puisse interagir avec d'autres protéines que ExsD étant donné la complexité de ce régulon et l'ensemble des stimuli qu'il intègre.

Pour découvrir d'autres partenaires de ExsA, nous disposons au laboratoire du plasmide pJN105-ExsA<sub>H</sub>, qui permet de contrôler par l'arabinose, la production de la protéine fusionnée à une étiquette histidine dans *P. aeruginosa*. Après avoir vérifié que cette protéine est bien capable de compléter une souche  $\Delta$ ExsA nous pourrions chercher de nouveaux partenaires de la protéine à travers des expériences de co-immunoprécipitation. Ces expériences seront effectuées dans des conditions où le SST3 est **réprimé** (stress métabolique, dommages à l'ADN, faible osmolarité,) ou **suractivé** (souches  $\Delta$ fliC,  $\Delta$ algR et en présence d'azithromycine, une molécule inhibitrice du QS qui induit une forte surexpression des gènes du SST3).

Pour identifier d'autres voies impliquées dans la régulation du SST3, nous proposons aussi d'étudier des isolats cliniques de *P. aeruginosa* provenant de patients atteints de la mucoviscidose qui n'expriment pas le SST3 (Dacheux *et al.*, 2001a). En effet, le génotypage de nombreuses souches issues de patients atteints de la mucoviscidose a montré que le génome de ces souches différait systématiquement de celui de la souche PAO1; de nombreuses mutations ont été intégrées dans le génome au cours de l'infection (Smith *et al.*, 2006). Les gènes les plus fréquemment mutés sont des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques (*mexZ* et *mexA*) et dans la régulation de la virulence, tels *lasR*, *vfr* et *exsA* (Smith *et al.*, 2006). Il existerait donc une « adaptation génétique » par *P. aeruginosa* au cours de l'infection chronique, prévalente dans les souches hypermutatrices, qui permettrait « d'éteindre » l'expression de facteurs de virulence agressifs à la faveur des facteurs qui permettent son installation chronique dans l'hôte (Mena *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2006 ).

Il a été montré au laboratoire que la complémentation en *trans* de *exsA* dans ces souches déficientes pour le SST3 permet de restaurer *ex vivo* la cytotoxicité et *in vitro* la sécrétion des protéines du SST3 (Dacheux *et al.*, 2001a). De plus, les souches qui ont été séquencées ne possèdent pas de mutation dans *exsA*. L'absence d'expression du SST3 résulterait donc d'un défaut d'activité et/ou de synthèse de ExsA. Ce défaut pourrait être dû à des mutations adaptatives dans les promoteurs *pC* et/ou *pA* ou dans des gènes appartenant à des voies de régulation qui contrôlent la synthèse et/ou l'activité de ExsA. Il faudra donc dans un premier temps, séquencer les gènes *exsA* et les promoteurs *pC* et *pA* de l'ensemble de ces souches et analyser la transcription de *exsA* par RT-PCR. Pour les souches qui ne possèdent pas de mutation dans ces régions ni de défaut de transcription, nous identifierons les gènes mutés par une approche de complémentation en *trans* de ces souches à l'aide d'une banque de cosmides contenant le génome de la souche cytotoxique CHA. Pour réaliser le criblage des mutants, le test de cytotoxicité envers les macrophages réalisés en plaque 96 puits pourra être utilisé.

## II.4 Régulation par ExsA

La transcription des gènes du SST3 chez *S. flexneri* et *S. enterica* est contrôlée par au moins deux régulateurs, VirB et MxiE, ou HilD, HilA et InvF, ce qui impose une hiérarchie dans la transcription ; d'abord les gènes codant pour l'injectisome (et pour les effecteurs « early » dans le cas de VirB) sont exprimés, puis ceux des effecteurs. A l'inverse, chez *P. aeruginosa*, ExsA régule seul la totalité des gènes du SST3.

Chez *S. enterica*, l'activation des promoteurs du SPI-1 au cours de l'induction (comportant des sites de fixation coopératifs) diffère selon le type de gènes qu'ils contrôlent (Temme *et al.*, 2008).

L'activité transcriptionnelle des promoteurs des gènes codant pour :

- des régulateurs transcriptionnels (*hilC*, *hilD*) augmente graduellement dans l'ensemble de la population
- des composants de l'appareil d'injection (*pgrH*) est tout de suite totalement activée (modèle «tout ou rien») dans une partie de la population. La fraction de population induite augmente avec le temps.
- des effecteurs et chaperonnes (*sicA*) augmente graduellement dans une partie de la population.

L'activité des promoteurs de *hilC* et *pgrH* décroît rapidement (55 min) et de manière exponentielle après l'induction (phénomène appelé «relaxation») tandis que l'activité de *sicA* décroît lentement et de manière moins marquée. Cette différence serait due au fait que l'activation de la transcription du promoteur *sicA* est directement reliée à l'activité de sécrétion du SPI-1 à travers l'activité de InvF (voir chapitre II) et que l'activité de InvF est elle-même régulée par SicA. La présence de ces nombreux niveaux de régulation de cette activation augmenterait donc le temps de relaxation (Temme *et al.*, 2008).

Nous remarquons que de manière similaire à ce qui a été décrit pour le promoteur *pS* (Rietsch and Mekalanos, 2006), l'activité du promoteur *sicA* est induite dans seulement une partie de la population. Nous n'avons malheureusement pas déterminé si l'activité transcriptionnelle de *pC* augmente graduellement au cours de l'induction dans la totalité de la population comme c'est le cas pour *hilD*, ce qui serait en accord avec le fait que *pC* contrôle la transcription de *exsA*. Il serait donc intéressant d'étudier l'activité des différents promoteurs du SST3 de *P. aeruginosa* au cours du temps.

Des études récentes suggèrent que ExsA posséderait des propriétés de fixation à l'ADN et d'interaction avec l'ARN polymérase variables selon ses promoteurs cibles, comme cela a précédemment été montré pour d'autres régulateurs de type A/X. En effet, ces résultats montrent que ExsA ne se fixe pas nécessairement de manière coopérative sur l'ensemble de ses promoteurs cibles et la protéine induit

une courbure plus importante sur le promoteur  $pC$  que sur les promoteurs  $pD$  et  $pT$  (Brutinel *et al.*, 2009; Brutinel *et al.*, 2008). Nous avons aussi observé un comportement des promoteurs différent *in vivo*, le phénomène de bistabilité rapporté pour  $pS$  (Rietsch and Mekalanos, 2006) n'ayant pas été observé lors de l'analyse de l'expression de  $pC$ . Les propriétés différentes de ExsA selon les promoteurs qu'il régule pourraient-elles permettre une hiérarchisation de la transcription des gènes *in vivo* ? Il est aussi possible que des facteurs additionnels, comme Vfr, PsrA ou un co-activateur inconnu, agissent de concert avec ExsA dans l'activation de certains promoteurs.

Il serait donc important d'étudier l'expression du régulon de ExsA. Nous pourrions déterminer *in vitro* si les deux motifs « HTH » et la dimérisation de ExsA sont nécessaires à sa fixation sur l'ADN sur l'ensemble des promoteurs du SST3 **ou seulement** sur certains. Pour cela, il faudrait réaliser des expériences de retard sur gel à partir de la protéine ExsA mutées soit dans les motifs « HTH » soit dans l'hélice  $\alpha_{156-163}$ .

## II.5 Comprendre pour mieux combattre

Lorsque tous les acteurs majeurs de la régulation du SST3 seront connus, il sera possible de comprendre comment cette régulation de et par ExsA fonctionne à un niveau moléculaire, avec l'espoir que cette compréhension sera convertie en de nouvelles thérapies qui permettront de traiter les infections à *P. aeruginosa*.

En effet, l'utilisation massive d'antibiotiques a conduit à l'émergence de souches bactériennes multirésistantes. Devant ce phénomène, l'objectif est de développer de nouvelles molécules qui inhibent des cibles comme les facteurs de virulence qui ne sont pas nécessaires à la croissance, afin de limiter la sélection de résistants. Les régulateurs de type A/X, de par leur implication dans la régulation de la virulence bactérienne et leur présence dans de nombreuses espèces pathogènes, sont une cible de choix. Ainsi, des inhibiteurs dirigés contre le

domaine « 2HTH » sont actuellement en cours de développement (Paratek, Pharmaceuticals, Inc. Boston). Les quatre protéines modèles utilisées pour tester l'effet inhibiteur de ces molécules sur la fixation à l'ADN sont MarA, SoxS, VirF (LcrF) et ExsA.





# Cinquième Partie

## Références bibliographiques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M.I. and Prince, A. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **30**: 627-634.
- Adler, B., Sasakawa, C., Tobe, T., Makino, S., Komatsu, K. and Yoshikawa, M. (1989) A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol.* **3**: 627-635.
- Aebi, C., Bracher, R., Liechti-Gallati, S., Tschappeler, H., Rudeberg, A. and Kraemer, R. (1995) The age at onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis--prognostic significance. *Eur J Pediatr.* **154**: S69-73.
- Ahmer, B.M., van Reeuwijk, J., Watson, P.R., Wallis, T.S. and Heffron, F. (1999) *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol.* **31**: 971-982.
- Akeda, Y. and Galan, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature.* **437**: 911-915.
- 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.
- Alkawash, M.A., Soothill, J.S. and Schiller, N.L. (2006) Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Apmis.* **114**: 131-138.
- Allaoui, A., Sansonetti, P.J. and Parsot, C. (1993) MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* lpa invasins. *Mol Microbiol.* **7**: 59-68.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., et al (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* **59**: 1114-1128.
- 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.
- Andrews, G.P. and Maurelli, A.T. (1992) mxiA of *Shigella flexneri* 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homolog of the low-calcium-response protein, LcrD, of *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* **60**: 3287-3295.
- Arora, S.K., Bangera, M., Lory, S. and Ramphal, R. (2001) A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 9342-9347.
- Asikyan, M.L., Kus, J.V. and Burrows, L.L. (2008) Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **190**: 7022-7034.
- Austin, B.P., Nallamsetty, S. and Waugh, D.S. (2009) Hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner for the production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol.* **498**: 157-172.
- Azghani, A.O. (1996) *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **15**: 132-140.

- Azghani, A.O., Gray, L.D. and Johnson, A.R. (1993) A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture. *Infect Immun.* **61**: 2681-2686.
- Azghani, A.O., Miller, E.J. and Peterson, B.T. (2000) Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung.* **178**: 261-269.
- 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.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. and Filloux, A. (2002) A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **43**: 475-485.
- Barbieri, J.T. and Sun, J. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **152**: 79-92.
- Bastonero, S., Le Priol, Y., Armand, M., Bernard, C.S., Reynaud-Gaubert, M., Olive, D., et al (2009) New microbicidal functions of tracheal glands: defective anti-infectious response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *PLoS One.* **4**: e5357.
- Basturea, G.N., Boderò, M.D., Moreno, M.E. and Munson, G.P. (2008) Residues near the amino terminus of Rns are essential for positive autoregulation and DNA binding. *J Bacteriol.* **190**: 2279-2285.
- Baumler, A.J., Tsolis, R.M., Ficht, T.A. and Adams, L.G. (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun.* **66**: 4579-4587.
- 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.
- Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C. and Mattick, J.S. (2002) Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **184**: 3605-3613.
- Bell, A.I., Gaston, K.L., Cole, J.A. and Busby, S.J. (1989) Cloning of binding sequences for the *Escherichia coli* transcription activators, FNR and CRP: location of bases involved in discrimination between FNR and CRP. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3865-3874.
- Bellair, M. and Withey, J.H. (2008) Flexibility of *Vibrio cholerae* ToxT in transcription activation of genes having altered promoter spacing. *J Bacteriol.* **190**: 7925-7931.
- Beloin, C., McKenna, S. and Dorman, C.J. (2002) Molecular dissection of VirB, a key regulator of the virulence cascade of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem.* **277**: 15333-15344.
- Belyaeva, T.A., Wade, J.T., Webster, C.L., Howard, V.J., Thomas, M.S., Hyde, E.I. and Busby, S.J. (2000) Transcription activation at the *Escherichia coli* melAB promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein. *Mol Microbiol.* **36**: 211-222.
- Bernhards, R.C., Jing, X., Vogelaar, N.J., Robinson, H. and Schubot, F.D. (2009) Structural evidence suggests that antiactivator ExsD from *Pseudomonas aeruginosa* is a DNA binding protein. *Protein Sci.* **18**: 503-513.
- Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F.O., Ros, A., Lucht, F. and Pozzetto, B. (2005) [Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*]. *Pathol Biol (Paris).* **53**: 341-348.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

- Blaylock, B., Riordan, K.E., Missiakas, D.M. and Schneewind, O. (2006) Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol.* **188**: 3525-3534.
- 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.
- Blocker, A., Komoriya, K. and Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 3027-3030.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiliaux, V., Parsot, C. and Sansonetti, P. (1999) The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol.* **147**: 683-693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., *et al* (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol.* **39**: 652-663.
- Blocker, A.J., Deane, J.E., Veenendaal, A.K., Roversi, P., Hodgkinson, J.L., Johnson, S. and Lea, S.M. (2008) What's the point of the type III secretion system needle? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 6507-6513.
- Bodero, M.D., Pilonieta, M.C. and Munson, G.P. (2007) Repression of the inner membrane lipoprotein NlpA by Rns in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **189**: 1627-1632.
- Bourgerie, S.J., Michan, C.M., Thomas, M.S., Busby, S.J. and Hyde, E.I. (1997) DNA binding and DNA bending by the MelR transcription activator protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1685-1693.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L. and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**: 20-26.
- Brencic, A. and Lory, S. (2009) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol.* **72**: 612-632.
- Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L. and Lory, S. (2009) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol.* **73**: 434-445.
- Broms, J.E., Edqvist, P.J., Forsberg, A. and Francis, M.S. (2006) Tetratricopeptide repeats are essential for PcrH chaperone function in *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *FEMS Microbiol Lett.* **256**: 57-66.
- Broz, P., Mueller, C.A., Muller, S.A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A. and Cornelis, G.R. (2007) Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol Microbiol.* **65**: 1311-1320.
- Brutinel, E.D., Vakulskas, C.A. and Yahr, T.L. (2009) Functional domains of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Bacteriol.* **191**: 3811-3821.
- Brutinel, E.D., Vakulskas, C.A., Brady, K.M. and Yahr, T.L. (2008) Characterization of ExsA and of ExsA-dependent promoters required for expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol.* **68**: 657-671.

- Bryan, R., Kube, D., Perez, A., Davis, P. and Prince, A. (1998) Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **19**: 269-277.
- Burghout, P., Beckers, F., de Wit, E., van Boxtel, R., Cornelis, G.R., Tommassen, J. and Koster, M. (2004a) Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* **186**: 5366-5375.
- Burghout, P., van Boxtel, R., Van Gelder, P., Ringler, P., Muller, S.A., Tommassen, J. and Koster, M. (2004b) Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* **186**: 4645-4654.
- Bustos, S.A. and Schleif, R.F. (1993) Functional domains of the AraC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 5638-5642.
- Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., *et al* (2009) Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol.* **73**: 622-638.
- Cambronne, E.D. and 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.
- Carra, J.H. and Schleif, R.F. (1993a) Variation of half-site organization and DNA looping by AraC protein. *Embo J.* **12**: 35-44.
- Carra, J.H. and Schleif, R.F. (1993b) Formation of AraC-DNA sandwiches. *Nucleic Acids Res.* **21**: 435-438.
- Cascales, E. (2008) The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep.* **9**: 735-741.
- Castang, S., McManus, H.R., Turner, K.H. and Dove, S.L. (2008) H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 18947-18952.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerova, M., Guery, B.P. and Faure, K. (2009) Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun.* **77**: 2065-2075.
- Childers, B.M., Weber, G.G., Prouty, M.G., Castaneda, M.M., Peng, F. and Klose, K.E. (2007) Identification of residues critical for the function of the *Vibrio cholerae* virulence regulator ToxT by scanning alanine mutagenesis. *J Mol Biol.* **367**: 1413-1430.
- Cisz, M., Lee, P.C. and Rietsch, A. (2008) ExoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **190**: 2726-2738.
- Cobb, L.M., Mychaleckyj, J.C., Wozniak, D.J. and Lopez-Boado, Y.S. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. *J Immunol.* **173**: 5659-5670.
- Collier, R.J. and McKay, D.B. (1982) Crystallization of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol.* **157**: 413-415.
- Cordes, F.S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E.H., Blocker, A. and Lea, S.M. (2003) Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem.* **278**: 17103-17107.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* **4**: 811-825.

- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. **284**: 1318-1322.
- Cuzick, A., Stirling, F.R., Lindsay, S.L. and Evans, T.J. (2006) The type III pseudomonal exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production. *Infect Immun*. **74**: 4104-4113.
- 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.
- D'Orazio, S.E. and Collins, C.M. (1993) The plasmid-encoded urease gene cluster of the family Enterobacteriaceae is positively regulated by UreR, a member of the AraC family of transcriptional activators. *J Bacteriol*. **175**: 3459-3467.
- Dacheux, D., Attree, I. and Toussaint, B. (2001a) 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., 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., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. and Attree, I. (2001b) Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol*. **40**: 76-85.
- Dacheux, D., Epaulard, O., de Groot, A., Guery, B., Leberre, R., Attree, I., et al (2002) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase aceAB operon. *Infect Immun*. **70**: 3973-3977.
- Dame, R.T., Luijsterburg, M.S., Krin, E., Bertin, P.N., Wagner, R. and Wuite, G.J. (2005) DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J Bacteriol*. **187**: 1845-1848.
- Dangi, B., Gronenborn, A.M., Rosner, J.L. and Martin, R.G. (2004) Versatility of the carboxy-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in transcriptional activation: use of the DNA contact site as a protein contact site for MarA. *Mol Microbiol*. **54**: 45-59.
- Dangi, B., Pelupessey, P., Martin, R.G., Rosner, J.L., Louis, J.M. and Gronenborn, A.M. (2001) Structure and dynamics of MarA-DNA complexes: an NMR investigation. *J Mol Biol*. **314**: 113-127.
- Darwin, K.H. and 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.
- Darwin, K.H. and Miller, V.L. (2000) The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella typhimurium* virulence genes. *Mol Microbiol*. **35**: 949-960.
- Darwin, K.H. and Miller, V.L. (2001) Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *Embo J*. **20**: 1850-1862.
- Darzins, A. (1994) Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis

- proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **11**: 137-153.
- Darzins, A. (1995) The *Pseudomonas aeruginosa* pilK gene encodes a chemotactic methyltransferase (CheR) homologue that is translationally regulated. *Mol Microbiol.* **15**: 703-717.
- Dasgupta, N. and Ramphal, R. (2001) Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **183**: 6636-6644.
- 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.
- Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G.W. and Yahr, T.L. (2006) Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca<sup>2+</sup> and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun.* **74**: 3334-3341.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, S.E. and Ramphal, R. (2002) fleQ, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol.* **184**: 5240-5250.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **280**: 295-298.
- Davies, J.A., Harrison, J.J., Marques, L.L., Foglia, G.R., Stremick, C.A., Storey, D.G., *et al* (2007) The GacS sensor kinase controls phenotypic reversion of small colony variants isolated from biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *FEMS Microbiol Ecol.* **59**: 32-46.
- de Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M.C. and Puchelle, E. (1996) Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* **64**: 1582-1588.
- De Keersmaecker, S.C., Marchal, K., Verhoeven, T.L., Engelen, K., Vanderleyden, J. and Detweiler, C.S. (2005) Microarray analysis and motif detection reveal new targets of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* HilA regulatory protein, including hilA itself. *J Bacteriol.* **187**: 4381-4391.
- Deane, J.E., Roversi, P., Cordes, F.S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., *et al* (2006) Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 12529-12533.
- Dekimpe, V. and Deziel, E. (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology.* **155**: 712-723.
- Desvaux, M., Parham, N.J. and Henderson, I.R. (2004) Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol.* **6**: 111-124.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **77**: 7347-7351.

- Dominguez-Cuevas, P., Marin, P., Marques, S. and Ramos, J.L. (2008a) XylS-Pm promoter interactions through two helix-turn-helix motifs: identifying XylS residues important for DNA binding and activation. *J Mol Biol.* **375**: 59-69.
- Dominguez-Cuevas, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Marques, S., Ramos, J.L. and de Lorenzo, V. (2006) Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J Biol Chem.* **281**: 11981-11991.
- Dominguez-Cuevas, P., Marin, P., Busby, S., Ramos, J.L. and Marques, S. (2008b) Roles of effectors in XylS-dependent transcription activation: intramolecular domain derepression and DNA binding. *J Bacteriol.* **190**: 3118-3128.
- Dorman, C.J. (2007) H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol.* **5**: 157-161.
- Dubern, J.F. and Diggle, S.P. (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst.* **4**: 882-888.
- Dubern, J.F., Lugtenberg, B.J. and Bloemberg, G.V. (2006) The ppuI-rsaL-ppuR quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. *J Bacteriol.* **188**: 2898-2906.
- Dubnau, D. and Losick, R. (2006) Bistability in bacteria. *Mol Microbiol.* **61**: 564-572.
- Egan, S.M. (2002) Growing repertoire of AraC/XylS activators. *J Bacteriol.* **184**: 5529-5532.
- Egan, S.M., Pease, A.J., Lang, J., Li, X., Rao, V., Gillette, W.K., et al (2000) Transcription activation by a variety of AraC/XylS family activators does not depend on the class II-specific activation determinant in the N-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *J Bacteriol.* **182**: 7075-7077.
- Eichelberg, K. and Galan, J.E. (1999) Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and hilA. *Infect Immun.* **67**: 4099-4105.
- Ellermeier, C.D. and Slauch, J.M. (2003) RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol.* **185**: 5096-5108.
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R. and Slauch, J.M. (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol Microbiol.* **57**: 691-705.
- Ellermeier, J.R. and Slauch, J.M. (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Curr Opin Microbiol.* **10**: 24-29.
- Engel, J. and Balachandran, P. (2009) Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol.* **12**: 61-66.
- Ernst, R.K., Moskowitz, S.M., Emerson, J.C., Kraig, G.M., Adams, K.N., Harvey, M.D., et al (2007) Unique lipid modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* **196**: 1088-1092.
- Eustance, R.J. and Schleif, R.F. (1996) The linker region of AraC protein. *J Bacteriol.* **178**: 7025-7030.
- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V. and Attree, I. (2006) Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry.* **45**: 8117-8123.



- Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T. and Holbrook, N.J. (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J.* **339 (Pt 1)**: 135-141.
- 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.
- Feng, X., Walthers, D., Oropeza, R. and Kenney, L.J. (2004) The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* **54**: 823-835.
- Filloux, A. and Vallet, I. (2003) [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris).* **19**: 77-83.
- Filloux, A. and Ventre, I. (2006) [Two sensors to control bacterial life style: the choice between chronic or acute infection]. *Med Sci (Paris).* **22**: 811-814.
- Filloux, A., Michel, G. and Bally, M. (1998) GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* **22**: 177-198.
- Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., Fleiszig, S.M., *et al* (1997) ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol.* **25**: 547-557.
- Frank, D.W., Nair, G. and Schweizer, H.P. (1994) Construction and characterization of chromosomal insertional mutations of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S trans-regulatory locus. *Infect Immun.* **62**: 554-563.
- Fu, H., Coburn, J. and Collier, R.J. (1993) The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 2320-2324.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* **176**: 269-275.
- Galan, J.E. and Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature.* **444**: 567-573.
- Gallegos, M.T., Williams, P.A. and Ramos, J.L. (1997) Transcriptional control of the multiple catabolic pathways encoded on the TOL plasmid pWW53 of *Pseudomonas putida* MT53. *J Bacteriol.* **179**: 5024-5029.
- Gallois, A., Klein, J.R., Allen, L.A., Jones, B.D. and Nauseef, W.M. (2001) *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. *J Immunol.* **166**: 5741-5748.
- Gambello, M.J. and 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., Frank, D.W., Misra, R.P., Schmidt, G. and Barbieri, J.T. (1998) *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J Biol Chem.* **273**: 7332-7337.
- Garrity-Ryan, L., Shafikhani, S., Balachandran, P., Nguyen, L., Oza, J., Jakobsen, T., *et al* (2004) The ADP ribosyltransferase domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoT contributes to its biological activities. *Infect Immun.* **72**: 546-558.
- Gebus, C., Faudry, E., Bohn, Y.S., Elsen, S. and Attree, I. (2008) Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *J Biol Chem.* **283**: 23940-23949.
- Gendlina, I., Gutman, D.M., Thomas, V. and Collins, C.M. (2002) Urea-dependent signal transduction by the virulence regulator UreR. *J Biol Chem.* **277**: 37349-37358.
- George, R.A. and Heringa, J. (2002) An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng.* **15**: 871-879.
- Gerlach, R.G. and Hensel, M. (2007) Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol.* **297**: 401-415.
- Germ, M., Yoshihara, E., Yoneyama, H. and Nakae, T. (1999) Interplay between the efflux pump and the outer membrane permeability barrier in fluorescent dye accumulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun.* **261**: 452-455.
- Glick, J. and Garber, N. (1983) The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J Gen Microbiol.* **129**: 3085-3090.
- 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.
- Gonzalez-Perez, M.M., Ramos, J.L., Gallegos, M.T. and Marques, S. (1999) Critical nucleotides in the upstream region of the XylS-dependent TOL meta-cleavage pathway operon promoter as deduced from analysis of mutants. *J Biol Chem.* **274**: 2286-2290.
- Gooderham, W.J. and Hancock, R.E. (2009) Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* **33**: 279-294.
- Gooderham, W.J., Bains, M., McPhee, J.B., Wiegand, I. and Hancock, R.E. (2008) Induction by cationic antimicrobial peptides and involvement in intrinsic polymyxin and antimicrobial peptide resistance, biofilm formation, and swarming motility of PsrA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **190**: 5624-5634.
- 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.
- Goodman, A.L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A. and Lory, S. (2009) Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev.* **23**: 249-259.
- Gophna, U., Ron, E.Z. and Graur, D. (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene.* **312**: 151-163.

- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A. and Attree, I. (2004) The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun.* **72**: 4741-4750.
- Grainger, D.C., Webster, C.L., Belyaeva, T.A., Hyde, E.I. and Busby, S.J. (2004a) Transcription activation at the *Escherichia coli* melAB promoter: interactions of MelR with its DNA target site and with domain 4 of the RNA polymerase sigma subunit. *Mol Microbiol.* **51**: 1297-1309.
- Grainger, D.C., Belyaeva, T.A., Lee, D.J., Hyde, E.I. and Busby, S.J. (2004b) Transcription activation at the *Escherichia coli* melAB promoter: interactions of MelR with the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Mol Microbiol.* **51**: 1311-1320.
- Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.K. and Vitanza-jack, V.B. (1974) Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol.* **28**: 987-991.
- Griffith, K.L. and Wolf, R.E., Jr. (2002) A comprehensive alanine scanning mutagenesis of the *Escherichia coli* transcriptional activator SoxS: identifying amino acids important for DNA binding and transcription activation. *J Mol Biol.* **322**: 237-257.
- Griffith, K.L., Shah, I.M. and Wolf, R.E., Jr. (2004) Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. *Mol Microbiol.* **51**: 1801-1816.
- Griffith, K.L., Fitzpatrick, M.M., Keen, E.F., 3rd and Wolf, R.E., Jr. (2009) Two functions of the C-terminal domain of *Escherichia coli* Rob: mediating "sequestration-dispersal" as a novel off-on switch for regulating Rob's activity as a transcription activator and preventing degradation of Rob by Lon protease. *J Mol Biol.* **388**: 415-430.
- 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, S. and Schleif, R. (1983) *In vivo* regulation of the *Escherichia coli* araC promoter. *J Bacteriol.* **155**: 593-600.
- Hauser, A.R. (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol.* **7**: 654-665.
- He, J., Baldini, R.L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., et al (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 2530-2535.
- Heeb, S., Kuehne, S.A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M.D., Haas, D., et al (2006) Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol.* **355**: 1026-1036.
- Henriksson, M.L., Rosqvist, R., Telepnev, M., Wolf-Watz, H. and Hallberg, B. (2000) Ras effector pathway activation by epidermal growth factor is inhibited *in vivo* by exoenzyme S ADP-ribosylation of Ras. *Biochem J.* **347 Pt 1**: 217-222.
- Henriksson, M.L., Francis, M.S., Peden, A., Aili, M., Stefansson, K., Palmer, R., et al (2002) A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional *in vivo*. *Eur J Biochem.* **269**: 4921-4929.

- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. and Parsek, M.R. (2001) Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol.* **183**: 5395-5401.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. and Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene.* **212**: 77-86.
- Hoe, N.P., Minion, F.C. and Goguen, J.D. (1992) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: regulation of yopE transcription by lcrF. *J Bacteriol.* **174**: 4275-4286.
- 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. and 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.
- Horvat, R.T. and Parmely, M.J. (1988) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease degrades human gamma interferon and inhibits its bioactivity. *Infect Immun.* **56**: 2925-2932.
- Hovey, A.K. and 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.
- Howard, V.J., Belyaeva, T.A., Busby, S.J. and Hyde, E.I. (2002) DNA binding of the transcription activator protein MelR from *Escherichia coli* and its C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* **30**: 2692-2700.
- Hsiao, A., Xu, X., Kan, B., Kulkarni, R.V. and Zhu, J. (2009) Direct regulation by the *Vibrio cholerae* regulator ToxT to modulate colonization and anticolonization pilus expression. *Infect Immun.* **77**: 1383-1388.
- Hulbert, R.R. and Taylor, R.K. (2002) Mechanism of ToxT-dependent transcriptional activation at the *Vibrio cholerae* tcpA promoter. *J Bacteriol.* **184**: 5533-5544.
- Ibarra, J.A., Perez-Rueda, E., Segovia, L. and Puente, J.L. (2008) The DNA-binding domain as a functional indicator: the case of the AraC/XylS family of transcription factors. *Genetica.* **133**: 65-76.
- Ichikawa, J.K., English, S.B., Wolfgang, M.C., Jackson, R., Butte, A.J. and Lory, S. (2005) Genome-wide analysis of host responses to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system yields synergistic effects. *Cell Microbiol.* **7**: 1635-1646.
- Iglewski, B.H. and Kabat, D. (1975) NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**: 2284-2288.
- Imundo, L., Barasch, J., Prince, A. and Al-Awqati, Q. (1995) Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 3019-3023.
- Jacob-Dubuisson, F., Loch, C. and Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol.* **40**: 306-313.
- Jair, K.W., Yu, X., Skarstad, K., Thony, B., Fujita, N., Ishihama, A. and Wolf, R.E., Jr. (1996) Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic

- resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J Bacteriol.* **178**: 2507-2513.
- Jensen, P.O., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., *et al* (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **153**: 1329-1338.
- Johnson, T.L., Abendroth, J., Hol, W.G. and Sandkvist, M. (2006) Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett.* **255**: 175-186.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P. and Cornelis, G.R. (2003) The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science.* **302**: 1757-1760.
- Kahramanoglou, C., Webster, C.L., El-Robh, M.S., Belyaeva, T.A. and Busby, S.J. (2006) Mutational analysis of the *Escherichia coli* melR gene suggests a two-state concerted model to explain transcriptional activation and repression in the melibiose operon. *J Bacteriol.* **188**: 3199-3207.
- Kaldalu, N., Toots, U., de Lorenzo, V. and Ustav, M. (2000) Functional domains of the TOL plasmid transcription factor XylS. *J Bacteriol.* **182**: 1118-1126.
- Kanack, K.J., Runyen-Janecky, L.J., Ferrell, E.P., Suh, S.J. and West, S.E. (2006) Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Microbiology.* **152**: 3485-3496.
- Kang, Y., Nguyen, D.T., Son, M.S. and Hoang, T.T. (2008) The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the fadBA5 beta-oxidation operon. *Microbiology.* **154**: 1584-1598.
- Kang, Y., Lunin, V.V., Skarina, T., Savchenko, A., Schurr, M.J. and Hoang, T.T. (2009) The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of rpoS and the type III secretion exsCEBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **73**: 120-136.
- Kaplan, N.O. (1985) The role of pyridine nucleotides in regulating cellular metabolism. *Curr Top Cell Regul.* **26**: 371-381.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., *et al* (2006) Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **188**: 6026-6033.
- Kim, J., Ahn, K., Min, S., Jia, J., Ha, U., Wu, D. and Jin, S. (2005) Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **151**: 3575-3587.
- Kipnis, E., Sawa, T. and Wiener-Kronish, J. (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.* **36**: 78-91.
- Kojic, M., Aguilar, C. and Venturi, V. (2002) TetR family member psrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and psrA promoters. *J Bacteriol.* **184**: 2324-2330.
- Kolin, A., Jevtic, V., Swint-Kruse, L. and Egan, S.M. (2007) Linker regions of the RhaS and RhaR proteins. *J Bacteriol.* **189**: 269-271.
- Kolin, A., Balasubramaniam, V., Skredenske, J.M., Wickstrum, J.R. and Egan, S.M. (2008) Differences in the mechanism of the allosteric l-rhamnose responses of the AraC/XylS family transcription activators RhaS and RhaR. *Mol Microbiol.* **68**: 448-461.

- Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., *et al* (1999) The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **25**: 313-321.
- 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.
- Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G.R. and Tommassen, J. (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol.* **26**: 789-797.
- Kownatzki, R., Tummler, B. and Doring, G. (1987) Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet.* **1**: 1026-1027.
- Krall, R., Sun, J., Pederson, K.J. and Barbieri, J.T. (2002) *In vivo* rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect Immun.* **70**: 360-367.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., *et al* (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science.* **280**: 602-605.
- 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.
- Kulasekara, B.R., Kulasekara, H.D., Wolfgang, M.C., Stevens, L., Frank, D.W. and Lory, S. (2006) Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **188**: 4037-4050.
- Kulasekara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A. and Lory, S. (2005) A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol Microbiol.* **55**: 368-380.
- Kumar, A. and Moran, C.P., Jr. (2008) Promoter activation by repositioning of RNA polymerase. *J Bacteriol.* **190**: 3110-3117.
- Kwon, H.J., Bennik, M.H., Demple, B. and Ellenberger, T. (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. *Nat Struct Biol.* **7**: 424-430.
- Labrec, E.H., Schneider, H., Magnani, T.J. and Formal, S.B. (1964) Epithelial Cell Penetration as an Essential Step in the Pathogenesis of Bacillary Dysentery. *J Bacteriol.* **88**: 1503-1518.
- Lambert de Rouvroit, C., 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.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* **240**: 1759-1764.
- LaRonde-LeBlanc, N. and Wolberger, C. (2000) Characterization of the oligomeric states of wild type and mutant AraC. *Biochemistry.* **39**: 11593-11601.
- Latifi, A., Winson, M.K., Foglino, M., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Lazdunski, A. and Williams, P. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol.* **17**: 333-343.

- Lawhon, S.D., Frye, J.G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M. and Altier, C. (2003) Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* **48**: 1633-1645.
- Lazdunski, A. (2003) [*Pseudomonas aeruginosa*: a model of choice for the study of opportunistic pathogen]. *Ann Fr Anesth Reanim.* **22**: 523-526.
- Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M. and Murgier, M. (1990) Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* **72**: 147-156.
- Le Gall, T., Mavris, M., Martino, M.C., Bernardini, M.L., Denamur, E. and Parsot, C. (2005) Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *Microbiology.* **151**: 951-962.
- 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 RhlR. *Mol Microbiol.* **48**: 199-210.
- Lee, C.A., Jones, B.D. and Falkow, S. (1992) Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 1847-1851.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., *et al* (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* **7**: R90.
- Leidal, K.G., Munson, K.L., Johnson, M.C. and Denning, G.M. (2003) Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J Interferon Cytokine Res.* **23**: 307-318.
- Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R. and Rahme, L.G. (2009) Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology.* **155**: 2845-2855.
- 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.
- Linder, J.U. and Schultz, J.E. (2003) The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal.* **15**: 1081-1089.
- Liu, S., Yahr, T.L., Frank, D.W. and Barbieri, J.T. (1997) Biochemical relationships between the 53-kilodalton (Exo53) and 49-kilodalton (ExoS) forms of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **179**: 1609-1613.
- Lobell, R.B. and Schleif, R.F. (1990) DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science.* **250**: 528-532.
- Lory, S., Merighi, M. and Hyodo, M. (2009) Multiple activities of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 51-52.
- Lostroh, C.P. and Lee, C.A. (2001) The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P(prgH) from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol.* **183**: 4876-4885.
- Lucas, R.L. and Lee, C.A. (2001) Roles of hilC and hilD in regulation of hilA expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol.* **183**: 2733-2745.

- Lyczak, J.B., Cannon, C.L. and Pier, G.B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* **2**: 1051-1060.
- Lykken, G.L., Chen, G., Brutinel, E.D., Chen, L. and Yahr, T.L. (2006) Characterization of ExsC and ExsD self-association and heterocomplex formation. *J Bacteriol.* **188**: 6832-6840.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M. and Saier, M.H., Jr. (2003) Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta.* **1611**: 223-233.
- Mackman, N., Baker, K., Gray, L., Haigh, R., Nicaud, J.M. and Holland, I.B. (1987) Release of a chimeric protein into the medium from *Escherichia coli* using the C-terminal secretion signal of haemolysin. *Embo J.* **6**: 2835-2841.
- Maddocks, S.E. and Oyston, P.C. (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology.* **154**: 3609-3623.
- Main, E.R., Xiong, Y., Cocco, M.J., D'Andrea, L. and Regan, L. (2003) Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure.* **11**: 497-508.
- Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., *et al* (2002) On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Mol Microbiol.* **46**: 889-901.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galan, J.E. and Unger, V.M. (2004) Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science.* **306**: 1040-1042.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V.M. and Galan, J.E. (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature.* **441**: 637-640.
- Martin, R.G. and Rosner, J.L. (2001) The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol.* **4**: 132-137.
- Martin, R.G., Jair, K.W., Wolf, R.E., Jr. and Rosner, J.L. (1996) Autoactivation of the marRAB multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178**: 2216-2223.
- Martin, R.G., Gillette, W.K., Rhee, S. and Rosner, J.L. (1999) Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of mar/sox/rob regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol.* **34**: 431-441.
- Martin, R.G., Gillette, W.K., Martin, N.I. and Rosner, J.L. (2002) Complex formation between activator and RNA polymerase as the basis for transcriptional activation by MarA and SoxS in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **43**: 355-370.
- Martin, R.G., Bartlett, E.S., Rosner, J.L. and Wall, M.E. (2008) Activation of the *Escherichia coli* marA/soxS/rob regulon in response to transcriptional activator concentration. *J Mol Biol.* **380**: 278-284.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., *et al* (2008) Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 3100-3105.



- Matsukawa, M. and Greenberg, E.P. (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol.* **186**: 4449-4456.
- Mavris, M., Page, A.L., Tournebize, R., Demers, B., Sansonetti, P. and Parsot, C. (2002) Regulation of transcription by the activity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Mol Microbiol.* **43**: 1543-1553.
- 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.
- McGrath, S., Wade, D.S. and Pesci, E.C. (2004) Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett.* **230**: 27-34.
- McMorran, B., Town, L., Costelloe, E., Palmer, J., Engel, J., Hume, D. and Wainwright, B. (2003) Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect Immun.* **71**: 6035-6044.
- Mena, A., Smith, E.E., Burns, J.L., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., Perez, J.L. and Oliver, A. (2008) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol.* **190**: 7910-7917.
- Menard, R., Sansonetti, P. and Parsot, C. (1994) The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *Embo J.* **13**: 5293-5302.
- Michel-Briand, Y. and Baysse, C. (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* **84**: 499-510.
- Mikkelsen, H., Bond, N.J., Skindersoe, M.E., Givskov, M., Lilley, K.S. and Welch, M. (2009) Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **155**: 687-698.
- Mizusaki, H., Takaya, A., Yamamoto, T. and Aizawa, S. (2008) Signal pathway in salt-activated expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol.* **190**: 4624-4631.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., *et al* (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science.* **312**: 1526-1530.
- Munson, G.P. and Scott, J.R. (1999) Binding site recognition by Rns, a virulence regulator in the AraC family. *J Bacteriol.* **181**: 2110-2117.
- Munson, G.P. and Scott, J.R. (2000) Rns, a virulence regulator within the AraC family, requires binding sites upstream and downstream of its own promoter to function as an activator. *Mol Microbiol.* **36**: 1391-1402.
- Munson, G.P., Holcomb, L.G. and Scott, J.R. (2001) Novel group of virulence activators within the AraC family that are not restricted to upstream binding sites. *Infect Immun.* **69**: 186-193.
- Neyt, C. and Cornelis, G.R. (1999) Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol.* **31**: 143-156.
- Nguyen, D. and Singh, P.K. (2006) Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 8305-8306.

- Nicholson, E.B., Concaugh, E.A., Foxall, P.A., Island, M.D. and Mobley, H.L. (1993) *Proteus mirabilis* urease: transcriptional regulation by UreR. *J Bacteriol.* **175**: 465-473.
- Niland, P., Huhne, R. and Muller-Hill, B. (1996) How AraC interacts specifically with its target DNAs. *J Mol Biol.* **264**: 667-674.
- Nye, M.B. and Taylor, R.K. (2003) *Vibrio cholerae* H-NS domain structure and function with respect to transcriptional repression of ToxR regulon genes reveals differences among H-NS family members. *Mol Microbiol.* **50**: 427-444.
- Olsson, J., Edqvist, P.J., Broms, J.E., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. and Francis, M.S. (2004) The YopD translocator of *Yersinia pseudotuberculosis* is a multifunctional protein comprised of discrete domains. *J Bacteriol.* **186**: 4110-4123.
- Pallen, M.J., Beatson, S.A. and Bailey, C.M. (2005) Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Rev.* **29**: 201-229.
- Papezova, K., Gregorova, D., Jonuschies, J. and Rychlik, I. (2007) Ordered expression of virulence genes in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Folia Microbiol (Praha)*. **52**: 107-114.
- Parker, L.L. and Hall, B.G. (1990) Characterization and nucleotide sequence of the cryptic cel operon of *Escherichia coli* K12. *Genetics*. **124**: 455-471.
- Parkins, M.D., Ceri, H. and Storey, D.G. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol.* **40**: 1215-1226.
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R. and Zhou, W.W. (1990) Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **58**: 3009-3014.
- Parsot, C., Menard, R., Gounon, P. and Sansonetti, P.J. (1995) Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. *Mol Microbiol.* **16**: 291-300.
- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., et al (2005) A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol.* **56**: 1627-1635.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J. and Attree, I. (2005) PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett.* **253**: 95-101.
- 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.
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 1490-1494.
- Penno, C. and Parsot, C. (2006) Transcriptional slippage in *mxIE* controls transcription and translation of the downstream *mxID* gene, which encodes a component of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *J Bacteriol.* **188**: 1196-1198.

- Penno, C., Sansonetti, P. and Parsot, C. (2005) Frameshifting by transcriptional slippage is involved in production of MxiE, the transcription activator regulated by the activity of the type III secretion apparatus in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol.* **56**: 204-214.
- 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.
- 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.
- Pielage, J.F., Powell, K.R., Kalman, D. and Engel, J.N. (2008) RNAi screen reveals an Abl kinase-dependent host cell pathway involved in *Pseudomonas aeruginosa* internalization. *PLoS Pathog.* **4**: e1000031.
- Pier, G.B., Grout, M. and Zaidi, T.S. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 12088-12093.
- Pilonieta, M.C. and Munson, G.P. (2008) The chaperone IpgC copurifies with the virulence regulator MxiE. *J Bacteriol.* **190**: 2249-2251.
- Plano, G.V. (2004) Modulation of AraC family member activity by protein ligands. *Mol Microbiol.* **54**: 287-290.
- Poore, C.A. and Mobley, H.L. (2003) Differential regulation of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster by UreR and H-NS. *Microbiology.* **149**: 3383-3394.
- Poore, C.A., Coker, C., Dattelbaum, J.D. and Mobley, H.L. (2001) Identification of the domains of UreR, an AraC-like transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol.* **183**: 4526-4535.
- Porwollik, S., Wong, R.M. and McClelland, M. (2002) Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 8956-8961.
- Prouty, M.G., Osorio, C.R. and Klose, K.E. (2005) Characterization of functional domains of the *Vibrio cholerae* virulence regulator ToxT. *Mol Microbiol.* **58**: 1143-1156.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D. and Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 15508-15513.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., et al (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 1528-1533.
- Qiu, X., Gurkar, A.U. and Lory, S. (2006) Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 19830-19835.
- Qiu, X., Kulasekara, B.R. and Lory, S. (2009) Role of Horizontal Gene Transfer in the Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Genome Dyn.* **6**: 126-139.
- Quinaud, M., Ple, S., Job, V., Contreras-Martel, C., Simorre, J.P., Attree, I. and Dessen, A. (2007) Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 7803-7808.
- Rabin, S.D., Veessenmeyer, J.L., Bieging, K.T. and Hauser, A.R. (2006) A C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells. *Infect Immun.* **74**: 2552-2561.

- 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.
- Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg, E.P., Bertani, I., Grasso, M., Venturi, V., *et al* (2007) RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. **66**: 1557-1565.
- Rhee, S., Martin, R.G., Rosner, J.L. and Davies, D.R. (1998) A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 10413-10418.
- Rietsch, A. and Mekalanos, J.J. (2006) Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. **59**: 807-820.
- 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.
- 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.
- Robinson, C.R. and Sauer, R.T. (1998) Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 5929-5934.
- Rodgers, M.E. and Schleif, R. (2009) Solution structure of the DNA binding domain of AraC protein. *Proteins*. **77**: 202-208.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V. and Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol*. **8**: 498-504.
- Rosqvist, R., Hakansson, S., Forsberg, A. and Wolf-Watz, H. (1995) Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersinia*, *Salmonellae* and *Shigellae*. *Embo J*. **14**: 4187-4195.
- Roy-Burman, A., Savel, R.H., Racine, S., Swanson, B.L., Revadigar, N.S., Fujimoto, J., *et al* (2001) Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis*. **183**: 1767-1774.
- Ruer, S., Stender, S., Filloux, A. and de Bentzmann, S. (2007) Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *J Bacteriol*. **189**: 3547-3555.
- Ruiz, R., Marques, S. and Ramos, J.L. (2003) Leucines 193 and 194 at the N-terminal domain of the XylS protein, the positive transcriptional regulator of the TOL meta-cleavage pathway, are involved in dimerization. *J Bacteriol*. **185**: 3036-3041.
- Ryder, C., Byrd, M. and Wozniak, D.J. (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*. **10**: 644-648.
- Saiman, L. and Prince, A. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest*. **92**: 1875-1880.
- Saliba, A.M., Nascimento, D.O., Silva, M.C., Assis, M.C., Gayer, C.R., Raymond, B., *et al* (2005) Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cell Microbiol*. **7**: 1811-1822.

- Samarasinghe, S., El-Robh, M.S., Grainger, D.C., Zhang, W., Soultanas, P. and Busby, S.J. (2008) Autoregulation of the *Escherichia coli* melR promoter: repression involves four molecules of MelR. *Nucleic Acids Res.* **36**: 2667-2676.
- Sato, H., Feix, J.B. and Frank, D.W. (2006) Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *Pseudomonas* type III toxin, ExoU. *Biochemistry.* **45**: 10368-10375.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., *et al* (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J.* **22**: 2959-2969.
- Saviola, B., Seabold, R.R. and Schleif, R.F. (1998) DNA bending by AraC: a negative mutant. *J Bacteriol.* **180**: 4227-4232.
- 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.
- Schleif, R. (2000) Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends Genet.* **16**: 559-565.
- Schleif, R. (2003) AraC protein: a love-hate relationship. *Bioessays.* **25**: 274-282.
- Schmid, A., Neumayer, W., Trulzsch, K., Israel, L., Imhof, A., Roessle, M., *et al* (2009) Cross-talk between type three secretion system and metabolism in *Yersinia*. *J Biol Chem.* **284**: 12165-12177.
- Schneiders, T. and Levy, S.B. (2006) MarA-mediated transcriptional repression of the rob promoter. *J Biol Chem.* **281**: 10049-10055.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. and Dessen, A. (2003) Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *Embo J.* **22**: 4957-4967.
- 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.
- 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.
- Schweizer, H.P. (2001) Vectors to express foreign genes and techniques to monitor gene expression in Pseudomonads. *Curr Opin Biotechnol.* **12**: 439-445.
- Shafikhani, S.H. and Engel, J. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 15605-15610.
- Shafikhani, S.H., Morales, C. and Engel, J. (2008) The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. *Cell Microbiol.* **10**: 994-1007.
- Shah, I.M. and Wolf, R.E., Jr. (2004) Novel protein--protein interaction between *Escherichia coli* SoxS and the DNA binding determinant of the RNA polymerase alpha subunit: SoxS functions as a co-sigma factor and redeploys RNA polymerase from UP-element-containing promoters to SoxS-dependent promoters during oxidative stress. *J Mol Biol.* **343**: 513-532.

- Shakhnovich, E.A., Hung, D.T., Pierson, E., Lee, K. and Mekalanos, J.J. (2007) Virstatin inhibits dimerization of the transcriptional activator ToxT. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**: 2372-2377.
- Shankar, S., Ye, R.W., Schlichtman, D. and Chakrabarty, A.M. (1995) Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: enzymology and regulation of gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. **70**: 221-255.
- Shaver, C.M. and Hauser, A.R. (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun*. **72**: 6969-6977.
- Shen, D.K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B. and Toussaint, B. (2006) PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. **74**: 1121-1129.
- Shen, D.K., Filopon, D., Chaker, H., Boullanger, S., Derouazi, M., Polack, B. and Toussaint, B. (2008) High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. *Microbiology*. **154**: 2195-2208.
- Sitkiewicz, I., Stockbauer, K.E. and Musser, J.M. (2007) Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol*. **15**: 63-69.
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., et al (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 8487-8492.
- Smith, R.S., Wolfgang, M.C. and Lory, S. (2004) An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun*. **72**: 1677-1684.
- Soisson, S.M., MacDougall-Shackleton, B., Schleif, R. and Wolberger, C. (1997a) The 1.6 Å crystal structure of the AraC sugar-binding and dimerization domain complexed with D-fucose. *J Mol Biol*. **273**: 226-237.
- Soisson, S.M., MacDougall-Shackleton, B., Schleif, R. and Wolberger, C. (1997b) Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science*. **276**: 421-425.
- Soong, G., Parker, D., Magargee, M. and Prince, A.S. (2008) The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *J Bacteriol*. **190**: 2814-2821.
- Spreter, T., Yip, C.K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T.G., Vuckovic, M., et al (2009) A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol*. **16**: 468-476.
- Steiner, T.S. (2007) How flagellin and toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. *Infect Immun*. **75**: 545-552.
- Stirling, F.R., Cuzick, A., Kelly, S.M., Oxley, D. and Evans, T.J. (2006) Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol*. **8**: 1294-1309.
- Stoebel, D.M., Free, A. and Dorman, C.J. (2008) Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology*. **154**: 2533-2545.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., et al (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**: 959-964.

