



HAL
open science

Phosphorylation et interaction hôte/pathogène: analyse de deux facteurs bactériens sécrétés, la kinase CstK de *Coxiella burnetii* et la phosphatase PtpA de *Staphylococcus aureus*

Solène Brelle

► To cite this version:

Solène Brelle. Phosphorylation et interaction hôte/pathogène: analyse de deux facteurs bactériens sécrétés, la kinase CstK de *Coxiella burnetii* et la phosphatase PtpA de *Staphylococcus aureus*. Bactériologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT: 2015MONT094 . tel-01760874

HAL Id: tel-01760874

<https://theses.hal.science/tel-01760874>

Submitted on 6 Apr 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences
Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Et de l'unité de recherche UMR5235 CNRS
Dynamique des Interactions Membranaires Normales et
Pathologiques (DIMNP)

Spécialité : **Biochimie et Biologie moléculaire**

Présentée par **Solène BRELLE**

**Phosphorylation et interaction hôte/pathogène :
analyse de deux facteurs bactériens sécrétés,
la kinase CstK de *Coxiella burnetii* et
la phosphatase PtpA de *Staphylococcus aureus***

Soutenue le 10 décembre 2015 devant le jury composé de

M. Christophe GRANGEASSE, DR, CNRS Lyon
Mme Anne GALINIER, DR, CNRS Marseille
M. Jacques COVES, DR, CNRS Grenoble
M. Matteo BONAZZI, CR, CNRS Montpellier
Mme Virginie MOLLE, DR, CNRS Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse



Résumé en français

Afin de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte et créer les niches nécessaires à leur survie, les bactéries pathogènes ont développé de nombreux mécanismes ciblant les voies de signalisation de la cellule hôte. L'un de ces mécanismes repose sur la sécrétion de protéines bactériennes dans les cellules cibles afin de moduler directement leurs réseaux de signalisation. Cependant, les signaux, les senseurs et les effecteurs impliqués dans ces régulations sont encore peu ou mal connus. La détection de l'environnement dans la cellule hôte lors de l'infection est l'élément clé d'une réponse adaptée, et les systèmes de signalisation basés sur les mécanismes de phosphorylation sont par conséquent indispensables à l'adaptation hôte-pathogène. Lors de ma thèse, j'ai tout d'abord étudié le rôle d'une nouvelle protéine kinase bactérienne identifiée chez *Coxiella burnetii*, nommée CstK (*Coxiella* serine threonine Kinase). *C. burnetii*, l'agent étiologique de la zoonose appelée fièvre Q, modifie les défenses de la cellule hôte, permettant sa réplication dans des vacuoles spécifiques au sein de la cellule infectée. Par ailleurs, la sécrétion d'un grand nombre d'effecteurs bactériens est indispensable au détournement du phagosome par *Coxiella*. Nous avons démontré que cette protéine kinase est capable de s'autophosphoryler et par conséquent possède une activité kinase. De plus, nous avons identifié différentes protéines spécifiques de la cellule hôte interagissant avec CstK à l'aide du modèle amibe *Dictyostelium discoideum*, un phagocyte professionnel eucaryote, permettant des études génétiques et biochimiques. Dans la deuxième partie de mon projet, j'ai étudié la régulation de la tyrosine phosphatase PtpA de *Staphylococcus aureus*, et démontré sa sécrétion. Bien connu dans les hôpitaux, ce pathogène humain est responsable de nombreuses maladies nosocomiales et l'apparition exponentielle de souches multi-résistantes en font un problème majeur. *S. aureus* est capable d'envahir et de persister dans différents types cellulaires en sécrétant des protéines effectrices qui vont moduler les réponses cellulaires. Nous avons démontré que PtpA était sécrétée durant la phase de croissance bactérienne, et pu déterminer que PtpA possédait une activité tyrosine phosphatase, régulée par la tyrosine kinase CapA1B2.

Titre en anglais

Phosphorylation and host/pathogen interactions : study of two bacterial secreted factors, the kinase CstK from *Coxiella burnetii* and the phosphatase PtpA from *Staphylococcus aureus*.

Résumé en anglais

Bacterial pathogens have developed diverse strategies towards host signalling pathways, in order to subvert the immune response and/or create permissive niches for their survival. One such strategy is based on the secretion of bacterial signalling proteins into the target host cells, thereby directly modulating the status of host signalling networks. Because the mechanisms involved are largely intractable to most *in vivo* analyses, very little is known about the signals, sensors, and effectors mediating these adaptations. Sensing the host environment is a key component to execute appropriate developmental programs, and the eukaryotic-like phosphosignaling systems in prokaryotes are emerging as equally important regulatory systems as the well-known eukaryotic systems, but the study of their functions is still in its infancy. The innovative aspect of this project resides in the study of the emerging role of secreted Ser/Thr kinases and phosphatases in the control of host-pathogen interactions thus modifying the global host response during infection. During my thesis, I first investigated the role of a novel bacterial protein kinase identified in *Coxiella burnetii* that we named CstK (*Coxiella* serine threonine Kinase). *C. burnetii*, the etiological agent of the emerging zoonosis Q fever, subverts host cell defenses, permitting its intracellular replication in specialized vacuoles within host cells. Secretion of a large number of bacterial effectors into host cell is absolutely required for rerouting the *Coxiella* phagosome. We demonstrated that this putative protein kinase identified by *in silico* analysis of the *C. burnetii* genome is able to autophosphorylate and undergoes *in vitro* phosphorylation. Moreover, we identified specific host cell proteins interacting with CstK, by the use of the model amoeba *Dictyostelium discoideum*, an eukaryotic professional phagocyte amenable to genetic and biochemical studies. In the second part of my project, I was interested in the role of a putative secreted protein tyrosine phosphatase (PtpA) from *Staphylococcus aureus*. Well-known in hospital-acquired diseases, *S. aureus* produces multiple virulence factors that lead to various severe diseases, and the increase of multi-resistant strains is a major concern. This pathogen has the ability to invade and persist in a number of different human host cell types, secreting effector proteins to modulate cellular responses. Here we demonstrated that PtpA is secreted during the bacterial growth. We also determined that PtpA presents a tyrosine phosphatase activity that is regulated by the tyrosine protein kinase CapA1B2 of *S. aureus*.

Mots-clés

Phosphorylation – Interactions hôte/pathogène – *Coxiella burnetii* – *Staphylococcus aureus* – Serine/Threonine Kinase – Tyrosine Phosphatase

A Corine et Jacky

« Ne vous tenez pas devant ma tombe en pleurant.
Je n'y suis pas, je ne dors pas.
Je souffle dans le ciel tel un millier de vents,
[...]
Ne vous tenez pas devant ma tombe en pleurant,
Je n'y suis pas. Je vis encore. »

Traduit d'un poème de Mary Elizabeth Frye (1932)

Merci aussi à tous les membres du DIMNP, pour votre accueil et tous ces bons moments, en particulier Amandine, nos pauses thé vont tellement me manquer ! Et la fin de ta thèse va aller comme sur des roulettes !, mais aussi Cathy pour tous tes conseils, et Alicia, son altesse Ouin-Ouin, j'ai essayé de prendre le relais de la ouin-ouinerie, mais j'ai pas duré longtemps !, Luc pour tes bonbons donnés en douce et tous ces moments de rire dans la cafet' !

Je tiens aussi bien évidemment à remercier toute ma famille, Papa, Maman, Eric, Rosalie, Pépère, Mémère et Valérie, qui même si ils ne comprenaient pas toujours ce que je racontais de mes journées, étaient contents pour moi, et m'ont permis de tenir dans les moments les plus difficiles ! Merci d'avoir été présents le jour de la soutenance !

Je ne peux pas ne pas remercier mes amies, Laura, depuis le temps qu'on se connaît (ça nous rajeunit pas...), tu m'as permis de m'échapper de Montpellier en m'accueillant chez toi à Pariiiiiiiiiis ("mi casa es su casa", j'oublie pas !) et d'aller voir Mickeeeeeey pour que je retombe à 5 ans d'âge mental (même si ça m'arrive souvent en dehors de Disney...malheureusement pour certain(e)s), et d'avoir fait le voyage jusqu'à Montpellier pour ma soutenance !. Et Morgane, ma monôme d'amuuuuuuur, pour tous ces moments de papotage et de cosplays qui me permettaient de me vider l'esprit, et toutes ces conventions, mes retards de couture etc etc... Seth est pour cette année (en tout cas je vais essayer !!).

Merci à l'Ecole des Arts Martiaux Chinois de Montpellier, pour avoir animé mes soirées à coup de sport, d'amitié et de rires (et de courbatures bien sûr !), en particulier Benjamin, Fengqin, Thao, et tous les autres !

Et bien sûr, comment ne pas remercier Julien, tu as toujours été là pour me soutenir, venir me chercher à pas d'heure quand j'avais pas envie de prendre le tram pour rentrer, m'écouter râler pendant des heures à propos des manips qui marchent pas, et tout le reste... Alors merci !

Et enfin, je veux dédier cette thèse à Corine et Jacky, on ne pourra malheureusement pas fêter ce diplôme ensemble, mais vous serez à jamais dans mon cœur.

Table des matières

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	10
CHAPITRE 1 : LA PHOSPHORYLATION DES PROTEINES CHEZ LES BACTERIES.....	12
1. LES SYSTEMES A DEUX COMPOSANTS	12
2. LE SYSTEME PHOSPHOENOLPYRUVATE-CARBOHYDRATE PHOSPHOTRANSFERASE (PTS)	13
3. LES KINASES BACTERIENNES ATP-DEPENDANTES	13
3.1. <i>Les Sérine/Thréonine Protéines Kinases</i>	14
3.2. <i>Les Tyrosines Protéines Kinases</i>	16
3.3. <i>Les “Dual Specificity Protein Kinases”</i>	17
4. LES SERINE/THREONINE ET TYROSINE PROTEINES PHOSPHATASES	18
CHAPITRE 2 : LES PROTEINES KINASES ET PHOSPHATASES BACTERIENNES SECRETÉES CHEZ L’HOTE	20
1. LES SERINE/THREONINE PROTEINES KINASES SECRETÉES CHEZ L’HOTE.....	20
1.1. <i>La protéine YpkA de Yersinia spp</i>	20
1.2. <i>Les protéines SteC et T4519 de Salmonella typhimurium</i>	21
1.3. <i>Les protéines LegK1 et LegK2 de Legionella pneumophila</i>	21
1.4. <i>La protéine Stk1 de Staphylococcus aureus</i>	22
1.5. <i>La protéine PknG de Mycobacterium tuberculosis</i>	23
1.6. <i>La protéine OspG de Shigella spp</i>	23
1.7. <i>Les protéines NleH1 et NleH2 des Escherichia coli pathogènes</i>	24
2. LES TYROSINE PROTEINES PHOSPHATASES SECRETÉES	24
2.1. <i>La protéine YopH de Yersinia pseudotuberculosis</i>	24
2.2. <i>La protéine PtpA de Mycobacterium tuberculosis</i>	24
2.3. <i>La protéine SptP de Salmonella typhimurium</i>	25
2.4. <i>La protéine OspF de Shigella flexneri</i>	25
2.5. <i>La protéine LipA de Listeria monocytogenes</i>	26
CHAPITRE 3 : COXIELLA BURNETII.....	27
1. HISTOIRE DE LA DECOUVERTE DE <i>COXIELLA BURNETII</i>	27
2. CARACTERISTIQUES GENERALES DE <i>COXIELLA BURNETII</i>	29
3. LA FIEVRE Q.....	30
4. CYCLE D’INFECTION DE <i>COXIELLA BURNETII</i>	31
CHAPITRE 4 : STAPHYLOCOCCUS AUREUS	33
1. CARACTERISTIQUES GENERALES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	33
2. POUVOIR PATHOGENE ET INFECTIONS STAPHYLOCOCCIQUES	34
3. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	34
4. FACTEURS DE VIRULENCE	35
OBJECTIFS DE LA THESE	39
RESULTATS	41
1. CARACTERISATION DE LA PROTEINE KINASE CSTK DE <i>C. BURNETII</i> ET IDENTIFICATION DE SUBSTRATS POTENTIELS CHEZ L’HOTE.	42
A. <i>Résumé de l’article</i>	42
B. <i>Article I</i> :	44
2. REGULATION PAR PHOSPHORYLATION DE LA TYROSINE PHOSPHATASE PTPA SECRETÉE PAR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	68
A. <i>Résumé de l’article</i>	68

<i>B. Article II :</i>	69
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	77
ANNEXES	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91

Table des figures et tableaux

Figure 1 : Transduction du signal via la phosphorylation des protéines.....	9
Figure 2 : Principaux systèmes de phosphorylation chez les procaryotes.....	11
Figure 3 : Les douze sous-domaines conservés dans le domaine catalytique des Sérine/Thréonine Protéines-Kinases.....	12
Figure 4 : Organisation des BY-kinases chez les firmicutes et les protéobactéries.....	14
Figure 5 : Transmission de <i>Coxiella burnetii</i> chez l'Homme.....	28
Figure 6 : Cycle intracellulaire de <i>Coxiella burnetii</i>	29
Figure 7 : Différents sites d'infection et différentes pathologies associées à une infection par <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Figure 8 : Représentation schématique de <i>Staphylococcus aureus</i> et de ses principaux facteurs de virulence.....	34
Tableau 1 : Sérine/Thréonine Protéines Kinases (STPK) bactériennes identifiées comme étant sécrétées dans la cellule hôte lors de l'infection.....	18
Tableau 2 : Tyrosine phosphatases bactériennes identifiées comme étant sécrétées dans la cellule hôte lors de l'infection.....	22

Liste des abréviations

ARN	: Acide RiboNucléique
ATP	: Adénosine TriPhosphate
BY-kinase	: Bacterial tYrosine-kinase
DSPK	: Dual Specificity Protein Kinase
DYRK	: Dual specificity tYrosine phosphorylation-Regulated Kinase
GDI	: Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
HPr	: Histidin-containing Phosphocarrier protein
LCV	: Large Cell Variant
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
Mn ²⁺	: ion manganèse
MRSA	: Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>
PASTA	: Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated
PBP	: Penicillin-Binding Protein
PEP	: PhosphoEnolPyruvate
PHP	: PhosphoHistidinol Phosphatase
PPM	: Phosphoprotéine Phosphatase Métal-dépendante
PPP	: PhosphoProtéine Phosphatase
PTP	: PhosphoTyrosine protéine Phosphatase
PTP-LMw	: PhosphoTyrosine protéine Phosphatase de bas poids moléculaire
PTS	: Phosphoenolpyruvate-carbohydate phosphoTransferase System
SCV	: Small Cell Variant
STPK	: Sérine/Thréonine Protéine-Kinase
VRSA	: Vacomycin-Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>

Introduction

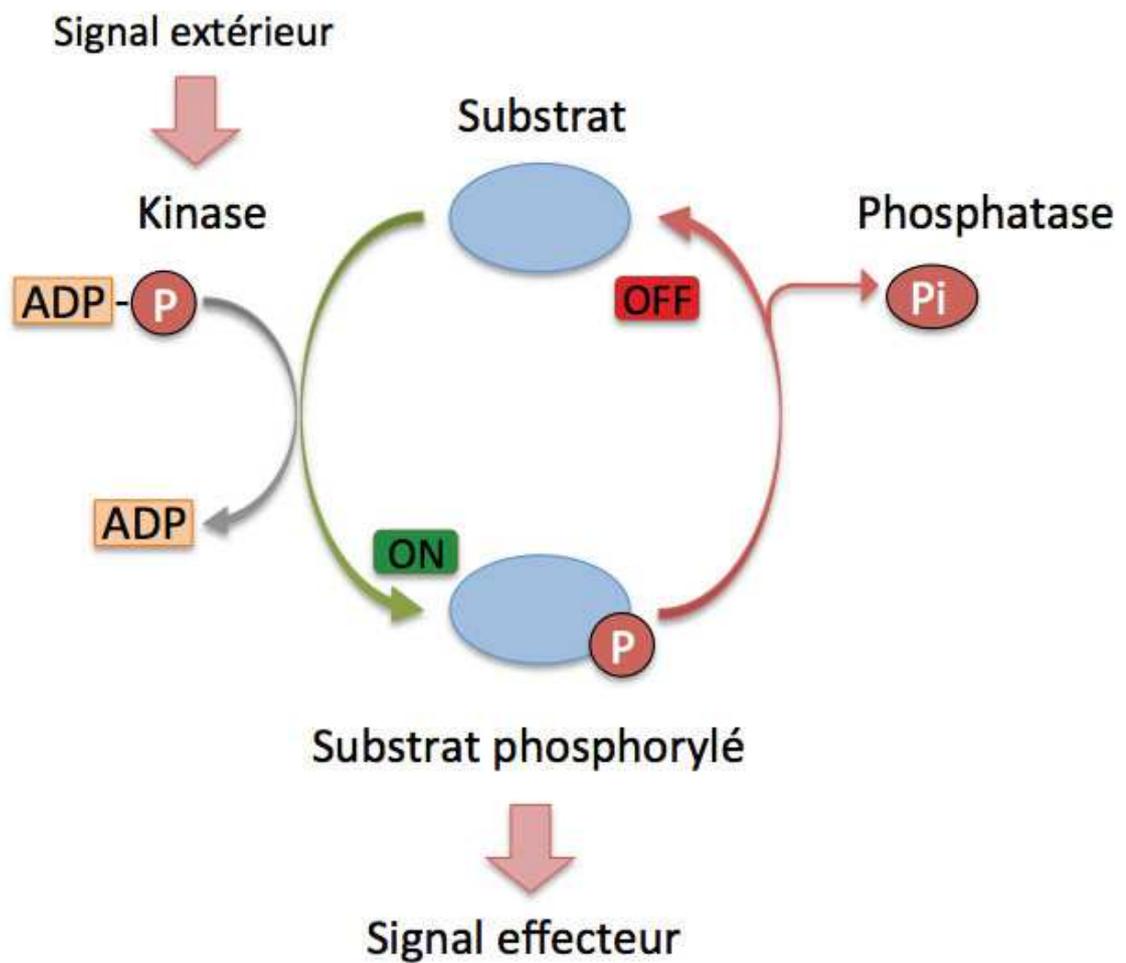


Figure 1 : Transduction du signal via la phosphorylation des protéines. L'activation d'une kinase par un signal extracellulaire entraîne la phosphorylation d'un substrat cible, qui une fois modifié devient effecteur de la réponse cellulaire. Les phosphatases permettent d'inverser ce signal effecteur.

Afin de survivre dans un environnement en constante évolution, les organismes vivants doivent perpétuellement s'adapter. Chez les eucaryotes comme chez les procaryotes, il existe de très nombreux systèmes d'adaptation, aussi bien au niveau cellulaire que moléculaire. Ces systèmes permettent aux organismes de répondre aux stimuli extérieurs, de mettre en place les mécanismes assurant aussi bien leur croissance, que leurs systèmes de défense ou d'invasion, leur déplacement, leur comportement, la régulation des protéines sécrétées ou de celles exposées en surface, etc. Ainsi, étant donné leur importance pour la cellule hôte, il n'est pas surprenant que les pathogènes exploitent ces systèmes de régulation.

Parmi les différents systèmes d'adaptation bactériens, mes travaux se sont concentrés spécifiquement sur une modification post-traductionnelle des protéines : la phosphorylation. La phosphorylation des protéines est une modification post-traductionnelle réalisée par des enzymes spécifiques, les kinases. Elle consiste en la formation d'une liaison covalente entre un groupement phosphoryl PO_3^{2-} et la chaîne latérale d'un acide aminé d'une protéine. Seuls certains acides aminés peuvent être phosphorylés : les sérines, thréonines et tyrosines sur leurs fonctions alcool ; les histidines, arginines et lysines sur leurs fonctions amine ; les aspartates et glutamates sur leurs fonctions acides carboxyliques ; les cystéines (bien que plus rares) sur leurs fonctions thiol (Cozzone, 1998). Cette réaction est réversible, le groupement phosphate peut en effet être hydrolysé par une réaction de déphosphorylation catalysée par les phosphatases.

La phosphorylation est considérée comme une réponse rapide à un signal. Elle entraîne des modifications structurales et fonctionnelles fondamentales du substrat (**Figure 1**). En effet, la phosphorylation d'une protéine peut engendrer une activation ou une inhibition de son activité enzymatique, un changement de localisation cellulaire, ou une modification de son interaction avec ses partenaires. Ainsi, la régulation des protéines par phosphorylation intervient dans de nombreux processus cellulaires.

Chapitre 1 : La phosphorylation des protéines chez les bactéries

Chez les eucaryotes, la phosphorylation a été mise en évidence pour la première fois par Krebs et Fischer. En effet, ils ont démontré la modulation de l'activité de la glycogène phosphorylase du muscle squelettique du lapin selon son état de phosphorylation (Krebs & Fischer, 1956) ; (Sutherland & Wosilait, 1955). Depuis, de nombreux exemples de régulation de protéines par phosphorylation ont été décrits chez différents organismes eucaryotes, et les rôles de cette modification post-traductionnelle ont été clairement établis. Chez les eucaryotes, seuls les acides aminés sérine, thréonine et tyrosine des protéines peuvent être phosphorylés. Les kinases qui catalysent cette modification utilisent l'ATP comme donneur de phosphate, et sont regroupées dans une seule famille de sérine/thréonine/tyrosine protéines-kinases par des homologies de séquences et des caractéristiques structurales communes (Hanks *et al.*, 1988, Hanks & Hunter, 1995).

Chez les procaryotes, l'existence des réactions de phosphorylation/déphosphorylation des protéines a longtemps fait l'objet de controverses (Cozzone, 1988). La phosphorylation des protéines était considérée comme exclusivement réservée aux organismes dits « supérieurs », afin de répondre aux besoins particuliers des organismes multicellulaires (Kennelly, 2002, Kennelly & Potts, 1996). C'est uniquement à partir des années 1970 que la notion de phosphorylation des protéines chez les bactéries a été clairement établie, confirmant ainsi son rôle universel (Garnak & Reeves, 1979, Wang & Koshland, 1978, Manai & Cozzone, 1979). Deux systèmes propres aux procaryotes ont alors été caractérisés : le système à deux composants et le système phosphoénolpyruvate-carbohydrate phosphotransférase (PTS). Ces deux systèmes sont reconnus comme les principaux systèmes d'adaptation des bactéries à leur environnement.

1. Les systèmes à deux composants

Tout d'abord, les systèmes à deux composants ont un rôle essentiel dans l'adaptation des bactéries aux variations physico-chimiques de leur environnement, et permettent la perception des signaux environnementaux et le développement d'une réponse appropriée. Ces systèmes sont le plus souvent composés d'un couple de protéines : un senseur histidine kinase, généralement membranaire, percevant les signaux environnementaux, et un régulateur de réponse cytoplasmique associé, permettant le développement d'une réponse adaptative. La transduction du signal est réalisée *via* un mécanisme de transfert de phosphate entre un résidu

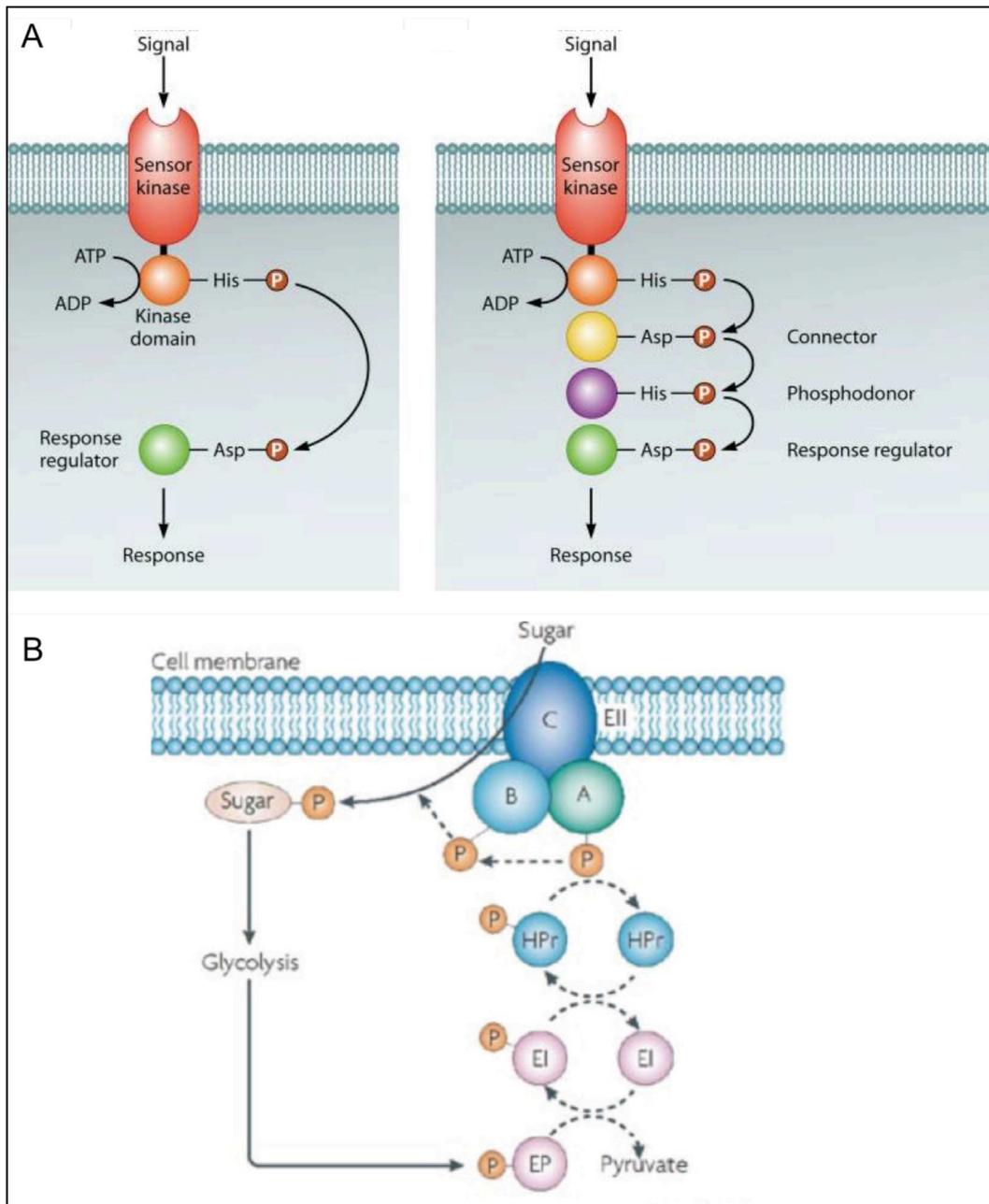


Figure 2 : Principaux systèmes de phosphorylation chez les procaryotes. (A) A gauche, le système à deux composants classique, à droite, le phosphorelais, plus complexe. (B) Le système PTS.

D'après Bretl, Demetriadou, and Zahrt, 2011 (A) et Görke, 2008 (B)

histidyle du senseur et un résidu aspartyle du régulateur de réponse à partir d'une molécule d'ATP (**Figure 2**) (Parkinson & Kofoed, 1992). La réaction de phosphorylation active ainsi le régulateur de réponse. Cette activation génère la mise en place de la réponse adaptative, généralement via la régulation de l'expression de gènes cibles (Stock *et al.*, 2000, Hoch, 2000). Des variantes plus complexes du système à deux composants, appelées phosphorelais, sont utilisées chez différentes espèces bactériennes. Elles utilisent généralement trois étapes de transfert de phosphate du senseur kinase au régulateur de réponse final (**Figure 2**) (Jung *et al.*, 2012). Par conséquent, ces systèmes complexes et les systèmes à deux composants classiques sont impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires comme la virulence, la sporulation, le chimiotactisme, la différenciation, etc.

2. Le système phosphoénolpyruvate-carbohydrate phosphotransférase (PTS)

D'autre part, le PTS est le système majeur de transport des sucres permettant une adaptation fine des bactéries à leurs besoins énergétiques. Le PTS est un système enzymatique complexe qui permet le transport et la phosphorylation concomitante de substrats carbonés, en utilisant comme donneur de phosphate et source d'énergie pour le transport le phosphoénolpyruvate (PEP) (Kalbitzer *et al.*, 1982, Gassner *et al.*, 1977). Le système PTS présente deux composants cytoplasmiques communs à tous les sucres, l'enzyme EI et la protéine HPr (Histidin-containing Phosphocarrier protein), ainsi qu'un complexe transmembranaire composé de différentes enzymes EII (EIIA, EIIB, EIIC), spécifiques d'un sucre donné et responsables de sa translocation à travers la membrane (Roseman & Meadow, 1990). Le transfert séquentiel du phosphate de l'EI à l'HPr, puis aux différentes EII, induit pour finir la phosphorylation du sucre et sa translocation à l'intérieur de la cellule (**Figure 2**). Ces réactions de phosphorylation sur les résidus histidyles ou cystéinyles des différentes protéines intermédiaires du PTS sont thermodynamiquement réversibles. En revanche, la phosphorylation d'un sucre donné est irréversible. Ces sucres serviront ensuite de substrats à la glycolyse (Meadow *et al.*, 1990).

3. Les kinases bactériennes ATP-dépendantes

Il existe également chez les procaryotes des kinases ATP-dépendantes capables de phosphoryler des protéines sur les résidus séryles, thréonyles et tyrosyles. Elles sont classées en fonction de leur spécificité pour un acide aminé.

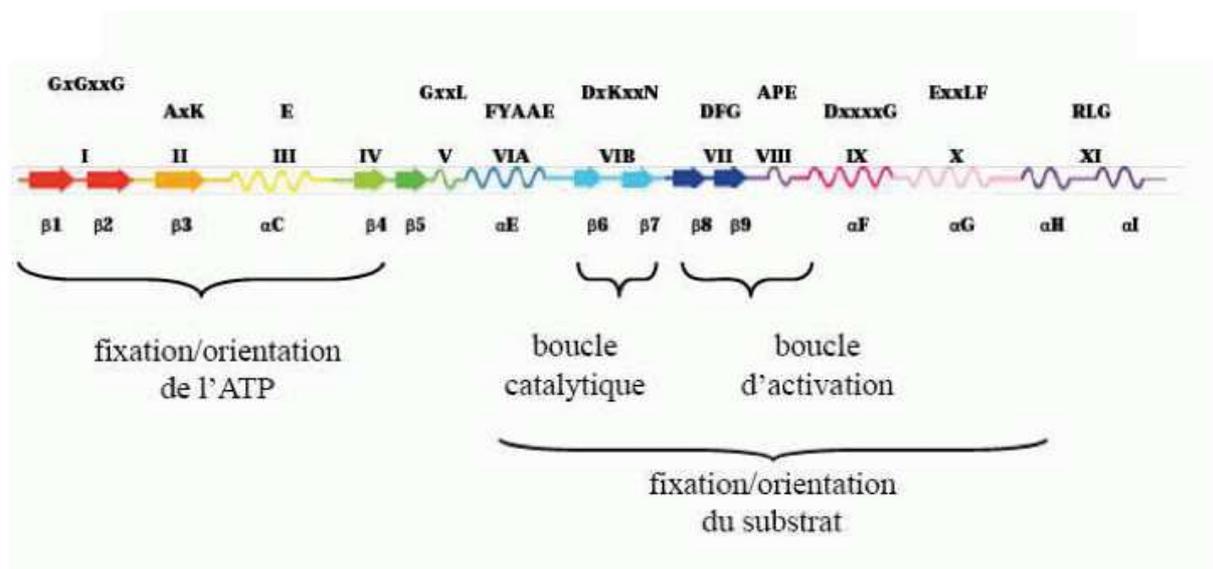


Figure 3 : Les douze sous-domaines conservés dans le domaine catalytique des Sérine/Thréonine Protéines-Kinases. Les sous-domaines I à IV permettent la fixation et l'orientation de l'ATP. Le sous-domaine VIB forme la boucle catalytique. Les domaines VII et VIII forment la boucle d'activation. Les domaines VIA à X permettent la fixation et l'orientation du substrat.

3.1. Les Sérine/Thréonine Protéines Kinases

Les premières Sérine/Thréonine Protéine-Kinases (STPK) ont été décrites chez les eucaryotes et jusqu'à récemment, il était assumé que la phosphorylation chez les organismes procaryotes et eucaryotes dépendait de mécanismes distincts. Cependant la généralisation du séquençage des génomes bactériens a permis de mettre en évidence des homologues de ces kinases eucaryotes chez les bactéries, notamment chez *Streptococcus pneumoniae* (Beilharz *et al.*, 2012, Echenique *et al.*, 2004, Fleurie *et al.*, 2012, Fleurie *et al.*, 2014), *Mycobacterium tuberculosis* (Av-Gay & Everett, 2000, Chaba *et al.*, 2002, Wehenkel *et al.*, 2008, Molle & Kremer, 2010, Alber, 2009, Greenstein *et al.*, 2005), *Yersinia spp.* (Galyov *et al.*, 1993, Hakansson *et al.*, 1996), *Listeria monocytogenes* (Lima *et al.*, 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (Wang *et al.*, 1998), *Enterococcus faecalis* (Kristich *et al.*, 2007), *Salmonella typhimurium* (Odendall *et al.*, 2012), *Bacillus subtilis* (Madec *et al.*, 2002) et *Staphylococcus aureus* (Debarbouille *et al.*, 2009). La répartition du nombre de ces kinases est très variable selon les espèces étudiées. En effet, à ce jour, onze STPKs ont été décrites chez *Mycobacterium tuberculosis* (Av-Gay & Everett, 2000) et une trentaine chez *Streptomyces coelicolor* par exemple (Petrickova & Petricek, 2003), alors qu'aucune de ce type n'a été identifiée chez *Escherichia coli*. La première STPK de type eucaryote décrite chez les bactéries fut Pkn1 de *Myxococcus xanthus* (Munoz-Dorado *et al.*, 1991).

D'un point de vue structural, les STPKs de type eucaryote appartiennent à la famille des kinases de type Hanks, définie par homologie de séquences (Hanks *et al.*, 1988, Hanks & Hunter, 1995). Elles sont composées d'un domaine catalytique et d'un domaine régulateur. Le domaine catalytique est constitué de douze sous-domaines conservés, numérotés de I à XI, le sous-domaine VI étant divisé en deux régions VIA et VIB (**Figure 3**), avec cependant des régions moins conservées, des lacunes ou des insertions. De plus, ces régions non conservées constituent le plus souvent des boucles dont le repliement permet l'agencement tridimensionnel des régions conservées.