- Sun, J. and 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.
- Sundin, C., Henriksson, M.L., Hallberg, B., Forsberg, A. and Frithz-Lindsten, E. (2001) Exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* elicits cytotoxicity without interfering with Ras signal transduction. *Cell Microbiol.* **3**: 237-246.
- Sundin, C., Wolfgang, M.C., Lory, S., Forsberg, A. and Frithz-Lindsten, E. (2002) Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog.* **33**: 265-277.
- Sutherland, I.W. (2001) The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9**: 222-227.
- Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I. and Flavell, R.A. (2007) Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med.* **204**: 3235-3245.
- 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.
- Tanaka, T., Yokoyama, S. and Kuroda, Y. (2006) Improvement of domain linker prediction by incorporating loop-length-dependent characteristics. *Biopolymers.* **84**: 161-168.
- Temme, K., Salis, H., Tullman-Ercek, D., Levskaya, A., Hong, S.H. and Voigt, C.A. (2008) Induction and relaxation dynamics of the regulatory network controlling the type III secretion system encoded within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Mol Biol.* **377**: 47-61.
- Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I. and Elsen, S. (2009) Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J Biol Chem.* **284**: 15762-15770.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., *et al* (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology.* **151**: 1313-1323.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T. and Sasakawa, C. (1993) Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by *virF* and repression by H-NS. *J Bacteriol.* **175**: 6142-6149.
- Torruellas, J., Jackson, M.W., Pennock, J.W. and Plano, G.V. (2005) The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol Microbiol.* **57**: 1719-1733.
- 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 Commun.* **196**: 416-421.
- Troisfontaines, P. and Cornelis, G.R. (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda).* **20**: 326-339.
- Tsolis, R.M., Adams, L.G., Hantman, M.J., Scherer, C.A., Kimbrough, T., Kingsley, R.A., *et al* (2000) *SspA* is required for lethal *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infections in calves but is not essential for diarrhea. *Infect Immun.* **68**: 3158-3163.

- 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.
- Urbanowski, M.L., Brutinel, E.D. and Yahr, T.L. (2007) Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun*. **75**: 4432-4439.
- Vakulskas, C.A., Brady, K.M. and Yahr, T.L. (2009) Mechanism of transcriptional activation by *Pseudomonas aeruginosa* ExsA. *J Bacteriol*. **191**: 6654-6664.
- 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 U S A*. **98**: 6911-6916.
- Vallet, I., Diggle, S.P., Stacey, R.E., Camara, M., Ventre, I., Lory, S., *et al* (2004) Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J Bacteriol*. **186**: 2880-2890.
- 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.
- Vasil, M.L. (1986) *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr*. **108**: 800-805.
- Vazquez-Torres, A., Fantuzzi, G., Edwards, C.K., 3rd, Dinarello, C.A. and Fang, F.C. (2001) Defective localization of the NADPH phagocyte oxidase to *Salmonella*-containing phagosomes in tumor necrosis factor p55 receptor-deficient macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 2561-2565.
- Venkatesan, M.M., Buysse, J.M. and Oaks, E.V. (1992) Surface presentation of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens requires the products of the spa locus. *J Bacteriol*. **174**: 1990-2001.
- Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., *et al* (2006) Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 171-176.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F. and Filloux, A. (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J*. **20**: 6735-6741.
- 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.
- Waite, R.D., Pacanaro, A., Papakonstantinou, A., Hurst, J.M., Saqi, M., Littler, E. and Curtis, M.A. (2006) Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles. *BMC Genomics*. **7**: 162.
- Wallis, T.S. and Galyov, E.E. (2000) Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol*. **36**: 997-1005.
- Wattiau, P. and Cornelis, G.R. (1993) SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ohe secretion of YopE. *Mol Microbiol*. **8**: 123-131.



- West, S.E., Sample, A.K. and Runyen-Janecky, L.J. (1994) The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol.* **176**: 7532-7542.
- Westfall, L.W., Carty, N.L., Layland, N., Kuan, P., Colmer-Hamood, J.A. and Hamood, A.N. (2006) *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol Lett.* **255**: 247-254.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. and Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* **295**: 1487.
- Whitchurch, C.B., Beatson, S.A., Comolli, J.C., Jakobsen, T., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., *et al* (2005) *Pseudomonas aeruginosa* *fimL* regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways. *Mol Microbiol.* **55**: 1357-1378.
- Whitchurch, C.B., Leech, A.J., Young, M.D., Kennedy, D., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., *et al* (2004) Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **52**: 873-893.
- Wickstrum, J.R., Skredenske, J.M., Kolin, A., Jin, D.J., Fang, J. and Egan, S.M. (2007) Transcription activation by the DNA-binding domain of the AraC family protein RhaS in the absence of its effector-binding domain. *J Bacteriol.* **189**: 4984-4993.
- Wilhelm, S., Tommassen, J. and Jaeger, K.E. (1999) A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **181**: 6977-6986.
- Williams, H.D., Zlosnik, J.E. and Ryall, B. (2007) Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microb Physiol.* **52**: 1-71.
- Williams, P. and Camara, M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol.* **12**: 182-191.
- Winstanley, C., Langille, M.G., Fothergill, J.L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F., *et al* (2009) Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of *in vivo* competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* **19**: 12-23.
- Withey, J.H. and DiRita, V.J. (2006) The toxbox: specific DNA sequence requirements for activation of *Vibrio cholerae* virulence genes by ToxT. *Mol Microbiol.* **59**: 1779-1789.
- 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., Wyckoff, T.J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A. and Parsek, M.R. (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 7907-7912.
- Wu, W. and Jin, S. (2005) PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage. *J Bacteriol.* **187**: 6058-6068.
- Yahr, T.L. (2006) A critical new pathway for toxin secretion? *N Engl J Med.* **355**: 1171-1172.
- Yahr, T.L. and Frank, D.W. (1994) Transcriptional organization of the trans-regulatory locus which controls exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **176**: 3832-3838.

- Yahr, T.L. and Wolfgang, M.C. (2006) Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol.* **62**: 631-640.
- Yahr, T.L., Goranson, J. and Frank, D.W. (1996) Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol.* **22**: 991-1003.
- 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., Mende-Mueller, L.M., Friese, M.B. and Frank, D.W. (1997) Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol.* **179**: 7165-7168.
- 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 U S A.* **95**: 13899-13904.
- Yamamoto, S. and Kutsukake, K. (2006) FliT acts as an anti-FlhD2C2 factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* **188**: 6703-6708.
- Yang, J., Hart, E., Tauschek, M., Price, G.D., Hartland, E.L., Strugnell, R.A. and Robins-Browne, R.M. (2008) Bicarbonate-mediated transcriptional activation of divergent operons by the virulence regulatory protein, RegA, from *Citrobacter rodentium*. *Mol Microbiol.* **68**: 314-327.
- Yip, C.K. and Strynadka, N.C. (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci.* **31**: 223-230.
- Yu, R.R. and DiRita, V.J. (2002) Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol Microbiol.* **43**: 119-134.
- Zhang, S., Santos, R.L., Tsolis, R.M., Stender, S., Hardt, W.D., Baumler, A.J. and Adams, L.G. (2002) The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun.* **70**: 3843-3855.
- Zheng, Z., Chen, G., Joshi, S., Brutinel, E.D., Yahr, T.L. and Chen, L. (2007) Biochemical characterization of a regulatory cascade controlling transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Biol Chem.* **282**: 6136-6142.
- Zhou, D. (2001) Collective efforts to modulate the host actin cytoskeleton by *Salmonella* type III-secreted effector proteins. *Trends Microbiol.* **9**: 567-569; discussion 569-570.
- Zhou, L.M., Timmis, K.N. and Ramos, J.L. (1990) Mutations leading to constitutive expression from the TOL plasmid meta-cleavage pathway operon are located at the C-terminal end of the positive regulator protein XylS. *J Bacteriol.* **172**: 3707-3710.
- Zhou, X., Shah, D.H., Konkel, M.E. and Call, D.R. (2008) Type III secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus* are positively regulated by ExsA and negatively regulated by ExsD. *Mol Microbiol.* **69**: 747-764.

# Annexes



## ANNEXE 1

Alignement des séquences protéiques entre ExsA de *P. aeruginosa* et ses homologues chez *A. hydrophila*, *P. luminescens* et *V. parahaemolyticus* (Programme ClustalW). Les acides aminés identiques sont indiqués par une étoile et les changements conservatifs par deux points.

ExsA [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	-----MNGITTAKEG-DMALLQWCMSAFNVIIEHPQEGIYILLEGESITWQ	43
ExsA [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	-----MNGITTSKGMDISLFRSMFPAFNVIIEHPQEGIYILLEGEMTWQ	44
LscA [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	-----MQGAKSLGRK-QITSCHWNIPTFEYRVNKEEGVYVLLLEGELTVQ	43
ExsA [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	MDVSGQLNTEVVGSSLRKIRSFSHYEKHDEVFHSDQSHIVVVHNGQLRVQ	50
	: : . : : : : : * *	
ExsA [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	DCTDTYELTPNQLLFVRRGNVAVCTA--GSPCRLWLPLSNSFLQGFLQR	91
ExsA [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	DSTNTYDI SHNELLFVRRGSYAAKTR--SDTCKLLWLPLSTAPLHGFLQR	92
LscA [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	DIDSTFCLAPGELLFVRRGSYVSTK--GKDSRILWIPLSAQFLQGFVQR	91
ExsA [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	TGDCTIDVVAGSGVFLSQGDYLLSEYVQGGNYHSSIIIEFDNELVSQLLQK	100
	* : . . : * : * * . : : . : : * :	
ExsA [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	FGSLLSEVARLEGMAPTLPLPFHSSPLLTQCIQGLYGLIDHEHPPALALQR	141
ExsA [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	FGTLLSEVERHNMPTELIIFTSSPLLSQSIINGLVDLLAHDYPTALGQLR	142
LscA [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	FGALLSEVERCDEPVPGI IAPAATPLLAGCVKGLKELLVHEHPPMLACLK	141
ExsA [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	HSDLMLTLPKVDKLNLSGLFSFGLNIIIEQVLSGMKLTLEEQSYPDAIMRLK	150
	.. ** : : : . : : * . * : : * : * : : * : * :	
ExsA [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	TEELLFLLAFGEQGPQLMSILRQLSNRQVERLQGFMEKHVLMENKLSSEFS	191
ExsA [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	TEELLFLLAFGEQGTLLMSVLRQLSNRQVERLQSFMENHYLKWKLSSEFA	192
LscA [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	IEELLMLFAFSPQGPLMSVLRQLSNRHVERLQGFMEKHVLMENKLSSEFS	191
ExsA [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	YEEMLIILLHSQGGVLYALLSQQTNRRTSDRLRRFMEQHYLKWKLTDYA	200
	** : * : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
ExsA [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	KEFGMGLTTFKELFGSIYGVSPRAWISERRILFAHQLLLNSSPSIVDIAM	241
ExsA [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	KEFGMGLTTFKELFRSVYGISPRAWISERRILYAHQLLLNSEMSIVDISM	242
LscA [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	REFGMGLTTFKELFGSVYGVSPRAWISERRILYAHQLLLNSDMSIVDIAM	241
ExsA [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	QEFGASLTTFKELFNEHYGISPRAWISERRLLHAHKLKLLTSKMSIVDVAM	250
	: * * * , * * * * * * , * * : * * * * * * * * : * * : * * : * * * * * * * * :	
ExsA [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	EAGFSSQSYFTQSYRRRFGCTPSRARRHGTD-----	271
ExsA [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	EAGFSSQSYFTQSYRRRFDCTPSRARYGKE-----	272
LscA [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	EAGFSSQSYFTQSYRRRFGCTPSRSRQWDECRANN	278
ExsA [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]	EAGFSSQSYFTQSYRRRFGTTPSKVRSQDEQVAIAN-	286
	***** , * * : * * :	

ANNEXE 2

Alignement des séquences protéiques entre ExsD de *P. aeruginosa* et ses homologues chez *A. hydrophila*, *P. luminescens* et *V. parahaemolyticus* (Programme ClustalW). Les acides aminés identiques sont indiqués par une étoile, les changements conservatifs par deux points et la région coiled-coil est encadrée en noir.

ExsD [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	MSQQDHNS---SNQGLFAGRRVTVVQPD <del>TL</del> SR-----DRLVGGQLSVLR	40
ExsD [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	MSQQDHNQ---TRTSMFLGRKISVMQSGIPRR-----DQLLGKSSAIQ	40
LscZ [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	MEQEDDKQY--SREAVFAGRRVSVVGS <del>DAR</del> SR-----GRVPGYASSSL	41
ExsD [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810]	MKKQHWRRRSLFPDSIVTQRKVTVLQ <del>R</del> GARYESASQPLQDLNVVHVNH <del>R</del> Q	50
	*.:.:. . . . . :. . *::*: . . . . .	
ExsD [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	YQDAGVITSQQMDLLQRL <del>LP</del> TRLES <del>LL</del> ESLWFQ <del>RL</del> DAALS <del>V</del> SREELQ <del>Q</del>	90
ExsD [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	YQNSDIINSQQFILLQRL <del>LP</del> RHLES <del>LM</del> KSVW <del>FR</del> RRLNCGQAL <del>RR</del> DDLQ <del>Q</del>	90
LscZ [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	YRESGIIISARQLALLQ <del>R</del> MLP <del>RL</del> LEQL <del>F</del> RCEWLQ <del>RL</del> ARGLALG <del>R</del> EEV <del>R</del> Q	91
ExsD [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810]	LLSEGVLNDDQLSLLQ <del>RL</del> LD <del>R</del> SVV <del>D</del> SLCASQLV <del>K</del> T <del>Y</del> LR <del>L</del> GT <del>S</del> ID <del>R</del> FAM <del>R</del> L	100
	. . . . . *:****:* * . : * . : : * : :	
ExsD [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	ILRLAGSERYD-----WLQQLGDRINLADRALLWHV <del>L</del> HPL <del>H</del> R	128
ExsD [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	LIRAAAEPECD-----WNKVLGDRINLADR <del>H</del> LLQH <del>V</del> VLQ <del>P</del> LF <del>D</del>	128
LscZ [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	ILLCAAQDDG-----WCSELGDRVNLAVPQSMIDW <del>V</del> LLP <del>V</del> Y <del>G</del>	129
ExsD [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810]	FLEIGAQLSDSQRVATF <del>E</del> QR <del>L</del> EYINSRLGFR <del>F</del> NLATPK <del>T</del> LILCCYLALTE	150
	: : . . . . . * * * . * * : : . . . . .	
ExsD [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	WV <del>V</del> Q <del>R</del> L <del>E</del> P <del>L</del> Y <b>GAWRNELVQLQVMRRQLNAQAVFWQTV--VDVPADLES-</b>	175
ExsD [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	W <del>W</del> L <del>R</del> L <del>L</del> E <del>P</del> E <del>I</del> D <del>F</del> W <del>F</del> T <del>E</del> F <del>E</del> Q <del>L</del> I <del>Q</del> E <del>R</del> Q <del>L</del> R <del>A</del> K <del>A</del> H <del>F</del> W <del>Q</del> Q <del>V</del> --E <del>S</del> V <del>P</del> S <del>Q</del> C <del>R</del> K <del>Q</del> H	176
LscZ [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	W <del>W</del> E <del>S</del> L <del>L</del> D <del>Q</del> A <del>I</del> P <del>G</del> W <del>R</del> L <del>S</del> L <del>V</del> E <del>L</del> E <del>T</del> Q <del>S</del> R <del>Q</del> L <del>R</del> V <del>K</del> S <del>E</del> F <del>W</del> S <del>R</del> V--A <del>E</del> L <del>E</del> P <del>E</del> Q <del>A</del> R <del>E</del>	177
ExsD [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810]	W <del>I</del> H <del>R</del> Q <del>T</del> D <del>Q</del> S <del>A</del> L <del>H</del> A <del>S</del> V <del>K</del> V <del>E</del> Q <del>L</del> M <del>N</del> ---Q <del>L</del> D <del>I</del> Q <del>K</del> E <del>Y</del> W <del>S</del> K <del>L</del> S <del>G</del> E <del>D</del> T <del>S</del> A <del>I</del> F <del>V</del> E <del>Q</del> Q	197
	* : . . . . . : * * : : * . . . . .	
ExsD [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	<b>---ITDQLAQLSQREQBLTQLHSDCEARLQLAWPAWYG--QT</b> EQEG-DPA	219
ExsD [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	HQEVISLQ <del>T</del> ALN <del>Q</del> R <del>K</del> Q <del>L</del> L <del>E</del> K <del>L</del> L <del>L</del> T <del>T</del> E <del>T</del> Q <del>A</del> R <del>E</del> A <del>W</del> P <del>N</del> W <del>F</del> T <del>G</del> L <del>D</del> A <del>L</del> Q <del>A</del> G <del>G</del> D <del>L</del> T	226
LscZ [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	L <del>A</del> R <del>V</del> A <del>K</del> C <del>Q</del> A <del>R</del> T <del>Q</del> E <del>Q</del> V <del>A</del> L <del>A</del> G <del>K</del> L <del>E</del> T <del>A</del> S <del>A</del> L <del>A</del> K <del>S</del> A <del>W</del> P <del>N</del> W <del>Q</del> R <del>G</del> M <del>A</del> T <del>L</del> L <del>A</del> S <del>G</del> L <del>A</del>	227
ExsD [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810]	L <del>A</del> L <del>I</del> E <del>S</del> Q <del>Q</del> T <del>Q</del> L <del>K</del> A <del>Q</del> L <del>N</del> T <del>L</del> N <del>E</del> Q <del>S</del> Q <del>V</del> I <del>E</del> S <del>H</del> K <del>A</del> L <del>V</del> D <del>K</del> W <del>P</del> S <del>L</del> S <del>N</del> L <del>K</del> E <del>L</del> A <del>D</del> Y <del>T</del>	247
	: . : . : * : * : : . . . . .	
ExsD [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	LLMP-----VPLELGVFWHALLALPHQDDVALTLHEWLVG	254
ExsD [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	AFTP-----VPEALSSCWTWLTALEHDNESAIHLQKWLCA	261
LscZ [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	GFEP-----IPEVLECLWQPLCRLDDDVGAADAVQAWLHE	262
ExsD [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810]	STTDMFISDWKTWCSEARLQAPDLNEVWDACDVVYNDLNAVAKVQWFRD	297
	. * * : : . : * :	
ExsD [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]	RGIALGQDHFYWQPAEP-----	271
ExsD [ <i>Aeromonas hydrophila</i> ]	RVLC <del>L</del> PQDSFYWQSTTT-----	278
LscZ [ <i>Photobacterium luminescens</i> ]	RNL <del>C</del> QAQDHFYWQS-----	276
ExsD [ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810]	MQIVGDVDHYFYFDIQSGCQACNHLSQI	326
	: * : * :	