Les domaines catalytiques peuvent être retrouvés sous deux états conformationnels, appelés conformation ouverte ou fermée. De manière générale, la conformation fermée correspond à l'état actif de ces enzymes. Le domaine catalytique cristallisé de la kinase eucaryote PKA est utilisé, sous sa conformation fermée, comme STPK de référence (Walsh *et al.*, 1968, Knighton *et al.*, 1991c, Knighton *et al.*, 1991b, Knighton *et al.*, 1991a, Zheng *et al.*, 1991, Walsh *et al.*, 1992).

Les STPKs sont de véritables “interrupteurs“ moléculaires existant sous une forme active et/ou inactive (Huse & Kuriyan, 2002). De nombreuses STPKs sont activées par l'autophosphorylation de résidus localisés au sein de la boucle d'activation, située au centre du domaine catalytique. Cependant la transition vers l'état actif est généralement très finement contrôlée par différents mécanismes, incluant la localisation subcellulaire et la fixation allostérique d'effecteurs.

Différentes sous-unités régulatrices peuvent être associées aux domaines catalytiques, et déterminent très probablement le rôle fonctionnel des STPKs de type Hanks. Par exemple, Krupa et Srinivasan ont décrit en 2005, sur la base d'une analyse comparative de séquences, divers domaines extracellulaires rencontrés chez les STPKs bactériennes pouvant être classés en fonction de leur similitude avec d'autres familles de protéines (Krupa & Srinivasan, 2005). On retrouve notamment le domaine PASTA (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated), conservé chez les bactéries à Gram positif (Yeats *et al.*, 2002). Ce domaine C-terminal a été identifié pour la première fois dans la protéine PBP2X de *Streptococcus pneumoniae*, où il est répété deux fois, et sa structure a été déterminée par cristallographie (Pares *et al.*, 1996). Ce domaine est impliqué dans la reconnaissance des dipeptides D-alanyl-D-alanine, utilisés dans la construction des strates de peptidoglycane de la paroi (Yeats *et al.*, 2002). Des domaines PASTA sont également retrouvés au sein du domaine extracellulaire de PrkC de *Bacillus subtilis*, et de Stk1 de *Staphylococcus aureus* (Madec *et al.*, 2002). Shah *et al.* ont également mis en évidence que les domaines PASTA de PrkC étaient capables de détecter et de fixer des fragments de peptidoglycane présents dans le milieu extracellulaire (Shah *et al.*, 2008). Cette fixation contrôlerait la germination des spores de *B. subtilis*. De plus, d'autres travaux ont récemment proposé un modèle d'activation de la kinase PknB de *Mycobacterium tuberculosis*, où la fixation de fragments de peptidoglycane par les domaines PASTA de cette STPK entraînerait une dimérisation, suivie d'une activation de la kinase (Barthe *et al.*, 2010). En effet, différentes observations ont mis en évidence le rôle de la dimérisation dans l'activation de différentes STPK de type eucaryote. Cependant, le mécanisme par lequel cette dimérisation entraînerait l'autophosphorylation de ces kinases reste encore inconnu (Pereira *et al.*, 2011).

La grande variabilité des domaines extracellulaires des STPKs de type eucaryote explique, en partie, la grande diversité des processus biologiques qu'elles régulent. De ce fait, elles peuvent être impliquées dans la différenciation morphologique, le métabolisme secondaire (Matsumoto *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 2002, Nariya & Inouye, 2005), la réponse au stress oxydant (Neu *et al.*, 2002), la biosynthèse des acides mycoliques et du peptidoglycane

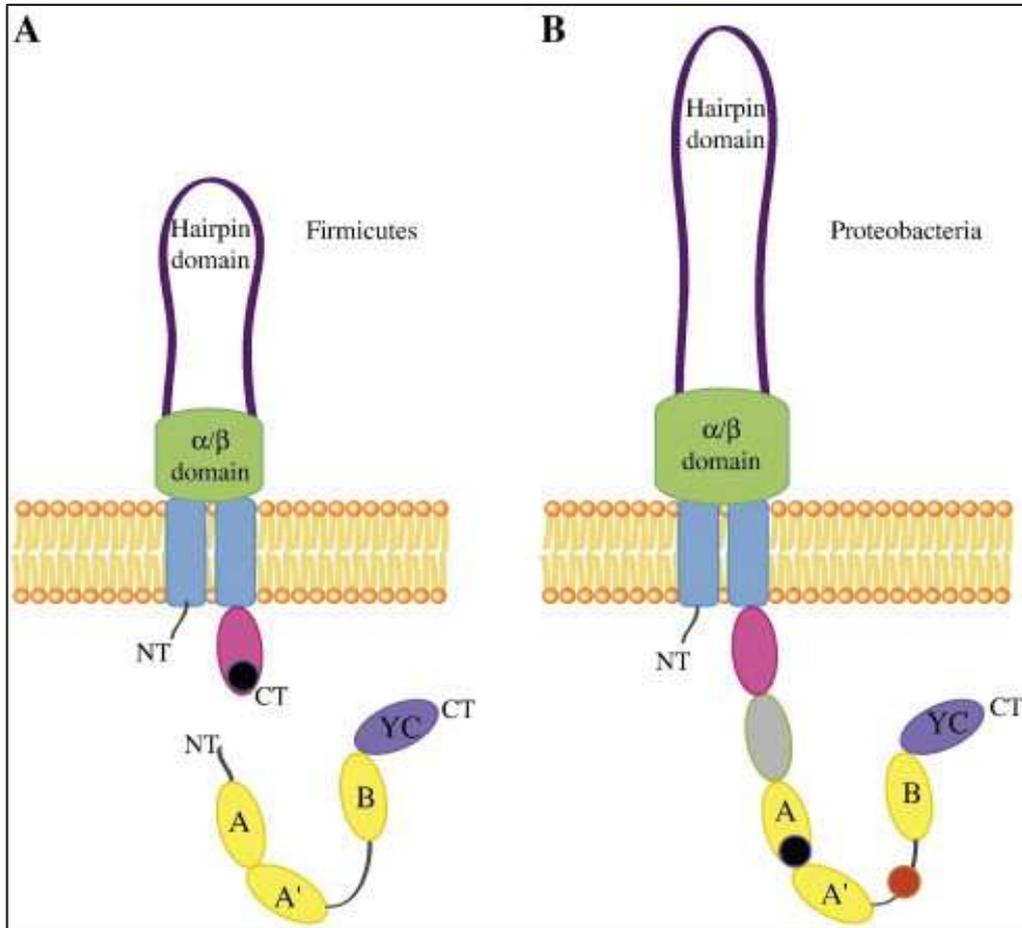


Figure 4 : Organisation des BY-kinases chez (A) les firmicutes et (B) les protéobactéries. Les motifs de Walker A, A' et B sont en jaune, le domaine juxtamembranaire en rose et le motif YC en violet. Le domaine α/β et la boucle extracellulaire "hairpin domain" sont en vert et violet, respectivement. Chez les BY-kinases des protéobactéries, la tyrosine indispensable à la phosphorylation est indiquée par un cercle rouge, le domaine RK est en gris. Les hélices transmembranaires sont en bleu. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées par NT et CT respectivement.

D'après Grangeasse, Terreux, and Nessler, 2010

chez *M. tuberculosis* (Molle & Kremer, 2010, Thakur & Chakraborti, 2008), la consommation du glycogène et du métabolisme du glucose chez *M. xanthus* (Nariya & Inouye, 2005, Lux & Shi, 2005, Inouye *et al.*, 2000), la croissance cellulaire, etc.

Récemment, la mise en évidence du rôle des STPKs dans la virulence de nombreux pathogènes bactériens a suscité un fort intérêt, en partie par le fait que ces protéines kinases peuvent être d'intéressantes nouvelles cibles thérapeutiques dans la lutte contre ces pathogènes.

3.2. Les Tyrosines Protéines Kinases

Il existe également chez les procaryotes des protéines kinases capables de phosphoryler les protéines sur les résidus tyrosyles, appelées tyrosines protéines kinases.

Il existe deux grands types de tyrosine kinases bactériennes : celles qui sont homologues aux tyrosines kinases eucaryotes et qui contiennent des domaines de Hanks (Hanks & Quinn, 1991), comme WaaP de *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao & Lam, 2002) et MasK de *Myxococcus xanthus* (Thomasson *et al.*, 2002), et celles qui ne présentent pas d'homologie avec ces domaines. On regroupe ces dernières, qui représentent la grande majorité des tyrosines kinases procaryotes, dans la famille des BY-kinases (Bacterial tYrosine-kinases) sur la base d'homologie de séquence protéique. En effet, toutes les BY-kinases possèdent un domaine extracellulaire et un domaine catalytique cytoplasmique. Cependant, l'organisation structurale de ces domaines diffère entre les familles de bactéries. Chez les protéobactéries, ces deux domaines sont liés et forment une chaîne polypeptidique. De plus, la présence d'une tyrosine spécifique localisée en C-terminal est indispensable à la phosphorylation. Chez les firmicutes, ces deux domaines sont séparés en deux protéines distinctes, un domaine catalytique cytoplasmique et un domaine transmembranaire, aussi appelé modulateur transmembranaire. L'interaction de ces deux chaînes polypeptidique, qui mime alors la conformation trouvée chez les protéobactéries, est nécessaire à l'activité tyrosine-kinase de la protéine. (Grangeasse *et al.*, 2010). Il existe également des différences dans l'activation et/ou le mécanisme d'autophosphorylation des BY-kinases des protéobactéries et des firmicutes, mais ces protéines sont toutes caractérisées par un mécanisme original de phosphorylation impliquant trois motifs de Walker (A, A' et B) situés dans leur domaine catalytique et un cluster de tyrosine C-terminal sur lequel la kinase va s'autophosphoryler (**Figure 4**).

Au niveau fonctionnel, les BY-kinases sont impliquées dans divers processus cellulaires, notamment la réponse au stress, la réplication et le métabolisme de l'ADN, la formation des biofilms, la résistance aux antibiotiques, le contrôle du cycle cellulaire bactérien ou la virulence. Elles ont toutefois principalement été étudiées pour leur rôle dans la biosynthèse et l'export de polysaccharides extracellulaires (Obadia *et al.*, 2007, Grangeasse *et al.*, 2012).

L'analyse du génome de *Staphylococcus aureus* met en évidence deux couples de protéines possédant une activité tyrosine kinase : CapA1/B1, codées par des gènes appartenant à l'opéron *cap* (qui contrôle la biosynthèse de la capsule), et CapA2/B2, codées par des gènes se trouvant ailleurs dans le génome. CapA1 et CapA2 sont les modulateurs transmembranaires, tandis que CapB1 et CapB2 correspondent aux domaines catalytiques cytoplasmiques (Soulat *et al.*, 2006). Ces derniers présentent près de 70% d'homologie, mais seule CapB2 est capable de s'autophosphoryler *in vitro*. De plus, dans leur étude, Soulat *et al* ont montré que CapA1 était capable d'activer CapB2 de façon plus efficace que CapA2. Dans mes travaux de thèse, j'ai pu travailler sur l'interaction de CapA1/B2 avec un substrat potentiel, la tyrosine protéine-phosphatase PtpA.

Cependant, la phosphorylation des résidus tyrosyles chez les bactéries n'est pas restreinte exclusivement aux BY-kinases ou aux kinases de type eucaryote, quelques tyrosine-kinases atypiques existent en effet chez certaines espèces.

3.3. Les “Dual Specificity Protein Kinases“

Il existe également des protéines kinases atypiques, capables de phosphoryler les acides aminés sérine, thréonine et tyrosine. Ces enzymes sont appelées “dual specificity protein kinases“.

Elles sont regroupées en deux catégories :

- les “Dual Specificity Protein Kinases“ (DSPK) s'autophosphorylent sur les résidus séryles, thréonyles et tyrosyles et sont également capables de transphosphoryler leurs substrats sur ces trois résidus. Les DSPK sont bien connues chez les eucaryotes, et à ce jour seulement trois ont été identifiées chez les procaryotes : PknD chez *Chlamydomophila pneumoniae* (Johnson & Mahony, 2007), PutA chez *Salmonella typhimurium* (Ostrovsky & Maloy, 1995), et PrkG chez *Bacillus anthracis* (Arora *et al.*, 2012).

- les “**Dual specificity tYrosine phosphorylation-Regulated Kinase**“ (**DYRK**) qui s'autophosphorylent uniquement sur les résidus tyrosyles, mais peuvent transphosphoryler sur les sérines, les thréonines et les tyrosines. La seule DYRK procaryote identifiée à ce jour est PrkD de *B. anthracis* (Arora *et al.*, 2012). De plus, chez ces deux catégories d'enzymes, l'activité kinase semble être principalement régulée par phosphorylation sur les tyrosines.

4. Les Sérine/Thréonine et Tyrosine protéines phosphatases

Les kinases fonctionnent en couple avec des protéines capables de déphosphoryler des acides aminés phosphosérine, phosphothréonine et phosphotyrosines. Elles sont appelées Sérine/Thréonine ou Tyrosine protéines phosphatases. Leur activité de déphosphorylation entraîne une propagation ou une inhibition du signal engendré par la phosphorylation.

On les retrouve généralement classées en cinq catégories :

- les **PhosphoProtéine Phosphatases** (PPP)
- les **Phosphoprotéines Phosphatases Métal-dépendantes** (PPM), notamment Stp chez *Listeria monocytogenes*, une Sérine/Thréonine protéine phosphatase dépendante du Mn^{2+} , nécessaire à la croissance de la bactérie lors d'une infection dans le modèle souris (Archambaud *et al.*, 2005).
- les **PhosphoTyrosine protéine Phosphatases** (PTP) de type eucaryote, qui englobent les protéine-phosphatases conventionnelles homologues à celles des eucaryotes, et les phosphatases à double spécificité capables de déphosphoryler à la fois les sérines, les thréonines et les tyrosines.
- les **PTP de bas poids moléculaire** (PTP-LMw), de petites enzymes aussi trouvées chez les eucaryotes. Les Tyrosine protéines phosphatases PtpA et PtpB de *M. tuberculosis* et *S. aureus* font partie de cette catégorie. Je parlerais plus en détail de ces protéines ci-après, notamment de PtpA chez *S. aureus* dans la partie “**Résultats**“.
- les **PhosphoHistidinol Phosphatases** (PHP), une famille de phosphoestérases trouvées classiquement chez les bactéries à Gram positif.

La déphosphorylation des résidus phosphosérine et phosphothréonine est réalisée principalement par les enzymes des familles PPP et PPM (Deutscher & Saier, 2005) alors que les phosphotyrosines sont déphosphorylées par celles des familles PTP, PTP-LMw et PHP. Les familles des PTP, des phosphatases à double spécificité et des PTP-LMw utilisent un mécanisme catalytique commun, impliquant un motif C(X)₅R conservé dans la boucle de

liaison du phosphate. Ainsi, les kinases et les phosphatases fonctionnent comme un système d'interrupteur on/off, modulant les voies de transduction d'un signal spécifique (Huse & Kuriyan, 2002).

Nom de la protéine	Organisme bactérien	Système de sécrétion	Cibles/Rôles	Références
YpkA	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> / <i>Yersinia enterocolitica</i>	T3SS	Perturbation du cytosquelette d'actine	(Hakansson <i>et al.</i> , 1996, Juris <i>et al.</i> , 2000)
SteC	<i>Salmonella typhimurium</i>	T3SS	Réorganisation du cytosquelette de F-actine, activation de la voie des MAPKs	(Odendall <i>et al.</i> , 2012, Poh <i>et al.</i> , 2008)
t4519			Activation des voies de signalisation, production de cytokines et chemokines	(Theeya <i>et al.</i> , 2015)
LegK1	<i>Legionella pneumophila</i>	T4SS Dot/Icm	Activation de l'inflammation par phosphorylation de IκBα (voie NF-κB)	(Ge <i>et al.</i> , 2009)
LegK2		T4SS Dot/Icm	Inconnu	(Hervet <i>et al.</i> , 2011)
Stk1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Inconnu	Inconnu	(Miller <i>et al.</i> , 2010)
PknG	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Inconnu	Interaction avec PKCα (STPK eucaryote)	(Chaurasiya & Srivastava, 2009)
OspG	<i>Shigella flexneri</i>	T3SS	Fixation aux enzymes E2 ubiquitinyllées, inhibition de la voie NF-κB	(Zhou <i>et al.</i> , 2013, Kim <i>et al.</i> , 2005)
NleH1 et NleH2	<i>Escherichia coli</i> pathogènes	T3SS	Interaction avec RPS3, inhibition de l'inflammation	(Gao <i>et al.</i> , 2009)

Tableau 1 : Sérine/Thréonine Protéines Kinases (STPK) bactériennes identifiées comme étant sécrétées dans la cellule hôte lors de l'infection.

Chapitre 2 : Les protéines kinases et phosphatases bactériennes sécrétées chez l'hôte

Les protéines kinases sont indispensables dans de nombreux systèmes bactériens, notamment lors de l'invasion chez l'hôte, bien que les différents mécanismes ne soient pas encore complètement élucidés. A ce jour, il est connu que certaines STPKs et certaines protéines phosphatases puissent être sécrétées par les bactéries, ce qui leur permet d'interférer directement avec les signaux de transduction de l'hôte. Parmi les bactéries qui sécrètent ces effecteurs, on retrouve des pathogènes comme *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Listeria*, *Legionella*, *Shigella* ou encore *Yersinia*.

1. Les Sérine/Thréonine Protéines Kinases sécrétées chez l'hôte

De nombreuses bactéries pathogènes sécrètent des Sérine/Thréonine protéines kinases dans le cytoplasme de la cellule hôte. A ce jour les plus étudiées sont décrites ci-dessous (**Tableau 1**).

1.1. La protéine YpkA de *Yersinia spp*

Les bactéries du genre *Yersinia* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Parmi les dix espèces qui composent ce genre, certaines sont pathogènes. Les plus connues sont *Y. pestis*, l'agent de la peste, *Y. pseudotuberculosis*, responsable de yersiniose, et *Y. enterocolitica*, responsable d'infections intestinales. Ces bacilles à Gram négatif possèdent un plasmide de virulence pIB1 qui porte le gène codant pour une STPK, YpkA (*Yersinia* protein kinase A, également appelée YopO). YpkA est une protéine à multi-domaines, avec un domaine kinase à l'extrémité N-terminale, et un domaine C-terminal GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor), suivi d'un domaine de liaison à l'actine (Galyov *et al.*, 1993, Hakansson *et al.*, 1996, Juris *et al.*, 2000, Dukuzumuremyi *et al.*, 2000, Prehna *et al.*, 2006). Ce facteur de virulence est sécrété dans la cellule hôte via un système de sécrétion de type 3 (T3SS) (Cornelis *et al.*, 1998). Une fois dans le cytoplasme de la cellule hôte, cette kinase s'associe à la surface interne de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte (Hakansson *et al.*, 1996) et va perturber le cytosquelette d'actine et contribuer à éviter la phagocytose par les macrophages (Juris *et al.*, 2000, Grosdent *et al.*, 2002). Son domaine kinase semble essentiel pour la virulence. En effet, les souches privées de ce domaine présentent une plus faible mortalité chez les souris infectées (Galyov *et al.*, 1993).

1.2. Les protéines SteC et T4519 de *Salmonella typhimurium*

Salmonella enterica sérotype Typhimurium (ou *S. typhimurium*) fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle est responsable d'infections gastro-intestinales chez l'Homme. Cette bactérie possède de nombreux facteurs de virulence, dont l'action repose sur deux systèmes de sécrétion de type 3. Les gènes codant pour ces deux T3SS se trouvent dans deux clusters géniques distincts, appelés SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity Island-1) et SPI-2. Les deux T3SS ne vont pas être activés au même moment lors de l'infection de la cellule hôte, et les protéines qu'ils vont sécréter de façon séquentielle permettront à la bactérie de s'adapter et de survivre à l'intérieur de la cellule. En effet, les facteurs sécrétés par le T3SS porté par le SPI-1 vont être les premiers à intervenir, interférant avec le cytosquelette d'actine, permettant ainsi l'invasion de la cellule et entraînant la maturation de la vacuole dans laquelle se trouve la bactérie (SCV : *Salmonella*-Containing Vacuole) (Steele-Mortimer *et al.*, 2002). La maturation de cette vacuole lui confère alors des caractéristiques d'endosome tardif, mais sans la présence d'enzymes lysosomales. Quelques heures après l'entrée de la bactérie, le T3SS porté par le SPI-2 va s'activer, entraînant la sécrétion de nouveaux facteurs qui vont permettre à la bactérie de se répliquer à l'intérieur de sa vacuole (Odendall *et al.*, 2012). C'est le cas de la STPK SteC, qui va induire une réorganisation du cytosquelette de la F-actine autour de la vacuole (Poh *et al.*, 2008) en activant entre autre la voie de signalisation des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein kinase) eucaryotes (MAPKs) (Odendall *et al.*, 2012).

Récemment, Theeya *et al.*, ont caractérisé une STPK sécrétée de type eucaryote chez *Salmonella* Typhi Ty2. En effet, le locus *t4519* code pour une protéine T4519 ayant une activité de Ser/Thr kinase *in vitro*. De plus, une mutation $\Delta t4519$ diminue la survie de la bactérie dans les macrophages. Cette nouvelle STPK est par ailleurs sécrétée dans le cytoplasme de la cellule hôte suite à la production de dérivés réactifs de l'oxygène par les macrophages. Sa translocation est suivie par l'activation des voies de signalisation de l'hôte et par la production de cytokines et de chemokines (Theeya *et al.*, 2015).

1.3. Les protéines LegK1 et LegK2 de *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila est une bactérie pathogène à Gram négatif responsable de la maladie du légionnaire. Une fois phagocytée par les macrophages du poumon, ses cellules cibles, elle va établir une niche de réplication, appelée *Legionella*-containing vacuole, en

redirigeant à son avantage la voie de dégradation phagolysosomale, lui permettant alors de s'échapper de la cellule hôte (McDade *et al.*, 1977, Kaufmann *et al.*, 1981, Horwitz, 1983). Il existe chez *Legionella* cinq STPKs réparties différemment selon les espèces. Les protéines LegK1 à LegK4 sont connues pour être sécrétées par un système de sécrétion de type 4 appelé Dot/Icm, indispensable à la croissance intracellulaire de la bactérie (Kaufmann *et al.*, 1981, Horwitz, 1983). Cependant, seule LegK1 interfère de façon spécifique avec la voie NF- κ B (elle n'intervient pas dans les voies de signalisation de l'immunité innée des MAPKs et de l'interféron par exemple (Ge *et al.*, 2009), en phosphorylant I κ B α , un régulateur central de la voie NF- κ B, entraînant alors une activation de l'inflammation. La kinase LegK2 a également été montrée comme impliquée dans la virulence de *Legionella pneumophila*, un mutant Δ legK2 présentant une cytotoxicité plus faible et une répllication intracellulaire retardée par rapport à la souche sauvage. Son activité kinase est donc nécessaire à l'infection par *L. pneumophila* (Hervet *et al.*, 2011).

1.4. La protéine Stk1 de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus étant l'un des modèles d'étude de mes travaux de thèse, une description détaillée de cette bactérie se trouve dans le **Chapitre 4** de ce manuscrit.

Bien que considérée comme un pathogène extracellulaire, *S. aureus* est capable d'infecter des cellules de mammifères n'étant pas des phagocytes professionnels comme les cellules épithéliales (Dziewanowska *et al.*, 1999) ou les kératinocytes (Kintarak *et al.*, 2004). *S. aureus* peut également survivre à la phagocytose des neutrophiles (Voyich *et al.*, 2005) et des macrophages (Kubica *et al.*, 2008). En effet, cette bactérie dispose de moyens de protection qui lui permettent de déjouer les défenses immunitaires et facilitent sa persistance dans la cellule hôte (Foster, 2005, Sinha & Fraunholz, 2010). L'étude de la Ser/Thr protéine kinase Stk1, aussi nommée PknB, a montré son rôle important lors de l'infection chez la souris (Debarbouille *et al.*, 2009, Tamber *et al.*, 2010), mais elle est aussi nécessaire à la résistance aux antibiotiques (Tamber *et al.*, 2010). Etant transmembranaire, il était admis qu'elle restait strictement associée à la membrane bactérienne, mais Miller *et al.* ont démontré que la protéine totale pouvait être détectée dans le milieu extracellulaire, malgré le fait que le mécanisme mis en jeu reste inconnu à ce jour (Miller *et al.*, 2010). Dans cette étude, les auteurs ont également pu identifier quarante-huit protéines substrats de l'hôte étant phosphorylées par Stk1, et impliquées dans différentes voies cellulaires comme la transduction du signal et la réponse au stress.

1.5. La protéine PknG de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis, l'agent responsable de la tuberculose, possède de nombreux facteurs de virulence lui permettant d'infecter les macrophages et de survivre à l'intérieur de ces derniers. L'analyse du génome de *M. tuberculosis* a révélé la présence de onze STPKs (Av-Gay & Everett, 2000), dont quatre impliquées dans la virulence de la bactérie *in vivo*. On retrouve parmi elle la STPK PknG, une protéine cytosolique, impliquée dans la persistance de la bactérie dans les macrophages, et exprimée chez les mycobactéries pathogènes comme *M. tuberculosis*, chez les mycobactéries atténuées comme *M. bovis* BCG, mais pas chez les non-pathogènes comme *M. smegmatis*. Des études de *M. bovis* et *M. smegmatis* sur des cultures de macrophages (Walburger *et al.*, 2004, Scherr *et al.*, 2009) et dans le modèle murin (Tiwari *et al.*, 2009) ont montré que PknG semblait inhiber la fusion phago-lysosomale. En effet, l'interaction, sans toutefois de phosphorylation, de PknG avec PKC α , une STPK de la cellule hôte régulant la formation du phagolysosome, semble améliorer la survie de la bactérie dans les macrophages (Chaurasiya & Srivastava, 2009). D'autres études ont également montré que PknG interagissait et perturbait les voies de défense de l'hôte (St-Denis *et al.*, 1999, Itoh *et al.*, 2002, Holm *et al.*, 2003, Ng Yan Hing *et al.*, 2004), et qu'elle était sécrétée dans la cellule hôte par le système SecA2 chez *Mycobacterium marinum* (van der Woude *et al.*, 2014).

1.6. La protéine OspG de *Shigella spp*

Les bactéries du genre *Shigella* font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des pathogènes stricts, rencontrés uniquement chez l'Homme. Elles sont responsables de shigelloses, des infections intestinales entraînant la destruction de l'épithélium du colon. Les bactéries du genre *Shigella* utilisent un système de sécrétion de type 3 afin d'envahir les cellules épithéliales, entraînant ensuite leur apoptose (Cossart & Sansonetti, 2004). Vingt protéines ont été identifiées comme étant des effecteurs de ce T3SS (Buchrieser *et al.*, 2000), parmi lesquelles la STPK OspG. Une fois sécrétée, cette protéine va permettre à la bactérie de manipuler le système de l'immunité innée de l'hôte en inhibant la voie NF- κ B. En effet, OspG bloque cette voie en se fixant à des enzymes E2 ubiquitinyllées sans les phosphoryler, entraînant une diminution de la dégradation de I κ B α (Kim *et al.*, 2005, Zhou *et al.*, 2013).

Nom de la protéine	Organisme bactérien	Système de sécrétion	Cibles/Rôles	Références
YopH	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	T3SS	P130Cas, Paxilline, Kinase d'adhésion focale Réarrangement du cytosquelette, inhibition de la phagocytose	(Black <i>et al.</i> , 1998, Persson <i>et al.</i> , 1999, Persson <i>et al.</i> , 1997, Andersson <i>et al.</i> , 1999)
PtpA/PtpB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Inconnu	VPS33B, sous-unité H de la V-ATPase Inhibition de l'acidification et de la maturation du phagosome	(Bach <i>et al.</i> , 2008, Wong <i>et al.</i> , 2011)
SptP	<i>Salmonella typhimurium</i>	T3SS	AAA+ ATPase valosin-containing protein Réorganisation de l'actine Dérégulation des MAPKs	(Lin <i>et al.</i> , 2003, Humphreys <i>et al.</i> , 2009)
OspF	<i>Shigella flexneri</i>	T3SS	P38 et ERK Réorganisation du cytosquelette	(Zurawski <i>et al.</i> , 2006, Zurawski <i>et al.</i> , 2009)
LipA	<i>Listeria monocytogenes</i>	Inconnu	Rôle dans la virulence dans le modèle murin	(Kastner <i>et al.</i> , 2011)

Tableau 2 : Tyrosine phosphatases bactériennes identifiées comme étant sécrétées dans la cellule hôte lors de l'infection.

1.7. Les protéines NleH1 et NleH2 des *Escherichia coli* pathogènes

Les souches entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) d'*Escherichia coli* sont responsables d'infections intestinales allant de la gastro-entérite pour les EPEC à des colites hémorragiques pour les EHEC. Ces souches pathogènes sont connues pour sécréter des effecteurs à l'intérieur des cellules épithéliales intestinales grâce à un système de sécrétion de type 3 (Hueck, 1998). Parmi ces effecteurs on trouve les STPKs NleH1 et NleH2. Une fois sécrétées dans le cytoplasme de la cellule, ces protéines vont interagir avec RPS3, une protéine de l'hôte qui se lie à la sous-unité p65 du NF- κ B, régulant alors son affinité pour ses gènes cibles (Wan *et al.*, 2007, Gao *et al.*, 2009). En effet, l'interaction de NleH1 et RPS3 provoque une réduction de la quantité de cette dernière au niveau du noyau, entraînant l'inhibition de la transcription dépendant de la voie NF- κ B.

2. Les Tyrosine protéines phosphatases sécrétées

Les bactéries pathogènes sécrètent également des Tyrosines protéines phosphatases dans la cellule hôte, afin de perturber son métabolisme comme détaillée ci-dessous (**Tableau 2**).

2.1. La protéine YopH de *Yersinia pseudotuberculosis*

Y. pseudotuberculosis exprime une tyrosine phosphatase de la famille des PTP, YopH. Essentielle pour sa virulence, ce facteur de virulence est sécrété dans les cellules épithéliales par le système de sécrétion de type 3 de la bactérie. Une fois dans le cytoplasme, YopH va interférer avec des voies de signalisation de la cellule hôte, notamment en déphosphorylant plusieurs protéines, comme la protéine p130Cas, une kinase d'adhésion focale, ou la paxilline (Black *et al.*, 1998, Persson *et al.*, 1999, Persson *et al.*, 1997, Andersson *et al.*, 1999), entraînant de réarrangements du cytosquelette et une inhibition de la phagocytose.

2.2. La protéine PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*

L'analyse du génome de *M. tuberculosis* a mis en évidence la tyrosine protéine phosphatase PtpA par homologie de séquence avec les PTP de bas poids moléculaire eucaryotes.

PtpA est sécrétée par *M. tuberculosis* dans les macrophages infectés, entraînant une

perturbation de la voie d'endocytose et un arrêt de la maturation du phagosome (Bach *et al.*, 2008, Wong *et al.*, 2011). Un des substrats identifié par Bach *et al.* correspond à la protéine humaine VPS33B (Vacuolar Protein Sorting 33B) comme substrat de PtpA. Régulateur clé du trafic et de la fusion endosomale, la déphosphorylation de VPS33B par PtpA l'inactive, entraînant l'inhibition de la fusion phago-lysosomale (Bach *et al.*, 2008). De plus, la délétion de *ptpA* diminue la survie de *M. tuberculosis* dans les macrophages, et les phagosomes qui contiennent la souche Δ *ptpA* présentent une augmentation de la fusion lysosomale comparée à la souche sauvage. Par ailleurs, un autre substrat de PtpA a également été identifié comme étant la sous-unité H du complexe V-ATPase, et cette interaction a pour conséquence le blocage de la fusion phago-lysosomale et bloque donc l'acidification du phagosome (Wong *et al.*, 2011). En effet, Wong *et al.* ont montré que la souche Δ *ptpA* était incapable de bloquer la fusion (Wong *et al.*, 2011).

Cette protéine est également présente chez *S. aureus*. J'ai pu l'étudier plus particulièrement dans l'étude exposée ci-après dans la partie "**Résultats**".

2.3. La protéine SptP de *Salmonella typhimurium*

S. typhimurium possède également une tyrosine phosphatase, SptP, qui va être sécrétée dans les cellules épithéliales grâce au système de sécrétion de type 3 (Fu & Galan, 1999). Cette PTP est impliquée dans la dérégulation de la MAPKinase (Lin *et al.*, 2003), et est nécessaire au développement de sa niche intracellulaire (Humphreys *et al.*, 2009).

2.4. La protéine OspF de *Shigella flexneri*

Le pathogène *S. flexneri* sécrète par son T3SS une tyrosine protéine phosphatase possédant également une activité de phosphothréonine lyase. Cette protéine, OspF, va se diriger vers le noyau de la cellule infectée, déphosphorylant les protéines p38 et ERK. Cette action va supprimer l'activité de MAPK de la cellule, entraînant alors une inhibition de la phosphorylation de l'histone H3, donc une modification du remodelage de la chromatine, mais aussi une répression de l'expression de certains gènes spécifiques, notamment des cytokines inflammatoires (Zurawski *et al.*, 2006, Zurawski *et al.*, 2009).

2.5. La protéine LipA de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est une bactérie pathogène à Gram positif, responsable d'infections alimentaire appelées listériose. Après être entrée dans l'organisme par ingestion d'aliments contaminés, la bactérie va traverser la barrière intestinale et va alors se disséminer dans la rate et le foie grâce à la circulation sanguine, pour ensuite atteindre ses organes cibles, le cerveau et le placenta. L'analyse du génome de *L. monocytogenes* avait permis d'identifier une première phosphatase, Stp. Récemment, l'étude du gène *lmo1800* a permis d'identifier une nouvelle phosphatase, la protéine LipA (Listeria Phosphatase A). De façon intéressante, cette protéine présente à la fois une activité de phosphatase à la fois sur les protéines et sur les lipides et semble jouer un rôle important dans la virulence de *Listeria* chez la souris (Kastner *et al.*, 2011).

Chapitre 3 : *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii est la bactérie pathogène responsable de la fièvre Q. Son fort pouvoir infectieux et sa forte résistance aux stress environnementaux font de ce microorganisme un agent potentiel de bioterrorisme.

1. Histoire de la découverte de *Coxiella burnetii*

L'histoire de la découverte de *Coxiella burnetii* repose sur les recherches simultanées, à la fin des années 1930, de deux équipes de chercheurs situés l'une à Hamilton, dans le Montana, et l'autre à Queensland, en Australie.

Dans les années 1930, à Hamilton, le principal axe de recherche du Rocky Mountain Laboratory (RML) concernait une maladie qui sévissait depuis des dizaines d'années dans la région, la Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF). Cette pathologie, qui est mortelle pour près de 80% des patients adultes, est transmise par des piqûres de tique. Au printemps 1935, une équipe est chargée d'aller recueillir des tiques à Nine Mile (Montana), et 200 des arachnides prélevés, des *Dermacentor andersoni*, connus pour être de bons vecteurs de la RMSF, sont confiés à Gordon Davis, un chercheur bactériologiste et entomologiste du RML, afin de lui servir dans ses recherches sur l'écologie de la maladie. En étudiant la transmission éventuelle d'un agent infectieux par les tiques sur les cobayes (*Cavia porcellus*), il remarqua que l'un des animaux présentait une forte fièvre au bout de 12 jours. Par inoculation du sang de l'animal malade à deux cobayes sains, il réussit à reproduire les mêmes symptômes. Davis comprit alors qu'il avait isolé un agent infectieux, et il continua à passer du sang infecté dans de nouveaux cobayes afin d'isoler, d'identifier et de caractériser l'organisme responsable. Il suspecta d'abord *Rickettsia rickettsii*, responsable de la RMSF, mais les symptômes présentés par les cobayes différaient de ceux habituellement observés dans la maladie. De plus, lorsque les tissus infectés étaient placés dans divers milieux de cultures bactériens, aucune croissance n'était observée. De 1936 à 1937, avec l'aide de Herald Cox et de Ralph Parker, Davis montra que l'organisme qu'il passait de cobaye en cobaye possédait à la fois des caractéristiques de virus et de rickettsies, et que la tique était bien le réservoir du pathogène Nine Mile.

Durant la même période, à Brisbane, en Australie, Edward Derrick, alors directeur du Laboratoire de Microbiologie et de Pathologie de Département de la Santé de Queensland, fut

alerté d'une nouvelle pathologie qui touchait neuf ouvriers travaillant dans un abattoir de la ville. Ces patients présentaient une fièvre durant de 7 à 24 jours, des maux de tête, des malaises, une anorexie et des douleurs dans les membres, ne pouvant être associés à aucune maladie connue. En effet, les analyses réalisées sur les patients se sont révélées négatives pour un grand nombre de pathogènes. L'ensemble de ces symptômes fut alors regroupé sous le nom de "fièvre Q", "Q" étant pour "Query" (question) et non pour "Queensland", là où la pathologie a donc été décrite pour la première fois. De nouveaux cas de personnes présentant cette maladie se déclarant, Derrick essaya alors d'isoler l'agent étiologique en inoculant le sang des patients dans des cobayes. Les animaux développèrent alors un état malade et la maladie pouvait être transférée dans des animaux sains. De plus, les animaux survivants du premier groupe infecté étaient capables de résister à une inoculation d'isolats provenant des nouveaux patients atteints, montrant ainsi que tous ces cas avaient une étiologie commune. Cependant, Derrick fut incapable de visualiser et caractériser l'agent infectieux, ne pouvant pas le cultiver en milieu de culture bactériologique classique, et ne retrouvant aucune trace de bactéries dans les tissus des cobayes infectés. Il conclut alors que l'origine de la maladie devait être virale.

En octobre 1936 il confia une émulsion saline de foie de cobaye infecté à Frank Macfarlane Burnet, un virologue travaillant au Walter and Eliza Hall Institute à Melbourne. Avec l'aide de Mavis Freeman, il réussit à reproduire la fièvre caractéristique de la maladie chez des cobayes, et ils parvinrent également à infecter des souris et des singes, mais échouèrent à cultiver l'organisme sur des membranes chorioallantoïques (CAM) d'œufs embryonnés. Ils observèrent que l'agent était difficilement filtrable, et que des frottis de tissus de rate infectée contenaient des organismes ressemblant à des rickettsies. De plus, ils parvinrent à montrer que du sérum d'un patient convalescent de la fièvre Q agglutinait avec une émulsion de rate infectée, produisant une preuve supplémentaire que l'agent infectieux était bien la cause de la fièvre Q.

L'organisme ne se comportant pas exactement comme une rickettsie classique, il fut placé dans un nouveau genre dans la famille des *Rickettsiaceae*, genre "*Coxiella*", espèce "*burnetii*", en l'honneur de Cox et Burnet, respectivement. Plus tard, après étude de la séquence codante de son ARNr 16S, *Coxiella burnetii* fut reclassée dans le phylum *Proteobacteria*, classe γ -*Proteobacteria*, ordre *Legionellales*, famille *Coxiellaceae*. Le génome de la bactérie présente une composition de 42,2% de G+C, ce qui la rapproche d'autant plus des membres de l'ordre des *Legionellales* que de celles de *Rickettsiales* (environ 29% G+C).

2. Caractéristiques générales de *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii est une bactérie pathogène à Gram négatif, strictement intracellulaire. Elle se présente sous la forme d'un petit coccobacille pléomorphe. Elle possède un très fort pouvoir pathogène. En effet, sa dose infectieuse est très faible, puisque seulement une à dix bactéries sont suffisantes pour déclencher une infection. Elle possède deux variants cellulaires aux morphologies distinctes, avec un cycle de développement biphasique. Tout d'abord, la particule infectieuse "Small Cell Variant", ou SCV, métaboliquement inactif, qui présente une chromatine condensée caractéristique. Ce morphotype est considéré comme la forme de survie extracellulaire car elle possède une forte résistance aux stress environnementaux comme la dessiccation, la chaleur, le choc osmotique, les UV et les désinfectants chimiques (Waag, 2007). Quand le small cell variant envahit la cellule hôte, il se différencie en un "Large Cell Variant" (LCV) qui est métaboliquement actif et est capable de se diviser. Cette différenciation implique des changements dans les protéines de surface de la bactérie (Waag, 2007).

Trente-deux isolats présentant une diversité génétique ont été classés en six groupes génomiques distincts (de I à VI) (Hendrix *et al.*, 1991). Les groupes I, II et III sont composés d'isolats humains dérivés de patients présentant la forme aiguë de la maladie, tandis que les groupes IV et V se réfèrent aux patients avec la forme chronique. Le groupe VI contient des organismes isolés sur des rongeurs près de Dugway (Utah, USA). La plupart des isolats présentent l'un des quatre plasmides à répllication autonome QpH1, QpRS, QpDV ou QpDG (Beare *et al.*, 2006, Ghigo *et al.*, 2009). Ces plasmides ont une taille comprise entre 32 et 42 kb et présentent tous une région "noyau" commune de 25 kb. Les souches qui ne contiennent pas de plasmide libre possèdent les séquences plasmidiques intégrées dans leur génome.

Trois lipopolysaccharides (LPS) distincts ont été décrits et sont associés à des groupes génomiques spécifiques (Toman *et al.*, 2009). Un lien probable entre ces différents LPS et la virulence de *C. burnetii* a été envisagé (Hackstadt, 1990). En effet, une variation de la phase du LPS s'est produite en laboratoire. La forme virulente de la bactérie, isolée à partir de patients infectés, produit un LPS complet. Elle est nommée "phase I" ou variant lisse. La multitude de passages *in vitro* dans des œufs embryonnés a entraîné une diminution du poids moléculaire et une modification de la composition en sucres du LPS. Ces organismes présentant un LPS tronqué sont appelés variants avirulents, de "phase II" ou encore de type "rugueux". Ce LPS de phase II contient un lipide A identique à celui de la phase I, mais il lui manque deux sucres O-antigènes inhabituels, le virenose (6-deoxy-3-C-méthyl-D-gulose) et le

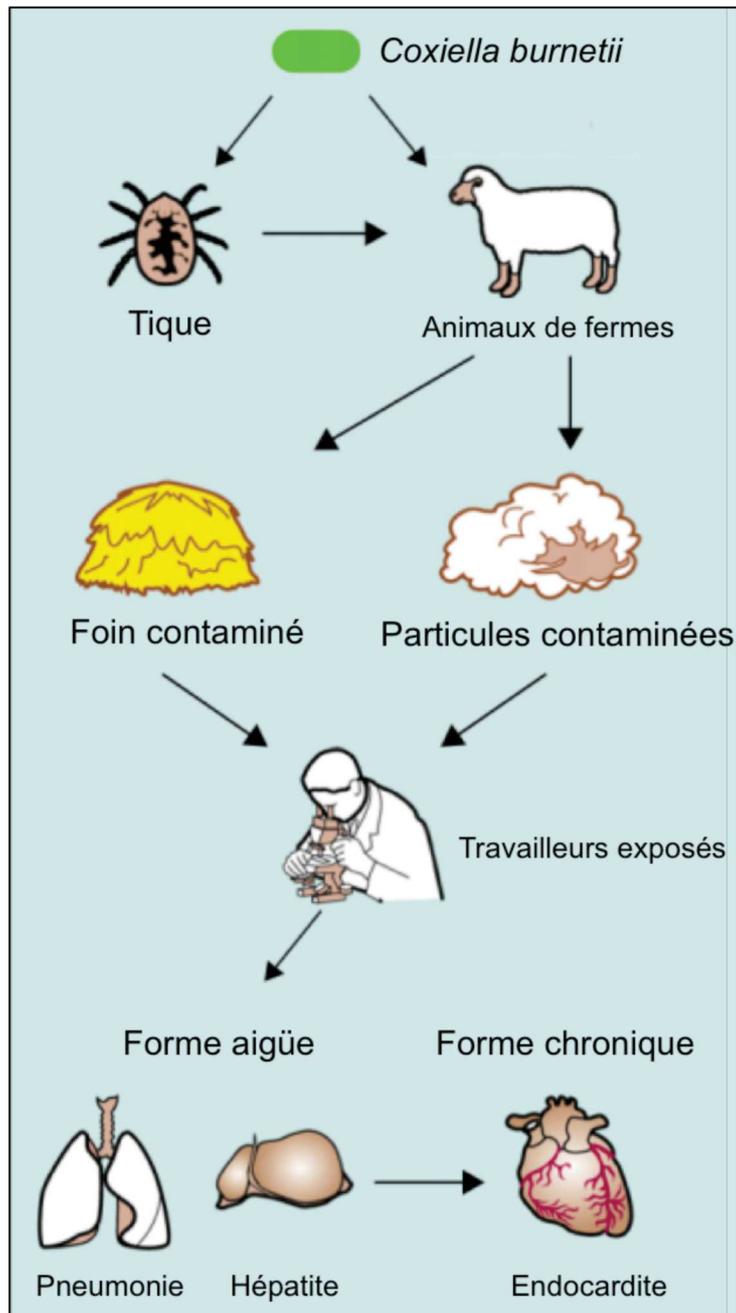


Figure 5 : Transmission de *Coxiella burnetii* chez l'Homme. La bactérie va infecter les animaux de ferme, son réservoir naturel, par l'intermédiaire des tiques. L'Homme va ensuite se contaminer en inhalant des particules ou des aérosols contaminés. La fièvre Q peut alors se déclarer sous sa forme aigüe par un syndrome grippal pouvant entraîner une pneumonie ou une hépatite. L'aggravation en forme chronique se produit chez des patients atteints de valvulopathie ou présentant une immunodépression et conduit à une endocardite.

dihydrohydroxystreptose [3-C-(hydroxyméthyl)-L-lyxose], qui sont des biomarqueurs uniques de *C. burnetii* (Toman *et al.*, 2009).

Deux clones de l'isolat virulent "Nine Mile phase I" (NMI), présentant des LPS différents, ont été décrits : le "Nine Mile Crazy" (NMC), avec une virulence intermédiaire, qui produit un LPS d'une longueur intermédiaire (Toman *et al.*, 2009), et le "Nine Mile phase II" (NMII), avirulent, qui présente un LPS extrêmement tronqué (Toman & Skultety, 1996). Les souches NMII et NMC possèdent d'importantes délétions chromosomales qui suppriment le cadre de lecture impliqué dans la biosynthèse des sucres O-antigènes, notamment le virenose (Hoover *et al.*, 2002).

Enfin, les caractéristiques de résistance dans l'environnement et de dissémination, ainsi que son fort pouvoir infectieux, classent *C. burnetii* parmi les agents de bioterrorisme de catégorie B.

3. La fièvre Q

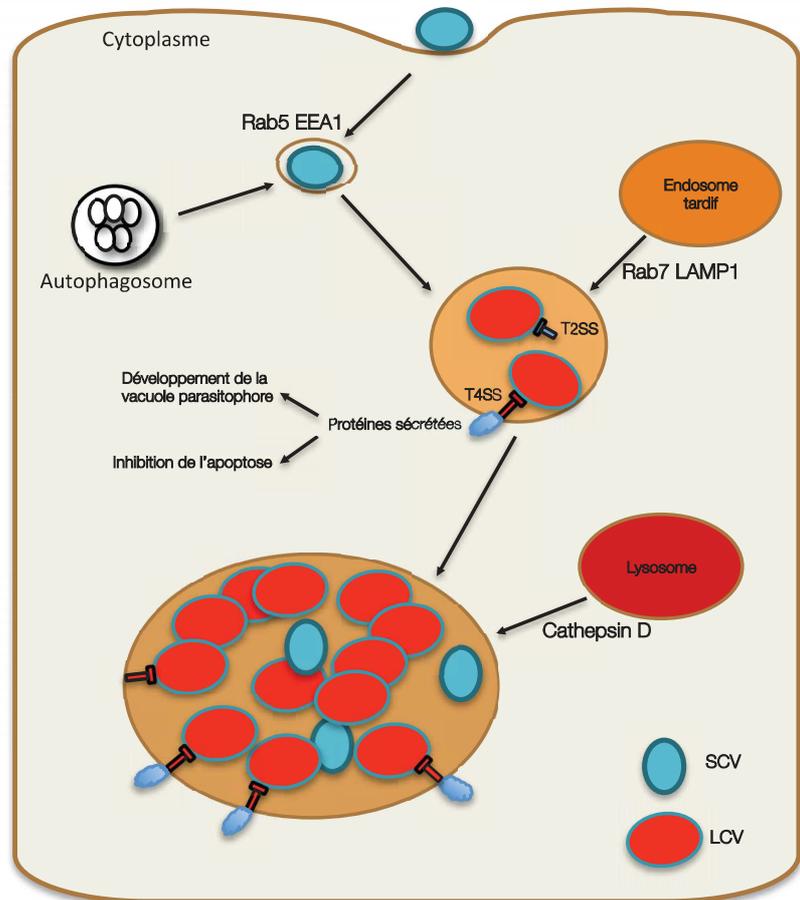
C. burnetii est l'agent responsable de la fièvre Q, une zoonose qui provoque chez l'Homme un syndrome grippal, pouvant se compliquer en pneumonie et en hépatite (Raoult *et al.*, 2005). La maladie peut se présenter sous forme aiguë ou sous forme chronique, plus rare, mais présentant dans la majorité des cas cliniques une endocardite (**Figure 5**). 60% des infections chez l'Homme se concluent par une séroconversion asymptomatique, une disparition des symptômes n'indiquant pas toujours une disparition de l'infection. En effet, de l'ADN de *C. burnetii* peut être retrouvé chez les patients plusieurs mois après la fin de la maladie (Harris *et al.*, 2000). La résolution de l'infection dépendant de la réponse immunitaire cellule-dépendante, la forme chronique de la maladie est principalement retrouvée chez des patients atteints de valvulopathie ou présentant une immunodépression. Une infection par *C. burnetii* survient classiquement après inhalation de la bactérie contenue dans des particules de poussière contaminées ou dans des aérosols, principalement à proximité de ruminants domestiques, bien que des contaminations indirectes à plus longue distance aient déjà été recensées (Meiklejohn *et al.*, 1981) (**Figure 5**). Le nombre de réservoirs naturels augmente et comprend les mammifères sauvages et domestiques, les oiseaux et les arthropodes comme les tiques (Maurin & Raoult, 1999).

D'un point de vue épidémiologique, la fièvre Q est retrouvée dans le monde entier, excepté en Nouvelle-Zélande (Maurin & Raoult, 1999).

Internalisation
Endosome précoce
2 à 6 heures post-infection
Fusion avec l'autophagosome

Vacuole parasitophore précoce
1 à 2 jours post-infection
Agrandissement de la vacuole
pH 5
Transition SCV vers LCV

Vacuole parasitophore tardive
Très grande vacuole
6 à 7 jours post-infection
pH 4-5
Transition LCV vers SCV



D'après une figure d'E. Martinez

Figure 6 : Cycle intracellulaire de *Coxiella burnetii*. Après son internalisation, la bactérie va transiter dans un endosome précoce portant des marqueurs caractéristiques (Rab5 et EEA1), subissant ainsi plusieurs étapes de maturation afin de générer une vacuole parasitophore. Durant la maturation de l'endosome, la bactérie va se différencier de la forme SCV à la forme LCV en réponse à l'acidification du pH. L'augmentation de la taille de la vacuole est associée à la croissance exponentielle de la forme LCV, suivie par la réapparition de la forme SCV, caractéristique du cycle bi-phasique de *C. burnetii*.

4. Cycle d'infection de *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii a un cycle de vie assez particulier, puisqu'il implique plusieurs variants cellulaires, un Small Cell Variant (SCV) et un Large Cell Variant (LCV) (**Figure 6**).

Après internalisation dans la cellule hôte sous sa forme SCV, *C. burnetii* va se retrouver dans un endosome qui va subir plusieurs étapes de maturation afin de devenir une vacuole parasitophore (PV). Habituellement, les bactéries qui sont phagocytées dans une cellule sont tuées et dégradées dans un phagolysosome. *C. burnetii* va cependant pouvoir survivre et se répliquer.

Classiquement, la maturation phagosomale implique une augmentation de l'acidité des phagosomes, et l'acquisition séquentielle de différentes protéines par des événements de fusion et de fission (Kinchen & Ravichandran, 2008). Les marqueurs d'endosomes précoces sont les protéines EEA1 et Rab5, tandis que les marqueurs d'endosomes tardifs sont Rab7, les protéines LAMP et la cathepsin D (Kinchen & Ravichandran, 2008). La vacuole parasitophore mature engendrée par *C. burnetii* présente des caractéristiques lysosomales. En effet, elle se caractérise par l'abondance de la protéine Rab7 (Beron *et al.*, 2002) et la présence de LAMP-1 (lysosomal hydrolase acid phosphatase) et de la cathepsin D, qui sont toutes deux des marqueurs caractéristiques des compartiments phagolysosomaux (Heinzen *et al.*, 1996, Howe *et al.*, 2010). De plus, l'acquisition séquentielle de Rab5 et Rab7 montre que *C. burnetii* transite par la voie endocytaire classique (Romano *et al.*, 2007).

Durant la maturation de l'endosome en vacuole parasitophore, la bactérie va elle aussi subir une transformation, et va alors passer de sa forme SCV à la forme LCV en réponse à l'acidification du pH (4,7-4,8) (Hackstadt & Williams, 1981). Cette transformation en la forme métaboliquement active se produit sans aucune répllication, mais est associée à la perte de ScvA, une protéine de liaison à l'ADN qui joue un rôle dans la condensation de la chromatine (Coleman *et al.*, 2004).

Huit heures après l'infection, on retrouve à l'intérieur de la PV à la fois les formes SCV et LCV, la transition étant complète seize heures post-infection, lorsque la PV ne contient plus que des LCV. La maturation de la bactérie dans la PV est associée à la synthèse de protéines, et nécessite une transition de 24 à 48h. La croissance exponentielle de la forme LCV est observée de deux à six jours après l'infection, suivi par la réapparition de la forme SCV, caractéristique du cycle bi-phasique de *C. burnetii*. De plus, il est considéré que cette morphogénèse intracellulaire est essentielle à la virulence de la bactérie, et que les protéines qui sont exprimées différemment entre les deux formes cellulaires pourraient être des facteurs

de virulence. En effet, quarante-huit protéines sont deux fois plus exprimées dans la forme LCV que dans la SCV (Coleman *et al.*, 2007), parmi lesquelles quinze sont associées à la division cellulaire et aux fonctions ribosomales (confirmant que la forme LCV est bien la forme active). Ainsi, le cycle bi-phasique de *C. burnetii* peut être considéré comme un mécanisme de virulence puisqu'il lui fournit une forme stable dans l'environnement extracellulaire, qui se transforme en une forme invasive une fois la cellule envahit.

Chapitre 4 : *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie extrêmement pathogène pour l'Homme, responsable d'une multitude d'infections, de bénignes à graves, communautaires et nosocomiales. Depuis sa caractérisation en 1880 par Sir Alexander Ogston, on observe, à l'échelle mondiale, l'émergence fréquente de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques, ce qui accroît considérablement la difficulté des traitements. En effet, *S. aureus* présente une incroyable capacité d'adaptation à son environnement.

1. Caractéristiques générales de *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques appartiennent au genre *Staphylococcus*, de la famille des *Staphylococcaceae*, comprenant plus de quarante espèces à Gram positif. Chez l'Homme, les souches les plus couramment retrouvées sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus*.

Ces espèces sont ubiquitaires, saprophytes ou commensales de l'Homme et des animaux, et constituent l'essentiel de la flore résidente de la peau et des muqueuses de ces organismes. En effet, *S. aureus* est retrouvé au niveau des fosses nasales et de la gorge chez 20 à 30% des individus sains, avec une affinité particulière pour l'épithélium du nez (Wertheim *et al.*, 2005).

Staphylococcus aureus présente une morphologie en forme de coques en petits amas ayant l'aspect de "grappes de raisins". Sa capacité à produire une coagulase, souvent utilisée pour son identification, la distingue des autres staphylocoques, appelés Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN). C'est une bactérie catalase positive, immobile aérobie ou anaérobie facultative, non sporulante. Son ubiquité lui permet une transmission de façon directe (par les mains et le nez essentiellement) et indirecte (par les objets).

Cette espèce est parfois appelée "staphylocoque doré" car elle synthétise un pigment caroténoïde responsable de la couleur "or" de certaines souches de *S. aureus*, la staphyloxantine, qui est également un facteur de virulence. (Liu *et al.*, 2005).

S. aureus est l'espèce la plus pathogène du genre et les infections qu'elle provoque sont très polymorphes (**Figure 7**) (Plata *et al.*, 2009). Par opposition, les SCN sont principalement non pathogènes, bien que certaines soient des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales. Le staphylocoque doré est particulièrement connu et redouté dans les hôpitaux où l'immunodépression des patients favorise l'apparition et les complications d'infections dites nosocomiales. En effet, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

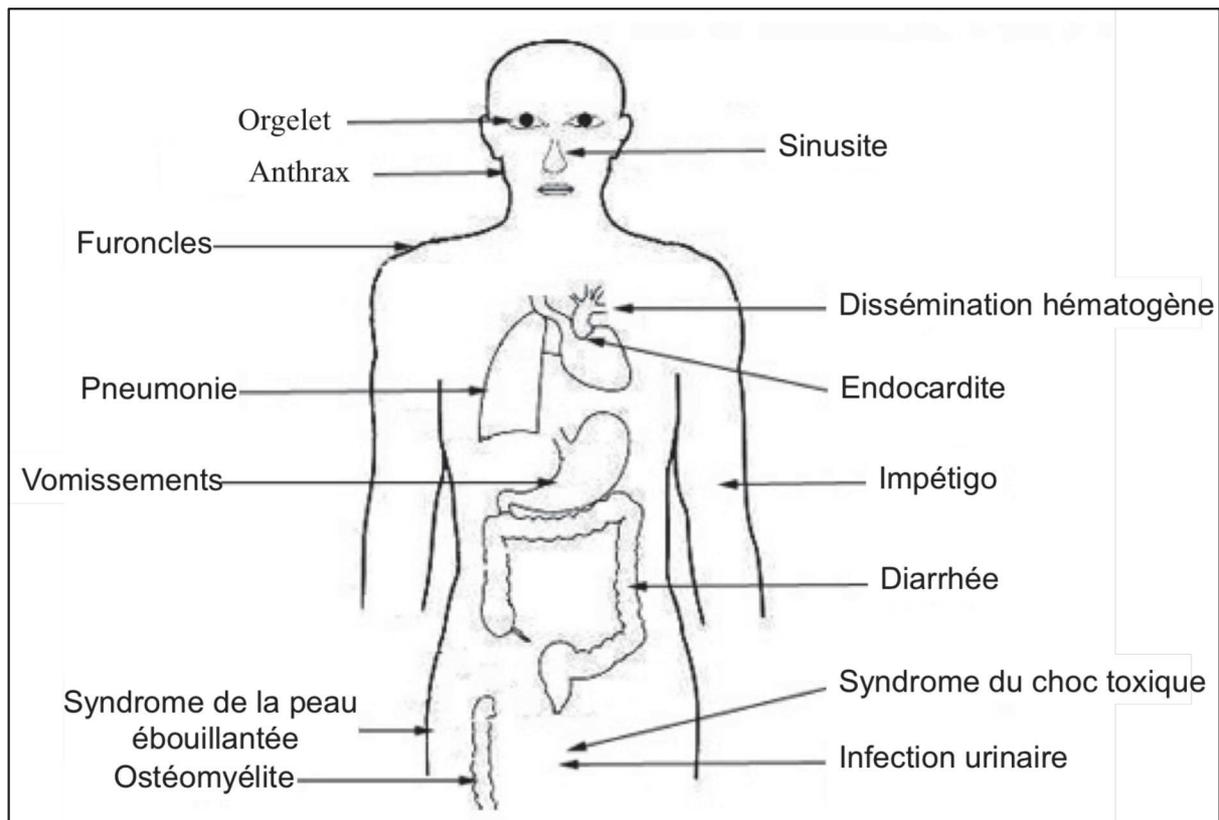


Figure 7 : Différents sites d'infection et différentes pathologies associées à une infection par *Staphylococcus aureus*.

Source de l'image <http://textbookofbacteriology.net/images/staph3.jpeg>

aeruginosa et *Staphylococcus aureus* sont responsables de la majorité des infections nosocomiales d'origine bactérienne dans le monde (Bereket *et al.*, 2012).

2. Pouvoir pathogène et infections staphylococciques

La pathogénie de *S. aureus* est multifactorielle et résulte de différents mécanismes, ce qui la rend extrêmement pathogène pour l'Homme. Elle est responsable d'un grand nombre d'infections (**Figure 7**), parmi lesquelles on distingue (Lowy, 1998) :

- **les infections suppuratives superficielles ou profondes.** Grâce à son pouvoir pyogène, *S. aureus* entraîne une suppuration des régions infectées. Ces infections sont principalement loco-régionales, les plus fréquentes étant les infections cutanéomuqueuses, telles que les furoncles, les panaris, ou l'impétigo, et elles peuvent parfois être le point de départ de suppurations plus profondes, par extension de l'infection, ou d'infections généralisées par diffusion sanguine de la bactérie.

- **les infections généralisées.** Elles reflètent le pouvoir invasif du pathogène, capable de se multiplier et de se disséminer dans l'organisme à partir de ses différentes portes d'entrées. *S. aureus* se multipliant chez l'hôte de façon extracellulaire, ces infections peuvent survenir suite à l'aggravation d'infections suppuratives superficielles entraînant la dissémination du germe dans la circulation sanguine et pouvant induire des septicémies graves voire mortelles.

- **les infections non suppuratives d'origine toxique.** *S. aureus* est une espèce toxigène. La production de ses toxines entraîne des toxémies staphylococciques, comme les syndromes cutanés staphylococciques, le choc toxique staphylococcique ou les intoxications alimentaires.

3. Résistance aux antibiotiques

Le traitement des infections dues à *Staphylococcus aureus* est de plus en plus difficile en raison de l'apparition exponentielle de souches multi-résistantes aux antibiotiques, venant gonfler la liste déjà importante des souches résistantes (McGowan, 1983).

Les souches résistantes à la pénicilline furent les premières à apparaître dans les années 1940 (Barber & Rozwadowska-Dowzenko, 1948). Cet antibiotique appartient à la

famille des β -lactamines, qui ont pour cible des enzymes de la biosynthèse du peptidoglycane pariétal, appelées PBP (Penicillin-Binding Protein), auxquelles la pénicilline se fixe de manière irréversible. La résistance est due à une enzyme, la pénicillinase ou β -lactamase, qui inactive l'antibiotique en clivant le noyau β -lactame caractéristique de la pénicilline et de ses dérivés (**Figure 8**) (Lowy, 1998). A l'heure actuelle, la plupart des isolats cliniques de *S. aureus* sont résistants à la pénicilline. Ainsi, afin de contrer ces souches devenues résistantes, un traitement utilisant un antibiotique résistant à l'inactivation par la β -lactamase, la méticilline, a été développé. Malheureusement, seulement deux ans après les premiers traitements, des souches résistantes à la méticilline (MRSA pour Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*) sont apparues (Jevons *et al.*, 1963). Cette nouvelle résistance est due à l'acquisition d'un élément génétique mobile, appelé élément *mec*, qui lui confère une résistance à l'ensemble des antibiotiques de la famille des β -lactamines (Katayama *et al.*, 2000).

Actuellement, dans la plupart des pays industrialisés, les souches MRSA sont responsables d'au moins 25 à 50% des infections dans les hôpitaux (Diekema *et al.*, 2001). Elles sont ainsi fréquemment retrouvées lors d'infections nosocomiales (Hospital-Acquired MRSA) mais également lors d'infections dites communautaires (Community-Acquired MRSA) (Otto, 2010). Depuis l'apparition de la première souche MRSA, différents clones de *S. aureus* sont apparus, ces derniers ayant pour la plupart acquis des éléments de résistance additionnels, leur conférant des résistances à l'érythromycine, la tétracycline ainsi qu'à d'autres antibiotiques (Shorr, 2007). La majorité des souches MRSA sont donc devenues multirésistantes.

La vancomycine restait actuellement l'un des seuls antibiotiques encore efficace sur ces souches, mais des souches résistantes à la vancomycine (VRSA) ont été caractérisées (Otto, 2012).

L'émergence de souches résistantes aux antibiotiques représente donc un problème majeur de santé publique, nécessitant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

4. Facteurs de virulence

Staphylococcus aureus possède de nombreux facteurs de virulence, ce qui lui confère un fort pouvoir pathogène. Ces facteurs permettent à la bactérie de contourner les défenses immunitaires de l'hôte, notamment aux moments clés du processus infectieux (Foster, 2005). Ces facteurs de virulence sont classés en trois grandes familles : les protéines de surface, les

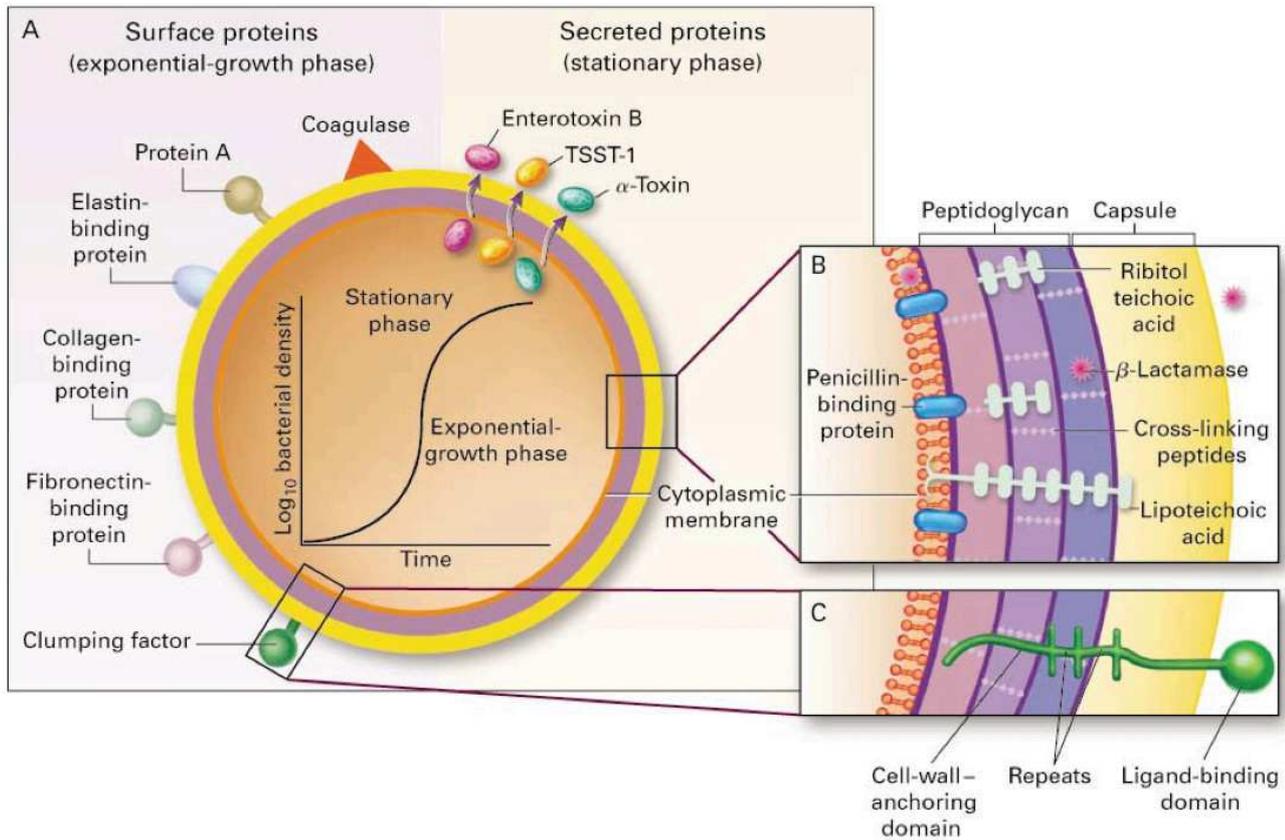


Figure 8 : Représentation schématique de *Staphylococcus aureus* et de ses principaux facteurs de virulence. (A) Les facteurs de virulence de surface et les facteurs sécrétés. La synthèse de la plupart de ces protéines dépend de la phase de croissance de la bactérie, comme le montre le graphique. (B) Sections transversales de l’enveloppe. (C) Organisation structurale du “clumping factor“ au sein de l’enveloppe.

D’après Lowy, 1998

protéines sécrétées et les composants de l'enveloppe cellulaire (**Figure 8**) (Lowy, 1998, Bartlett & Hulten, 2010).