# Anti-activator ExsD Forms a 1:1 Complex with ExsA to Inhibit Transcription of Type III Secretion Operons<sup>\*S</sup>

Received for publication, February 27, 2009, and in revised form, April 3, 2009. Published, JBC Papers in Press, April 15, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.003533

Julie Thibault<sup>†S¶1</sup>, Eric Faudry<sup>†S¶1</sup>, Christine Ebel<sup>¶||\*\*</sup>, Ina Attree<sup>†S¶1</sup>, and Sylvie Elsen<sup>†S¶2</sup>

From the <sup>†</sup>Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés, F-38054 Grenoble, <sup>¶</sup>CNRS, UMR 5092, F-38054 Grenoble, the <sup>¶1</sup>Université Joseph Fourier, F-38000 Grenoble, the <sup>¶||</sup>Commissariat à l'Énergie Atomique, Institut de Biologie Structurale, Laboratoire de Biophysique Moléculaire, F-38027 Grenoble, and <sup>\*\*</sup>CNRS, UMR 5075, F-38027 Grenoble, France

The ExsA protein is a *Pseudomonas aeruginosa* transcriptional regulator of the AraC/XylS family that is responsible for activating the type III secretion system operons upon host cell contact. Its activity is known to be controlled *in vivo* through interaction with its negative regulator ExsD. Using a heterologous expression system, we demonstrated that ExsD is sufficient to inhibit the transcriptional activity of ExsA. Gel shift assays with ExsA- and ExsD-containing cytosolic extracts revealed that ExsD does not block DNA target sites but affects the DNA binding activity of the transcriptional activator. The ExsA-ExsD complex was purified after coproduction of the two partners in *Escherichia coli*. Size exclusion chromatography and ultracentrifugation analysis revealed a homogeneous complex with a 1:1 ratio. When in interaction with ExsD, ExsA is not able to bind to its specific target any longer, as evidenced by gel shift assays. Size exclusion chromatography further showed a partial dissociation of the complex in the presence of a specific DNA sequence. A model of the molecular inhibitory role of ExsD toward ExsA is proposed, in which, under noninducing conditions, the anti-activator ExsD sequesters ExsA and hinders its binding to DNA sites, preventing the transcription of type III secretion genes.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that can cause both acute and chronic infections by exploiting deficiencies in the host defenses. The bacterium turns on/off a battery of different virulence factors depending on the type and the stage of infection (1, 2). The type three secretion system (T3SS)<sup>3</sup> is a major virulence determinant of *P. aeruginosa* that is associated with both early chronic and acute infections (3–5). It allows the bacterium to inject a set of effectors through a

syringe-like apparatus directly into the eukaryotic cytoplasm (6, 7). In *P. aeruginosa*, four translocated effector proteins, namely ExoY, ExoS, ExoT, and ExoU, lead to disruption of the cytoskeletal organization, increased cytosolic cAMP concentration, breaking of eukaryotic cell membranes, and cell death (8, 9).

According to the bacterial metabolism and/or infectious niche, the synthesis of T3SS as well as other virulence factors is finely tuned by general and specific regulatory pathways (10, 11). Molecular links between general pathways and T3SS regulation have generally not been identified yet; however, they all converge toward one transcription factor that is absolutely required for T3SS gene expression, the ExsA protein (10 and references therein and Refs. 12, 13).

ExsA is an activator belonging to the AraC/XylS family of transcription factors, whose common feature is a conserved ~100-amino acid domain containing two helix-turn-helix (HTH) motifs. Like ExsA, they often possess an additional N-terminal domain that may carry dimerization determinants and/or ligand-binding property capable of modulating their activity (14, 15). Interestingly, although the ligands are usually small molecules (for instance, arabinose for AraC and 3-methyl benzoate for XylS), some AraC/XylS members involved in virulence, and more particularly in T3SS, are regulated positively or negatively through interactions with protein ligands (16). Indeed, InvF of *Salmonella typhimurium* and MxiE of *Shigella flexneri*, two transcription factors regulating the expression of T3SS, are activated by T3SS chaperones, respectively, SicA and IpgC (17, 18). In addition, MxiE is also negatively regulated by association with the anti-activator/chaperone OspD1-Spa15 complex (19). The regulation of SPI1 (*Salmonella* pathogenicity island 1) genes, many of them encoding components of T3SS, involves the HilD factor, another AraC/XylS member negatively modulated by a ligand protein HilE (20).

In *P. aeruginosa*, ExsA has been reported to be regulated by two inhibitors, ExsD and PtrA (21, 22). The anti-activator ExsD belongs to the dedicated regulatory cascade that links synthesis of T3SS proteins to secretory activity (21). This pathway involves also the anti-anti-activator ExsC (23) and the secreted/translocated protein ExsE (24, 25). Based on *in vivo* and *in vitro* studies, a model of regulation has been proposed (10): when the T3SS is induced, after direct contact with the target cell or calcium depletion, the small protein ExsE is translocated through the syringe-like apparatus into the host cell; consequently, ExsC binds ExsD, which releases ExsA that becomes able to activate transcription of the T3SS genes. Indeed, recent

\* This work was supported in part by institutional grants from the CNRS, Commissariat à l'Énergie Atomique, and Université Joseph Fourier and a grant from Région Rhône-Alpes (Cluster 10 Infectiologie).

<sup>§</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental "Experimental Procedures," Tables S1–S3, and Fig. S1.

<sup>1</sup> Recipient of a Ph.D. fellowship from Région Rhône-Alpes Cluster 10.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: LBBSI/IRTSV, Commissariat à l'Énergie Atomique, Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France. Tel.: 33-438783074; Fax: 33-438784499; E-mail: sylvie.elsen@cea.fr.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: T3SS, type III secretion system; HTH, helix-turn-helix; SEC, size exclusion chromatography; EMSA, electrophoretic mobility shift assays; AUC, analytical ultracentrifugation; SV, sedimentation velocity; SE, sedimentation equilibrium; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine.

biochemical characterization of the ExsE-ExsC and ExsC-ExsD complexes supports this model (26). More recently the second putative ligand called PtrA, unique in *P. aeruginosa*, has been discovered as an inhibitor of T3SS synthesis under specific environmental conditions, such as copper stress (22). Its direct interaction with ExsA was visualized using a bacterial two-hybrid system, pulldown experiments, and enzyme-linked immunosorbent assays. However, the molecular mechanisms used by these two anti-activators to interact with and prevent ExsA from activating the transcription are still unknown. Notably, no information exists concerning the regulation of any other AraC/XylS members by protein inhibitors, like MxiE in *S. flexneri* or HilD in *Salmonella* (19, 20).

This study reports the first biochemical characterization of ExsA in complex with its anti-activator ExsD and the consequence of this interaction on DNA recognition. By combining *in vivo* (heterologous system) and *in vitro* approaches (protein purification, analytical ultracentrifugation, size exclusion chromatography, protein/DNA interaction assays), our work shows the following: (i) ExsD is sufficient to inhibit *in vivo* ExsA transcriptional activity; (ii) ExsD does not bind to DNA and inhibits the binding of ExsA to DNA through direct interaction; (iii) ExsA-ExsD is a 1:1 complex; and (iv) ExsA binds to DNA or ExsD in an exclusive manner. A model for a molecular mechanism by which the protein ligand ExsD inhibits the activity of the AraC/XylS member ExsA is proposed.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Bacterial Strains and Growth Conditions**—The *P. aeruginosa* strain CHA, a cystic fibrosis clinical isolate (27), was used for gene amplifications. *Escherichia coli* Top10 strain (Invitrogen) was used for standard cloning experiments and for expression in heterologous systems. The overproduction assays were done using *E. coli* strain BL21 Star (DE3) (Invitrogen). Cells were grown aerobically in Luria Bertani (LB) medium at 37 °C. Antibiotics were added at the following concentrations (in milligrams/liter): 100 (ampicillin), 34 (chloramphenicol), 25 (kanamycin), 10 (tetracycline).

***E. coli* Heterologous Expression System**—The construction of the reporter gene plasmid, *pRK-pC<sup>+</sup>lacZ*, of the *exsA* expression vector *pRSF-pX<sub>2</sub>ExsA* and of the *exsD* expression vector *pIApX<sub>2</sub>ExsD* is detailed in the supplemental material. All three plasmids (*pRK-pC<sup>+</sup>lacZ*, control *pRSFDuet-1* or *pRSF-pX<sub>2</sub>ExsA*, and control *pIApX<sub>2</sub>* or *pIApX<sub>2</sub>ExsD*) were transformed into the *E. coli* Top10 strain by successive transformation. Overnight cultures of the strains grown at 37 °C in LB supplemented with appropriate antibiotics were diluted to an absorbance at 600 nm ( $A_{600}$ ) of 0.1 and then grown at 37 °C until the  $A_{600}$  reached 1.0. The  $\beta$ -galactosidase activity was measured as described below, and 25 ml of the cells were further sedimented by centrifugation and then resuspended in 0.5 ml of buffer (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 10% glycerol, pH 8). After sonication, the lysates were ultracentrifuged for 30 min at 250,000  $\times g$  in a TLA 120.2 rotor (Beckman) at 4 °C to separate the soluble fraction from the insoluble membrane fraction. Then immunoblot analyses on the soluble fractions were performed as described below to assess the amount of ExsA and ExsD produced.

**$\beta$ -Galactosidase Assays**—Whole cells (0.5 ml) of *E. coli* strains at  $A_{600}$  of 1.0 were made permeable by addition of 20  $\mu$ l of 0.1% SDS and 20  $\mu$ l of chloroform, followed by vortexing for 1 min.  $\beta$ -Galactosidase activity was then assayed according to Miller (28), with up to 0.1 ml of cells, in 0.9 ml of Z buffer (0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 50 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0) at 28 °C. Reaction was initiated by addition of 0.2 ml of *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside at 4 mg/ml and stopped with 0.5 ml of 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . The  $A_{420}$  was then read after sedimentation of cell debris, and the activities were expressed in Miller units ( $(A_{420} \times 1000)(t_{\text{min}} \times \text{Vol}_{\text{ml}} \times A_{600})$ ). The reported values for enzyme activities are the average of at least two independent experiments performed in triplicate.

**Production and Purification of ExsA, ExsD, and ExsA-ExsD Complex**—Construction of overexpression plasmids is detailed in the supplemental material. Production of His<sub>6</sub>ExsA ( $_{\text{H}}$ ExsA), ExsAHis<sub>6</sub> (ExsA<sub>H</sub>), and ExsD was performed in *E. coli* BL21 Star (DE3) strains harboring *pET15b-HEXsA*, *pET22b-ExsAH*, and *pACYC-ExsD*, respectively, grown in LB at 37 °C. Expression was induced with 0.5 mM isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside at an  $A_{600}$  of 0.6. Cells were additionally grown overnight at 16 °C and 120 rpm and then harvested by centrifugation. The  $_{\text{H}}$ ExsA and ExsA<sub>H</sub> proteins were purified and stored as already described for  $_{\text{H}}$ ExsA (29), in 20 mM Tris/HCl buffer, 500 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.5% Tween 20, pH 7.4. For purification of ExsD, the harvested cells were lysed at 4 °C by three passages through a French press cell in lysis buffer (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0) supplemented with Protease Inhibitor Mixture (Complete, Roche Applied Science). After centrifugation at 200,000  $\times g$  for 45 min at 4 °C, the soluble fraction was loaded onto a 5-ml anion exchange column (Hitrap<sup>TM</sup> Q HP, GE Healthcare). The column was washed with 25 ml of lysis buffer, and the protein was eluted with a 50-ml gradient ranging from 100 mM to 1.5 M NaCl in 20 mM Tris/HCl, pH 8.0. Fractions containing ExsD were pooled, and 6 ml were loaded onto a gel filtration column (Hiload 16/60 Superdex<sup>TM</sup> 200, GE Healthcare) previously equilibrated in 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, and 2 mM EDTA, pH 8.5. ExsD was eluted with a flow rate of 1 ml/min.

Coproduction of  $_{\text{H}}$ ExsA-ExsD, ExsA<sub>H</sub>-ExsD, His<sub>6</sub>ExsA(1–168)-ExsD, or His<sub>6</sub>ExsA(166–278)-ExsD was performed in *E. coli* BL21 Star (DE3) strains harboring *pACYC-ExsD* and *pET15b-HEXsA*, *pET22b-ExsAH*, *pET15b-HNter*, or *pET15b-HCter*, respectively. Culture and induction were performed as described above for individual proteins. Harvested cells were resuspended in 20 mM Tris/HCl buffer, 250 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0, supplemented with Protease Inhibitor Mixture (Complete Roche Applied Science). After cell breakage by French press, the supernatants were cleared by ultracentrifugation at 200,000  $\times g$  for 45 min. Then the soluble fractions were loaded onto a nickel affinity column (HisTrap<sup>TM</sup> chelating, GE Healthcare) and submitted to a step imidazole gradient (20, 50, 100, 200, and 500 mM). Fractions eluted at 100 mM imidazole were pooled, and 6 ml were loaded onto a preparative gel filtration column (Hiload 16/60 Superdex<sup>TM</sup> 200, GE Healthcare) at a flow rate of 1 ml/min. Peak protein fractions were concentrated by Vivaspinn 20<sup>TM</sup> (Vivasciences) and analyzed by SDS-



## ExsD and ExsA Form a 1:1 Inhibitory Complex

PAGE. The same procedure was used for the copurification of the individual N-terminal and C-terminal domains of ExsA with ExsD. Protein concentrations were estimated using BCA Assay (Interchim) and UV measurement.