- **les protéines de surface**, les adhésines, sont capables de fixer les molécules de l'hôte grâce à leur domaine N-terminal exposé à la surface de la bactérie (Foster & Hook, 1998). De nombreuses adhésines ont été identifiées, parmi lesquelles la protéine A, les protéines de liaison au collagène, à l'élastine, à la fibronectine (FnbP) et au fibrinogène A et B (clumping factor ClfA et ClfB). On trouve également les protéines de la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule) qui reconnaissent spécifiquement les molécules de la matrice extracellulaire, et permettent l'adhésion des bactéries puis la colonisation des tissus (Patti *et al.*, 1994). Ces adhésines sont également impliquées dans la colonisation des biomatériaux implantés comme les cathéters, par exemple, et dans le détournement du système immunitaire de l'hôte (Foster, 2005, Hartleib *et al.*, 2000, Cheung & Fischetti, 1990, Herrmann *et al.*, 1988).

- **les toxines et enzymes sécrétées** impliquées dans l'invasion et la progression de l'infection (Bartlett & Hulten, 2010). Ces facteurs de virulence comprennent principalement les Pyrogenic Toxin SuperAntigens (PTSAgs) (TSST-1 responsable du syndrome du choc toxique, les entérotoxines impliquées dans les intoxications alimentaires), les exfoliatines responsables du syndrome de la peau ébouillantée chez les jeunes enfants (Plata *et al.*, 2009, Dinges *et al.*, 2000), les exotoxines (comme les α -, β -, δ -hémolysines et les toxines synergophyménotropes, qui forment des pores dans les membranes cellulaires (Shorr, 2007, Dinges *et al.*, 2000) mais également les exoenzymes comme les protéases, les lipases, les hyaluronidases, la coagulase de la famille des adhésines SERAM (Secreted Expanded Repertoire Adhesives Molecules) et la staphylokinase) (Lowy, 1998, Chavakis *et al.*, 2005, Friedrich *et al.*, 2003, Jin *et al.*, 2004) qui favorisent l'extension du foyer d'infection.

- **les composants de l'enveloppe cellulaire** participent également à la virulence de *S. aureus* (**Figure 8**) (Thakker *et al.*, 1998). En effet, la majorité des souches cliniques produisent une microcapsule composée d'exo-polysaccharides (Lowy, 1998), impliqués dans la protection de la bactérie contre la phagocytose par les cellules immunitaires de l'hôte, et favorisant la progression de l'infection (Thakker *et al.*, 1998). Le peptidoglycane et les acides lipoteichoïques, les deux principaux composants de la paroi, sont aussi considérés comme des

facteurs de virulence. Ils possèdent des motifs structuraux antigéniques activant l'immunité innée de l'hôte (Moreillon & Majcherczyk, 2003, Fournier & Philpott, 2005).

Les gènes codant les facteurs de virulence sont régulés très finement par l'environnement extracellulaire, notamment par le quorum sensing, et de façon synchronisée avec le cycle biologique de *S. aureus* (Bartlett & Hulten, 2010). En effet, l'expression des différents gènes de virulence est temporellement régulée au cours de la croissance et notamment lors du processus infectieux (Novick, 2003). L'expression différentielle des facteurs de virulence est sous la dépendance de nombreux systèmes de régulation. Le plus important est le régulateur global *Agr* ("Accessory gene regulator"), comprenant un système à deux composants senseur de l'autoinducteur AI-P (AutoInducting-Peptide), principal médiateur du quorum sensing (Novick & Geisinger, 2008, Cheung *et al.*, 1992). L'effecteur de ce système est une molécule d'ARN, l'ARNIII. Cet ARN régulateur réprime l'expression des facteurs de virulence de surface ou associés à la paroi (adhésines MSCRAMM et SERAM), en phase exponentielle de croissance. Il contrôle également positivement l'expression des exoprotéines (exoenzymes et exotoxines), en phase stationnaire (Arvidson & Tegmark, 2001). D'autres régulateurs globaux du virulon de *S. aureus* participent à cette régulation fine des facteurs de virulence, comme la protéine SarA (Staphylococcal accessory regulator A), les systèmes à deux composants *Sae* (Staphylococcal accessory element) et *Srr* (Staphylococcal respiratory response), ou le facteur sigma alternatif de réponse aux stress sigmaB (Cheung *et al.*, 2004). Les systèmes de régulation de la virulence sont donc particulièrement complexes et interdépendants (Yarwood & Schlievert, 2003).

Par ailleurs, les facteurs de virulence de surface de ce pathogène, comme les adhésines MSCRAMM ou SERAM, sont impliqués dans la formation de biofilms, une des caractéristiques de *S. aureus* (Otto, 2008). En plus de permettre aux bactéries de rester attachées à des surfaces biotiques ou abiotiques, les biofilms offrent une protection importante contre les antibiotiques et les défenses de l'hôte (Otto, 2008). Les biofilms peuvent donc contribuer à prolonger une infection et favoriser la colonisation du pathogène (Otto, 2012). De plus, plusieurs études suggèrent que l'augmentation de la capacité à former des biofilms et à adhérer aux cellules épithéliales de certains isolats de *S. aureus* ait permis de favoriser la propagation de souches MRSA dans les hôpitaux et dans la communauté (Amaral *et al.*, 2005).

La phosphorylation des protéines sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine joue donc un rôle majeur dans le métabolisme et les mécanismes de virulence des bactéries, mais également lors de l'infection de l'hôte. La sécrétion de STPKs et de phosphatases dans la cellule hôte étant une notion récente, de nombreuses questions subsistent. Quelles sont ces protéines, et quel est leur rôle une fois sécrétées dans la cellule hôte lors de l'infection ? Quel est (sont) le(s) substrats de ces protéines ? Sur quelles voies de signalisation cellulaire vont-elles agir ?

Objectifs de la thèse

A l'issue de mon stage de Master 2, qui a porté sur l'étude de différentes STPKs de *M. tuberculosis* ainsi qu'à l'identification de leurs substrats endogènes, nous avons décidé de nous intéresser au rôle émergent des kinases bactériennes en tant que facteur de virulence sécrété lors de l'infection chez l'hôte. De plus il apparaissait intéressant de changer de modèle d'étude tout en étudiant de nouvelles bactéries pathogènes. Par conséquent, suite à de nouvelles collaborations initiées au laboratoire, couplée à une lecture approfondie de la bibliographie révélant l'intérêt croissant pour les kinases et phosphatases sécrétées lors de l'infection, nous avons décidé d'étudier le modèle *S. aureus* pour les bactéries à Gram positif et *C. burnetii* pour les bactéries à Gram négatif, représentant respectivement un pathogène extracellulaire et un intracellulaire stricte.

Chez *C. burnetii*, aucune STPK n'avait encore été caractérisée. Cependant, lors de l'analyse du génome nous avons détecté par analogie de séquence la présence d'une probable Ser/Thr protéine kinase, CBU_0175, bien que présentant des différences avec les STPKs dites classiques de type Hanks. Par ailleurs, l'étude de Chen *et al.* publiée en 2010 (Chen *et al.*, 2010), a mis en évidence lors d'un screen des protéines sécrétées par *C. burnetii* dans le système hétérologue *Legionella pneumophila*, que CBU_0175 était probablement sécrétée par le système de sécrétion Dot/Icm de *L. pneumophila*, fortement similaire à celui de *C. burnetii*. Par conséquent, le premier axe de recherche de ma thèse a alors porté sur la caractérisation *in vitro* de cette protéine kinase, que nous avons renommée CstK (Coxiella serine thréonine Kinase), afin de confirmer son activité kinase. Egalement, nous avons entrepris de reproduire les résultats de sécrétion obtenu chez *L. pneumophila* mais cette fois dans notre modèle *C. burnetii*. A l'heure actuelle cette mise en évidence est toujours en cours. En parallèle, nous avons également entrepris d'identifier les substrats potentiels de CstK lors de l'infection dans la cellule hôte grâce au modèle amibe *Dictyostelium discoideum*. Ces résultats sont présentés dans le **premier article** de mes travaux de thèse qui devrait être soumis prochainement.

Le deuxième axe de mes travaux de thèse a porté sur l'étude d'une tyrosine phosphatase de *S. aureus*. En effet, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse ayant travaillé sur la STPK de *S. aureus*, Stk1, il apparaissait intéressant de poursuivre sur ce modèle bactérien mais cette fois en étudiant la possibilité qu'une phosphatase puisse être sécrétée par *S. aureus*. Nous avons donc entrepris de caractériser la tyrosine phosphatase PtpA, fortement

similaire à la tyrosine phosphatase homonyme de *M. tuberculosis*, connue pour être sécrétée. Bien que PtpA ait été précédemment étudiée afin de confirmer son activité phosphatase, aucune donnée ne montrait qu'elle était sécrétée, ni si elle était régulée via phosphorylation comme démontré pour PtpA de *M. tuberculosis*. Par conséquent, nous avons entrepris de répondre à ces deux questions et les résultats correspondant sont présentés dans le **deuxième article** de mes travaux de thèse en cours de soumission.

Résultats

1. Caractérisation de la protéine kinase CstK de *C. burnetii* et identification de substrats potentiels chez l'hôte.

A. Résumé de l'article

La phosphorylation des protéines est une modification post-traductionnelle clé dans le métabolisme et la virulence des bactéries pathogènes. De plus en plus d'études ont récemment démontré que des protéines kinases bactériennes peuvent être sécrétées dans la cellule hôte lors de l'infection afin de perturber les voies de signalisation et les défenses de l'hôte.

Chez *C. burnetii*, l'agent étiologique de la fièvre Q, une Ser/Thr protéine kinase a été identifiée *in silico*, CBU_0175. L'analyse de sa séquence protéique indiquait qu'elle ne correspondait pas à une STPK classique de type Hanks, bien que certains domaines soient conservés, comme la lysine du site catalytique, essentielle à la fixation de l'ATP et donc à l'activation de la kinase. Des tests de phosphorylation *in vitro* avec la protéine recombinante nous ont permis de montrer que cette protéine, que nous avons renommée CstK (pour Coxiella sérine thréonine Kinase), était capable de s'autophosphoryler, mais également de trans-phosphoryler un substrat universel eucaryote, la protéine MBP (pour Myelin Basic Protein). De plus, un mutant du site catalytique, dans lequel la lysine est mutée en méthionine, s'avère incapable de s'autophosphoryler. Ces résultats confirment néanmoins que CstK possède une activité de type Ser/Thr kinase.

L'analyse par spectrométrie de masse, a permis d'identifier trois sites accepteurs de phosphorylation, deux tyrosines et une thréonine. Cette protéine serait donc une "dual specificity protein kinase" similaire à celles identifiées chez les eucaryotes, et par conséquent capable de s'autophosphoryler à la fois sur des résidus thréonine et tyrosine.

Un mutant par transposon réalisé dans l'équipe de Mattéo Bonazzi, dont l'insertion se trouve dans la région promotrice du gène *cstK*, présente un défaut de répllication dans les vacuoles formées par *C. burnetii* lors de l'infection de cellules Vero. De manière surprenante, les analyses de qRT-PCR ont montré que chez ce mutant, *cstK* était trois fois plus exprimé que dans la souche sauvage de *C. burnetii*. Cette kinase semble donc jouer un rôle important dans la multiplication de la bactérie lors de l'infection, mais des études plus approfondies sont toutefois nécessaires afin de comprendre ce phénomène.

Par ailleurs, l'étude de Chen *et al*, publiée en 2010 dans PNAS montre que des protéines de *C. burnetii* peuvent être sécrétées dans la cellule hôte grâce au système de sécrétion Dot/Icm de *Legionella*, ce dernier étant très proche de celui de *C. burnetii*. Parmi les protéines identifiées comme sécrétées, on retrouve CstK. Tout en essayant de reproduire cette sécrétion dans le système homologue *C. burnetii*, ces travaux étant toujours en cours, nous avons en parallèle cherché à identifier les potentiels substrats de la kinase dans la cellule infectée. Pour cela, nous avons utilisé le modèle amybe *Dictyostelium discoideum*. Nous avons ainsi pu identifier plusieurs substrats potentiels, parmi lesquels la Rab7-GTPase activating protein (GAP) TBC1D5. Cette protéine de l'hôte semble être un candidat particulièrement intéressant, de part son implication dans la fusion phagolysosomale médiée par Rab7 et qui est connu comme importante lors de l'établissement de l'infection par *C. burnetii*.

B. Article I :

**From the characterization of the secreted kinase CstK of
Coxiella burnetii toward its role during host invasion**

**Solène Brelle¹, Eric Martinez², François Letourneur¹, Mariana Rosas Olvera¹,
Sylvaine Huc-Brandt¹, Franck Cantet², Laila Gannoun Zaki¹, Matteo Bonazzi² and
Virginie Molle^{1*}**

¹Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques,
Université de Montpellier II, CNRS UMR 5235, Place Eugène Bataillon, 34095
Montpellier Cedex 05, France.

²CNRS, UMR5236 CPBS, Montpellier 34293, France.

³Centre de Biochimie Structurale, CNRS UMR 5048, INSERM U554, Université
Montpellier I et II, Montpellier, France.

***Corresponding author:**

VM: Tel: (+33) 4 67 14 47 25, Fax: (+33) 4 67 14 42 86, E-mail: virginie.molle@univ-
montp2.fr

Running title: Characterization of CstK from *Coxiella burnetii*.

Keywords: secreted factor, *Coxiella burnetii*, phosphorylation,
serine/threonine/tyrosine protein kinases, host substrates

ABSTRACT

Coxiella burnetii is the etiological agent of the emerging zoonosis Q fever. Crucial to the pathogenesis of this intracellular pathogen is its ability to subvert host cell defenses, permitting intracellular replication in specialized vacuoles within host cells. Secretion of bacterial effectors into host cells is absolutely required for rerouting the *C. burnetii* phagosome maturation towards the development of a parasitophorous vacuole. The characterization of prokaryotic Serine/Threonine Protein Kinases (STPKs) in mammalian bacterial pathogens is emerging as an important strategy to better understand host-pathogen interactions. In this study, we investigated the role of a novel bacterial protein kinase, CstK, identified in *C. burnetii* by *in silico* analysis. We report here that this putative protein kinase undergoes autophosphorylation on Ser, Thr, and Tyr residues, and phosphorylates classical eukaryotic protein kinase substrates *in vitro*. This double Ser/Thr and Tyr kinase activity is similarly observed for eukaryotic dual specificity Tyr phosphorylation-regulated kinase class. Protein-protein interaction studies were performed to identify several CstK-specific host putative targets. Among them, the rab7-GTPase activating protein (GAP) TBC1D5 emerged as a promising candidate; indeed, due to the key role of Rab7 in phagolysosomal fusion TBC1D5 may be involved in the biogenesis of *C. burnetii* parasitophorous vacuoles. Finally, Vero cells infected with a *C. burnetii* mutant overexpressing CstK displayed smaller *C. burnetii*-containing vacuoles and resulted in reduced intracellular replication. Thus CstK might play an important role in the biogenesis of *C. burnetii* replicative vacuoles in host cells.

INTRODUCTION

Signal transduction is an essential and universal function that allows all cells, from prokaryotes to eukaryotes, to translate environmental signals to adaptive changes. By this mechanism, extracellular inputs propagate through complex signaling networks whose activity is often regulated by reversible protein phosphorylation. Signaling mediated by Serine/Threonine/Tyrosine protein phosphorylation has been extensively studied in eukaryotes, however, its relevance in prokaryotes has only begun to be appreciated. The recent discovery that bacteria also use Ser/Thr/Tyr kinase-based signaling pathways has opened new perspectives to study environmental adaptation, especially in the case of bacterial pathogens, with respect to host infection. Thus, advances in genetic strategies

and genome sequencing have revealed the existence of "eukaryotic-like" serine/threonine protein kinases (STPKs) and phosphatases in a number of prokaryotic organisms, including pathogens such as, *Streptococcus* spp. (1-4), *Mycobacteria* (5-10), *Yersinia* spp. (11,12), *Listeria monocytogenes* (13,14), *Pseudomonas aeruginosa* (15), *Enterococcus faecalis* (16) or *Staphylococcus aureus* (17-19). Consequently, the study of prokaryotic Serine/Threonine Protein Kinases (STPKs) in human bacterial pathogens is emerging as an important strategy to better understand host-pathogen interactions and develop new, targeted antimicrobial therapies. However, if on one hand it is clear that STPKs and phosphatases regulate important functions in bacterial pathogens, their signal transduction mechanism remains ill defined and restricted to a limited number of microbes.

STPKs expressed by pathogenic bacteria are not only essential for regulating important bacterial processes, but some are secreted and interact with host substrates, thereby subverting essential host functions such as immune responses, cell shape and integrity (20). Whether these STPK interactions involve phosphorylation of a host substrate remains to be defined. Phosphorylation of host substrates has been demonstrated for some bacterial STPK, whereas other STPK seem to require their kinase activity but their phosphorylated substrates remain to be identified (20). Therefore, biochemical mechanisms of these pathogen-directed targeted perturbations in the host cell-signaling network are being actively investigated and STPKs are proving to be molecular switches that play key roles in host-pathogen interactions (20).

Among emerging human pathogens, *Coxiella burnetii* is the most infectious microorganism known to date, one bacterial cell being sufficient to cause the disease (21). *C. burnetii* is the agent of the zoonosis Q fever, a debilitating flu-like disease that often leads to large outbreaks with a severe health and economic burden (21-23). The main reservoirs of *C. burnetii* are domestic and farm animals, where infections are often asymptomatic, therefore difficult to detect. *C. burnetii* mainly accumulates in the placenta of infected animals, and bacteria are shed in the environment upon delivery constituting a serious threat for exposed human individuals (22). Q fever manifests either as an acute disease, resulting in undulating fever, fatigue and pneumonia with a mortality rate of 2%, or as a chronic disease, with fatal complications such as endocarditis and hepatitis with a mortality rate reaching 65%. The recent outbreak of Q fever in the Netherlands, with a total of over 4000 cases of human Q fever, stands as an example of the severe virulence of *C. burnetii*, which has also been exploited, for biological warfare (21). The efficiency of infections by *C. burnetii* is likely associated with the remarkable capacity of this bacterium to adapt to environmental as well as intracellular stress. Indeed, outside the host, *C. burnetii* generates pseudo-spores that facilitate its airborne

dissemination. During infection, *C. burnetii* has developed a unique adaptation to the host, being the only bacterium that thrives in an acidic compartment containing active lysosomal enzymes. Similarly to other intracellular bacterial pathogens, *C. burnetii* adaptation depends on the tightly regulated expression of virulence genes and the secretion of bacterial effectors by a Dot/Icm Type 4b Secretion System (T4SS). However, despite the importance of understanding the cell biology of *C. burnetii* infections, the obligate intracellular nature of this pathogen has severely limited its investigation and the microbial factors involved in host cell invasion, bacterial replication and dissemination of the infection remain unknown. *C. burnetii* genome analysis revealed a close homology to the facultative intracellular pathogen *Legionella pneumophila*, in particular at the level of Dot/Icm core genes (24). This similarity has allowed the *in silico* identification of a number of putative *C. burnetii* effector proteins, some of which have been partially characterized using *Legionella* as a surrogate model. Importantly, recent advances in axenic culture techniques open the way, today, to the genetic manipulation of *C. burnetii*, fostering Q fever research worldwide (25-28).

In this study, we investigated the role of a novel bacterial protein kinase identified in *C. burnetii* that we named CstK (*Coxiella* serine threonine Kinase) and that was previously identified as being a secreted CstK effector (29). *In vitro* kinase assays revealed that CstK undergoes autophosphorylation on Ser, Thr, and Tyr residues, and CstK displays kinase activity towards a test substrate of eukaryotic protein kinases. The role of CstK in *C. burnetii* intracellular replication was explored by the identification of several potential host cell substrates and analysis of a *C. burnetii* mutant with defects in the formation of the replicative *C. burnetii* niche. Our data provide the first evidence that a *C. burnetii* secreted kinase might control host cell infection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains and plasmids are described in Table 1. Strains used for cloning and expression of recombinant proteins were *E. coli* TOP10 (Invitrogen) and *E. coli* BL21(DE3)Star (Stratagene), respectively. *E. coli* cells were grown and maintained at 25 °C in LB medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin when required. *Coxiella burnetii* RSA439 NMII and transposon mutant *Tn2496* were grown in ACCM-2 [77] supplemented with kanamycin (340 mg/ml) or chloramphenicol (3 mg/ml) as appropriate in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 2.5% O₂ at 37°C.

Cloning, expression and purification of CstK derivatives. The *cstK* (*CBU_0175*) gene was amplified by PCR using *Coxiella burnetii* RSA439 NMII chromosomal DNA as a template with the primers listed in Table 2 containing a *Bam*HI and *Hind*III restriction site, respectively. The corresponding amplified product was digested with *Bam*HI and *Hind*III, and ligated into the bacterial pGEX(M) plasmid, that includes a N-terminal GST-tag, thus generating pGEX(M)_{*cstK*}. pGEX(M)_{*cstK*} derivatives harboring different mutations were generated by using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA), and resulted in the construction of plasmids detailed in Table 2. All constructs were verified by DNA sequencing. Recombinant strains harboring the different constructs were used to inoculate 200 ml of LB medium supplemented with ampicillin, and resulting cultures were incubated at 37°C with shaking until the optical density of the culture reached an A_{600} of 0.5. IPTG (1mM final) was added to induce the overexpression, and growth was continued overnight at 16°C. Purifications of the GST-tagged recombinants were performed as described by the manufacturer (Qiagen). The coding sequence for *cstK* with optimized codons for mammalian cell expression (GenScript USA Inc. 860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854, USA) was amplified by PCR and cloned into pDXA-3C (30) containing a FLAG-tag for C-terminal fusion. After sequencing, the plasmid was linearized by the restriction enzyme *Sca*I and transfected in *Dictyostelium discoideum* as described (31). Clone selection was made with 10 mg/ml G418, and protein expression was assayed by Western blot analysis of *D. discoideum* crude extract with an anti-FLAG rabbit polyclonal antibody (GenScript, USA).

RNA extraction and quantitative RT-PCR (qRT-PCR). *C. burnetii* 50 ml culture was harvested, resuspended in 600 μ L of RNA protect reagent (Qiagen) and incubated 5 min at room temperature. Bacteria were centrifuged and resuspended in 200 μ L TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) containing 1 mg/ml lysozyme. Bacterial suspension was incubated at room temperature for 5 min and bacteria were disrupted by vigorous vortexing for 10 sec every 2 min. 700 μ L of RLT buffer from RNA easy kit (Qiagen), were added to the bacterial suspension and disruption was completed by vortexing vigorously. RNA was purified with the RNA easy kit according to manufacturer's instructions. DNA was further removed using DNase I (Invitrogen). cDNA was produced using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Controls without reverse transcriptase were done on each RNA sample to rule out possible DNA contamination. Quantitative real-time PCR was performed using LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) and a 480 light cycler instrument (Roche). PCR conditions were as

follows: 3 min denaturation at 98°C, 45 cycles of 98°C for 5 sec, 60°C for 10 sec and 72°C for 10 sec. The *dotA* gene was used as internal control. The sequences of primers used for qRT-PCR are listed in Table 2. The expression level of *cstK* in the wild type strain was set at 100 and the expression levels of *cstK* in the *Tn2496* mutant were normalized to the wild type levels.

***In vitro* kinase assays.** *In vitro* phosphorylation was performed with 4 µg of wild-type CstK or CstK derivatives in 20 µl of buffer P (25 mM Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM DTT; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 50µM ATP) with 200 µCi ml⁻¹ (65 nM) [γ -³³P]ATP (PerkinElmer, 3000 Ci mmol⁻¹) for 30 min at 37 °C. The ionic requirement was estimated by *in vitro* kinase assays together with either metal ion (MgCl₂/MnCl₂). For substrate phosphorylation, 4 µg of MBP (Myelin Basic Protein) (Sigma) and 4 µg of CstK were used. Each reaction mixture was stopped by addition of an equal volume of Laemmli buffer and the mixture was heated at 100 °C for 5 min. After electrophoresis, gels were soaked in 16% TCA for 10 min at 90 °C, and dried. Radioactive proteins were visualized by autoradiography using direct exposure to films.

Mass spectrometry analysis. For mass spectrometry analysis, CstK was phosphorylated as described above, excepted that [γ -³³P]ATP was replaced with 5 mM cold ATP. Subsequent mass spectrometry analyses were performed as previously reported (32-35). Spectra were analyzed with the paragon algorithm from the ProteinPilot® 2.0 database-searching software (Applied Biosystems) using the phosphorylation emphasis criterion against a homemade database that included the sequence of CstK.

Intracellular replication of C. burnetii in Vero cells. Vero cells were seeded into triplicate 96-wells plates (Greiner Bio one) 2 days prior to infection. Cells were then challenged either with GFP-*Coxiella burnetii* RSA439 NMII or with *Coxiella* mutant *Tn2496* at an MOI of 100. Bacterial contact with cells was promoted by centrifugation (10 min, 400 g, RT) and cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Unbound bacteria were removed after 1 h of incubation and cells were further incubated in fresh culture medium for 7 days. Plates were analyzed at a 24-hours interval using a TECAN Infinite 200 Pro operated by the Magellan software (TECAN) to monitor the variations of GFP fluorescence associated with the intracellular growth of *Coxiella*. Raw data were analyzed for background subtraction, normalization and quality control among triplicates using in-house developed methods. Seven days after infection, plates were fixed in 3% paraformaldehyde in PBS at room temperature for

30 minutes, rinsed in PBS and incubated in blocking solution (0.5% BSA, 50 mM NH₄Cl in PBS, pH 7.4). Cells were then incubated in Hoechst 33258 diluted 1:200 in blocking solution for 30 minutes at room temperature, rinsed and incubated in PBS. Images were acquired with an Arrayscan VTI Live epifluorescence automated microscope (Cellomics) equipped with an ORCA ER CCD camera. 6 fields/well of triplicate 96-wells plates were imaged with a 20X objective in the GFP, DAPI and Bright-field channels. Images were then processed and analyzed using CellProfiler. Briefly, the GFP channel was subtracted from the corresponding DAPI channel to avoid false identification of large *Coxiella* colonies as host cell nuclei, images were thresholded using the Otsu global method and host cell nuclei as well as *Coxiella* colonies were identified and segmented. The number, form factor and fragmentation of host cell nuclei and the number, form factor, area, perimeter, GFP intensity and compactness of *Coxiella* colonies were then calculated per object and per image. Raw data were processed for background subtraction, normalization and quality control using in-house developed methods as previously described (36).

Immunoprecipitation. For immunoprecipitations, 2×10^7 cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.5% NP40, protease inhibitors (Roche)) and cleared by centrifugation for 15 min at 14 000 rpm in a microfuge. Lysate supernatants were incubated overnight at 4°C with anti-flag monoclonal antibody coated on agarose beads (Genscript). The beads were then washed five times in wash buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 0,1% NP40) and once in PBS. Bound proteins were migrated on SDS-PAGE and analysed by LC-MS/MS.

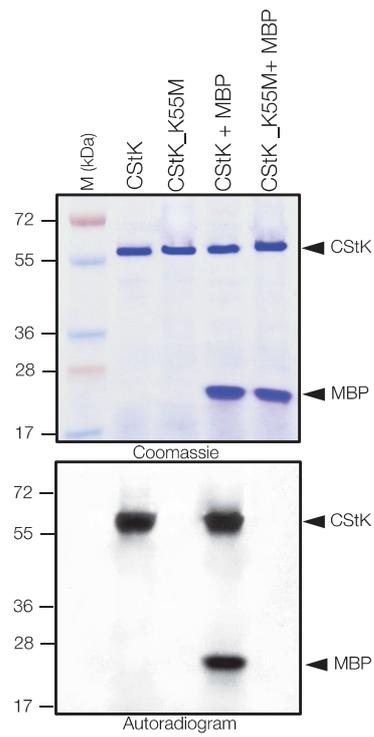
GST pull-down. GST fusion proteins were produced as described here above and bound to Glutathione Sepharose 4B beads according to manufacturer's instructions (GE Healthcare). To prepare cell lysates, *D. discoideum* cells (2×10^7) were incubated 15 min in lysis buffer (20 mM HEPES buffer, pH 7.0; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1% Triton X100; complete protease inhibitors) and centrifuged for 15 min at 14 000 rpm in a refrigerated microfuge. GST beads were then incubated with cell lysates (800 µg) overnight at 4°C on a wheel. After three washes in lysis buffer, beads were heated at 95°C for 10 min. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose before incubation with an anti-myc antibody (9E10; Sigma). Blots were revealed with the Odyssey Western Detection System.

Figure 1

A



B



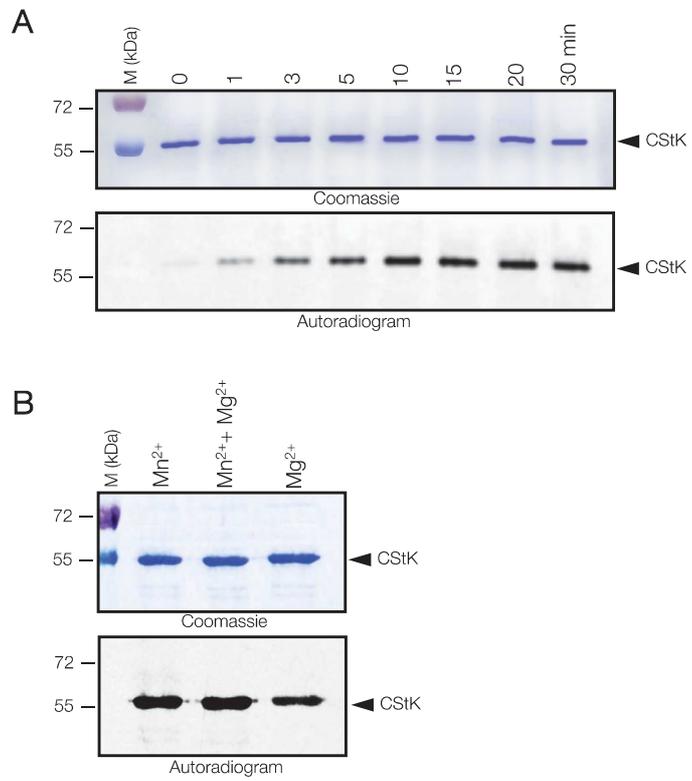
RESULTS AND DISCUSSION

***Coxiella burnetii* genome encodes one putative protein kinase.** *In silico* analysis of the epidemic *C. burnetii* strain RSA493 NMI genome revealed one gene encoding a putative Serine/Threonine Protein Kinase (STPK). To date, no STPK have been characterized in this organism. This gene was named *cstK* for *C. burnetii* serine threonine Kinase and encoded a 246 amino acids protein with a calculated molecular mass of 31 kDa. ClustalW and BLAST analysis revealed the presence of most of the essential amino acids and sequence subdomains characterizing the Hanks' family of eukaryotic-like protein kinases (37). CstK shares a common eukaryotic protein kinases superfamily fold with two lobes and a Gly-rich loop. These include the central core of the catalytic domain, and the invariant lysine residue in the consensus motif within subdomain II, which is usually involved in the phosphotransfer reaction and required for the autophosphorylating activity of eukaryotic STPKs (Fig. 1A) (37,38). The activation loop in the catalytic domain is particularly short in CstK, and the DFG motif is substituted by a GLG motif. Interestingly, the transmembrane domain usually presents in classical prokaryotic STPKs is lacking in CstK, thus it is a so-called cytoplasmic STPK. Moreover, CstK harbors a C-terminal E-block motif in position -5 to -2 (ExxE), as well as an hydrophobic tryptophane residue in position -1. These motifs have been shown to be necessary for Dot/Icm secretion in a number of putative *Coxiella* effector proteins (39,40), that may explain the lack of transmembrane domain in CstK and thus confort its predicted secretion as previously shown by Chen *et al.* (29).

***CstK* displays autokinase and protein kinase activities.** To determine whether CstK is a functional protein kinase, this protein was overproduced in *E. coli* and purified as a recombinant protein fused to glutathione *S*-transferase (GST) tag. The purified tagged CstK protein (Fig. 1B, upper panel) was then assayed for autokinase activity in presence of the phosphate donor [γ -³³P]ATP. As shown in Fig. 1B (lower panel), CstK incorporated radioactive phosphate from [γ -³³P]ATP, generating a radioactive signal corresponding to the expected size of the protein isoform, strongly suggesting that this kinase undergoes autophosphorylation.

To confirm CstK autophosphorylation and exclude that contaminant kinase activities from *E. coli* extracts might phosphorylate CstK, we mutated the conserved Lys55 residue present in subdomain II into CstK by site-directed mutagenesis. Indeed protein sequence analysis revealed that Lys55 in CstK is similarly positioned as a conserved Lys residue usually involved in the phosphotransfer reaction and also required for the autophosphorylating

Figure 2



activity of eukaryotic-like STPKs (37,38). Thus, Lys55 was substituted by a Met residue, and the mutated form of CstK, CstK_K55M, was purified as described above (Fig. 1B, upper panel) and then tested for autophosphorylation in presence of [γ - ^{33}P]ATP. As expected, no radioactive signal could be detected (Fig. 1B, lower panel), thus establishing that CstK displayed autophosphorylating activity.

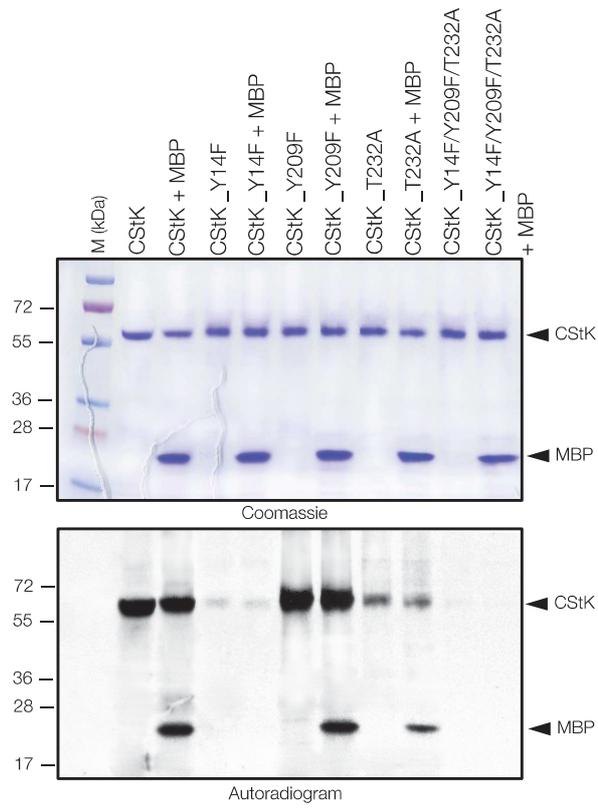
A kinetic analysis of CstK phosphorylation was next performed to determine the initial CstK phosphorylation rate (Fig. 2A). Incorporation of γ -phosphate occurred rapidly, reaching about 50% of its maximum rate within 5 min of reaction. This autokinase activity was dependent on bivalent cations such as Mg^{2+} and Mn^{2+} as shown in Fig. 2B, and abolished by addition of 20 mM EDTA (data not shown).