**Analytical Size Exclusion Chromatography (SEC)**—500  $\mu$ l of complex from preparative SEC developed in “binding buffer” (20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 25 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 10% glycerol, pH 8.0) were loaded onto a high resolution gel filtration column (Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL, GE Healthcare) equilibrated in the same buffer. The complex was eluted at a volume of 14.1 ml with a flow rate of 0.4 ml/min. The column calibration was performed with molecular weight standards of protein, as recommended by the manufacturer (GE Healthcare). For the study of the proteins in the presence of DNA, we used the pC 60-mer DNA probe generated by annealing a complementary pair of oligonucleotides (pC EMSA F and pC EMSA R, see supplemental Table S2). Prior to the chromatography, the <sub>H</sub>ExsA-ExsD complex, <sub>H</sub>ExsA, or ExsD were mixed to the probe in 1:2 molar ratio (protein/DNA) and incubated for 30 min at 25 °C in the binding buffer, in a total volume of 500  $\mu$ l. Samples containing the proteins, the pC probe, or their mixtures were analyzed on Superdex 200<sup>TM</sup> 10/300 GL as described (30). Fractions of 250  $\mu$ l were collected and analyzed by SDS-PAGE or Western blot to monitor the protein elutions.

**Antibodies and Immunoblot Analysis**—Polyclonal antibodies against the ExsA<sub>H</sub> protein were raised in rabbits, and antibodies against ExsD were raised in guinea pigs by Eurogentec as described by the manufacturer. The specific antibodies directed against ExsA<sub>H</sub> were affinity-purified. For the immunoblots, the samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk before addition of primary antibodies (1:2,000) and a secondary goat anti-rabbit (Sigma) or rabbit anti-guinea pig antibody (Invitrogen) conjugated to peroxidase. Detection was performed by ECL (Amersham Biosciences).

**Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)**—The pC DNA probe was generated by annealing a complementary pair of biotinylated oligonucleotides (5' dR Biot-pC EMSA F and 5' dR Biot-pC EMSA R, see supplemental Table S2). When cytosolic extracts were used, the production of ExsA<sub>H</sub>, ExsD and PcrV was performed in *E. coli* BL21 Star (DE3) strains harboring pET22b-ExsAH, pACYC-ExsD, and pET15b-PcrV, respectively. Cultures were grown in LB at 37 °C as described above. 30 ml of cells were resuspended in 2.5 ml of buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10% glycerol, pH 8.0). After sonication, the lysates were ultracentrifuged, and the concentration of the total soluble proteins was measured (0.7 mg/ml). The protein profiles were analyzed on a 15% Tris/Tricine denaturing gel.

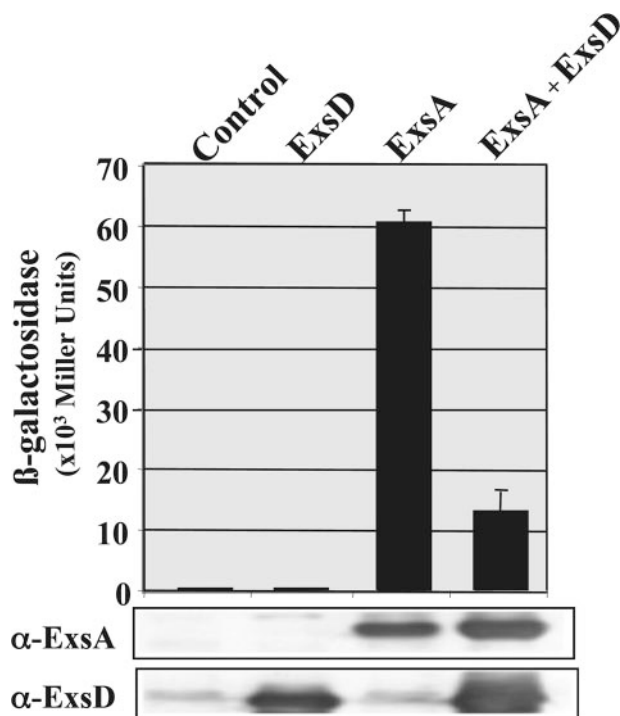
DNA binding assays were performed as follows: 1  $\mu$ l of each protein preparation (purified proteins or cytosolic extracts) was added to a mixture containing 0.2 nM specific probe, 20 ng/ $\mu$ l poly(dI-dC) ( $\times 2,500$ ), 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 200 mM KCl, 10% glycerol, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 2 mM EDTA, in a final reaction volume of 20  $\mu$ l. The reactions were incubated at 25 °C for 15 min. When indicated, 2  $\mu$ l of antibodies were added, and the reaction was extended for 5 min. Then the samples were loaded on a native 5% Tris/glycine/EDTA (TGE)-

buffered polyacrylamide gel and electrophoresed at 100 V with cold (1 $\times$ ) TGE buffer. After electrotransfer (180 mA, 30 min, in 0.5  $\times$  Tris/borate/EDTA buffer) onto a Biodyne<sup>®</sup> B nylon membrane (Pierce), the probes were cross-linked to the membrane using a Biolinker BLX-E254 UV cross-linker (Vilber Lourmat) and detected using the Lightshift<sup>®</sup> chemiluminescent EMSA kit (Pierce).

**Analytical Ultracentrifugation (AUC)**—Experiments were performed using an AN-50 rotor in a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge. Samples were freshly prepared by preparative SEC developed in “complex buffer” (20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0). Samples of ExsA<sub>H</sub>/ExsD diluted at 0.95, 0.45, and 0.09 mg/ml and <sub>H</sub>ExsA/ExsD at 0.09 and 0.05 mg/ml were investigated by sedimentation velocity (SV) at 42,000 rpm and 20 °C, at 280 nm and using interference optics, with two-channel centerpieces of 1.2- or 0.3-cm optical path length with sapphire windows. Sedimentation equilibrium (SE) was done at 4 °C for ExsA<sub>H</sub>/ExsD between 0.14 and 0.57 mg/ml, from SEC followed by a concentration step and dilution series, with two- and six-channel centerpieces of 0.3- and 1.2-cm optical path length, with quartz windows. SE experiments were performed at successively, for more than 24 h at each angular velocity, 8,300, 10,000, and 14,400 rpm, followed by speeding at 42,000 rpm. Radial scans at 280 nm were taken every 2 h. The density (1.0074 g/ml) and viscosity (1.03 millipascal-s) of the buffer as well as the partial specific volume, molar mass, and molar extinction coefficients of the polypeptides and complexes (see supplemental Table S3) were estimated with the program Sednterp. Data analyses were made as described previously (31, 32). We used the refractive index increment  $\partial n/\partial c = 0.186$  ml/g to estimate protein concentration from the interference signal and experimental  $E_{280,0.1\%} = 1.44$  cm<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> ml for determining the complex concentration. SV analyses were done with the program Sedfit in terms of continuous distributions  $c(s)$  of sedimentation coefficients ( $s$ ) (33). As samples were homogeneous, the analysis was made considering one noninteracting particle, allowing the estimates of  $s$ , of the protein molar mass ( $M$ ), and of the Stokes radius ( $R_s$ ). In SE experiments, the equilibrium conditions were checked using Winmatch version 7 software. A global analysis was performed using Sedphat software, assuming one type of ideal species, with mass conservation in each sample, for the determination of  $M$ .

## RESULTS

**ExsD Is Sufficient to Inhibit ExsA Transcriptional Activity**—The ExsD protein was shown previously to negatively control ExsA activity in a *P. aeruginosa* background, and a bacterial two-hybrid system gave evidence for direct interaction between ExsA and ExsD (21). To address the question whether ExsD is sufficient to block ExsA activity, we designed a heterologous transcription assay in *E. coli*. The ExsA-target promoter of the *exsCEBA* operon was fused to the *lacZ* reporter gene (fusion pC<sup>+</sup>-*lacZ*) and introduced into *E. coli*. ExsA and ExsD were produced either alone or in concert, and their effect on pC expression was assessed by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity. As shown in Fig. 1, ExsD alone did not affect pC transcription as the  $\beta$ -galactosidase activity was similar to that observed in the control cells. On the contrary, ExsA was able to



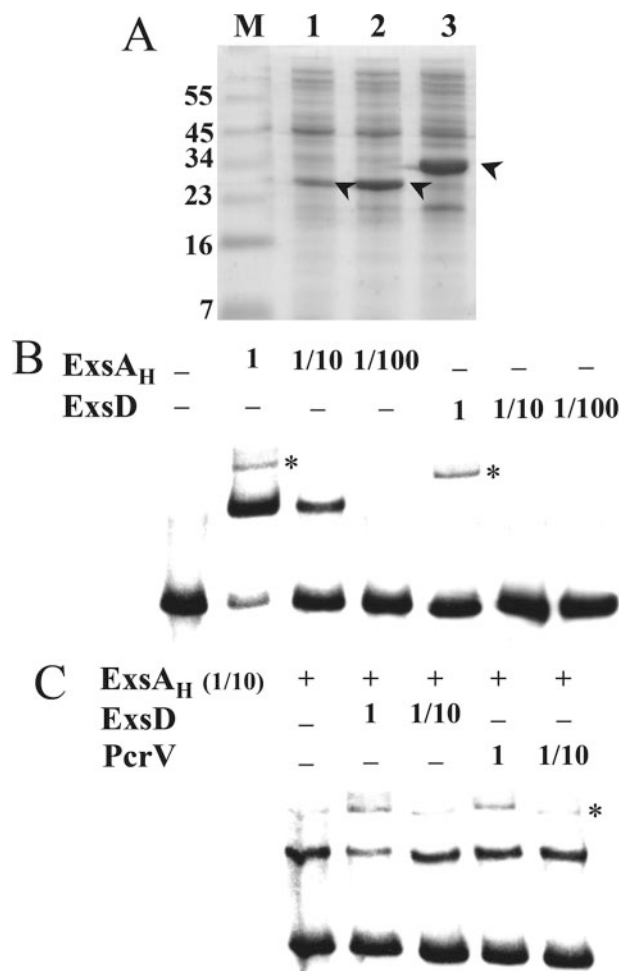
**FIGURE 1. Direct inhibition of *in vivo* ExsA activity by the anti-activator ExsD.** The histograms present the  $\beta$ -galactosidase activity from *E. coli* strains containing three plasmids as indicated. The reporter plasmid pRK- $pC^+$ -*lacZ* is present in all the strains. The second plasmid is either pRSFDuet- $pX_2$ ExsA (ExsA) or pRSFDuet-1 (control). The third plasmid is either pAp $X_2$ ExsD (ExsD) or pAp $X_2$  (control). Error bars denote standard deviation. The lower panels represent the anti-ExsA and anti-ExsD immunoblot analyses of the soluble fractions of the corresponding cells.

activate *pC* expression at a high level (60,500 Miller units). When both ExsA and ExsD were present in the cells, the activity of *pC* was strongly reduced (4.5-fold) compared with the expression observed with ExsA alone, whereas the amount of ExsA was similar in both cases as visualized by immunoblots (Fig. 1). These data clearly demonstrate that the ExsD protein is sufficient to inhibit *in vivo* ExsA transcriptional activity.

**ExsD Affects ExsA DNA Binding Activity**—To get insights into the inhibitory effect of ExsD, we assessed the DNA binding activity of both ExsA and ExsD, alone or mixed together. The fusion protein ExsA<sub>H</sub> (ExsA fused to a His<sub>6</sub> tag at its C terminus) and the ExsD protein were overproduced separately in *E. coli* strains (Fig. 2A). Then increasing dilutions of the cytosolic extracts were used in mobility shift assays using the promoter of the regulatory gene operon (*pC*) as a probe. As shown Fig. 2B, ExsA<sub>H</sub> is clearly endowed with DNA binding activity, whereas the anti-activator ExsD does not bind to the probe, not even at the highest concentration. This experiment clearly supports the idea that the anti-activator inhibits ExsA by directly interacting with the transcription factor and not by occluding the DNA targets of ExsA.

Moreover, when the two proteins were mixed together in the binding reaction buffer 15 min prior to the addition of the *pC* probe, a slight reduction of the amount of shifted probe in presence of a high amount of ExsD could be observed (Fig. 2C). As a negative control, cytosolic extracts of PcrV-overproducing strain did not affect the binding of ExsA to DNA. These data

## ExsD and ExsA Form a 1:1 Inhibitory Complex



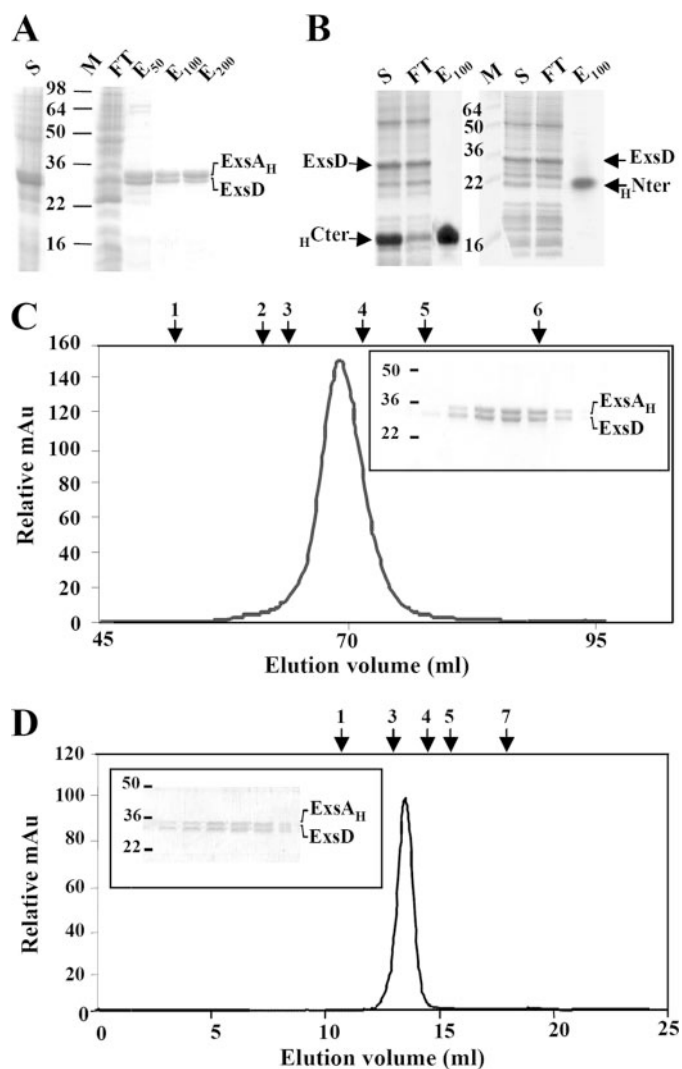
**FIGURE 2. ExsD interferes with ExsA binding to DNA.** A, cytosolic extracts of cells producing ExsA<sub>H</sub> (lane 1), ExsD (lane 2), and PcrV (lane 3) were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. The bands corresponding to the proteins are indicated by an arrowhead. M, protein marker (in kDa). B, EMSA of the *pC* promoter with ExsA<sub>H</sub> and ExsD extracts. Biotinylated *pC* fragment (60-mer, 0.2 nM) was incubated for 15 min at 25 °C in the absence (–) or in the presence of 1  $\mu$ l of indicated cytosolic fraction, either undiluted (0.7 mg/ml) (lane 1), diluted 10 (lane 1/10), or 100 times (lane 1/100). The samples were then electrophoresed, electrotransferred onto a nylon membrane, and revealed using Lightshift® chemiluminescent EMSA kit. C, 1  $\mu$ l of ExsA<sub>H</sub>-cytosolic fraction, 10-fold diluted, was incubated with 1  $\mu$ l of the indicated fractions (undiluted or diluted 10 times) 15 min prior to addition of *pC* probe. A nonspecific band (\*) is revealed at the highest concentration of all extracts.

further suggest that it is the DNA binding activity of ExsA that is affected in presence of ExsD.

**ExsA and ExsD Form a Complex**—To further study the effect of ExsD on the *in vitro* binding activity of ExsA<sub>H</sub>, we overproduced and purified the ExsA<sub>H</sub> and ExsD. Surprisingly, addition of up to 100-fold molar excess of ExsD did not affect the binding of the transcription factor on its target DNA in gel shift experiments (data not shown). Of note, we also never observed by SEC a ExsA-ExsD complex by mixing the two purified proteins *in vitro*.