The recombinant CstK protein was further characterized by studying its ability to phosphorylate exogenous proteins and was thus assayed for *in vitro* phosphorylation of the general eukaryotic protein kinase substrate, myelin basic protein (MBP), in the presence of [γ - ^{33}P]ATP. MBP is a commonly used substrate for both Ser/Thr and Tyr kinases. A radiolabeled signal at the expected 18-kDa molecular mass of MBP was detected, thus demonstrating that CstK phosphorylates protein substrates such as MBP (Fig. 1). Altogether, these data indicate that *in vitro*, CstK possesses intrinsic autophosphorylation activity and displays kinase functions for exogenous substrates.

Identification of CstK autophosphorylation sites. To determine the specificity of this kinase, we next identified its autophosphorylation sites. A mass spectrometry approach was used since this technique allows precise characterization of post-translational modifications including phosphorylation (41,42). NanoLC/nanospray/ tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS) was applied for the identification of phosphorylated peptides and for localisation of phosphorylation sites in CstK. This approach led to 97% of sequence coverage, while the remaining residues uncovered did not include Ser, Thr or Tyr residues able to be phosphorylated.

As detailed in Table 3, analysis of tryptic digests allowed the characterization of three phosphorylation sites in CstK. Surprisingly, unlike classical Ser/Thr or Tyr kinases, CstK was phosphorylated on two Tyr residues (Y14 and Y209) in addition to one Thr site (T232). Since protein sequence analysis did not reveal a classical activation loop in this kinase, the contribution of T232, Y14 and Y209 to CstK kinase activity was individually assessed. Hence, these residues were mutated either to phenylalanine to replace tyrosine residues or alanine to

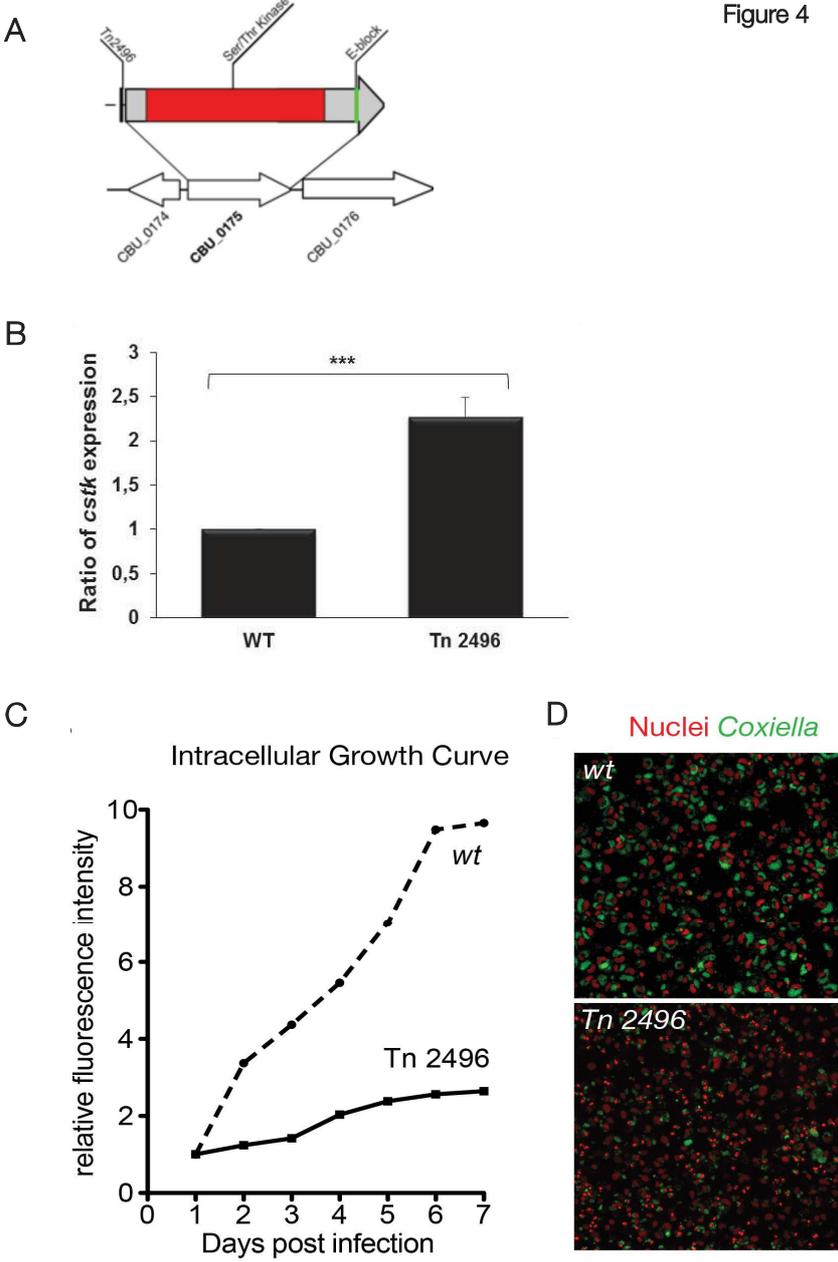
Figure 3



replace threonine residue, thus generating the single mutants CstK_Y14F, CstK_Y209F, and CstK_T232A as well as the CstK_Y14F/Y209F/T232A triple mutant. Next, *in vitro* kinase assays with [γ - 33 P]ATP were carried out and revealed that maximum loss in CstK autophosphorylation activity was observed in the CstK_Y14F mutant (Fig. 3), suggesting that this site is central for CstK activation. In contrast, the CstK_Y209F mutant exhibited a slight hyperphosphorylation, which might indicate that Y209 only plays an accessory role in controlling CstK autophosphorylation. Finally, the CstK_T232A mutant showed a reduced CstK phosphorylation and displayed diminished kinase activity towards the exogenous substrate MBP. Note that mutating all three autophosphorylation sites fully abrogated CstK kinase activity. These results indicate that Y14 and T232 are the major phosphorylation sites in CstK and strongly suggest that CstK might to be a dual specificity (Thr/Tyr) kinase. We thus provide evidence for the efficiency of mass spectrometry profiling coupled to *in vitro* kinase assays to unambiguously demonstrate CstK Thr/Tyr kinase activity. From a general standpoint, this type of analysis provides an essential groundwork for mechanistic/functional studies of bacterial Ser/Thr/Tyr kinases and demonstrates the efficiency of combining genetics and mass spectrometry analyses with precise identification of phosphoacceptors, a prerequisite for a further understanding of the mode of action of CstK. *In vivo* experiments will be next required to assess the actual role of these different CstK phosphorylation sites in *C. burnetii* growth and virulence.

Overexpression of CstK reduces multiplication within infected cells. As a first step towards the understanding of CstK functions *in vivo*, and to appreciate the extent to which this kinase is required for growth and viability of *C. burnetii*, we attempted to inactivate the corresponding chromosomal gene. Unfortunately, after several attempts we were unable to generate a null mutant suggesting that *cstK* might be essential. However, during a multi-phenotypic high-content screen of a *C. burnetii* transposon mutant library (36) we isolated a mutant (Tn 2496) that carries a transposon insertion at position 156783, 32bp upstream of the starting codon of *cstK* (Fig. 4A). To determine the effect of this transposon insertion for *cstK* gene expression, we first assessed the expression level of *cstK* mRNA from the *C. burnetii* wild type and mutant Tn2496 strains. Surprisingly, *cstK* expression was significantly upregulated in the mutant strain suggesting that the transposon insertion may have released a transcriptional negative regulation (Fig. 4B). One could hypothesize that a putative transcriptional regulator might bind the *cstK* promoter and control its activity during host invasion.

Figure 4



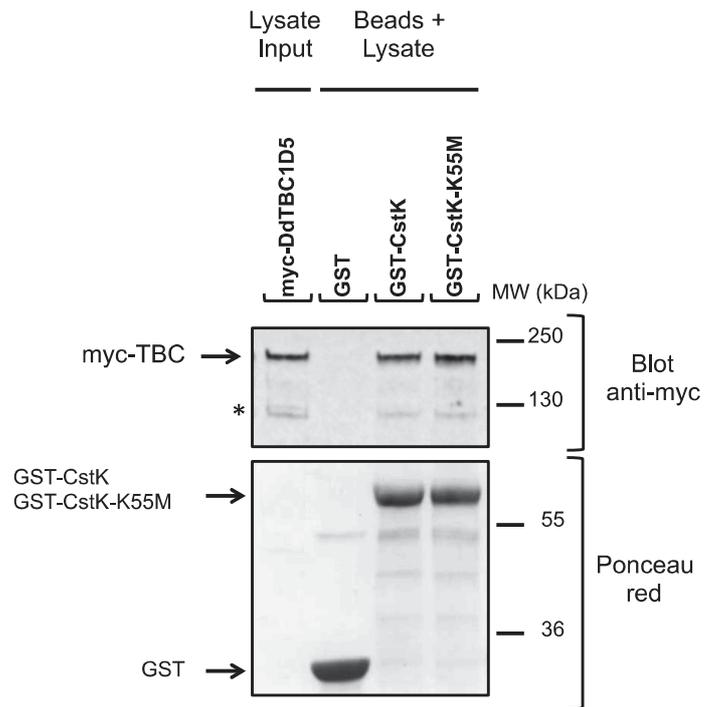
We next examined the phenotypic effects of overexpressing CstK in *C. burnetii*. This mutant was tested for its capacity of invading and replicating within host cells, and we could observe a significant growth defect over 7 days of infection (Fig. 4C). Accordingly, this was reflected in a strong reduction in the median size of intracellular *C. burnetii* colonies, which was half the size of that developed by wild-type *C. burnetii* (Fig. 4D). Therefore, we could conclude that CstK might participate in the formation of the *C. burnetii* replicative vacuole.

CstK specifically interacts with host cell proteins. Since CstK is a secreted protein, we assume that this kinase would interfere with host cell signal transduction pathways to subvert host cell defenses to the bacteria benefit. To identify host cell proteins that could interact with CstK, we made use of the model amoeba *Dictyostelium discoideum*. *D. discoideum* is an eukaryotic professional phagocyte amenable to genetic and biochemical studies. Lysate from cells overexpressing CstK tagged with a C-terminal FLAG epitope (CstK-FLAG) was incubated with beads coupled to an anti-FLAG antibody. Beads were extensively washed and bound proteins were separated by SDS-PAGE before mass-spectrometry analysis. Among several identified proteins (Table 4), we further characterized the interaction with a RabGAP/TBC domain-containing protein, DDB_G0280253 (UniProtKB - Q54VM3), here after referred to as DdTBC1D5. This 136.4 kDa protein is homologous to mammalian TBC1D5 (<http://dictybase.org>), a GTPase-activating protein (GAP) for Rab7 A (43). To verify the interaction between CstK and DdTBC1D5, we performed GST pull-down assays (Fig. 5). Fusion proteins made between GST and CstK were immobilized onto glutathione agarose beads and incubated with *D. discoideum* cell lysates expressing myc-tagged-DdTBC1D5 (myc-DdTBC1D5). Bound proteins were revealed by Western blot with an anti-myc antibody. As observed in Fig. 5, myc-DdTBC1D5 interacted both with native CstK (GST-CstK) and the catalytic mutant CstK-K55M (GST-CstK-K55M). As a control, DdTBC1D5 was not detected using GST alone. Therefore, we can conclude that CstK is able to interact with TBC1D5.

Next, we assessed whether CstK might phosphorylate the recombinant TBC1D5. Despite the *in silico* prediction of several Ser/Thr and Tyr phosphorylatable residues in TBC1D5, we failed to detect TBC1D5 phosphorylation using several *in vitro* kinases assays (data not shown).

However, lack of phosphorylation of host interactors of bacterial STPKs is not uncommon (20). Interaction between STPKs and host proteins might as well perturb protein interaction networks at play in host cells. The biochemical mechanisms of these pathogen-directed targeted perturbations of host cell-signaling networks are being actively investigated and the specific role of the CstK/TBC1D5 interaction during host invasion remains to be

Figure 5



elucidated. In mammals, TBC1D5 was suggested to function as a molecular switch between endosomal and autophagy pathways. Indeed TBC1D5 associates the retromer VPS29 subunit involved in endosomal trafficking, and upon autophagy induction, the autophagy ubiquitin-like protein LC3 can displace VPS29, thus orienting TBC1D5 functions towards autophagy instead of endosomal functions (44). It is thus tempting to propose that CstK might interfere with this tight regulation between TBC1D5, LC3 and VPS29, and redirect TBC1D5 functions to support efficient *C. burnetii* intracellular replication.

CONCLUSION

In conclusion, our results provide the first biochemical analysis of the secreted kinase CstK and its involvement in the process of infection and intracellular growth of *C. burnetii*. Our study also delineates important differences with the classical Ser/Thr kinases. In particular, we provided evidence that CstK is a dual kinase able to autophosphorylate on Thr and Tyr residues. Moreover, our overexpressing mutant suggested the presence of a negative transcriptional regulation of *cstK* expression and its phenotype highlighted the importance of regulating *cstK* expression during *C. burnetii* infections. Finally, the identification of candidate host interactors of CstK further corroborated an important role of the bacterial kinase during infection. Further work needs to be carried out to understand how CstK recognize these host substrates and how they participate in the establishment of *C. burnetii* parasitophorous vacuoles. Another perspective of this work is the opening of a new field of investigation for future drug development to fight this pathogen. Because CstK seems to be essential, specific inhibitors capable of preventing *C. burnetii* growth would be extremely useful for the development of new therapies.

FOOTNOTES

The authors wish to thank I. Zanella-Cléon from the Mass Spectrometry Unit (CCMP), UMS3444/US8 Biosciences Gerland Lyon Sud, for her excellent expertise and technical assistance. The authors also thank the Montpellier RIO imaging facility at the University of Montpellier 2. This work was supported by grants from the ATIP/AVENIR Program for V.M. and M.B., the Region Languedoc-Roussillon for S.B, and a Marie Curie CIG to E.M (grant n. 293731).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) CstK schematic representation. The kinase domain is shown by a shaded circle. The conserved lysine residue is indicated and the phosphorylated sites indicated by an asterisk. **(B) Biochemical activities of recombinant CstK.** CstK recombinant protein derivatives were overproduced, purified on glutathione-Sepharose 4B matrix and submitted to gel electrophoresis and stained with Coomassie Blue (upper panel). *In vitro* phosphorylation assays were performed with [γ - ^{33}P]ATP for 30 min and the eukaryotic substrate myelin basic protein (MBP) when required. Proteins were analyzed by SDS-PAGE, and radioactive bands were revealed by autoradiography (lower panel). The upper bands illustrate the autokinase activity of CstK, and the lower bands represent phosphorylated MBP. Standard proteins of known molecular masses were run in parallel.

Figure 2. Biochemical characterization of CstK. (A) A kinetic analysis was performed by incubation of CstK with [γ - ^{33}P]ATP over different times. Proteins were analyzed by SDS-PAGE, and radioactive bands were revealed by autoradiography **(B)** Effects of cations on autokinase activity of CstK. Purified CstK protein was subjected to *in vitro* autophosphorylation assays in the presence of [γ - ^{33}P]ATP and Mg^{2+} or Mn^{2+} . Phosphoproteins were separated by SDS-PAGE and then revealed by autoradiography.

Figure 3. *In vitro* phosphorylation of CstK mutant derivatives. The mutated variants CstK_Y14F (harboring a Tyr to Phe substitution at Y14), CstK_Y209F (harboring a Tyr to Phe substitution at Y209), CstK_T232A (harboring a Thr to Ala substitution at T232), or CstK_Y14F/Y209F/T232A (harboring all three substitutions) were incubated in presence of [γ - ^{33}P]ATP with or without the eukaryotic substrate myelin basic protein (MBP). Samples were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue (upper panel), and visualized by autoradiography (lower panel). The upper bands illustrate the autokinase activity of CstK, and the lower bands represent phosphorylated MBP. Standard proteins of known molecular masses were run in parallel (kDa lane).

Figure 4. Overexpression of CstK reduces multiplication within infected cells. (A) *C. burnetii* mutant *Tn2496* carries a transposon insertion at position 156783, 32bp upstream of the starting codon of *cstK* (*cbu_0175*). **(B)** The expression of *CstK* gene was measured by qRT-

PCR from a culture of wild type *C. burnetii* strain and *C. burnetii* mutant Tn2496. Data are the means \pm SEM of 4 independent experiments. ***, $p < 0.001$. **(C)** Vero cells were challenged with either *C. burnetii* wild-type (WT) or with the mutant Tn2496. Intracellular replication was monitored over 7 days of infection using a microplate reader exploiting the GFP expressed by both *C. burnetii* strains. **(D)** After 7 days of infection cells treated as in C were fixed and processed for automated image acquisition and analysis. Host cell nuclei were labelled with Hoechst (red) and *C. burnetii* colonies were visualized exploiting the GFP expressed by both mutants. The average size of *C. burnetii* colonies measured from 11207 cells infected by *C. burnetii* Tn2496 mutant was 161.12 pixels. The average size of *C. burnetii* colonies measured from 8612 cells infected by *C. burnetii* WT was 349.20 pixels.

Figure 5. CstK interacts with DdTBC1D5. The interaction between CstK and DdTBC1D5 was tested by GST pull-down analysis. The indicated GST fusion proteins were produced in bacteria, bound to glutathione beads, and then incubated with *D. discoideum* cell lysates expressing myc-DdTBC1D5. Beads were washed, eluted by boiling, and bound proteins were revealed by Western blot analysis with an anti-myc antibody (upper panel). Identical amounts of GST fusion proteins were used as verified by Ponceau red staining of the nitrocellulose membrane (lower panel). Positions of myc-DdTBC1D5 (calculated size 140kDa), GST-CstK and GST-CstK-K55M on the blot are indicated by arrows. Note that the major myc-DdTBC1D5 band (arrow) shows a slow migration profile during SDS-PAGE analysis and might correspond to unseparated dimers. Putative myc-DdTBC1D5 monomer is indicated by an asterisk.

REFERENCES

1. Rajagopal, L., Clancy, A., and Rubens, C. E. (2003) A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem* **278**, 14429-14441
2. Hussain, H., Branny, P., and Allan, E. (2006) A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **188**, 1628-1632

3. Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P. W., and Trombe, M. C. (2004) Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72**, 2434-2437
4. Jin, H., and Pancholi, V. (2006) Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J Mol Biol* **357**, 1351-1372
5. Av-Gay, Y., and Everett, M. (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **8**, 238-244
6. Chaba, R., Raje, M., and Chakraborti, P. K. (2002) Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. *Eur J Biochem* **269**, 1078-1085
7. Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Grana, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., Andre-Leroux, G., England, P., Takiff, H., Cervenansky, C., Cole, S. T., and Alzari, P. M. (2008) Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 193-202
8. Molle, V., and Kremer, L. (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol Microbiol* **75**, 1064-1077
9. Alber, T. (2009) Signaling mechanisms of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 650-657
10. Greenstein, A. E., Grundner, C., Echols, N., Gay, L. M., Lombana, T. N., Miecskowski, C. A., Pullen, K. E., Sung, P. Y., and Alber, T. (2005) Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 167-181
11. Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**, 730-732
12. Hakansson, S., Galyov, E. E., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (1996) The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* **20**, 593-603
13. Archambaud, C., Gouin, E., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., and Dussurget, O. (2005) Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **56**, 383-396

14. Lima, A., Duran, R., Schujman, G. E., Marchissio, M. J., Portela, M. M., Obal, G., Pritsch, O., de Mendoza, D., and Cervenansky, C. (2011) Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *J Proteomics* **74**, 1720-1734
15. Wang, J., Li, C., Yang, H., Mushegian, A., and Jin, S. (1998) A novel serine/threonine protein kinase homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the host infection site and is required for full virulence in neutropenic mice. *J Bacteriol* **180**, 6764-6768
16. Kristich, C. J., Wells, C. L., and Dunny, G. M. (2007) A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3508-3513
17. Beltramini, A. M., Mukhopadhyay, C. D., and Pancholi, V. (2009) Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect Immun* **77**, 1406-1416
18. Truong-Bolduc, Q. C., Ding, Y., and Hooper, D. C. (2008) Posttranslational modification influences the effects of MgrA on norA expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **190**, 7375-7381
19. Truong-Bolduc, Q. C., and Hooper, D. C. (2010) Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **192**, 2525-2534
20. Canova, M. J., and Molle, V. (2014) Bacterial Serine/Threonine Protein Kinases in Host-Pathogen Interactions. *J Biol Chem* **in press**
21. Madariaga, M. G., Rezai, K., Trenholme, G. M., and Weinstein, R. A. (2003) Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis* **3**, 709-721
22. Kazar, J. (2005) *Coxiella burnetii* infection. *Ann N Y Acad Sci* **1063**, 105-114
23. Arricau-Bouvery, N., and Rodolakis, A. (2005) Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* **36**, 327-349
24. Vogel, J. P. (2004) Turning a tiger into a house cat: using *Legionella pneumophila* to study *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol* **12**, 103-105
25. Omsland, A., Cockrell, D. C., Howe, D., Fischer, E. R., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Porcella, S. F., and Heinzen, R. A. (2009) Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4430-4434

26. Beare, P. A., Gilk, S. D., Larson, C. L., Hill, J., Stead, C. M., Omsland, A., Cockrell, D. C., Howe, D., Voth, D. E., and Heinzen, R. A. (2011) Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. *mBio* **2**, e00175-00111
27. Carey, K. L., Newton, H. J., Luhrmann, A., and Roy, C. R. (2011) The *Coxiella burnetii* Dot/Icm system delivers a unique repertoire of type IV effectors into host cells and is required for intracellular replication. *PLoS Pathog* **7**, e1002056
28. Beare, P. A., Larson, C. L., Gilk, S. D., and Heinzen, R. A. (2012) Two systems for targeted gene deletion in *Coxiella burnetii*. *Appl Environ Microbiol* **78**, 4580-4589
29. Chen, C., Banga, S., Mertens, K., Weber, M. M., Gorbaslieva, I., Tan, Y., Luo, Z. Q., and Samuel, J. E. (2010) Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21755-21760
30. Manstein, D. J., Schuster, H. P., Morandini, P., and Hunt, D. M. (1995) Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* **162**, 129-134
31. Alibaud, L., Cosson, P., and Benghezal, M. (2003) *Dictyostelium discoideum* transformation by oscillating electric field electroporation. *BioTechniques* **35**, 78-80, 82-73
32. Corrales, R. M., Molle, V., Leiba, J., Mourey, L., de Chastellier, C., and Kremer, L. (2012) Phosphorylation of mycobacterial PcaA inhibits mycolic acid cyclopropanation: consequences for intracellular survival and for phagosome maturation block. *J Biol Chem* **287**, 26187-26199
33. Slama, N., Leiba, J., Eynard, N., Daffe, M., Kremer, L., Quemard, A., and Molle, V. (2011) Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC dehydratases from *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase system. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 401-406
34. Leiba, J., Syson, K., Baronian, G., Zanella-Cleon, I., Kalscheuer, R., Kremer, L., Bornemann, S., and Molle, V. (2013) *Mycobacterium tuberculosis* maltosyltransferase GlgE, a genetically validated antituberculosis target, is negatively regulated by Ser/Thr phosphorylation. *J Biol Chem* **288**, 16546-16556
35. Leiba, J., Hartmann, T., Cluzel, M. E., Cohen-Gonsaud, M., Delolme, F., Bischoff, M., and Molle, V. (2012) A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. *J Biol Chem* **287**, 43607-43619

36. Martinez, E., Cantet, F., and Bonazzi, M. (2015) Generation and multi-phenotypic high-content screening of *Coxiella burnetii* transposon mutants. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e52851
37. Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52
38. Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**, 576-596
39. Voth, D. E., Howe, D., Beare, P. A., Vogel, J. P., Unsworth, N., Samuel, J. E., and Heinzen, R. A. (2009) The *Coxiella burnetii* ankyrin repeat domain-containing protein family is heterogeneous, with C-terminal truncations that influence Dot/Icm-mediated secretion. *J Bacteriol* **191**, 4232-4242
40. Voth, D. E., Beare, P. A., Howe, D., Sharma, U. M., Samoilis, G., Cockrell, D. C., Omsland, A., and Heinzen, R. A. (2011) The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates. *J Bacteriol* **193**, 1493-1503
41. Fiuza, M., Canova, M. J., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Cozzone, A. J., Mateos, L. M., Kremer, L., Gil, J. A., and Molle, V. (2008) From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J Biol Chem* **283**, 18099-18112
42. Molle, V., Leiba, J., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., and Kremer, L. (2010) An improved method to unravel phosphoacceptors in Ser/Thr protein kinase-phosphorylated substrates. *Proteomics* **10**, 3910-3915
43. Seaman, M. N., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E., and Bright, N. (2009) Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *Journal of cell science* **122**, 2371-2382
44. Popovic, D., and Dikic, I. (2014) TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO reports* **15**, 392-401
45. Beare, P. A., Sandoz, K. M., Omsland, A., Rockey, D. D., and Heinzen, R. A. (2011) Advances in genetic manipulation of obligate intracellular bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology* **2**, 97
46. Martinez, E., Cantet, F., Fava, L., Norville, I., and Bonazzi, M. (2014) Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. *PLoS Pathog* **10**, e1004013

47. Molle, V., Kremer, L., Girard-Blanc, C., Besra, G. S., Cozzone, A. J., and Prost, J. F. (2003) An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **42**, 15300-15309

TABLES

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Genotype or Description ^a	Source or Referenc
<i>E. coli</i> strains		
<i>E. coli</i> 10G	<i>E. coli</i> derivative ultra competent cells used to general cloning; F-mcrA D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) f80 <i>dlacZ</i> ÄM15 D <i>lacX74 endA1 recA1araD139</i> D (<i>ara, leu</i>)7697	Lucigen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star	F2 <i>ompT hsdSB</i> (rB2 mB2) <i>gal dcm</i> (DE3); used to express recombinant proteins in <i>E. coli</i>	Stratagen e
<i>Coxiella burnetii</i> strains		
GFP- <i>Coxiella burnetii</i> RSA439 NMII	<i>Coxiella burnetii</i> RSA439 NMII carrying a Tn7-CAT-GFP cassette in the intergenic region between CBU_1787 and CBU_1788	(45)
<i>Coxiella burnetii</i> Tn2496	<i>Coxiella burnetii</i> RSA439 NMII carrying an Himar1-CAT-GFP cassette 32 bp upstream of CBU_0175	(46)
<i>E. coli</i> plasmids		
pGEX(M)	pGEX with a 321-bp <i>EcoRI/BamHI</i> fragment from pET19b introducing a <i>HindIII</i> site in the pGEX polylinker	(47)

pGEX(M) <i>_cstK</i>	pGEX(M) derivative used to express GST-tagged fusion of CstK (Amp ^R)	This work
pGEX(M) <i>_cstK_K55M</i>	pGEX(M) derivative used to express GST-tagged fusion of CstK_K55M (Amp ^R)	This work
pGEX(M) <i>_cstK_Y14F</i>	pGEX(M) derivative used to express GST-tagged fusion of CstK_Y14F (Amp ^R)	This work
pGEX(M) <i>_CstK_Y209F</i>	pGEX(M) derivative used to express GST-tagged fusion of CstK_Y209F (Amp ^R)	This work
pGEX(M) <i>_cstK_T232A</i>	pGEX(M) derivative used to express GST-tagged fusion of CstK_T232A (Amp ^R)	This work
pGEX(M) <i>_CstK_Y14F/Y209F/T232A</i>	pGEX(M) derivative used to express GST-tagged fusion of CstK_Y14F/Y209F/T232A (Amp ^R)	This work
<i>Dictyostelium discoideum</i> plasmids		
pDXA-3C <i>_cstK</i>	vector for overexpression of CstK in <i>D. discoideum</i>	This work

^a Amp^R, ampicillin resistant; Cm^R, chloramphenicol resistant; Km^R, kanamycin resistant; Spec^R, spectinomycin resistant; Tet^R, tetracycline resistant

Table 2. Primers used in this study

Primers	5' to 3' Sequence^{a, b}
NtermCstK	TAT <u>GGATCCT</u> TAATGGCTTATATGAGGCTTAGT (<i>Bam</i> HI)
CtermCstK	TATAAGCTTTTAATCCCATTC AATATTTTC (<i>Hind</i> III)
RvCstK K55M	ATAAAAGAGCA T CGCCGCTCG
FwCstKY14F	CTTAGTGTGGCTGACTTTTTT G ATTTGAAGAAGGGCAAG
FwCstKY209F	GGGGCGACGGGCTATCGCT T TCTGTAACCCTCACATAAAG
FwCstKT232A	CATTCGTGAACAGTTTAAT G CTGCGGGCCATTTGCGATTAC
RT-PCR PRIMERS	
DotA-F	GCTCCCAGCATT C ATCCAGT
DotA-R	GGCACTTAACCAGCC C T C AT
CstK-F	GGCAAGGTATTAGGGCGGAA
CstK-R	GGGATTCTCACCATTGGCCT

^a Restriction sites are underlined and specified into brackets.

^b Mutagenized codons are shown in bold.

Table 3. Phosphoacceptors identified after phosphorylation of *C. burnetii* CstK. Sequences of the phosphorylated peptides identified in CstK as determined by mass spectrometry following tryptic digestion are indicated, and phosphorylated residues (pT or pY) are shown in bold.

Phosphorylated tryptic peptide sequence of CstK	Number of detected phosphate groups LC/MS/MS	Phosphorylated residue(s)
[8-18] LSVADF p YDLKK	1	Y14
[228-237] EQFN p TAGHLR	1	T232
[209-215] p YCNPHIK	1	Y209

Table 4. CstK-FLAG interacting proteins

Name, accession number and description
acpB [DDB_G0272104] F-actin-capping protein subunit alpha
act13 [DDB_G0274599] actin
act18 [DDB_G0289489] actin
ancA [DDB_G0267454] ADP/ATP translocase transmembrane protein mitochondrial substrate carrier family protein
capA-1 [DDB_G0272560] cAMP-binding protein
clmA [DDB_G0278685] clathrin assembly protein AP180.
DDB_G0270388 ubiquitin system component Cue domain containing protein
DDB_G0275603 Arf GTPase activating protein
DDB_G0280253 RabGAP/TBC domain-containing protein putative GTPase activating protein
DDB_G0290433 FK506-binding protein 15
DG1124 [DDB_G0274577] Calcium-binding EF-hand domain-containing protein
dymA [DDB_G0277849] dynamin A
epnA [DDB_G0291512] epsin
fbl [DDB_G0269878] fibrillar rRNA 2'-O-methyltransferase
gpdA [DDB_G0275153] gpd = Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase N
ifdA [DDB_G0269146] DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein eukaryotic translation initiation factor 4A
pefA [DDB_G0291081] similar to mammalian apoptosis component ALG-2.
tufM [DDB_G0289593] Elongation factor Tu, mitochondrial
ubqF [DDB_G0289449] ubiquitin F
vatD-1 [DDB_G0273071] vacuolar ATPase subunit D

2. Régulation par phosphorylation de la tyrosine phosphatase PtpA sécrétée par *Staphylococcus aureus*.

A. Résumé de l'article

L'augmentation exponentielle du nombre de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques, retrouvées majoritairement lors de maladies nosocomiales hospitalières, représente un problème de santé majeur. Par conséquent, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques afin de lutter contre ce pathogène humain est devenue une priorité.

La phosphorylation des protéines, étant un mécanisme clef régulant de nombreux processus de régulation, que ce soit chez les eucaryotes ou les procaryotes, correspond donc à une cible thérapeutique intéressante. *S. aureus* possède la tyrosine phosphatase de bas poids moléculaire PtpA, similaire à la phosphatase homonyme de *M. tuberculosis*. Il a été récemment démontré que PtpA de *M. tuberculosis* était régulée *via* phosphorylation par la tyrosine kinase PknA, et qu'elle était sécrétée dans la cellule hôte lors de l'infection. Bien que PtpA de *S. aureus* ait été précédemment étudiée afin de confirmer son activité phosphatase, aucune donnée ne montrait qu'elle était sécrétée, ni si elle pouvait être régulée *via* phosphorylation.

Les tests de phosphorylation *in vitro* avec la tyrosine kinase CapA1B2 de *S. aureus* ont permis de mettre en évidence une phosphorylation de PtpA sur deux résidus tyrosines adjacents. De plus, des tests d'activité réalisés avec la protéine recombinante sauvage ont permis de démontrer qu'elle possédait bien une activité de tyrosine phosphatase, négativement régulée par la phosphorylation de CapA1B2.

Enfin, la sécrétion de PtpA dans le milieu de culture de *S.aureus* pendant la phase de croissance a été montrée. En effet, la phosphatase a été détectée dans le surnageant de culture par western blot, bien que PtpA ne possède pas de signal de sécrétion.

B. Article II :

Phosphorylation-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* secreted tyrosine phosphatase PtpA

Solène Brelle¹, Grégory Baronian¹, Sylvaine Huc-Brandt¹, Martin Cohen-Gonsaud², Laila Gannoun Zaki¹, Markus Bischoff³, and Virginie Molle^{1*}

¹Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université Montpellier 2, CNRS, UMR 5235, Montpellier, France

²Centre de Biochimie Structurale, CNRS UMR 5048, INSERM U554, Université Montpellier I et II, Montpellier, France

³Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland, Homburg/Saar, Germany

***Corresponding author:**

VM: Tel: (+33) 4 67 14 47 25, Fax: (+33) 4 67 14 42 86, E-mail: virginie.molle@univ-montp2.fr

Running title: Phosphorylation-mediated regulation of the secreted *S. aureus* PtpA



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Phosphorylation-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* secreted tyrosine phosphatase PtpA



Solène Brelle^a, Grégory Baronian^a, Sylvaine Huc-Brandt^a, Laila Gannoun Zaki^a,
Martin Cohen-Gonsaud^b, Markus Bischoff^c, Virginie Molle^{a,*}

^a Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université Montpellier 2, CNRS UMR 5235, Montpellier, France

^b Centre de Biochimie Structurale, CNRS UMR 5048, INSERM U554, Université Montpellier I et II, Montpellier, France

^c Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland, Homburg/Saar, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2015

Accepted 27 November 2015

Available online 8 December 2015

Keywords:

Staphylococcus aureus

Protein tyrosine phosphatase A

Phosphorylation

Tyrosine kinase

Secretion

ABSTRACT

Due to the emergence of methicillin-resistant strains, *Staphylococcus aureus* has become a major public-health threat. Studies aimed at deciphering the molecular mechanism of virulence are thus required to identify new targets and develop efficient therapeutic agents. Protein phosphorylations are known to play key regulatory functions and their roles in pathogenesis are under intense scrutiny. Here we analyzed the protein tyrosine phosphatase PtpA of *S. aureus*, a member of the family of low molecular weight protein tyrosine phosphatases that are often secreted by pathogenic bacteria. We report for the first time that PtpA is phosphorylated *in vitro* by the *S. aureus* tyrosine kinase CapA1B2. A mass spectrometry approach allowed determining that Tyr122 and Tyr123 were the only two residues phosphorylated by this kinase. This result was confirmed by analysis of a double PtpA_Y122A/Y123A mutant that showed no phosphorylation by CapA1B2. Interestingly, PtpA phosphatase activity was abrogated in this mutant, suggesting a key regulatory function for these two tyrosine residues. This was further reinforced by the observation that CapA1B2-mediated phosphorylation significantly increased PtpA phosphatase activity. Moreover, we provide evidence that PtpA is secreted during growth of *S. aureus*. Together our results suggest that PtpA is an exported *S. aureus* signaling molecule controlled by tyrosine phosphorylation which may interfere with host cell signaling.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is currently the most common cause of infections in hospitalized patients, and infections caused by this pathogen can involve almost any organ system [1]. The success of *S. aureus* as a pathogen and its ability to cause such a wide range of infections are the result of its large arsenal of virulence factors that is controlled by a sophisticated network of regulatory molecules. The increase in multi-resistant variants of this species, coupled with its increasing prevalence as a nosocomial pathogen, is of major concern [2]. Indeed, infections with methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) pose a growing public health problem, causing severe mortality and morbidity [3]. Treatment options for MRSA are highly limited, and resistance to almost all kinds of antibiotics has been reported, highlighting the need for new drugs with novel

mechanisms of action [4].

Signal transduction through reversible protein phosphorylation is a key regulatory mechanism of both prokaryotes and eukaryotes. Given the success of drugs against human phosphosignaling enzymes [5,6], their prokaryotic counterparts could provide similarly tractable targets. To overcome the stressful conditions imposed by a host, pathogens have evolved various protective and offensive responses generally achieved through cascades of phosphorylation reactions. Many of the stimuli encountered are transduced *via* sensor kinases in the membrane, allowing the pathogen to adapt for survival in hostile environments. In addition to the classical two-component systems and the Ser/Thr/Tyr protein kinases, *S. aureus* produces two protein tyrosine phosphatases (PTPs), PtpA and PtpB [7]. Sequence similarity groups PtpA and PtpB with the family of low molecular weight protein tyrosine phosphatases (LMW-PTP) or acid phosphatases which are often secreted.

Based on recent studies on the *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) PtpA homologue [8,9] demonstrating that Ptp^{Mtb} serves as a

* Corresponding author.

E-mail address: virginie.molle@univ-montp2.fr (V. Molle).

substrate for the protein tyrosine kinase A (PtkA), we decided to investigate whether PtpA from *S. aureus* might be also regulated by tyrosine phosphorylation. In this study, we show that the *S. aureus* chimeric tyrosine kinase CapA1B2 [10] phosphorylates PtpA on Tyr122 and Tyr123 residues that are also essential for its phosphatase activity. Our studies also revealed that CapA1B2-mediated phosphorylation significantly increases PtpA phosphatase activity. Finally, we demonstrated that PtpA is secreted during *S. aureus* growth.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, media, and growth conditions

Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in LB medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin when required. *S. aureus* isolates were plated on Tryptic Soy Agar (TSA) supplemented with 10 µg/ml erythromycin, when required, or grown in Tryptic Soy Broth (TSB) medium at 37 °C and 150 rpm.

2.2. Cloning, expression and purification of recombinant PtpA and mutant proteins

The *ptpA* gene was amplified by PCR using *S. aureus* N315 chromosomal DNA as a template with the primers listed in Table 2 containing an *Nde*I and a *Hind*III restriction site, respectively. The corresponding amplified product was directly ligated using the ClonEZ PCR cloning kit (Genscript) into the pETPhos plasmid [11], a variant of pET15b (Novagen) that includes a tobacco etch virus (TEV) protease site instead of the thrombin site, and a N-terminal His-tag free of Ser/Thr/Tyr residues, thus generating pETPhos_*ptpA*. pETPhos_*ptpA* derivatives harboring tyrosine to alanine or aspartic acid to alanine substitutions were generated by using the Quik-Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). All constructs were verified by DNA sequencing. Recombinant strains harboring the different constructs were used to inoculate 200 ml of LB medium supplemented with ampicillin, and resulting cultures were incubated at 37 °C with shaking until the optical density of the

culture reached an A_{600} of 0.5. IPTG (1 mM final) was added to induce the overexpression, and growth was continued overnight at 16 °C. Purifications of the His-tagged recombinants were performed using TALON[®] metal affinity resin (Clontech) accordingly to the manufacturer's instructions.

2.3. Construction of the *S. aureus ptpA* deletion

1-Kilobase fragments, containing the flanking regions of the *ptpA* (NWMN_1819) gene were amplified by PCR from chromosomal DNA of *S. aureus* strain Newman using primer pairs MBH381/MBH382 and MBH383/MBH384, respectively (Table 2). The PCR products were digested with *Kpn*I/*Xho*I and *Bam*HI/*Sac*I, respectively, and cloned together with the *Xho*I/*Bam*HI-digested lox66-*aphAIII*-lox71 resistance cassette (obtained from pBT2-*arcA*) into suicide vector pBT to generate plasmid pBT_*ptpA*_KO-lox-*aph*. Plasmid pBT_*ptpA*_KO-lox-*aph* was electroporated into *S. aureus* strain RN4220 to obtain strain RN4220_Δ*ptpA*::lox-*aph*, in which the *ptpA* gene was replaced by the lox66-*aphAIII*-lox71 cassette by allelic replacement. RN4220_Δ*ptpA*::lox-*aph* was then used as a donor for transducing the *ptpA* deletion into *S. aureus* Newman. The deletion of *ptpA* in Newman Δ*ptpA*_lox-*aph* was confirmed by PCR, and DNA sequencing.

2.4. Construction of the *S. aureus ptpA*_flag cis-complementation strain Newman *ptpA*::*ptpA*_flag

For cis-complementation of the *ptpA* mutation in strain Newman Δ*ptpA*_lox-*aph* with a flag-tagged *ptpA* variant, a 1.4-kb fragment containing the wild-type *ptpA* allele and 0.7-kb of the upstream region was amplified by PCR from chromosomal DNA of *S. aureus* strain Newman using the primer pair Nterm_PtpA-flag_EcoRI/pEC/Cterm_PtpAflag_BamHI_pEC (the latter one including a flag tag sequence) (Table 2). The resulting PCR product was digested with *Bam*HI/*Eco*RI, and subsequently cloned into *Bam*HI/*Eco*I-digested vector pEC1 to generate the suicide plasmid pEC1_*ptpA*-flag. Plasmid pEC1_*ptpA*-flag was then electroporated into a marker-free *ptpA* variant of *S. aureus* strain RN4220, which was constructed by treatment of RN4220_Δ*ptpA*::lox-*aph* with the

Table 1
Strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmids	Genotype or description	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
<i>E. coli</i> 10G	<i>E. coli</i> derivative ultra competent cells used to general cloning; F- <i>mcrA</i> D(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) <i>f80dlacZ</i> Δ <i>M15</i> D <i>lacX74</i> <i>endA1</i>	Lucigen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star	<i>recA1</i> <i>araD139</i> D (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> - <i>tonA</i>	Stratagene
<i>S. aureus</i> strains		
RN4220	NCTC 8325-4 r ⁻ m ⁺ (restriction negative, modification positive)	[23]
RN4220 Δ <i>ptpA</i> _lox- <i>aph</i>	RN4220 Δ <i>ptpA</i> ::lox66- <i>aphAIII</i> -lox71	This work
RN4220 Δ <i>ptpA</i>	RN4220 Δ <i>ptpA</i> ::lox72	This work
Newman Δ <i>ptpA</i> _lox- <i>aph</i>	Newman Δ <i>ptpA</i> ::lox66- <i>aphAIII</i> -lox71	This work
Newman Δ <i>ptpA</i> :: <i>ptpA</i> _Flag	Newman Δ <i>ptpA</i> derivative cis-complemented with pEC1_ <i>ptpA</i> _Flag	This work
<i>E. coli</i> plasmids		
pEC1	pUC19 derivative containing the 1.45-kb <i>Clal</i> <i>erm</i> (B) fragment of Tn551	[24]
pEC1_PtpA_Flag	pEC1 with a 1.4-kb fragment covering the <i>ptpA</i> ORF including a C-terminal flag tag, and 0.7-kb of the upstream region.	This study
pETPhos	pET-15b (Novagen) derivative including the replacement of the thrombin site coding sequence with a tobacco etch virus (TEV) protease site and Ser to Gly mutagenesis in the N-term His-tag	[11]
pETPhos_ <i>ptpA</i>	pETPhos derivative used to express His-tagged fusion of <i>Staphylococcus aureus</i> PtpA WT in <i>E. coli</i>	This study
pETPhos_ <i>ptpA</i> _D120A	pETPhos derivative used to express His-tagged fusion of <i>Staphylococcus aureus</i> PtpA_D120A in <i>E. coli</i>	This study
pETPhos_ <i>ptpA</i> _Y122A/Y123A	pETPhos derivative used to express His-tagged fusion of <i>Staphylococcus aureus</i> PtpA_Y122A/Y123A in <i>E. coli</i>	This study
pQE30_ <i>capA1B2</i>	pQE30 derivative used to express His-tagged fusion of <i>Staphylococcus aureus</i> CapA1B2	[20]

Table 2

Primers used in this study.

Primers	5' to 3' Sequence ^{a,b}
Nterm PtpA NdeI IF_Phos	ATTTCAGGGCCATATGGTAGATGTAGCATTGTCTGTCTT (<i>NdeI</i>)
Cterm PtpA HindIII IF_Phos	TATCATCGATAAGCTTCTACCCCTCTTTCAAATTTGCATC (<i>HindIII</i>)
MBH381	gtcgGTACCTTCAGATACATAATGCAACGC (<i>KpnI</i>)
MBH382	ctgctcgAGACAGACAAATGCTACATCTACC (<i>XhoI</i>)
MBH383	gtcggatcTTGTGATAATTTAATAGACTACATCG (<i>BamHI</i>)
MBH384	gtcggatcCATAGGGACATAGCAAGTACG (<i>SacI</i>)
Nterm_PtpAflag_EcoRI_pEC	TATTGCGAATTCGATACCATCCATTAATCAGG (<i>EcoRI</i>)
Cterm_PtpAflag_BamHI_pEC	TATCGATCCTTATTTATCATCATCATCTTTGTAATCGATATCGTGATCTTTGTAATCACCATCGTGATCTTTGTAATCCCCCTCTTTCAAATTTGCATC (<i>BamHI</i>)
PtpA_D120A	GAGTGATGTACCA GCT CCACTACTACCG
PtpA_Y122A/Y123A	GTACCAGATCC AGCCG CCACGAATAATTTTG

^a Restriction sites are underlined and specified into brackets.^b Mutagenized codons are shown in bold.

Cre recombinase expressed from the temperature-sensitive vector pRAB1 as described before [12]. A RN4220 derivative that integrated pEC1_ptpA-flag was subsequently used as a donor for transducing the *cis*-integrated pEC1_ptpA-flag into Newman Δ ptpA_lox_aph, thereby replacing the *aph*-tagged *ptpA* deletion with the flag-tagged *ptpA*. Replacement of the *ptpA* deletion with the flag-tagged *ptpA* in Newman Δ ptpA::ptpA_Flag was confirmed by sequencing.

2.5. Immunoprecipitation and immunoblotting

For immunoprecipitations, *S. aureus* Newman Δ ptpA and its *cis*-complemented *S. aureus* derivative Newman Δ ptpA::ptpA_Flag were grown in TSB broth to exponential phase (A_{600} of 0.5), and the culture supernatants were collected by centrifugation at 4 °C, 5000 rpm for 20 min. The supernatants were filtered through 0.2 μ m filter units and incubated overnight at 4 °C with anti-flag monoclonal antibodies coated on agarose beads (Genscript) on a rotative wheel. Beads were then washed three times with TBS. Bound proteins were stripped off by boiling in Laemmli buffer, and protein samples were subsequently analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-flag antibodies (Genscript) in conjunction with secondary anti-rabbit antibodies labeled with an IRDye 800CW infrared dye (LiCOR).

2.6. In vitro kinase assays

In vitro phosphorylation was performed with 4 μ g of PtpA protein or mutant derivatives in 20 μ l of buffer P (25 mM Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM DTT; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 50 μ M ATP) with 200 μ Ci ml⁻¹ (65 nM) [γ -³³P]ATP (PerkinElmer, 3000 Ci mmol⁻¹), and 0.5 μ g of CapA1B2 kinase for 30 min at 37 °C. Control experiments were conducted under the same conditions but without kinase. Cloning, expression and purification of the CapA1B2 kinase from *S. aureus* were done as previously described [10]. Reactions were stopped by addition of an equal volume of 5 \times Laemmli buffer and heated at 100 °C for 5 min. After electrophoresis, gels were soaked in 16% TCA for 10 min at 90 °C, and dried. Radioactive proteins were visualized by autoradiography.

2.7. Mass spectrometry analysis

For mass spectrometry analysis, PtpA was phosphorylated as described above, with the exception that [γ -³³P]ATP was replaced with 5 mM cold ATP. Subsequent mass spectrometric analyses were performed as previously reported [13–16]. Spectra were analyzed with the paragon algorithm from the ProteinPilot[®] 2.0 database-searching software (Applied Biosystems) using the

phosphorylation emphasis criterion against a homemade database that included the sequence of PtpA.

2.8. PtpA phosphatase activity assay

PtpA phosphatase activity was determined using p-nitrophenyl phosphate (pNPP) as chromogenic substrate according to published protocols [7,9]. Purified wild type PtpA or mutant PtpA recombinant protein (0.25 μ M) was added to the reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 5 mM DTT). When necessary, purified CapA1B2 recombinant protein kinase was added to assay its effect on PtpA phosphatase activity.

3. Results and discussion

3.1. PtpA is phosphorylated in vitro by the chimeric CapA1B2 tyrosine protein kinase

A new family of protein tyrosine-kinases harboring a P-loop type nucleotide binding-domain with a Walker A motif has been described. They have been called BY-kinases (Bacterial-tyrosine-kinases) as they are only found in bacterial genomes [17,18]. They have been proposed to participate in the regulation of several cellular processes but to date, their best-documented cellular function concerns capsular polysaccharide synthesis in which they act as co-polymerase in the multiprotein capsule assembly machinery [19]. In *S. aureus*, two BY-kinases (CapB1 and CapB2) together with their cognate transmembrane modulators (CapA1 and CapA2) have been identified [10]. Reproducing the Gram-negative organization of BY-kinases by direct linkage of the Cap5A1Ct fragment (herein called CapAct) to the N-terminal extremity of Cap5B2 (herein called CapB) allowed the production of a fully active soluble chimeral protein called CapA1B2 that proved to be very useful to identify specific substrates [10].

Based on recent studies on the *M. tuberculosis* (Mtb) PtpA homologue [8,9], showing that PtpA^{Mtb} activity is modulated by the cognate protein tyrosine kinase A, we decided to investigate whether this staphylococcal BY-kinase might regulate *S. aureus* PtpA phosphatase activity, as to date only one substrate has been identified [20]. This was first investigated *in vitro* in the presence of CapA1B2. The soluble chimeric kinase CapA1B2 from *S. aureus* was expressed as His-tagged fusion protein and purified from *E. coli* as reported earlier [10]. This purified kinase was incubated with *S. aureus* PtpA and [γ -³³P]-ATP, and protein phosphorylation was revealed by autoradiography after protein separation by SDS-PAGE. As observed in Fig. 1A, the presence of an intense radioactive band of 20 kDa corresponding to PtpA indicated that PtpA was phosphorylated upon addition of CapA1B2. Note that CapA1B2 was also

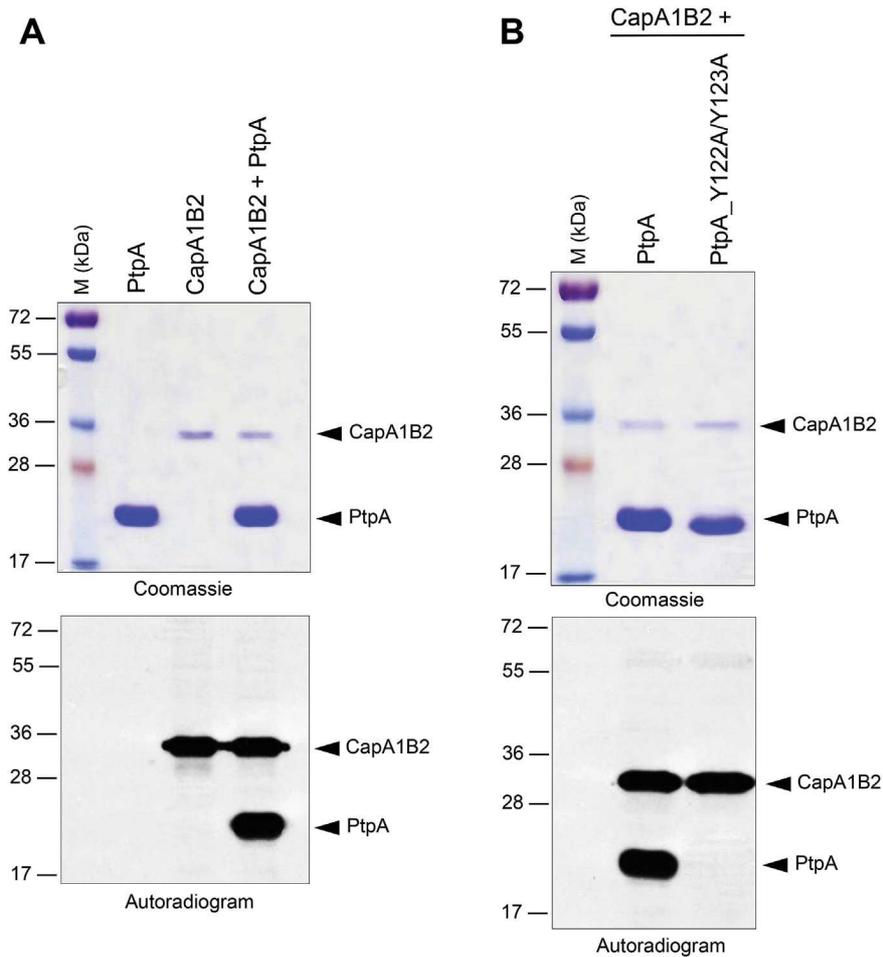


Fig. 1. (A) *In vitro* phosphorylation of PtpA. The recombinant PtpA encoded by the *S. aureus* genome was expressed and purified as a His-tagged fusion in *E. coli* and incubated in presence of [γ - 33 P]-ATP with the *S. aureus* CapA1B2 tyrosine kinase. Samples were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue (upper panel), and visualized by autoradiography (lower panel). The upper bands illustrate the autokinase activity of CapA1B2, and the lower bands represent phosphorylated PtpA proteins. Standard proteins of known molecular masses were run in parallel (kDa lane). (B) *In vitro* phosphorylation of PtpA mutant derivatives. The mutated variants PtpA_D120A (harboring a Asp to Ala substitution at D120), PtpA_Y122A (harboring a Tyr to Ala substitution at T122), or PtpA_Y123A (harboring a Tyr to Ala substitution at T123) were expressed and purified as a His-tagged fusion in *E. coli* and incubated in presence of [γ - 33 P]-ATP with the purified His-tagged *S. aureus* CapA1B2 kinase. Samples were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue (upper panel), and visualized by autoradiography (lower panel). The upper bands illustrate the autokinase activity of CapA1B2, and the lower bands represent phosphorylated PtpA mutant proteins. Standard proteins of known molecular masses were run in parallel (kDa lane). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

autophosphorylated as previously reported [10,20]. The presence of PtpA did not reduce CapA1B2 autophosphorylation, suggesting that CapA1B2 is not a substrate for PtpA, thus excluding a feedback loop between both proteins. As expected, no radioactive band was observed in the absence of the kinase, confirming that PtpA is a cognate substrate of CapA1B2.

3.2. PtpA is phosphorylated on Tyr122 and Tyr123 residues

Mass spectrometry was used to identify and localize the phosphorylation site(s) on *S. aureus* PtpA. *In vitro* phosphorylated PtpA following incubation with CapA1B2 was subjected to mass spectrometric analysis after tryptic digestion and phosphopeptides enrichment. A sequence coverage of 98% that included all Tyr residues was obtained. The MS/MS spectra unambiguously identified the presence of two phosphate groups (data not shown), indicating that PtpA is phosphorylated by CapA1B2 on Tyr122 and Tyr123, respectively.

To confirm that only the identified residues are phosphorylated *in vitro*, these residues were mutated to alanine. The juxtaposition

of Tyr122 and Tyr123 strongly suggested that both residues are correctly exposed to undergo phosphorylation, hampering thus phosphorylation analysis of individual residues. We therefore constructed a double mutant where both Tyr122 and Tyr123 were mutated to alanine. The corresponding phosphoablative PtpA_Y122A/Y123A variant was expressed as a His-tagged protein, purified and incubated with CapA1B2 in the presence of [γ - 33 P]-ATP. Following separation by SDS-PAGE and analysis by autoradiography, total abrogation of the phosphorylation signal was observed with this variant, strongly supporting our hypothesis that Tyr122 and Tyr123 are the main phosphorylation sites for CapA1B2 (Fig. 1B).

3.3. Both Tyr122 and Tyr123 are essential for PtpA phosphatase activity

Since tyrosine phosphorylation is a well-described mechanism to control protein activity, phosphorylation of Tyr122 and Tyr123 might regulate PtpA phosphatase activity. To assess the role of Tyr122 and Tyr123 on PtpA phosphatase activity, we first made use

of the phospho-ablative mutant, PtpA_Y122A/Y123A, described above. By assaying the PtpA *in vitro* phosphatase activity, we revealed that this variant was as inactive as the catalytically deficient PtpA derivative PtpA_D120A (Fig. 2A). Residue D120 corresponds to the first aspartate residue among D residues in the conserved PtpA catalytic loop. The defective phosphatase activity in PtpA_D120A confirmed the essential role of D120 for PtpA phosphatase activity, which is in agreement with what was observed for PtpA homologues in other species [8]. Furthermore, our mutagenesis data indicate that the tyrosine residues Y122/Y123 are both indispensable for PtpA activity and strongly suggest that phosphorylation-mediated regulation of these residues might interfere with PtpA phosphatase activity. Noteworthy, these defects were not due to a tertiary structure change in the mutants, as inferred by analyses of the trypsinolysis kinetics of wild type and mutated PtpA proteins that showed comparable profiles (data not shown). Based on the X-ray structure, the function attributed to the Y122 and Y123 residues is to contribute to the deepening of the active site pocket, likely excluding pSer and pThr as potential substrates, thus being critical for PtpA activity and specificity towards tyrosine phosphorylated substrates (Fig. 3) [21].

3.4. Tyrosine kinase-mediated phosphorylation positively regulates PtpA activity *in vitro*

To monitor the effect of PtpA phosphorylation by CapA1B2, we measured PtpA phosphatase activity in the presence of the recombinant CapA1B2 kinase. We found that CapA1B2 increased PtpA phosphatase activity (30% activation upon adding 0.25 μ M CapA1B2) in a dose-dependent manner (Fig. 2B). Thus, it can be inferred that PtpA phosphorylation in *S. aureus* positively regulates

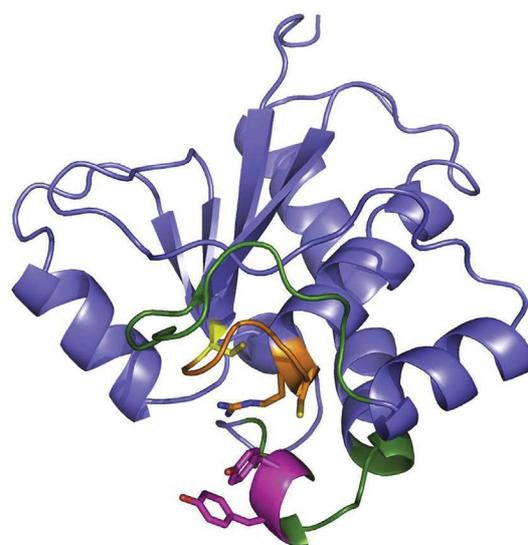


Fig. 3. Mapping of the PtpA phosphorylation sites. The structure of *S. aureus* PtpA (PDB3ROF) is represented as a cartoon. The catalytic cysteine, Cys8, is shown in yellow, the P-loop bearing the CX4CR (residues 6 to 12) motif common to LMW-PTPs is shown in orange. The active-site cavity defined by two loop regions is shown in green. The two adjacent tyrosine residues, Tyr122 and Tyr123 are shown in pink. While these tyrosines function is likely to exclude pSer and pThr as potential phosphoacceptors, their phosphorylation will certainly exclude any non-phosphorylated peptide to enter the catalytic groove. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

its activity, supporting the view that this post-translational modification plays a role in regulating PtpA activity.

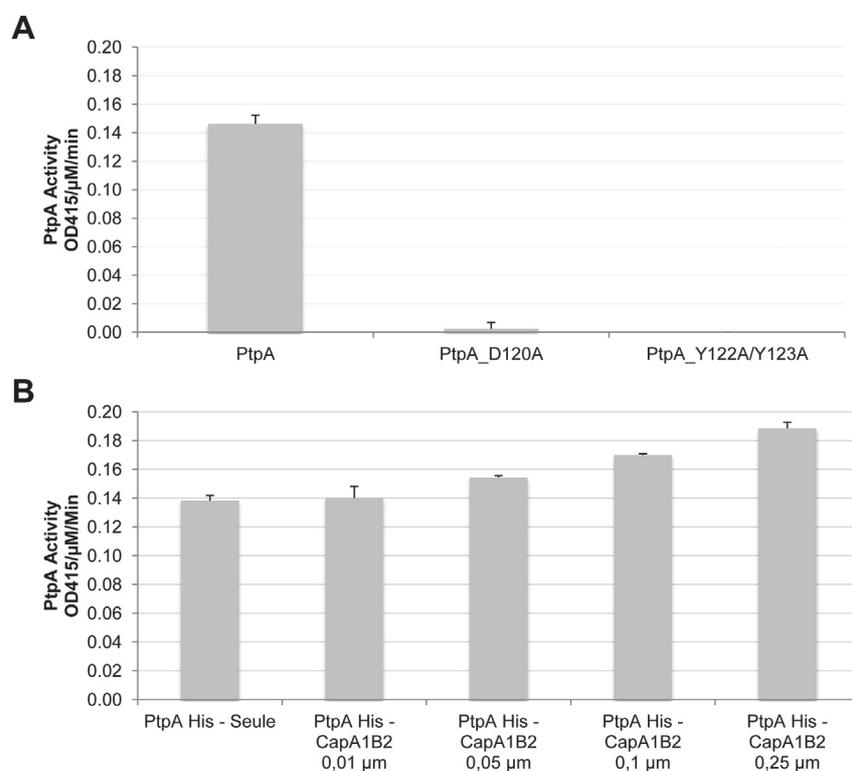


Fig. 2. Phosphatase activity of PtpA. (A) 0.25 μ M of PtpA or mutant derivatives were used to test their phosphatase activities by using p-nitrophenyl phosphate (pNPP) as a substrate. Values represent mean \pm S.D. of PtpA phosphatase activity from triplicate of a representative experiment. (B) Recombinant CapA1B2 enhances PtpA phosphatase activity *in vitro*. 0.25 μ M of PtpA protein were used in each reaction with increasing concentration of CapA1B2 (0.01, 0.05, 0.1 and 0.25 μ M). Values are the mean \pm S.D. of PtpA phosphatase activity from triplicate of a representative experiment.

3.5. The *S. aureus* PtpA protein can be released during growth

While bacterial tyrosine phosphatases can be intimately involved in a number of cellular processes, one major theme has become apparent: involvement of the LMW-PTPs family as secreted effector proteins with the potential for manipulation of host cell signal transduction pathways. To determine whether *S. aureus* PtpA is secreted by *S. aureus*, we created a Flag-tag translational fusion of the *ptpA* gene, and introduced this construct into *S. aureus* Newman Δ *ptpA* strain lacking the expression of endogenous PtpA. The resulting plasmid drives high levels of expression of the PtpA-Flag fusion protein. Cells expressing the PtpA-Flag fusion protein were grown in liquid media for only 2 h in order to minimize cell death and lysis, and PtpA-Flag protein contents were determined in culture supernatants by anti-flag immunoprecipitation followed by Western-blot analysis (Fig. 4). As shown in Fig. 4, cultures expressing the PtpA-Flag fusion construct allowed the detection of PtpA in culture supernatants, while the negative secretion control corresponding to the *S. aureus* Newman Δ *ptpA* strain pSC300 produced no signal. From these results, it appears that PtpA is indeed released by *S. aureus* into the growth medium. Notably, PtpA does not exhibit a general export pathway signal sequence at its N-terminus, leaving the question open, how this protein is exported by *S. aureus*.

In conclusion, although the study of host-pathogen interactions is regarded today as a powerful tool to investigate infectious diseases, much remains to be discovered about the role of PtpA during infection, including its precise secretion and molecular function in order to decipher the dynamics of its interactions with specific host substrates. Understanding how *S. aureus* PtpA participates in

controlling host invasion and persistence represents a promising approach to better understand essential processes of *S. aureus* pathogenicity. The role of PtpA phosphorylation by CapA1B2 still needs to be defined. Mutational analyses of PtpA showed that CapA1B2 could phosphorylate two adjacent tyrosine residues of PtpA. This result is in concordance with human low-molecular-mass protein tyrosine phosphatase B expressed in T-lymphocytes, where two adjacent tyrosine residues can be phosphorylated alternatively by a tyrosine kinase [22]. Thus, one may hypothesize that the phosphorylation of PtpA might be needed to retain its activity within the host. Alternatively, phosphorylation might be needed for PtpA secretion from the pathogen through the phagosome membrane to the host cytosol. Therefore, further experiments are now needed to characterize the role of its phosphorylation-dependent activity regarding its secretion and interaction with host protein substrates in order to assess its differential roles in the physiology of *S. aureus*.

Acknowledgments

The authors wish to thank I. Zanella-Cléon from the Mass Spectrometry Unit (CCMP), UMS3444/US8 Biosciences Gerland Lyon Sud, for her excellent expertise and technical assistance, and C. Grangeasse (IBCP, Lyon) for providing the strain overexpressing the kinase CapA1B2. This work was supported by grants from the ATIP/AVENIR Program for V.M., the Region Languedoc-Roussillon for S.B., and the Deutsche Forschungsgemeinschaft grant BI 1350/1–2 to M.B.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.123>.

References

- [1] F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus* infections, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 520–532.
- [2] R.J. Gordon, F.D. Lowy, Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *Clin Infect Dis.* 46 (Suppl 5) (2008) S350–S359.
- [3] R.M. Klevens, M.A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L.H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J.M. Townes, A.S. Craig, E.R. Zell, G.E. Fosheim, L.K. McDougal, R.B. Carey, S.K. Fridkin, M.I. Active Bacterial Core surveillance, Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States, *JAMA* 298 (2007) 1763–1771.
- [4] E. Klein, D.L. Smith, R. Laxminarayan, Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005, *Emerg. Infect. Dis.* 13 (2007) 1840–1846.
- [5] P. Cohen, Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 309–315.
- [6] Z.Y. Zhang, Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 416–423.
- [7] D. Soulat, E. Vaganay, B. Duclos, A.L. Genestier, J. Etienne, A.J. Cozzone, *Staphylococcus aureus* contains two low-molecular-mass phosphotyrosine protein phosphatases, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 5194–5199.
- [8] H. Bach, K.G. Papavinasundaram, D. Wong, Z. Hmama, Y. Av-Gay, *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B, *Cell Host Microbe* 3 (2008) 316–322.
- [9] P. Zhou, W. Li, D. Wong, J. Xie, Y. Av-Gay, Phosphorylation control of protein tyrosine phosphatase A activity in *Mycobacterium tuberculosis*, *FEBS Lett.* 589 (2015) 326–331.
- [10] D. Soulat, J.M. Jault, B. Duclos, C. Geourjon, A.J. Cozzone, C. Grangeasse, *Staphylococcus aureus* operates protein-tyrosine phosphorylation through a specific mechanism, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 14048–14056.
- [11] M.J. Canova, L. Kremer, V. Molle, pETPhos: a customized expression vector designed for further characterization of Ser/Thr/Tyr protein kinases and their substrates, *Plasmid* 60 (2008) 149–153.
- [12] T. Hartmann, B. Zhang, G. Baronian, B. Schulthess, D. Homerova, S. Grubmuller, E. Kutzner, R. Gaupp, R. Bertram, R. Powers, W. Eisenreich, J. Kormanec, M. Herrmann, V. Molle, G.A. Somerville, M. Bischoff, Catabolite control protein E (CcpE) is a LysR-type transcriptional regulator of tricarballylic acid cycle activity in *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 36116–36128.
- [13] R.M. Corrales, V. Molle, J. Leiba, L. Mourey, C. de Chastellier, L. Kremer,

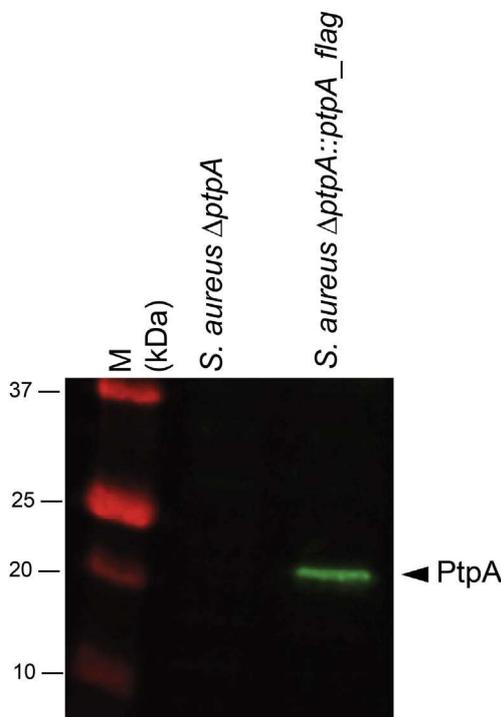


Fig. 4. PtpA is secreted into the culture supernatant. Equal amounts of anti-flag beads from culture supernatants immunoprecipitation from *S. aureus* Newman Δ *ptpA* and complemented *S. aureus* Newman Δ *ptpA*::*ptpA*_flag strains were loaded on an SDS–15% polyacrylamide gel and electroblotted. Blots were probed with anti-flag antibodies according to the manufacturer's instructions (Genscript), and marked with secondary antibodies labeled with IRDye infrared dyes (Odyssey, LiCOR). M (kDa), molecular mass markers.