Therefore, to study the DNA-binding properties of ExsA in the presence of ExsD, we attempted to obtain the ExsA-ExsD complex by coproducing the two proteins in BL21 Star (DE3) *E. coli* and to probe the existence of a complex by copurification. During the Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography, the untagged

## ExsD and ExsA Form a 1:1 Inhibitory Complex



**FIGURE 3. Copurification of the ExsA<sub>H</sub> protein and its anti-activator ExsD.** SDS-PAGE analysis of nickel affinity chromatography of coproduced ExsA<sub>H</sub>-ExsD (A), H<sub>Cter</sub> (H<sub>Cter</sub>-ExsA(166–268))-ExsD (B, left panel), and H<sub>Nter</sub> (H<sub>Nter</sub>-ExsA(1–168))-ExsD (B, right panel). S, supernatant obtained after ultracentrifugation; M, protein marker (kDa); FT, flow-through; E<sub>50</sub>, E<sub>100</sub>, E<sub>200</sub>, proteins eluted at 50, 100, and 200 mM imidazole, respectively. The gels were stained by Coomassie Blue. C, elution profile of the ExsA<sub>H</sub>-ExsD complex on size exclusion chromatography (Hiload 16/60 Superdex 200); the complex elutes as a single peak at 69.13 ml. The inset represents the SDS-PAGE monitoring the eluted proteins from 66 to 72 ml. D, elution profile of the ExsA<sub>H</sub>-ExsD complex on analytical size exclusion chromatography (Superdex 200 10/300 GL); the complex elutes as a single peak at 14.1 ml. The inset represents the SDS-PAGE monitoring the eluted proteins from 13.5 to 15.25 ml. Above the two chromatograms are indicated the elution volumes of the standard proteins with known molecular weight and Stoke radius: arrow 1, ferritin (440 kDa, 61 Å); arrow 2, catalase (232 kDa, 52.2 Å); arrow 3, aldolase (158 kDa, 48.1 Å); arrow 4, bovine serum albumin (67 kDa, 35.5 Å); arrow 5, ovalbumin (43 kDa, 30.5 Å); arrow 6, chymotrypsinogen (25 kDa, 20.9 Å); arrow 7, ribonuclease A (13.7 kDa, 16.4 Å).

ExsD protein coeluted with ExsA<sub>H</sub> (Fig. 3A), whereas ExsD alone was not retained on the HisTrap column. The fractions containing the two proteins were first injected onto a preparative size exclusion column (Superdex 200 16/60), and the single eluted peak was analyzed by SDS-PAGE (Fig. 3C). This peak should correspond to the ExsA-ExsD complex as, when purified independently in the same conditions, ExsA eluted in the void volume, whereas the ExsD protein eluted at the volume expected for its trimeric form (data not shown and see Ref. 26).

The most concentrated fraction was further loaded onto a high resolution gel filtration column (Superdex 200 10/30 GL). One single peak again eluted from this column containing both the ExsA<sub>H</sub> and ExsD proteins in the same amount, as visualized on SDS-PAGE (Fig. 3D) and confirmed by immunoblots. This second SEC further indicates the existence of a single complex that does not dissociate. The same results were obtained when ExsD was coproduced and copurified with ExsA fused with a His<sub>6</sub> tag at its N terminus (H<sub>Nter</sub>ExsA) (data not shown).

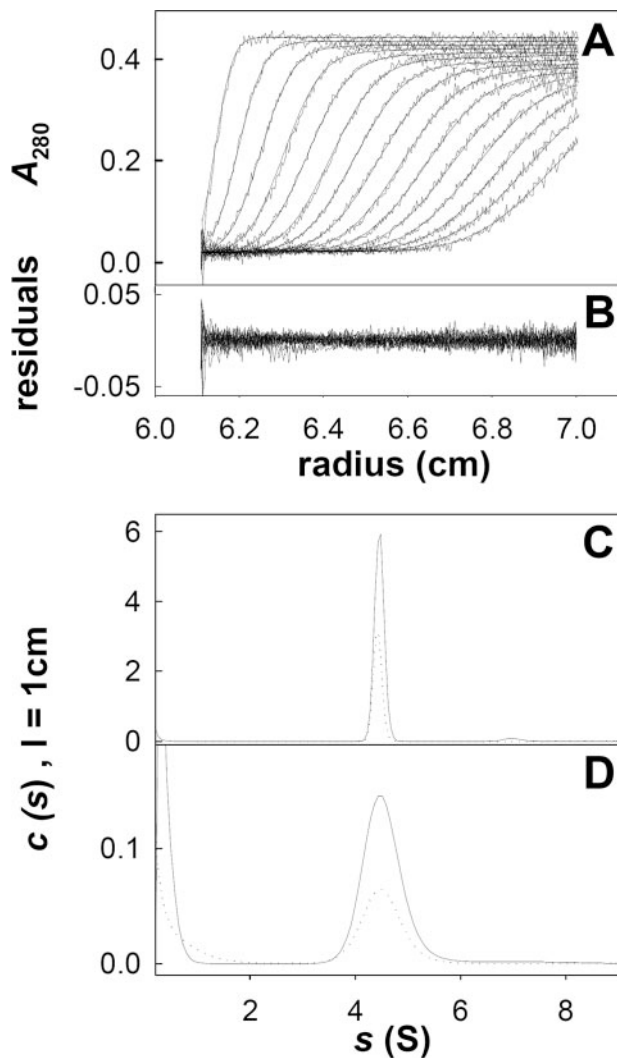
ExsA is composed of two distinct domains as follows: the C-terminal domain containing the two HTH motifs and the N-terminal domain supposed to be involved in the regulation of the DNA binding activity. To determine whether any of the two ExsA distinct domains are sufficient to interact with ExsD, ExsD was coproduced with either the first 168 amino acids of ExsA (H<sub>H</sub>ExsA(1–168)) or with the C-terminal domain of ExsA (H<sub>H</sub>ExsA(166–278)), both domains carrying the hexahistidine tag on N terminus. In both cases, no ExsD could be eluted in the same fractions as ExsA domains during the affinity chromatography. Of note, this also illustrates that untagged ExsD was not retained on the HisTrap column (Fig. 3B). As for the entire ExsA, the recombinant H<sub>H</sub>ExsA(1–168) and H<sub>H</sub>ExsA(166–278) purified separately were not able to interact with ExsD as assessed by SEC (data not shown). All these data indicated that the ExsA and ExsD proteins do interact and form a complex only when the two partners are coproduced and that the interaction with ExsD requires the entire ExsA protein.

**ExsD and ExsA Form a 1:1 Complex**—Our results from SEC on the Superdex 200 10/30 GL revealed that the ExsA<sub>H</sub>-ExsD and H<sub>H</sub>ExsA-ExsD complexes eluted at the same volume of 14.1 ml (Fig. 3D, and data not shown), corresponding to a globular macromolecule with a Stokes radius of ~39.9 Å.

As SEC only allows the estimation of the complex size, we further characterized the stoichiometry of the complex by AUC analysis. SV experiments were performed on fresh samples issued from SEC. For the two complexes ExsA<sub>H</sub>-ExsD and H<sub>H</sub>ExsA-ExsD, investigated in the range 0.09–0.95 and 0.05–0.09 mg/ml, respectively, we observed the sedimentation of a well defined boundary (Fig. 4). The *c(s)* analysis showed for all investigated samples a species at 4.45 S (*s*<sub>20,w</sub> = 4.7 S), and the contributions observed at the lowest *s* values were most probably artifacts. The sedimentation coefficient did not vary with the His tag position nor with protein concentration suggesting, respectively, that the two complexes present the same stoichiometry and that there is no dissociation at low concentration (Fig. 4, C and D). The *s* value depends on the molar mass (*M*) and Stokes radius (*R*<sub>S</sub>), of the particle, according to Svedberg Equation 1,

$$s = M(1 - \rho\bar{v}) / (N_A 6\pi\eta R_S) \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $\rho$  and  $\eta$  are the solvent density and viscosity;  $\bar{v}$  is the partial specific volume of the particle, and  $N_A$  is the Avogadro number.  $R_S$  may be measured as follows: (i) either independently, (ii) from the SV profiles analyzed in the framework of the model of one type of noninteracting species, or (iii) estimated with hypothesis of molar mass and shape. (i) The combination of the *s* values with  $R_S = 4.0$  nm estimated from calibrated SEC

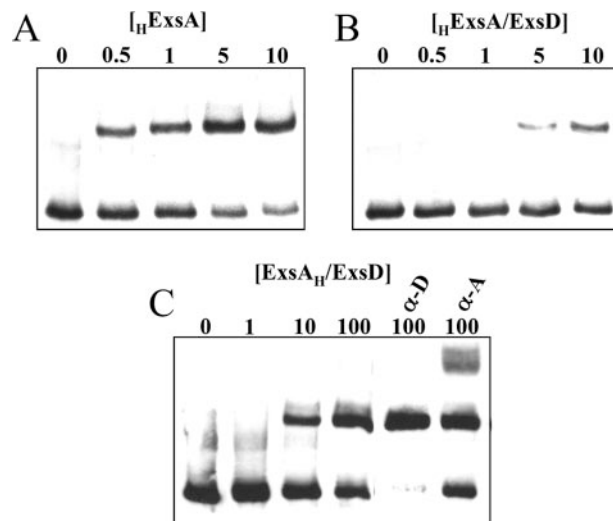


**FIGURE 4. Sedimentation velocity experiments of ExsA<sub>H</sub>/ExsD and HExsA/ExsD.** *A*, superimposition, for ExsA<sub>H</sub>/ExsD at 0.95 mg/ml, of selected experimental sedimentation profiles obtained at 280 nm during 4 h at 42,000 rpm, at 20 °C, in a 3 mm cell. *B*, corresponding residuals. *C*, result of the *c(s)* analysis for ExsA<sub>H</sub>/ExsD at 0.95 and 0.45 mg/ml (solid and dashed lines, respectively). *D*, result of the *c(s)* analysis for HExsA/ExsD at 0.09 and 0.05 mg/ml (solid and dashed lines, respectively).

gives an estimate for the complex of  $M = 78$  kDa. (ii) The analysis of the SV profiles in the model of one type of noninteracting species gives, from different samples, an estimate of  $M = 65$  kDa and  $R_S = 3.3$  nm ( $\pm 10\%$ ). (iii) If considering a frictional ratio of 1.25, which is typical of globular compact shape, the experimental *s* value corresponds, again, to  $M = 65$  kDa and  $R_S = 3.3$  nm values. The molar mass of 65 kDa is the value calculated for a 1:1 complex. Thus, SV supports a compact 1:1 complex, and most probably SEC provides an overestimated value of  $R_S$ .

SE was done to confirm the association state. The SE profiles were measured for four samples of ExsA<sub>H</sub>/ExsD in the range 0.14–0.57 mg/ml, at 280 nm and at three angular velocities. A global analysis was first made in the model of one component, with mass conservation constraint for each sample, without fitting any noise and gave  $M = 70$  kDa (see supplemental material and supplemental Fig. S1), close to the value of 65 kDa calculated for a 1:1 complex. When fitting, for each sample, a

## ExsD and ExsA Form a 1:1 Inhibitory Complex



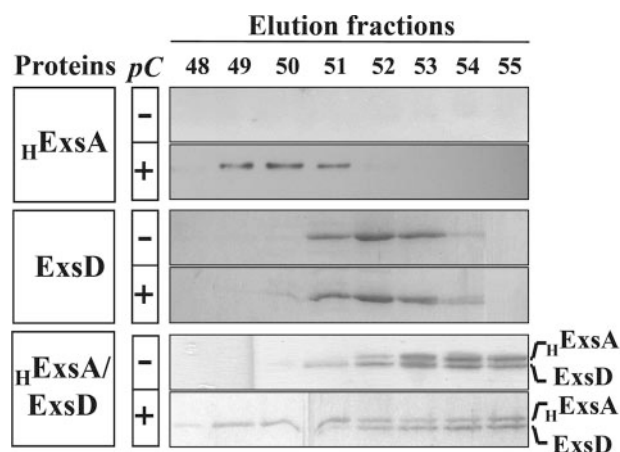
**FIGURE 5. DNA binding activity of ExsA alone or in complex with ExsD.** EMSA of the *pC* promoter with HExsA (*A*), HExsA-ExsD complex (*B*), or ExsA<sub>H</sub>/ExsD complex (*C*). Biotinylated *pC* probe (0.2 nM) was incubated 15 min with indicated concentrations of proteins (in nM). After electrophoresis and electrotransfer onto a nylon membrane, the labeled DNA was revealed using Lightshift® chemiluminescent EMSA kit. *C*, at the highest concentration of ExsA<sub>H</sub>-ExsD complex, antibodies directed against ExsD ( $\alpha$ -D) or against ExsA ( $\alpha$ -A) were added 5 min prior electrophoresis.

constant base line or time-independent noise (not shown), slightly larger molar masses of  $\approx 75$  kDa were obtained, which remains much below the value of 96–98 kDa calculated for ExsA<sub>H</sub>(ExsD)<sub>2</sub> or (ExsA<sub>H</sub>)<sub>2</sub>-ExsD complexes. Taken together, the AUC data demonstrate that both HExsA and ExsA<sub>H</sub> do form with its anti-activator ExsD a complex of 1:1 stoichiometry.

**ExsD Prevents ExsA from Binding to DNA**—To precisely characterize the inhibitory effect of ExsD on ExsA within the 1:1 complex, we compared the DNA-binding ability of ExsA alone or in complex with ExsD by performing gel shift assays on the *pC* promoter. The ExsA protein exhibited a specific and strong binding activity toward the *pC* probe, as illustrated on Fig. 5*A*, whereas the anti-activator ExsD by itself was not able to bind the probe in the same experimental conditions and in the same range of concentration (data not shown). These results corroborate the ones observed with cytosolic extracts (Fig. 2).

When the purified HExsA-ExsD and ExsA<sub>H</sub>-ExsD complexes, obtained from size exclusion chromatography, were used in EMSA, a shift of the *pC* promoter was also observed, with an electrophoretic mobility similar to that observed in presence of HExsA alone but that required at least 10 times more protein (Fig. 5, *B* and *C*). The same observation was made when another ExsA-target promoter, the promoter of the *pcrGVHpopBD* operon, was used in EMSA, and addition of unlabeled specific probe strongly reduced the intensity of the shifted band, confirming the specificity of the formed nucleoprotein complex (data not shown). To discriminate between a probe-ExsA-ExsD tripartite complex or a probe-ExsA complex, antibodies directed either against ExsD or against ExsA were added to EMSA reactions. Although the anti-ExsA antibodies (Fig. 5*C*) or anti-His (data not shown) formed a supercomplex with the probe-ExsA complex, addition of anti-ExsD antibodies led to the almost complete disappearance of the free

## ExsD and ExsA Form a 1:1 Inhibitory Complex



**FIGURE 6. Specific DNA partially dissociates the ExsA-ExsD complex.** Samples containing  ${}_{6H}$ ExsA (3  $\mu$ M), ExsD (4  $\mu$ M), and the  ${}_{6H}$ ExsA-ExsD complex (4  $\mu$ M) were incubated 30 min at 25  $^{\circ}$ C in binding buffer (see "Experimental Procedures"), either alone or mixed with pC probe in a 1:2 ratio (protein/DNA). The samples were loaded onto an analytical gel filtration column (Superdex 200 10/300 GL); 60  $\mu$ l of each indicated fraction (from 12.25 to 14.25 ml) were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining for the complex and ExsD or immunoblot using anti-His<sub>6</sub>-horseradish peroxidase for  ${}_{6H}$ ExsA.

probe and concomitantly increased the amount of the shifted probe (Fig. 5C).

All these data suggested that the ExsA-ExsD complex cannot bind to DNA and that the shifted probe observed in the presence of the complex was rather due to free ExsA released from the complex in presence of its target DNA. This is supported by the effect of anti-ExsD antibodies that seem to trap ExsD and consequently to increase the amount of free ExsA able to interact with DNA.

**ExsA Binds to DNA or ExsD in an Exclusive Manner**—To confirm the partial release of ExsA from the ExsA-ExsD complex in the presence of specific DNA, we analyzed the behavior of ExsA, free or in interaction with ExsD, in the presence of the pC probe. The proteins were incubated either in absence of DNA or in the presence of pC probe at a 1:2 molar ratio (protein/DNA) for 30 min at 25  $^{\circ}$ C, and the resulting species were separated using analytical SEC (Superdex 200 10/300 GL). The elution profiles were monitored by SDS-PAGE or Western blot (Fig. 6), because the 60-mer probe exhibits high absorbance preventing UV detection of the proteins and nucleoproteins. When  ${}_{6H}$ ExsA was subjected to SEC analysis, the protein was found in the void volume of the column, probably aggregated (data not shown). However, in the presence of pC, a second peak corresponding to low amounts of  ${}_{6H}$ ExsA eluted at a volume of 13 ml, as visualized by Western blot (Fig. 6), demonstrating that a part of ExsA is stabilized through the interaction with DNA. ExsD alone, reported to be a trimeric protein (26), was eluted independently of the presence of pC (elution volume of 13.5 ml), confirming its incapability to interact with DNA (Fig. 6). Concerning  ${}_{6H}$ ExsA-ExsD, the complex was eluted as a single peak at a volume of 14.1 ml as already observed in Fig. 3D. After incubation of the  ${}_{6H}$ ExsA-ExsD complex with pC, a clear modification of the elution pattern could be observed as follows: a fraction of  ${}_{6H}$ ExsA eluted earlier than the complex at a volume of 13 ml, which corresponds to the elution of the pC-ExsA nucleoprotein complex described above (Fig. 6). This dis-

sociation was DNA-specific, as an unrelated 60-mer fragment was not able to dissociate ExsA from the complex (data not shown).