- Phosphorylation of mycobacterial PcaA inhibits mycolic acid cyclopropanation: consequences for intracellular survival and for phagosome maturation block, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 26187–26199.
- [14] N. Slama, J. Leiba, N. Eynard, M. Daffe, L. Kremer, A. Quemard, V. Molle, Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC dehydratases from *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 (2011) 401–406.
- [15] J. Leiba, K. Syson, G. Baronian, I. Zanella-Cleon, R. Kalscheuer, L. Kremer, S. Bornemann, V. Molle, *Mycobacterium tuberculosis* maltosyltransferase GlgE, a genetically validated antituberculosis target, is negatively regulated by Ser/Thr phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 16546–16556.
- [16] J. Leiba, T. Hartmann, M.E. Cluzel, M. Cohen-Gonsaud, F. Delolme, M. Bischoff, V. Molle, A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 43607–43619.
- [17] F. Jadeau, E. Bechet, A.J. Cozzone, G. Deleage, C. Grangeasse, C. Combet, Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature, *Bioinformatics* 24 (2008) 2427–2430.
- [18] C. Grangeasse, S. Nessler, I. Mijakovic, Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 367 (2012) 2640–2655.
- [19] C. Whitfield, Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 39–68.
- [20] D. Soulat, C. Grangeasse, E. Vaganay, A.J. Cozzone, B. Duclos, UDP-acetylmannosamine dehydrogenase is an endogenous protein substrate of *Staphylococcus aureus* protein-tyrosine kinase activity, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13 (2007) 45–54.
- [21] C. Vega, S. Chou, K. Engel, M.E. Harrell, L. Rajagopal, C. Grundner, Structure and substrate recognition of the *Staphylococcus aureus* protein tyrosine phosphatase PtpA, *J. Mol. Biol.* 413 (2011) 24–31.
- [22] P. Tailor, J. Gilman, S. Williams, C. Couture, T. Mustelin, Regulation of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase by phosphorylation at tyrosines 131 and 132, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 5371–5374.
- [23] B.N. Kreiswirth, S. Lofdahl, M.J. Betley, M. O'Reilly, P.M. Schlievert, M.S. Bergdoll, R.P. Novick, The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage, *Nature* 305 (1983) 709–712.
- [24] R. Bruckner, Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosum*, *FEMS Microbiol. Lett.* 151 (1997) 1–8.

Discussion et Perspectives

La phosphorylation des protéines est une modification post-traductionnelle clé dans le métabolisme et la virulence des bactéries pathogènes. Du fait de son importance, ce phénomène a été extrêmement étudié, en particulier dans l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse. Cette thèse, en privilégiant des approches de biochimie et de biologie moléculaire, avait pour ambition d'une part, de caractériser de nouvelles protéines kinases et phosphatases potentiellement sécrétées, et d'autre part d'étudier leur(s) rôle(s) lors de l'interaction hôte/pathogène. En partant de l'analyse *in silico* des génomes de deux bactéries pathogènes modèles étudiées dans l'équipe, j'ai pu identifier deux gènes d'intérêt, celui de la protéine kinase *cstK* de *C. burnetii* et de la tyrosine phosphatase *ptpA* de *S. aureus*.

Les résultats obtenus lors de notre étude sur CstK nous amènent à nous questionner :

- **La protéine CstK est une nouvelle kinase atypique.**

L'analyse *in silico* du génome de *C. burnetii* a permis l'identification d'une nouvelle protéine kinase atypique. En effet, bien qu'elle possède des caractéristiques structurales d'une Ser/Thr protéine kinase, l'analyse de ses sites d'autophosphorylation a permis l'identification de phospho-tyrosines, normalement spécifique des tyrosine kinases. Trois sites ont ainsi été identifiés, deux tyrosines (Y14 et Y209) et une thréonine (T232). CstK présente donc une double spécificité. Cependant, pour le moment aucun substrat, endogène ou exogène, n'a été clairement identifié. On ne peut donc pas dire si CstK est capable de transphosphoryler sur les résidus sérine, thréonine et/ou tyrosine. En revanche, la poursuite de l'étude du substrat TBC1D5 nous permettra donc de répondre à cette question.

D'autre part, la génération d'un mutant transposon du gène *cstK* par l'équipe de Mattéo Bonazzi dont l'insertion a lieu dans la région promotrice du gène, a permis d'observer un défaut d'infection et de réplique. Par conséquent, une régulation transcriptionnelle de CstK semble probable, l'insertion détruisant potentiellement le site de fixation d'un répresseur. Cette hypothèse est confortée par le fait que nos études de qRT-PCR sur le mutant ont montré une surexpression de *cstK* d'un facteur trois par rapport à la souche sauvage. L'analyse de la région d'insertion devrait nous donner des éléments de réponse. D'autre part, nos échecs à obtenir un mutant $\Delta cstK$ étaient encore plus surprenants. Cela suggère que la kinase CstK pourrait être essentielle. Nous pouvons donc suggérer que CstK nécessite une très fine régulation, une surexpression ou une trop faible expression entraînant des défauts d'infection et de réplique à l'intérieur des vacuoles. Il serait donc intéressant d'analyser *in vivo* les

conséquences de la surexpression de ce gène.

L'ensemble de ces données ont non seulement permis de mieux comprendre le rôle biologique de la kinase CstK mais également de renforcer son intérêt comme cible thérapeutique potentielle. En effet, le développement d'un inhibiteur de ce gène permettrait d'altérer la croissance de *C. burnetii*, et constituerait donc un nouveau moyen de lutte contre ce pathogène, particulièrement virulent et classé comme arme bactériologique de catégorie B.

- **CstK est-elle sécrétée dans la cellule hôte lors de l'infection ?**

L'étude de Chen *et al.* en 2010 (Chen *et al.*, 2010) a montré que CstK pouvait être sécrétée par le système Dot/Icm de *L. pneumophilla*, fortement similaire à celui de *C. burnetii*. Cependant, cette étude étant réalisée dans un système hétérologue, nous avons voulu reproduire ce résultat chez *C. burnetii*, afin de confirmer cette sécrétion. Toutefois, à l'heure actuelle cette confirmation est toujours en cours. En effet, nous avons tout d'abord voulu utiliser le système de fusion à la β -lactamase, le même que celui utilisé dans l'étude chez *Legionella*, afin de visualiser une sécrétion de la protéine dans le cytoplasme de cellules. Cependant, lors de l'infection des cellules par une souche de *C. burnetii* exprimant CstK en fusion avec la β -lactamase, nous avons observé une perte de l'infection, ce résultat étant en adéquation avec celui du mutant surexprimant la kinase. Nous avons alors utilisé une construction avec un promoteur inductible afin de contrôler la production de CstK et l'induire une fois l'infection réalisée. Malgré de nombreuses mises au point et tentatives, cela n'a toujours pas permis de visualiser une sécrétion. L'activité de CstK serait-elle en cause ? Une construction comprenant la version inactive (par mutation de la lysine catalytique K55 en méthionine) de CstK est actuellement en cours afin de déterminer si l'activité kinase pourrait être liée à ce problème de toxicité empêchant la mise en évidence de la sécrétion dans la cellule hôte.

- **Quel est le rôle de CstK dans la cellule hôte ?**

Afin de comprendre le rôle de CstK dans la cellule hôte lors de l'infection, il est nécessaire d'identifier spécifiquement ses cibles potentielles. L'identification de TBC1D5 comme substrat potentiel de CstK est une piste très intéressante. En effet, TBC1D5 a une fonction de "switch" entre les voies endosomales et d'autophagie dans les cellules de mammifère. Une interaction entre CstK et TBC1D5 permettrait donc à la bactérie de moduler ces deux voies métaboliques afin de permettre

une réplication intracellulaire optimale de *C. burnetii*. Cependant, bien que l'identification de cette protéine ait été obtenue chez *Dictyostelium discoideum* par immunoprécipitation et confirmée par GST pull-down, une étude similaire sur la version humaine de TBC1D5 est essentielle.

Ensuite, le projet mené sur PtpA de *S. aureus* nous amène aux conclusions suivantes :

- **La tyrosine phosphatase PtpA de *S. aureus* est régulée négativement par la tyrosine kinase CapA1B2**

L'analyse du génome de *S. aureus* nous a permis de mettre en évidence une tyrosine phosphatase de bas poids moléculaire intéressante pour notre étude, la protéine PtpA. Similaire à son homonyme chez *M. tuberculosis*, seule son activité phosphatase avait été caractérisée avant mes travaux de thèse. L'étude de Zhou et al., (Zhou *et al.*, 2015) a montré que l'activité de PtpA de *M. tuberculosis* était régulée *via* phosphorylation par la tyrosine kinase PtkA. Un mécanisme de régulation similaire existait-il chez *S. aureus*? Nous avons donc réalisé un test de phosphorylation *in vitro*, ainsi que des tests d'activité avec la protéine recombinante PtpA sauvage et la tyrosine kinase CapA1B2 de *S. aureus*. L'ensemble des données obtenues ont démontré que PtpA de *S. aureus* est négativement régulée *via* phosphorylation par CapA1B2. De nouvelles questions se posent donc : (i) pourquoi PtpA a-t-elle besoin d'être régulée négativement par CapA1B2 ? (ii) quel est le rôle de cette régulation *in vivo* ?

- **Quel est l'état de phosphorylation de PtpA lorsqu'elle est sécrétée dans la cellule hôte ?**

De manière intéressante, nous avons également pu montrer que PtpA était sécrétée dans le surnageant de culture de *S. aureus* durant la phase de croissance, ce qui confirme encore une fois que cette protéine se comporte fortement comme son homologue de *M. tuberculosis*. Il serait très intéressant de tester l'état de phosphorylation de la protéine lors de sa sécrétion. Pour cela, nous avons réalisé un western blot avec un anticorps anti-phospho tyrosine sur des surnageants de culture de *S. aureus* surexprimant PtpA, mais un problème technique nous a empêché de conclure sur l'état de phosphorylation de PtpA. Une optimisation du protocole est à mettre en place. De plus, il serait également intéressant de visualiser cette sécrétion dans des cellules infectées par *S. aureus*. Enfin, différents mutants des systèmes de sécrétion spécifiques à *S. aureus* sont actuellement en cours de réalisation, ce qui nous permettra de mettre en évidence le système impliqué et pas conséquent

confirmer cette sécrétion. Ces études complémentaires réalisées par Mariana Rosas Olvera (en 1^{ère} année de thèse) nous permettront de répondre aux questions suivantes : (i) PtpA a-t'elle besoin d'être phosphorylée pour être sécrétée ? (ii) Sera-t'elle phosphorylée dans le cytoplasme de la cellule hôte par une tyrosine kinase eucaryote ?

Afin de comprendre la contribution de la sécrétion de PtpA dans l'infection de la cellule hôte, il sera nécessaire d'aller identifier ses cibles spécifiques. Bien que ces résultats soient encore préliminaires, nous avons pu identifier des substrats potentiels de PtpA chez *D. discoideum*. Parmi eux, nous avons spécifiquement identifié la V-ATPase, présente à la membrane des endosomes, et permettant d'y maintenir un pH acide nécessaire à l'inactivation des bactéries capturées dans le phagosome. Par conséquent, la question se pose du rôle de PtpA dans l'acidification du phagosome et est-ce que cette phosphatase pourrait réguler ce mécanisme clé de la survie intracellulaire ?

De plus, nous avons en notre possession un mutant $\Delta ptpA$ de *S. aureus* qui, d'après nos résultats préliminaires, présente un défaut de survie dans les macrophages, confirmant ainsi le rôle important de cette protéine lors de l'interaction hôte/pathogène.

Ainsi, des analyses plus approfondies nous permettrons de comprendre le rôle de cette régulation de l'activité de PtpA *via* phosphorylation, notamment lors de sa sécrétion et de son interaction avec ses substrats potentiels chez l'hôte.

Enfin, les résultats présentés dans ce manuscrit correspondent à mes travaux de thèse mais j'ai également eu l'occasion de collaborer ponctuellement à d'autres projets, notamment certains commencés durant mon stage de master 2. C'est le cas du projet VraR, qui a abouti à un article en 2013, et qui est présenté en annexe de cette thèse. Egalement, j'ai initié une étude sur la méthyltransférase MmaA3 de *M. tuberculosis*, phosphorylée par une STPK, mais qui n'a malheureusement pu aboutir suite à un problème de mise au point du test d'activité, qui nous a empêché d'avoir suffisamment de données exploitables.

Annexes

L'article scientifique publié et présenté en annexe de ce manuscrit correspond à une étude à laquelle j'ai contribué pendant mon stage de master 2. Dans cet article, ma participation a consisté à mettre en évidence la phosphorylation de la protéine VraR, un régulateur transcriptionnel impliqué dans la résistance aux antibiotiques, par la Sérine/Thréonine protéine kinase Stk1 de *S. aureus*.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* Vancomycin-resistance-associated response regulator VraR mediated by Stk1 protein phosphorylation



Marc J. Canova^a, Grégory Baronian^a, Solène Brelle^a, Martin Cohen-Gonsaud^b, Markus Bischoff^c, Virginie Molle^{a,*}

^a Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier II, CNRS UMR 5235, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

^b Centre de Biochimie Structurale, CNRS UMR 5048, INSERM U554, Université Montpellier I et II, Montpellier, France

^c Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Saarland Hospital, Homburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2014

Available online 2 April 2014

Keywords:

Ser/Thr protein kinase

VraR

Staphylococcus aureus

Phosphorylation

Antibiotic resistance

ABSTRACT

The *Staphylococcus aureus* Vancomycin-resistance-associated response regulator VraR is known as an important response regulator, member of the VraTSR three-component signal transduction system that modulates the expression of the cell wall stress stimulon in response to a number of different cell wall active antibiotics. Given its crucial role in regulating gene expression in response to antibiotic challenges, VraR must be tightly regulated. We report here for the first time in *S. aureus* convergence of two major signal transduction systems, serine/threonine protein kinase and two (three)-component systems. We demonstrate that VraR can be phosphorylated by the staphylococcal Ser/Thr protein kinase Stk1 and that phosphorylation negatively affects its DNA-binding properties. Mass spectrometric analyses and site-directed mutagenesis identified Thr106, Thr119, Thr175 and Thr178 as phosphoacceptors. A *S. aureus* Δ vraR mutant expressing a VraR derivative that mimics constitutive phosphorylation, VraR_{Asp}, still exhibited markedly decreased antibiotic resistance against different cell wall active antibiotics, when compared to the wild-type, suggesting that VraR phosphorylation may represent a novel and presumably more general mechanism of regulation of the two (three)-component systems in staphylococci.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Signal transducing mechanisms are essential for regulation of gene expression in both prokaryotic and eukaryotic organisms. Regulation of gene expression in eukaryotes is accomplished by serine/threonine and tyrosine kinases and cognate phosphatases. In contrast, gene expression in prokaryotes is often controlled by two-component systems that are comprised of a sensor histidine kinase and a cognate DNA-binding response regulator. Pathogenic bacteria utilize two-component systems in many cases to regulate expression of their virulence factors and for adaptive responses to the external environment. It has been previously shown that the human pathogen *Staphylococcus aureus* encodes a single eukaryotic-type serine/threonine kinase, Stk1. Recent studies provided first insights into the regulatory function of Stk1 and the molecular mechanisms of the Ser/Thr phosphorylation system in *S. aureus* [1].

Interestingly, the Ser/Thr kinase Stk1 was identified to influence central metabolic processes in *S. aureus* [2], and the activity of important regulatory factors such as SarA [3], MgrA [4], LuxS [5], and CcpA [6]. Though, the putative role of Stk1 towards antibiotic adaptation remained to be investigated.

The spread of *S. aureus* strains that are resistant to many of the commonly administered antibiotics is a significant threat to public health throughout the world. There is an urgent need to understand the signalling pathways that allow *S. aureus* to respond to and resist antibiotic chemotherapy treatment and to find new drug targets, in novel biochemical pathways, to combat these infections. In recent years, there has been growing interest in the *S. aureus* Vancomycin-resistance-associated sensor and response regulator (VraTSR) system, a three-component signal transduction system that responds to a number of cell wall active antibiotics by modulating the expression of a set of genes called the “cell wall stress stimulon” [7]. The histidine kinase, VraS, and its cognate response regulator, VraR are part of an operon that includes two further open reading frames, *vraU*, and *vraT* (syn. *yvqF*), with the latter

* Corresponding author. Fax: +33 4 67 14 42 86.

E-mail address: virginie.molle@univ-montp2.fr (V. Molle).

gene product, a putative membrane protein, playing a regulatory role in the VraSR-mediated cell wall stress stimulon [8,9]. Mutations or deletions within either *vraT*, *vraS*, or *vraR* affect antibiotic resistance to both β -lactam and glycopeptide antibiotics in a range of *S. aureus* strains including Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) [10,11].

In this work, we demonstrated convergence of the two major signal transduction systems, serine/threonine protein kinase and two (three)-component systems, for the first time in *S. aureus*. We identified VraR to be phosphorylated and therefore dysregulated by Stk1-mediated phosphorylation. Collectively, our study provides novel evidence that discrete signalling components such as a eukaryotic-type serine/threonine kinase and a two (three)-component response regulator are integrated for co-ordinate regulation.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, media, and growth conditions

Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in LB medium supplemented with 100 μ g/ml ampicillin or 100 μ g/ml spectinomycin when required. *S. aureus* isolates were plated on Tryptic Soy Agar (TSA) supplemented with 10 μ g/ml chloramphenicol or 50 μ g/ml kanamycin, when required, or grown in filter-sterilized Tryptic Soy Broth (TSB), Müller-Hinton (MH) or Brain–Heart Infusion (BHI) mediums at 37 °C and 150 rpm with a culture to flask volume of 1:10.

2.2. Cloning, expression and purification of recombinant VraR and mutant proteins

The *vraR* gene was amplified by PCR using *S. aureus* N315 chromosomal DNA as a template with the primers listed in Table 1 containing an *NdeI* and a *BamHI* restriction site, respectively. The corresponding amplified product was digested with *NdeI* and *BamHI*, and ligated into the pETPhos plasmid [12], a variant of pET15b (Novagen) that includes a tobacco etch virus (TEV) protease site instead of the thrombin site, and a N-terminal His-tag free of Ser/Thr/Tyr residues, thus generating pETPhos_ *vraR*. pETPhos_ *vraR* derivatives harboring threonine to alanine or aspartic acid substitutions were generated by using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). The duet strategy was used to gen-

erate a hyper-phosphorylated VraR protein as described previously [6,13]. The *vraR* gene was cloned into the pCDFDuet-1 vector containing the Stk1 kinase domain [5], generating plasmid pDuet_ *vraR*, which was used to transform *E. coli* BL21(DE3)Star cells. pDuet_ *vraR* *E. coli* cells were used to overexpress and purify His-tagged VraR as previously described [6].

2.3. Overexpression of VraR in *S. aureus*

The *vraR* gene was amplified by PCR using *S. aureus* N315 chromosomal DNA as a template with the primers listed in Table 1 containing a *BamHI* and a *PstI* site, respectively. The PCR product was digested with *BamHI/PstI*, enabling direct cloning into the pMK4-pProt expression vector cut with the same enzymes, thus generating pMK4_ *vraR*, which allows constitutive expression in *S. aureus* as previously described [6,14]. The mutants corresponding to Thr to Ala or Asp were generated using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) generating the pMK4_ *vraR*_ *Ala* and the pMK4_ *vraR*_ *Asp* constructs. The resulting vectors were used to transform *S. aureus* strain RN4220 which served as donor for transducing the plasmids into *S. aureus* BB270 Δ *vraR* [10].

2.4. In vitro kinase assay

In vitro phosphorylation was performed with 4 μ g of VraR and 1 μ g of Stk1 as described previously [6].

2.5. Electrophoretic mobility shift assays

The DNA probes for electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were generated by PCR using *S. aureus* N315 chromosomal DNA as a template which encompass the promoter region of *vraRS operon* as previously described with respective primers pairs listed in Table 1 [15]. The 5' ends of the double-stranded PCR products were labeled using [γ -³²P]-ATP and T4 polynucleotide kinase. A typical assay mixture contained in 20 μ l: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM KCl; 1 mM dithiothreitol (DTT); 5 mM MgCl₂; 0.1 μ g of nonspecific competitor (polydI-dC); 2.5% (v/v) glycerol; 0.05% (v/v) Igepal; radioactive DNA probe (2000 cpm ml⁻¹) and various amounts (0, 15, 65, 130, 200 nM) of the purified VraR proteins. After 20 min of incubation at room temperature, 20 μ l of this mixture was loaded onto a native 6% polyacrylamide TBE retardation gel (Novex[®], Invitrogen) and electrophoresed in 1 \times TBE (v/v) buffer

Table 1
Primers used in this study.

Primers	5' to 3' sequence ^{a,b}
VraR WT dir pETPhos	TAATAGctCATATGACGATTAAGTATTGTTTGGATGATCATG (NdeI)
VraR WT rev pETPhos	TATGGATCCTTACTATTGAATTAATTATGTTGGAATGC (BamHI)
VraR WT dir pETDuet	AGGAGATATACCATGGCGGCCACCATCATCATCAT (NcoI)
VraR WT rev pETDuet	GCTCGAATTCGGATCCCTATTGAATTAATTATGTTGGAATGC (BamHI)
VraR WT dir pMK4-pProt	GGAGGATCCATGGACTACAAGGACCACGCGGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGATGACGACAAG (BamHI)
VraR WT rev pMK4-pProt	CTGCTGCAGCTATTGAATTAATTATGTTGGAATGC (PstI)
VraR T106A dir	ATGCAGGTGTCGATAGTTACATTTTAAAGCAACAAGTGCAAAAGA
VraR T106D dir	TGCATTAGATGCGAGGTGTCGATAGTTACATTTTAAAGATACAAGTGCAAAAGATATCG
VraR T119A dir	GCCGATGCGATTCGTAAGGCTTCTAGAGGAGAATCT
VraR T119D dir	GCAAAAGATATCGCGGATGCGATTCGTAAGGATTCTAGAGGAGAATCT
VraR T175A dir	GCTAGTGCATCGCATATTGCTATTTAAACGGTTAAG
VraR T178A dir	tcgcatATTACTATTAAGCGGTTAAGACACATGTG
VraR T175_178A dir	AAATCAAGAAATTGCTAGTGCATCGCATATTGCTATTTAAAGCGGTTAAGACACATGT
VraR T175_178D dir	GCTAGTGCATCGCATATTGATATTTAAAGATGTTAAGACACATGTGAG
Promoter region of VraSR operon dir	ACGAAGCTTGGTCCGATTTTAAACGACAAAAATTG
Promoter region of VraSR operon rev	TGAAATGACGCATTGATTGTGTT

^a Restriction sites are underlined and specified into brackets.

^b Mutagenized bases are shown in bold.

for 1 h at 100 V cm⁻¹. Radioactive species were detected by autoradiography using direct exposure to films.

2.6. Mass spectrometry analysis

Purified His-tagged hyper-phosphorylated VraR from the *E. coli* strain carrying pDuet_vraR and co-expressing the Stk1 kinase, was subjected to mass spectrometry without further treatment. Subsequent mass spectrometric analyses were performed as previously reported [6,16].

2.7. Antibody production and immunoblotting

Polyclonal anti-VraR antibodies were raised by injecting 500 µg of the His-tagged recombinant VraR into rats (Eurogentec, Liege, Belgium). The resulting crude antisera were purified against the immobilized VraR antigen. For the determination of VraR expression in *S. aureus*, cytoplasmic protein extracts were isolated from *S. aureus* cell cultures grown for 5 h in TSB at 37 °C as previously described [17], and protein fractions were separated using SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane, and subjected to Western blot analysis using the antigen-purified polyclonal anti-VraR antiserum and revealed with secondary antibodies labeled with IRDye 800CW infrared dyes (LiCOR). Phosphorylated VraR isoforms were separated by SDS-polyacrylamide gel containing MnCl₂ and Phos-tag acrylamide (Wako Chemicals, Japan) and subjected to Western blot analysis as described above.

2.8. Antibiotic resistance tests

MICs of antibiotics were determined by Etest (Biomérieux) according to the manufacturer's instructions. Broth microdilutions were performed according to CLSI M07-A9 guidelines. Plates for resistance tests were supplemented with chloramphenicol (10 µg/ml) to ensure plasmid maintenance.

3. Results and discussion

3.1. Stk1-mediated phosphorylation of VraR

The *S. aureus* genome encodes one Ser/Thr protein kinase named Stk1 or PknB [2,14]. While Stk1 appears to be involved in different key pathways like cell wall metabolism, antibiotic susceptibility, central metabolism, and regulation of virulence [1–3,6,18–20], only little is known about the nature of the corresponding substrates. Due to our interests in Ser/Thr kinase regulation in *S. aureus*, and in antibiotic resistance pathways of this pathogen, we were interested in investigating whether the response regulator (VraR), might be regulated by Ser/Thr phosphorylation, as it is already known to be regulated by the histidine kinase VraS in this organism.

In order to establish whether the VraR protein could undergo Stk1-mediated phosphorylation, we first investigated *in vitro*, whether VraR could be phosphorylated in the presence of the purified Stk1 kinase. Stk1 was expressed as a His-tagged fusion protein and purified from *E. coli* as described previously [3,5]. The purified kinase was incubated with VraR and [γ -³³P]-ATP, the proteins resolved by SDS-PAGE, and the phosphorylation profile analyzed by autoradiography (Fig. 1A). The upper bands illustrate the autokinase activity of Stk1, while the lower bands represent phosphorylated VraR proteins (VraR-P). The presence of an intense radioactive signal indicated that VraR was indeed phosphorylated by Stk1. As expected, no radioactive bands were observed in the absence of Stk1 in this assay. These data indicated that VraR is phosphorylated by Stk1, and suggested that this protein is regulated via this Ser/Thr kinase.

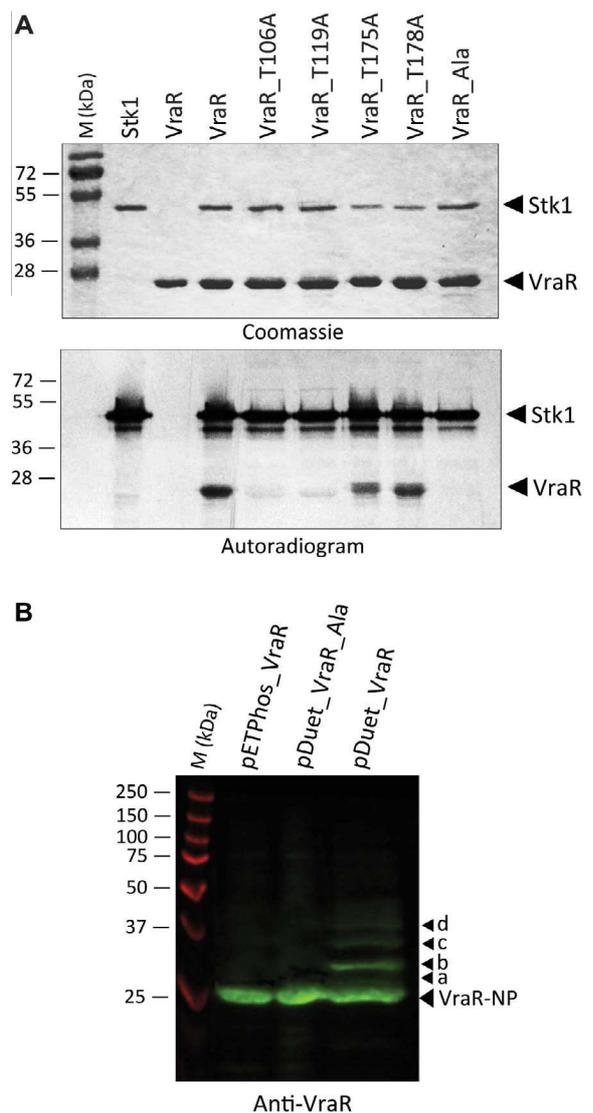


Fig. 1. (A) *In vitro* phosphorylation of VraR and mutant derivatives. The recombinant Stk1 kinase encoded by the *S. aureus* genome was expressed and purified as a His-tagged fusion in *E. coli* and incubated in presence of [γ -³³P]-ATP with either the purified His-tagged *S. aureus* VraR, or the mutated variants VraR_T106A (harboring a Thr to Ala substitution at T106), VraR_T119A (harboring a Thr to Ala substitution at T119), VraR_T175A (harboring a Thr to Ala substitution at T175), VraR_T178A (harboring a Thr to Ala substitution at T178), or VraR_Alta (harboring Thr to Ala substitutions at T106, T119, T175, T178). Samples were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue (upper panel), and visualized by autoradiography (lower panel). The upper bands illustrate the autokinase activity of Stk1, and the lower bands represent phosphorylated VraR proteins. Standard proteins of known molecular masses were run in parallel (kDa lane). (B) Phosphorylation status of VraR in a Stk1 co-expressing *E. coli* strain. The *vraR* and *vraR_Alta* alleles were cloned into pETDuet_stk1. Four micrograms of the purified His-tagged VraR variants were run on Phos-tag SDS-PAGE gel, probed with anti-VraR antibodies and revealed with secondary antibodies labeled with IRDye 800CW infrared dyes (LiCOR). VraR-NP corresponds to unphosphorylated VraR. a, b, c, d highlight phosphorylated state of VraR.

3.2. VraR is phosphorylated on four threonine residues

Mass spectrometry (MS) was subsequently used to identify the number and nature of phosphorylation sites on VraR, as reported previously for other STPK substrates [5,6,16,21]. Phosphorylated VraR-P was purified from *E. coli* co-expressing Stk1 and VraR (pDuet_vraR) and subjected to mass spectrometry analysis after tryptic digestion. We obtained a sequence coverage of 97%, bearing all possible Ser and Thr residues. The ProteinPilot[®] database searching

software, using the Paragon method with phosphorylation emphasis, was then used to detect and identify the phosphorylated peptides. The MS/MS spectra unambiguously identified the presence of four phosphate groups (Table 2), thus indicating that VraR is phosphorylated on four threonines, corresponding to Thr106, Thr119, Thr175 and Thr178.

To confirm the phosphorylation sites identified by MS/MS, we substituted the phosphosites by alanines, either individually or together by site-directed mutagenesis to introduce either single or quadruple mutations (Thr to Ala) in VraR. The corresponding VraR derivatives were expressed and purified as His-tagged proteins in *E. coli* BL21(DE3)Star cells. Following incubation with Stk1 and [γ - ^{33}P]-ATP, SDS-PAGE/autoradiogram revealed that phosphorylation was partially inhibited in the VraR_T175A and VraR_T178A mutants and this inhibition was even more pronounced in the VraR_T106A and VraR_T119A mutants, which seem to indicate their critical role in VraR phosphorylation (Fig. 1A). Complete abrogation of the phosphorylation reaction was evidenced in the quadruple VraR_T106A/T119A/T175A/T178A (VraR_Ala) phosphoablative mutant, thus confirming the proper identification of the sites (Fig. 1A).

To further address the relevance of *in vitro* phosphorylation, the phosphoablative *vraR_Ala* allele was cloned into the pCDFDuet-1 vector [5], which allows its co-expression together with Stk1 in *E. coli*. The purified VraR_Ala was next assessed for phosphorylation in an *in vivo* context. Therefore, in order to track the level of phosphorylated VraR and confirm that the phosphoablative mutant was not phosphorylated anymore *in vivo*, we took advantage of the Phos-tag compound, which selectively forms a complex with phosphorylated amino acids in the presence of divalent cations [22]. In the presence of MnCl_2 , Phos-tag induces a mobility shift in phosphorylated proteins in SDS-PAGE, causing them to migrate slower than the non-phosphorylated form. This method, originally developed for the study of eukaryotic Ser/Thr kinases, has been successfully adapted for bacterial histidine kinases (e.g. *E. coli* PhoP), and validated against standard methods that require radioactive ^{32}P -labelling [23]. We used Phos-tag SDS-PAGE followed by Western immunoblotting with purified VraR antiserum to simultaneously detect the phosphorylated and the unphosphorylated forms of VraR. First, the specificity of the Phos-tag for the phosphorylated VraR isoform was demonstrated using the protein purified from *E. coli* co-expressing Stk1 together with VraR wild-type (Fig. 1B) corresponding to pETDuet_VraR. As anticipated, pETDuet_VraR displayed four different slowly migrating phospho-VraR bands (labeled a, b, c and d in Fig. 1B) among remaining non-phosphorylated VraR (VraR-NP). We deduced that the four phospho-VraR signals correspond to VraR phosphorylated either at one site towards the four identified phosphorylation sites, thus confirming our results about four phosphosites. Our observations are consistent with previous studies, which also reported that Phos-tag binding shifts the mobility of phosphorylated proteins specific to different phosphorylation sites [23]. Phosphobands were absent in the purified non-phosphorylatable pETDuet_VraR_Ala protein as

well as in the purified protein expressed without its specific Stk1 kinase (pETPhos_VraR) (Fig. 1B), thus confirming that VraR is specifically phosphorylated by Stk1 in this *in vivo* system.