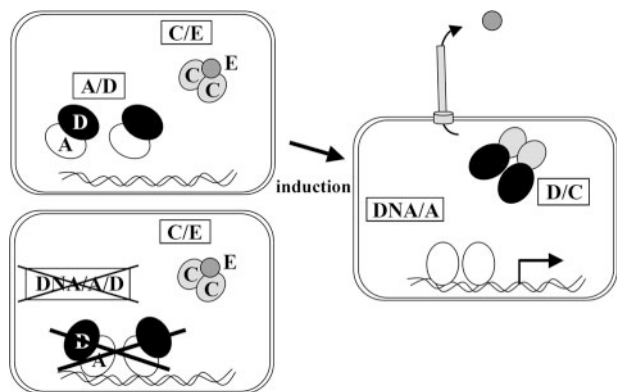
These experiments clearly indicate that the inhibitory mechanism used by the anti-activator ExsD to prevent ExsA activity is to sequester the transcription factor and hinder its binding to its target sequences. Indeed the ExsA-ExsD complex was not able to interact with DNA in gel shift assays in our experimental conditions, and the preformed complex partially dissociates *in vitro* in the presence of target DNA.

## DISCUSSION

In this study, we examined the interaction between the key regulator of the T3SS in *P. aeruginosa*, ExsA, an AraC/XylS member, and one of its two inhibitor proteins, ExsD. The use of a heterologous system indicated that, whereas ExsA can activate by itself the expression of a specific promoter target, the presence of ExsD is sufficient to strongly reduce the ExsA-transcription activation. Furthermore, the ExsD protein of *P. aeruginosa* (this study) and of *Vibrio parahemolyticus* (34) is devoid of DNA binding activity on ExsA-DNA targets, and its interaction with ExsA was previously suggested by a two-hybrid system (21). Hence, these data support a model in which ExsD binds to ExsA forming a complex inefficient in transcriptional activation.

The AraC/XylS family of transcriptional regulators of virulence traits can be modulated by ligand proteins in a positive or negative manner, but the molecular mechanisms underlying these interactions are still mostly unknown (16). So far, only activation mechanisms by non-protein ligands have been characterized (35–37). To our knowledge, the inhibition mechanism of AraC/XylS members triggered by ligand binding has not been documented yet. However, based on what is known about non-AraC/XylS transcription factors, several inhibitory molecular mechanisms could be envisioned. One possibility, for instance, would be that the transcription factor may be sequestered by the inhibitor leading to its incapacity to bind DNA and consequently to activate transcription. An example for this is the interaction between the chaperone FliT and FhlDC that prevents FhlDC-dependent expression of flagellar middle genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (38). Another mechanism would be that the activator-inhibitor complex still binds to DNA but is inefficient in transcriptional activation. In *P. aeruginosa*, this putative mechanism has been illustrated; the anti-activator FleN directly interacts with the enhancer binding protein FleQ without affecting its DNA binding activity (39). Alternatively, the negative regulator TraM in *Agrobacterium tumefaciens* can bind and inactivate TraR, a quorum-sensing activator of Ti plasmid conjugation, through a two-step process; TraM forms first an unstable tripartite complex with DNA-bound TraR that concomitantly releases the DNA (40).

To decipher the mechanism of ExsA inhibition by its anti-activator ExsD, we undertook the purification of the two proteins. Like most AraC/XylS proteins, ExsA is largely insoluble when overproduced and tends to aggregate when concentrated, both properties which are challenging for biochemical studies. Although a maltose-binding protein-ExsA fusion was used to



**FIGURE 7. Model of ExsD inhibitory role on ExsA.** Under noninducing T3SS conditions, ExsD captures ExsA within a 1:1 complex, making the transcription activator unable to bind target promoters. The second putative mechanism of inhibition, implying the DNA-binding of an ExsA-ExsD complex inefficient in transcriptional activation, was ruled out. The two other components of the regulatory cascade coupling T3SS secretion and synthesis, ExsC and ExsE, can form a 2:1 complex (11, 26). Upon induction of the T3SS system, ExsE is translocated into host cell, and the free ExsC protein interacts with ExsD. Released ExsA then binds to DNA and activate T3SS operons.

study the DNA binding activity (41), only recently was the biochemical characterization of His<sub>6</sub>-ExsA at a low concentration and in presence of Tween 20 reported (29). However, in these conditions separately produced and purified ExsA and ExsD proteins were not able to form any complex *in vitro*, and our attempts to see an effect of ExsD on the *in vitro* binding activity of purified ExsA repeatedly failed (data not shown). Therefore, to study the DNA-binding properties of ExsA in the presence of ExsD, we undertook the purification of the expected ExsA-ExsD complex after coproduction of the two partners in *E. coli*. This approach was successfully used for two other AraC/XylS members in interaction with their positive ligand proteins as follows: InvF-His<sub>6</sub> with the chaperone SicA (17) and the regulator maltose-binding protein-MxiE associated to the chaperone IpgC (42). We could obtain the ExsA<sub>H</sub>-ExsD and <sub>H</sub>ExsA-ExsD complexes by a two-step purification, including metal ion affinity chromatography followed by a size exclusion chromatography. Of note, the protein/protein interaction with ExsD stabilizes ExsA in solution.

AUC analysis revealed that ExsD is engaged with ExsA in a 1:1 complex. On the other hand, free ExsD was reported to be a trimer and to form a 2:2 complex with its own inhibitor, the anti-anti-activator ExsC (26). Free ExsC is a homodimeric chaperone (26), and ExsA was recently shown to be a monomer (29) (Fig. 7). Therefore, it is possible that ExsD has important and surprising plasticity allowing it to be a trimer, dimer, or monomer depending on its interacting partner (ExsD, ExsC, and ExsA, respectively), and that this modulating oligomeric state is important in the regulatory cascade. Accordingly, Zheng *et al.* (26) observed that subunit assembly within trimeric ExsD is dynamic, with the subunits associating and dissociating. However, it is also probable that, in *P. aeruginosa*, the protein is always engaged in a complex, either as a monomer in interaction with ExsA or two monomers interacting with the dimeric ExsC protein. Indeed, whereas the ExsD protein is able to self-associate, this property is not absolutely required for its regulatory activity as observed by the monohybrid system and complementation experiment using several mutants of the protein (43).

The effect of ExsD on ExsA DNA binding activity was then characterized by gel shift experiments. In the presence of the complex, we observed a shifted band with a mobility identical to that of the ExsA-dependent shift but that required a protein amount at least 10-fold higher for the complex compared with ExsA alone. One could have expected either no binding to the probe or a shifted probe with a lower mobility than DNA/ExsA, which could reflect a tripartite DNA-ExsA-ExsD complex, as observed for probe-FleQ-FleN or TraM-TraR-DNA (39, 40). Notably, the presence of anti-ExsD antibodies did not provoke any supershift of the probe, but rather it increased the amount of the shifted probe. These data suggested a release of a fraction of ExsA from the complex in the presence of specific DNA. This release was further confirmed by analyzing the novel protein species resulting from the mixture of DNA with the complex by SEC. Therefore, ExsA was shown to be able to bind to ExsD and to DNA in an exclusive manner.

In the AraC/XylS family, non-protein ligand binding is mediated by the N-terminal domain of the transcription factor that is associated to the C-terminal domain containing the two HTH motifs. We probed if the N-terminal domain of ExsA has a regulatory role and possesses this capacity of ligand binding. However, no complex was observed between the isolated domain and ExsD, after coproduction of the putative partners or *in vitro* after mixing the purified proteins. Similarly, when the independently purified C-terminal domain was assayed, no complex could be formed, suggesting that both domains of ExsA are required for the interaction with ExsD. Of note, the overproduction of the N-terminal domain in *P. aeruginosa* does not lead to the up-regulation of the T3SS by ExsD titration, as an unexpected dominant negative effect was observed.<sup>4</sup> Therefore, the role of the N-terminal domain remains puzzling. The mutagenesis of ExsA is underway to identify the determinants important for the ExsD interaction, and the three-dimensional structure of the complex would be another way to define the molecular basis of the inhibitory interaction.

Taken together, this work provides strong evidence for a negative effect of ExsD on the DNA binding activity of ExsA through protein/protein interaction. As illustrated Fig. 7, we propose a model of the molecular inhibitory role of ExsD that sequesters the transcriptional activator ExsA and abolishes the binding to DNA in absence of a signal inducing T3SS. Upon induction by host cell contact or calcium depletion, rearrangements of the different protein complexes lead to the release of ExsA that can bind to its DNA recognition sites. Consequently, ExsA activates gene transcription, and the synthesis of the *P. aeruginosa* T3SS is switched on.

*Acknowledgments*—We thank Aline Appourchaux from the Analytical Ultracentrifugation Platform of the Institut de Biologie Structurale (Grenoble, France) for technical assistance. We also thank Tammy Bohn-Chang and François Cretin for comments regarding the manuscript, Caroline Gêbus for technical assistance, and the entire team for helpful discussions.

<sup>4</sup> J. Thibault and S. Elsen, unpublished results.

## ExsD and ExsA Form a 1:1 Inhibitory Complex

### REFERENCES

1. Furukawa, S., Kuchma, S. L., and O'Toole, G. A. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 1211–1217
2. Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., and Lory, S. (2004) *Dev. Cell* **7**, 745–754
3. Banwart, B., Splaingard, M. L., Farrell, P. M., Rock, M. J., Havens, P. L., Moss, J., Ehrmantraut, M. E., Frank, D. W., and Barbieri, J. T. (2002) *J. Infect. Dis.* **185**, 269–270
4. Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadeja, L. (1983) *Rev. Infect. Dis.* **5**, 279–313
5. Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2002) *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 194–222
6. Cornelis, G. R. (2006) *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 811–825
7. Galán, J. E., and Wolf-Watz, H. (2006) *Nature* **444**, 567–573
8. Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006) *Med. Mal. Infect.* **36**, 78–91
9. Engel, J., and Balachandran, P. (2009) *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 61–66
10. Yahr, T. L., and Wolfgang, M. C. (2006) *Mol. Microbiol.* **62**, 631–640
11. Brutinel, E. D., and Yahr, T. L. (2008) *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 128–133
12. Dacheux, D., Attree, I., and Toussaint, B. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 538–542
13. Yahr, T. L., Hovey, A. K., Kulich, S. M., and Frank, D. W. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 1169–1178
14. Martin, R. G., and Rosner, J. L. (2001) *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 132–137
15. Egan, S. M. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 5529–5532
16. Plano, G. V. (2004) *Mol. Microbiol.* **54**, 287–290
17. Darwin, K. H., and Miller, V. L. (2001) *EMBO J.* **20**, 1850–1862
18. Mavris, M., Page, A. L., Tournebize, R., Demers, B., Sansonetti, P., and Parsot, C. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**, 1543–1553
19. Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., Sansonetti, P., and Demers, B. (2005) *Mol. Microbiol.* **56**, 1627–1635
20. Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L., and Jones, B. D. (2003) *Infect. Immun.* **71**, 1295–1305
21. McCaw, M. L., Lykken, G. L., Singh, P. K., and Yahr, T. L. (2002) *Mol. Microbiol.* **46**, 1123–1133
22. Ha, U. H., Kim, J., Badrane, H., Jia, J., Baker, H. V., Wu, D., and Jin, S. (2004) *Mol. Microbiol.* **54**, 307–320
23. Dasgupta, N., Lykken, G. L., Wolfgang, M. C., and Yahr, T. L. (2004) *Mol. Microbiol.* **53**, 297–308
24. Urbanowski, M. L., Lykken, G. L., and Yahr, T. L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9930–9935
25. Rietsch, A., Vallet-Gely, L., Dove, S. L., and Mekalanos, J. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8006–8011
26. Zheng, Z., Chen, G., Joshi, S., Brutinel, E. D., Yahr, T. L., and Chen, L. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 6136–6142
27. Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P. M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 416–421
28. Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352–355, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
29. Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A., Brady, K. M., and Yahr, T. L. (2008) *Mol. Microbiol.* **68**, 657–671
30. Chen, G., Malenkos, J. W., Cha, M. R., Fuqua, C., and Chen, L. (2004) *Mol. Microbiol.* **52**, 1641–1651
31. Lebowitz, J., Lewis, M. S., and Schuck, P. (2002) *Protein Sci.* **11**, 2067–2079
32. Ebel, C. (2007) in *Protein Structures: Methods in Protein Structure and Stability Analysis* (Uverski, V., and Permyakov, E. A., eds) pp. 229–260, Nova Science Publishers, New York
33. Schuck, P. (2000) *Biophys. J.* **78**, 1606–1619
34. Zhou, X., Shah, D. H., Konkol, M. E., and Call, D. R. (2008) *Mol. Microbiol.* **69**, 747–764
35. Schleif, R. (2003) *BioEssays* **25**, 274–282
36. Domínguez-Cuevas, P., Marín, P., Busby, S., Ramos, J. L., and Marqués, S. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 3118–3128
37. Yang, J., Hart, E., Tauschek, M., Price, G. D., Hartland, E. L., Strugnell, R. A., and Robins-Browne, R. M. (2008) *Mol. Microbiol.* **68**, 314–327
38. Yamamoto, S., and Kutsukake, K. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 6703–6708
39. Dasgupta, N., and Ramphal, R. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 6636–6644
40. Qin, Y., Su, S., and Farrand, S. K. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 19979–19991
41. Hovey, A. K., and Frank, D. W. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 4427–4436
42. Pilonieta, M. C., and Munson, G. P. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 2249–2251
43. Lykken, G. L., Chen, G., Brutinel, E. D., Chen, L., and Yahr, T. L. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 6832–6840

## RESUME

L'expression des gènes codant pour le Système de Sécrétion de Type III (SST3), facteur de virulence majeur de *Pseudomonas aeruginosa*, est activée par ExsA. Ce facteur de transcription appartient à la famille des régulateurs de type AraC/XylS caractérisés par un domaine de fixation à l'ADN comportant deux motifs hélice-tour-hélice. L'activité de ces protéines est généralement régulée par la fixation d'un ligand sur un domaine supplémentaire non conservé. Ce ligand peut être de nature protéique dans le cas de certains régulateurs contrôlant la synthèse de SST3. Ainsi, l'activité transcriptionnelle de ExsA est inhibée par l'anti-activateur ExsD.

L'étude de la fonctionnalité de ExsA et de ses domaines par des approches *in vitro* et *in vivo* a révélé que le domaine C-terminal de ExsA est bien le domaine de fixation à l'ADN et que deux monomères se fixent sur le promoteur de l'opéron des gènes de régulation du SST3 (*pC*). Ce domaine isolé possède une affinité pour *pC* et une activité transcriptionnelle inférieure à celle de ExsA. En effet, la fixation efficace de ExsA sur le promoteur *pC* requiert sa dimérisation à travers son domaine N-terminal. La dernière hélice  $\odot$  de ce domaine N-ter semble jouer un rôle majeur dans la dimérisation de ExsA. Le deuxième objectif de ma thèse était de comprendre l'interaction entre ExsA et ExsD et d'identifier le mécanisme grâce auquel l'inhibiteur empêche ExsA d'activer la transcription des gènes du SST3. Après co-production des deux protéines, le complexe ExsA/ExsD a été purifié puis caractérisé. ExsA et ExsD forment un complexe hétérodimérique au sein duquel l'inhibiteur empêche le facteur de transcription de se fixer à l'ADN.

**Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, Système de Sécrétion de Type III, Régulateurs de type AraC/XylS, ExsA, régulation transcriptionnelle, ExsD, anti-activateur.

## Functional characterization and mechanism of inhibition of ExsA, the master regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* Type Three Secretion System

### ABSTRACT

Expression of the genes encoding the Type Three Secretion System T3SS, major virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*, is under the positive transcriptional control of ExsA. This activator is a member of the AraC/XylS family of transcriptional regulators characterized by a DNA binding domain containing two helix–turn–helix motifs. The activity of these proteins is generally modulated by a ligand which binds to an additional non-conserved domain. AraC/XylS family members involved in SST3 control can be regulated by protein ligands. The ExsA activity is inhibited by the anti-activator ExsD.

The study of the functional domains of ExsA through *in vitro* and *in vivo* approaches showed that the C-terminal of ExsA is the DNA-binding domain and that two monomers bind to the promoter of the *exsCEBA* regulatory gene operon (*pC*). However, this domain possesses a lower affinity for *pC* and a lower transcriptional activity than the entire protein. Indeed, the efficient binding of ExsA to *pC* requires its dimerization through its N-terminal domain. The last  $\odot$ -helix of this domain seems to play a crucial role in this dimerization. The second goal of my work was to understand the interaction between ExsA and ExsD and to define the molecular mechanism of inhibition used by the anti-activator. By co-producing the two proteins, we succeeded to purify and characterize the ExsA-ExsD complex. ExsA and ExsD form a heterodimeric complex within which ExsD prevents ExsA from binding to its target sequences.

**Keywords :** *Pseudomonas aeruginosa*, Type Three Secretion System, AraC/XylS family of transcriptional regulators, ExsA, transcriptional regulation, ExsD, anti-activator.