3.3. Localization of the phosphoacceptors on the VraR structure

To get more insights into the possible role of Stk1-mediated phosphorylation on VraR, we looked at the crystal structure of VraR. Three out of the four Stk1-mediated phosphorylation sites are located in key residues for the VraR activity and regulation. The residues T175 and T178 are located on the Helix-Turn-Helix (HTH) binding domain of VraR. More precisely, they are located at the beginning and in the middle of the α -helix α 9, respectively (residues I176 to L190). The reported structures of VraR in its inactive monomer and active dimer forms have recently been published [24]. Then, structural analysis of the activated VraR demonstrated the role of this α -helix α 9 for the DNA-binding recognition, thus being in accordance with the previous hypothesis [25]. In the dimer, the two α 9 helices are positioned to create a large electropositive DNA-binding surface. Therefore, the incorporation of negative charges within the α 9 helix will impede DNA-binding (Fig. 2A). Two other phosphorylation sites are located at the other side of the protein, in the VraR regulator domain. Upon activation, VraR is phosphorylated on the Asp55 and leads to dimerization which is (i) promoted by structural rearrangement as described by Leonard et al. (2013) [24]; and (ii) mediated by hydrophobic contact between two monomers around the α -helix α 1 (residues E12 to S23). A key residue for this interaction is the methionine M13 docked into a hydrophobic pocket within the dimerization interface comprises of the α -helix α 1 and the α -helix α 5 (residues A109 to S120). If the residue M13 is not in contact with the threonine T106 (distance C α -C α is 8.7Å), as might be the case upon phosphorylation of the T106, it will disturb the hydrophobic request for the protein dimerization, thus preventing VraR activation (Fig. 2B).

3.4. Phosphorylation negatively regulates VraR DNA-binding properties

The structural mapping of the phosphorylation sites suggested that the phosphorylation of VraR might negatively influence the DNA-binding activity of this protein. To test this hypothesis, we took advantage that VraR was already known to be able to bind to its own promoter preceding *vraSp* [15]. Therefore, we analyzed the binding capacities of the non-phosphorylated VraR form (VraR) and that of the hyper-phosphorylated VraR form (VraR-P) (Fig. 3). While the unphosphorylated VraR interacted with the double-stranded DNA probe *vraSp* tested (Fig. 3A), the phosphorylated VraR-P failed to shift any of these probes (Fig. 3B), indicating that VraR-P had lost its ability to bind to its *vraS* promoter sequence. However, our EMSA carried out with the VraR_Ala phosphoablative mutant protein showed that this VraR derivative was also impaired in its DNA-binding activity (Fig. 3C), thus highlighting the critical

Table 2

Phosphoacceptors identified after purification of *S. aureus* VraR from the *E. coli* BL21(DE3)star strain co-expressing *S. aureus* Stk1. Sequences of the phosphorylated peptides identified in VraR as determined by mass spectrometry following tryptic digestion are indicated, and phosphorylated residues (pT) are shown in bold.

Phosphorylated tryptic peptide sequence of VraR purified from pCDFDuet co-expressing Stk1	Number of detected phosphate groups LC/MS/MS	Phosphorylated residue(s)
[94–110] ALDAGVDSYILK p TTS AK	1	T106
[94–117] ALDAGVDSYILK p TTS AKDIADAVR	1	T106
[118–133] K p TSRGESVFEPEVLVK	1	T119
[110–133] DIADAVR p TSRGESVFEPEVLVK	1	T119
[105–133] TTS AKDIADAVR p TSRGESVFEPEVLVK	1	T119
[162–177] GYSNQEIASASHI p TIK	1	T175
[162–180] GYSNQEIASASHIT p TIK	1	T178

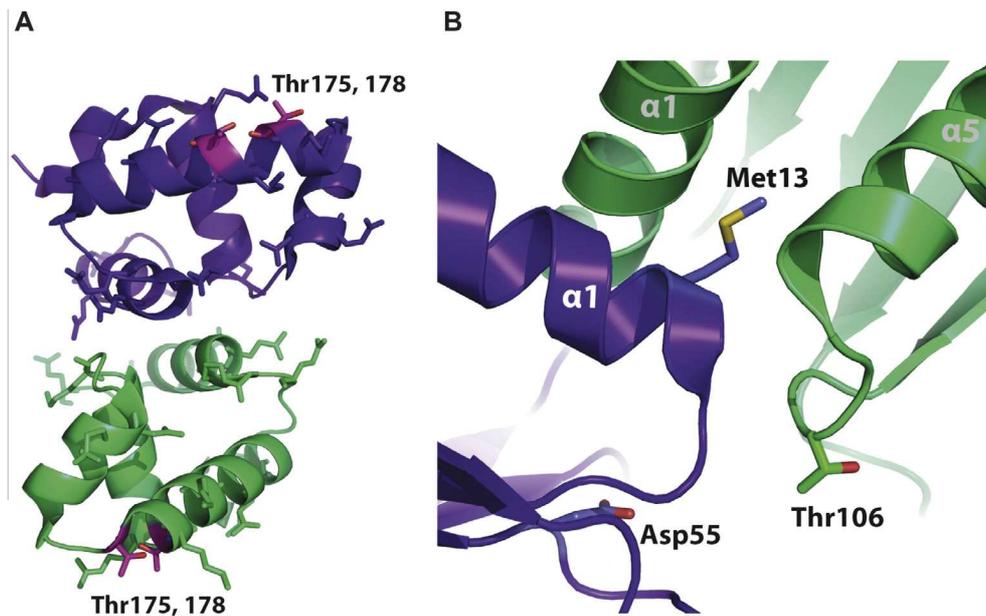


Fig. 2. Mapping of the VraR phosphorylation sites. The structure of the activated form of VraR (PDB4IF4) is represented as a cartoon and each monomer are colored either in green or purple. (A) Two phosphorylation sites (T175 and T178) are located on the DNA-binding domain. The phosphorylation will bring electronegative charge on a positively charged surface (residues KRQN are represented with sticks). (B) Two phosphorylation sites are located on the regulator domain (T106 and T119). The phosphorylation of T106 will bring a negative charge in an hydrophobic environment and could impaired the dimerization leads by hydrophobic contact, noteworthy by the methionine residue M13. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

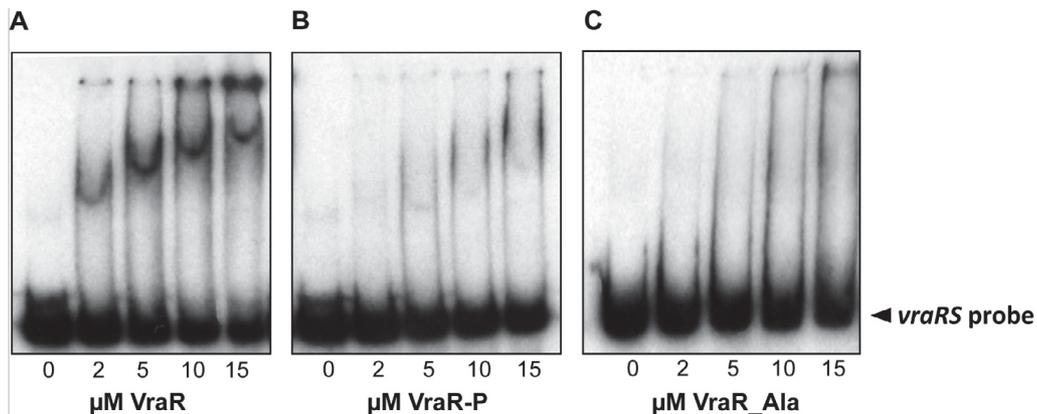


Fig. 3. DNA-binding activity of VraR derivatives. Gel electrophoretic mobility shift assays (EMSA) of VraR binding to the *vraRS* promoter. The promoter region of the *vraRS* operon was amplified by PCR, radioactively labeled, and incubated with 2, 5, 10 and 15 μM of purified VraR. (A) Binding of the unphosphorylated VraR (VraR), (B) phosphorylated VraR (VraR-P), or (C) VraR_{Ala} mutant to the *vraRS* promoter region.

role of phosphorylation but also of the natures of the residues on the DNA-binding capacity of this regulatory protein. Noteworthy, these effects were not due to a tertiary structure change, as confirmed by analysis of the trypsinolysis kinetics of wild type and mutated VraR proteins (Fig. S1). Thus, it can be inferred that VraR phosphorylation in *S. aureus* reduces/abolishes its activity, supporting the view that this post-translational modification plays a critical role in regulating VraR activity.

Taken together, these results indicate that Stk1-phosphorylation negatively affects the DNA-binding properties of VraR rather than altering the overall structure of the protein.

3.5. Lack of antibiotic resistance complementation with the VraR phosphomimetic mutant in a Δ vraR mutant strain

In order to test the role of Stk1-mediated phosphorylation in *S. aureus* regarding antibiotic resistance, we assessed the role of the specific phosphosites identified. Acidic residues such as aspartic

acid (Asp) qualitatively mimic the phosphorylation effect with regard to functional activity [16,21,26]. Therefore, phosphoablative (Thr to Ala replacements) and phosphomimetic (Thr to Asp replacements) VraR alleles were generated and cloned into the shuttle vector pMK4-pProt, and the resulting plasmids, pMK4_vraR, pMK4_vraR_{Ala} and pMK4_vraR_{Asp}, respectively, were transformed into the *S. aureus* strain BB270 Δ vraR [10]. In these strains, wild-type, phosphoablative and phosphomimetic VraR isoforms expression was monitored by Western blotting using anti-VraR antibodies. As expected, *S. aureus* BB270 Δ vraR failed to express VraR, while increased amounts of VraR were synthesized in the BB270 Δ vraR derivatives complemented with the phosphoablative *vraR* variant (pMK4_vraR_{Ala}), the phosphomimetic (pMK4_vraR_{Asp}) and the *vraR* wild-type allele (pMK4_vraR), respectively (Fig. 4A), probably due to a multi-copy effect induced by transformation with the pMK4 derivatives.

The impact of constitutive VraR phosphorylation on specific antibiotic resistance known to be associated with this regulator

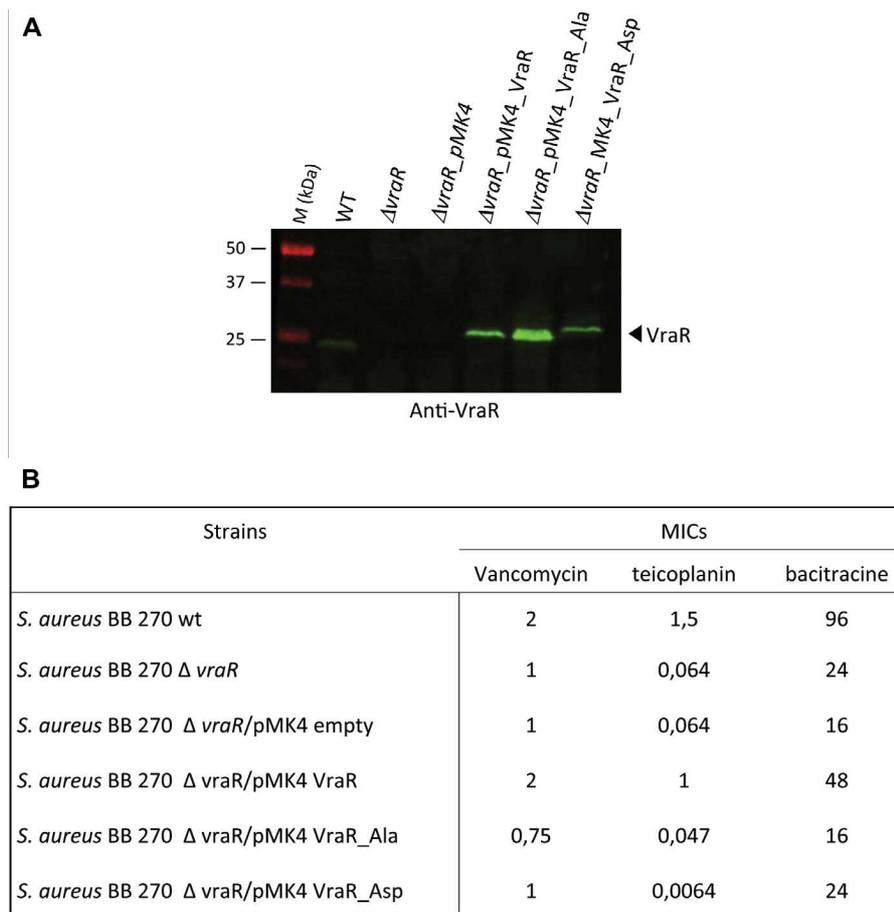


Fig. 4. Complementation of the *vraR* antibiotic resistance phenotype in *S. aureus*. (A) Western blot analysis of cytosolic protein extracts obtained from cultures of *S. aureus* strain BB270, its respective Δ *vraR* mutant, and the Δ *vraR* derivatives complemented with the wild type allele (pMK4_*vraR*), the *VraR*_Ala variant (pMK4_*vraR*_Ala), and the *VraR*_Asp variant (pMK4_*vraR*_Asp), with the polyclonal anti-*VraR* antibody. (B) MICs were performed on *S. aureus* BB270 and derivative mutant strains.

was next examined. In line with previous findings [10], we found an almost complete complementation of the antibiotic resistance phenotype in the Δ *vraR* mutant trans-complemented with *vraR* wild-type allele, while *VraR*_Ala or *VraR*_Asp expressing strains were unable to complement the resistance profile (Fig. 4B), although introduction of the *VraR*_Ala or *VraR*_Asp versions did neither alter the expression of both proteins nor their folding (Figs. 4A and S1). This result suggests that the threonine residues involved in this regulation are critical for *VraR* activity *in vivo*, presumably as a consequence of its impaired DNA-binding activity towards specific regulated genes involved in these antibiotic resistance processes.

In conclusion, we provide here the first evidence of a Ser/Thr kinase mediated modification involved in the regulation of *VraR* activity in *S. aureus*. Our results strongly suggest that phosphorylation of *VraR* may play a role in regulating the levels of antibiotic resistance in addition to the previously shown regulation via *VraS* and *VraT*. Thus, it appears that *S. aureus* may control in a very subtle manner the equilibrium between STPK-mediated phosphorylation compared to classical two (three)-component activation. Whether *Stk1* driven phosphorylation occurs under certain circumstances such as antibiotic stress in regulating the major regulator *VraR* requires further investigation.

Acknowledgments

The authors wish to thank I. Zanella-Cléon from the Mass Spectrometry Unit (CCMP), UMS3444/US8 Biosciences Gerland Lyon

Sud, for her excellent expertise and technical assistance, and N. McCallum for providing strains BB270 and BB270 Δ *vraR*. This work was supported by Grants from the National Research Agency (ANR-09-MIEN-004) for V.M., and the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant BI 1350/1-2 to M.B.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.128>.

References

- [1] K. Ohlsen, S. Donat, The impact of serine/threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Med. Microbiol.* 300 (2010) 137–141.
- [2] S. Donat, K. Streker, T. Schirmeister, S. Rakette, T. Stehle, M. Liebeke, M. Lalk, K. Ohlsen, Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 4056–4069.
- [3] J.P. Didier, A.J. Cozzone, B. Duclos, Phosphorylation of the virulence regulator *SarA* modulates its ability to bind DNA in *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol. Lett.* 306 (2010) 30–36.
- [4] F. Sun, Y. Ding, Q. Ji, Z. Liang, X. Deng, C.C. Wong, C. Yi, L. Zhang, S. Xie, S. Alvarez, L.M. Hicks, C. Luo, H. Jiang, L. Lan, C. He, Protein cysteine phosphorylation of *SarA*/*MgrA* family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 15461–15466.
- [5] M.E. Cluzel, I. Zanella-Cleon, A.J. Cozzone, K. Futterer, B. Duclos, V. Molle, The *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 synthase *LuxS* is regulated by Ser/Thr phosphorylation, *J. Bacteriol.* 192 (2010) 6295–6301.
- [6] J. Leiba, T. Hartmann, M.E. Cluzel, M. Cohen-Gonsaud, F. Delolme, M. Bischoff, V. Molle, A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite

- control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 43607–43619.
- [7] V. Dengler, P.S. Meier, R. Heusser, B. Berger-Bachi, N. McCallum, Induction kinetics of the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon in response to different cell wall active antibiotics, *BMC Microbiol.* 11 (2011) 16.
- [8] S. Gardete, C. Kim, B.M. Hartmann, M. Mwangi, C.M. Roux, P.M. Dunman, H.F. Chambers, A. Tomasz, Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002505.
- [9] S. Boyle-Vavra, S. Yin, D.S. Jo, C.P. Montgomery, R.S. Daum, VraT/YvqF is required for methicillin resistance and activation of the VraSR regulon in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 83–95.
- [10] N. McCallum, P.S. Meier, R. Heusser, B. Berger-Bachi, Mutational analyses of open reading frames within the vraSR operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011) 1391–1402.
- [11] E. Galbusera, A. Renzoni, D.O. Andrey, A. Monod, C. Barras, P. Tortora, A. Polissi, W.L. Kelley, Site-specific mutation of *Staphylococcus aureus* VraS reveals a crucial role for the VraR-VraS sensor in the emergence of glycopeptide resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011) 1008–1020.
- [12] M.J. Canova, L. Kremer, V. Molle, pETPhos: a customized expression vector designed for further characterization of Ser/Thr/Tyr protein kinases and their substrates, *Plasmid* 60 (2008) 149–153.
- [13] V. Molle, J. Leiba, I. Zanella-Cleon, M. Becchi, L. Kremer, An improved method to unravel phosphoacceptors in Ser/Thr protein kinase-phosphorylated substrates, *Proteomics* 10 (2010) 3910–3915.
- [14] M. Debarbouille, S. Dramsi, O. Dussurget, M.A. Nahori, E. Vaganay, G. Jouvion, A. Cozzone, T. Msadek, B. Duclos, Characterization of a serine/threonine kinase involved in virulence of *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 4070–4081.
- [15] A. Belcheva, D. Golemi-Kotra, A close-up view of the VraSR two-component system. A mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 12354–12364.
- [16] N. Slama, J. Leiba, N. Eynard, M. Daffe, L. Kremer, A. Quemard, V. Molle, Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC dehydratases from *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 (2011) 401–406.
- [17] B. Schultness, D.A. Bloes, P. Francois, M. Girard, J. Schrenzel, M. Bischoff, B. Berger-Bachi, The sigmaB-dependent yabJ-spoVG operon is involved in the regulation of extracellular nuclease, lipase, and protease expression in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 193 (2011) 4954–4962.
- [18] S. Tamber, J. Schwartzman, A.L. Cheung, The role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300, *Infect. Immun.* 78 (2010) 3637–3646.
- [19] K. Burnside, A. Lembo, M. de Los Reyes, A. Iliuk, N.T. Binhtran, J.E. Connelly, W.J. Lin, B.Z. Schmidt, A.R. Richardson, F.C. Fang, W.A. Tao, L. Rajagopal, Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase, *PLoS One* 5 (2010) e11071.
- [20] Q.C. Truong-Bolduc, D.C. Hooper, Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 192 (2010) 2525–2534.
- [21] V. Molle, G. Gulten, C. Vilcheze, R. Veyron-Churlet, I. Zanella-Cleon, J.C. Sacchetti, W.R. Jacobs Jr., L. Kremer, Phosphorylation of InhA inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol. Microbiol.* 78 (2010) 1591–1605.
- [22] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1513–1521.
- [23] C. Kaimeir, D.R. Zusman, Phosphorylation-dependent localization of the response regulator FrzZ signals cell reversals in *Myxococcus xanthus*, *Mol. Microbiol.* 88 (2013) 740–753.
- [24] P.G. Leonard, D. Golemi-Kotra, A.M. Stock, Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in *Staphylococcus aureus* VraR activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013) 8525–8530.
- [25] L.W. Donaldson, The NMR structure of the *Staphylococcus aureus* response regulator VraR DNA binding domain reveals a dynamic relationship between it and its associated receiver domain, *Biochemistry* 47 (2008) 3379–3388.
- [26] R.M. Corrales, J. Leiba, M. Cohen-Gonsaud, V. Molle, L. Kremer, *Mycobacterium tuberculosis* S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase is negatively regulated by Ser/Thr phosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430 (2012) 858–864.

Références bibliographiques

- Alber, T., (2009) Signaling mechanisms of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinases. *Current opinion in structural biology* **19**: 650-657.
- Amaral, M.M., L.R. Coelho, R.P. Flores, R.R. Souza, M.C. Silva-Carvalho, L.A. Teixeira, B.T. Ferreira-Carvalho & A.M. Figueiredo, (2005) The predominant variant of the Brazilian epidemic clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells. *The Journal of infectious diseases* **192**: 801-810.
- Andersson, K., K.E. Magnusson, M. Majeed, O. Stendahl & M. Fallman, (1999) *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect Immun* **67**: 2567-2574.
- Archambaud, C., E. Gouin, J. Pizarro-Cerda, P. Cossart & O. Dussurget, (2005) Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **56**: 383-396.
- Arora, G., A. Sajid, M.D. Arulanandh, A. Singhal, A.R. Mattoo, A.P. Pomerantsev, S.H. Leppla, S. Maiti & Y. Singh, (2012) Unveiling the novel dual specificity protein kinases in *Bacillus anthracis*: identification of the first prokaryotic dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK)-like kinase. *J Biol Chem* **287**: 26749-26763.
- Arvidson, S. & K. Tegmark, (2001) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *International journal of medical microbiology : IJMM* **291**: 159-170.
- Av-Gay, Y. & M. Everett, (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **8**: 238-244.
- Bach, H., K.G. Papavinasasundaram, D. Wong, Z. Hmama & Y. Av-Gay, (2008) *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell host & microbe* **3**: 316-322.
- Barber, M. & M. Rozwadowska-Dowzenko, (1948) Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* **2**: 641-644.
- Barthe, P., G.V. Mukamolova, C. Roumestand & M. Cohen-Gonsaud, (2010) The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure* **18**: 606-615.
- Bartlett, A.H. & K.G. Hulten, (2010) *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. *The Pediatric infectious disease journal* **29**: 860-861.
- Beare, P.A., J.E. Samuel, D. Howe, K. Virtaneva, S.F. Porcella & R.A. Heinzen, (2006) Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol* **188**: 2309-2324.
- Beilharz, K., L. Novakova, D. Fadda, P. Branny, O. Massidda & J.W. Veening, (2012) Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: E905-913.
- Bereket, W., K. Hemalatha, B. Getenet, T. Wondwossen, A. Solomon, A. Zeynudin & S. Kannan, (2012) Update on bacterial nosocomial infections. *European review for medical and pharmacological sciences* **16**: 1039-1044.
- Beron, W., M.G. Gutierrez, M. Rabinovitch & M.I. Colombo, (2002) *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect Immun* **70**: 5816-5821.
- Black, D.S., L.G. Montagna, S. Zitsmann & J.B. Bliska, (1998) Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol Microbiol* **29**: 1263-1274.

- Buchrieser, C., P. Glaser, C. Rusniok, H. Nedjari, H. D'Hauteville, F. Kunst, P. Sansonetti & C. Parsot, (2000) The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **38**: 760-771.
- Chaba, R., M. Raje & P.K. Chakraborti, (2002) Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**: 1078-1085.
- Chaurasiya, S.K. & K.K. Srivastava, (2009) Downregulation of protein kinase C-alpha enhances intracellular survival of *Mycobacteria*: role of PknG. *BMC microbiology* **9**: 271.
- Chavakis, T., K. Wiechmann, K.T. Preissner & M. Herrmann, (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thrombosis and haemostasis* **94**: 278-285.
- Chen, C., S. Banga, K. Mertens, M.M. Weber, I. Gorbaslieva, Y. Tan, Z.Q. Luo & J.E. Samuel, (2010) Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 21755-21760.
- Cheung, A.L., A.S. Bayer, G. Zhang, H. Gresham & Y.Q. Xiong, (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS immunology and medical microbiology* **40**: 1-9.
- Cheung, A.L. & V.A. Fischetti, (1990) The role of fibrinogen in staphylococcal adherence to catheters in vitro. *The Journal of infectious diseases* **161**: 1177-1186.
- Cheung, A.L., J.M. Koomey, C.A. Butler, S.J. Projan & V.A. Fischetti, (1992) Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (sar) distinct from agr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 6462-6466.
- Coleman, S.A., E.R. Fischer, D.C. Cockrell, D.E. Voth, D. Howe, D.J. Mead, J.E. Samuel & R.A. Heinzen, (2007) Proteome and antigen profiling of *Coxiella burnetii* developmental forms. *Infect Immun* **75**: 290-298.
- Coleman, S.A., E.R. Fischer, D. Howe, D.J. Mead & R.A. Heinzen, (2004) Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J Bacteriol* **186**: 7344-7352.
- Cornelis, G.R., A. Boland, A.P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M.P. Sory & I. Stainier, (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1315-1352.
- Cossart, P. & P.J. Sansonetti, (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Cozzone, A.J., (1988) Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* **42**: 97-125.
- Cozzone, A.J., (1998) Post-translational modification of proteins by reversible phosphorylation in prokaryotes. *Biochimie* **80**: 43-48.
- Debarbouille, M., S. Dramsi, O. Dussurget, M.A. Nahori, E. Vaganay, G. Jouvion, A. Cozzone, T. Msadek & B. Duclos, (2009) Characterization of a serine/threonine kinase involved in virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191**: 4070-4081.
- Deutscher, J. & M.H. Saier, Jr., (2005) Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria - for long time neglected, now well established. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **9**: 125-131.
- Diekema, D.J., M.A. Pfaller, F.J. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R.N. Jones, M. Beach & S.P. Group, (2001) Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial

- Surveillance Program, 1997-1999. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **32 Suppl 2**: S114-132.
- Dinges, M.M., P.M. Orwin & P.M. Schlievert, (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews* **13**: 16-34, table of contents.
- Dukuzumuremyi, J.M., R. Rosqvist, B. Hallberg, B. Akerstrom, H. Wolf-Watz & K. Schesser, (2000) The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* **275**: 35281-35290.
- Dziewanowska, K., J.M. Patti, C.F. Deobald, K.W. Bayles, W.R. Trumble & G.A. Bohach, (1999) Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* **67**: 4673-4678.
- Echenique, J., A. Kadioglu, S. Romao, P.W. Andrew & M.C. Trombe, (2004) Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72**: 2434-2437.
- Fleurie, A., C. Cluzel, S. Guiral, C. Freton, F. Galisson, I. Zanella-Cleon, A.M. Di Guilmi & C. Grangeasse, (2012) Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **83**: 746-758.
- Fleurie, A., C. Lesterlin, S. Manuse, C. Zhao, C. Cluzel, J.P. Lavergne, M. Franz-Wachtel, B. Macek, C. Combet, E. Kuru, M.S. VanNieuwenhze, Y.V. Brun, D. Sherratt & C. Grangeasse, (2014) MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* **516**: 259-262.
- Foster, T.J., (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nature reviews. Microbiology* **3**: 948-958.
- Foster, T.J. & M. Hook, (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**: 484-488.
- Fournier, B. & D.J. Philpott, (2005) Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clinical microbiology reviews* **18**: 521-540.
- Friedrich, R., P. Panizzi, P. Fuentes-Prior, K. Richter, I. Verhamme, P.J. Anderson, S. Kawabata, R. Huber, W. Bode & P.E. Bock, (2003) Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature* **425**: 535-539.
- Fu, Y. & J.E. Galan, (1999) A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**: 293-297.
- Galyov, E.E., S. Hakansson, A. Forsberg & H. Wolf-Watz, (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732.
- Gao, X., F. Wan, K. Mateo, E. Callegari, D. Wang, W. Deng, J. Puente, F. Li, M.S. Chaussee, B.B. Finlay, M.J. Lenardo & P.R. Hardwidge, (2009) Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function. *PLoS pathogens* **5**: e1000708.
- Garnak, M. & H.C. Reeves, (1979) Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* **203**: 1111-1112.
- Gassner, M., D. Stehlik, O. Schrecker, W. Hengstenberg, W. Maurer & H. Ruterjans, (1977) The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. 2. ¹H and ³¹P-nuclear-magnetic-resonance studies on the phosphocarrier protein HPr, phosphohistidines and phosphorylated HPr. *European journal of biochemistry / FEBS* **75**: 287-296.
- Ge, J., H. Xu, T. Li, Y. Zhou, Z. Zhang, S. Li, L. Liu & F. Shao, (2009) A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the IkappaB family of inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 13725-13730.
- Ghigo, E., L. Pretat, B. Desnues, C. Capo, D. Raoult & J.L. Mege, (2009) Intracellular life of *Coxiella burnetii* in macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1166**: 55-66.

- Grangeasse, C., S. Nessler & I. Mijakovic, (2012) Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **367**: 2640-2655.
- Grangeasse, C., R. Terreux & S. Nessler, (2010) Bacterial tyrosine-kinases: structure-function analysis and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* **1804**: 628-634.
- Greenstein, A.E., C. Grundner, N. Echols, L.M. Gay, T.N. Lombana, C.A. Miecskowski, K.E. Pullen, P.Y. Sung & T. Alber, (2005) Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **9**: 167-181.
- Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M.P. Sory & G.R. Cornelis, (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**: 4165-4176.
- Hackstadt, T., (1990) The role of lipopolysaccharides in the virulence of *Coxiella burnetii*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **590**: 27-32.
- Hackstadt, T. & J.C. Williams, (1981) Stability of the adenosine 5'-triphosphate pool in *Coxiella burnetii*: influence of pH and substrate. *J Bacteriol* **148**: 419-425.
- Hakansson, S., E.E. Galyov, R. Rosqvist & H. Wolf-Watz, (1996) The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* **20**: 593-603.
- Hanks, S.K. & T. Hunter, (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**: 576-596.
- Hanks, S.K. & A.M. Quinn, (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods in enzymology* **200**: 38-62.
- Hanks, S.K., A.M. Quinn & T. Hunter, (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.
- Harris, R.J., P.A. Storm, A. Lloyd, M. Arens & B.P. Marmion, (2000) Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. *Epidemiology and infection* **124**: 543-549.
- Hartleib, J., N. Kohler, R.B. Dickinson, G.S. Chhatwal, J.J. Sixma, O.M. Hartford, T.J. Foster, G. Peters, B.E. Kehrel & M. Herrmann, (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* **96**: 2149-2156.
- Heinzen, R.A., M.A. Scidmore, D.D. Rockey & T. Hackstadt, (1996) Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* **64**: 796-809.
- Hendrix, L.R., J.E. Samuel & L.P. Mallavia, (1991) Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *Journal of general microbiology* **137**: 269-276.
- Herrmann, M., P.E. Vaudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler, P.D. Lew, F. Schumacher-Perdreau, G. Peters & F.A. Waldvogel, (1988) Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *The Journal of infectious diseases* **158**: 693-701.
- Hervet, E., X. Charpentier, A. Vianney, J.C. Lazzaroni, C. Gilbert, D. Atlan & P. Doublet, (2011) Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **79**: 1936-1950.
- Hoch, J.A., (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current opinion in microbiology* **3**: 165-170.

- Holm, A., K. Tejle, T. Gunnarsson, K.E. Magnusson, A. Descoteaux & B. Rasmusson, (2003) Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* **302**: 653-658.
- Hoover, T.A., D.W. Culp, M.H. Vodkin, J.C. Williams & H.A. Thompson, (2002) Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* nine mile strain. *Infect Immun* **70**: 6726-6733.
- Horwitz, M.A., (1983) Cell-mediated immunity in Legionnaires' disease. *The Journal of clinical investigation* **71**: 1686-1697.
- Howe, D., J.G. Shannon, S. Winfree, D.W. Dorward & R.A. Heinzen, (2010) *Coxiella burnetii* phase I and II variants replicate with similar kinetics in degradative phagolysosome-like compartments of human macrophages. *Infect Immun* **78**: 3465-3474.
- Hueck, C.J., (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Humphreys, D., P.J. Hume & V. Koronakis, (2009) The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. *Cell host & microbe* **5**: 225-233.
- Huse, M. & J. Kuriyan, (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**: 275-282.
- Inouye, S., R. Jain, T. Ueki, H. Nariya, C.Y. Xu, M.Y. Hsu, B.A. Fernandez-Luque, J. Munoz-Dorado, E. Farez-Vidal & M. Inouye, (2000) A large family of eukaryotic-like protein Ser/Thr kinases of *Myxococcus xanthus*, a developmental bacterium. *Microbial & comparative genomics* **5**: 103-120.
- Itoh, S., K. Suzuki, J. Nishihata, M. Iwasa, T. Oku, S. Nakajin, W.M. Nauseef & S. Toyoshima, (2002) The role of protein kinase C in the transient association of p57, a coronin family actin-binding protein, with phagosomes. *Biological & pharmaceutical bulletin* **25**: 837-844.
- Jevons, M.P., A.W. Coe & M.T. Parker, (1963) Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* **1**: 904-907.
- Jin, T., M. Bokarewa, T. Foster, J. Mitchell, J. Higgins & A. Tarkowski, (2004) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *Journal of immunology* **172**: 1169-1176.
- Johnson, D.L. & J.B. Mahony, (2007) *Chlamydophila pneumoniae* PknD exhibits dual amino acid specificity and phosphorylates Cpn0712, a putative type III secretion YscD homolog. *J Bacteriol* **189**: 7549-7555.
- Jung, K., L. Fried, S. Behr & R. Heermann, (2012) Histidine kinases and response regulators in networks. *Current opinion in microbiology* **15**: 118-124.
- Juris, S.J., A.E. Rudolph, D. Huddler, K. Orth & J.E. Dixon, (2000) A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 9431-9436.
- Kalbitzer, H.R., W. Hengstenberg, P. Rosch, P. Muss, P. Bernsmann, R. Engelmann, M. Dorschug & J. Deutscher, (1982) HPr proteins of different microorganisms studied by hydrogen-1 high-resolution nuclear magnetic resonance: similarities of structures and mechanisms. *Biochemistry* **21**: 2879-2885.
- Kastner, R., O. Dussurget, C. Archambaud, E. Kernbauer, D. Soulat, P. Cossart & T. Decker, (2011) LipA, a tyrosine and lipid phosphatase involved in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **79**: 2489-2498.
- Katayama, Y., T. Ito & K. Hiramatsu, (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 1549-1555.

- Kaufmann, A.F., J.E. McDade, C.M. Patton, J.V. Bennett, P. Skaliy, J.C. Feeley, D.C. Anderson, M.E. Potter, V.F. Newhouse, M.B. Gregg & P.S. Brachman, (1981) Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *American journal of epidemiology* **114**: 337-347.
- Kennelly, P.J., (2002) Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS microbiology letters* **206**: 1-8.
- Kennelly, P.J. & M. Potts, (1996) Fancy meeting you here! A fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. *J Bacteriol* **178**: 4759-4764.
- Kim, D.W., G. Lenzen, A.L. Page, P. Legrain, P.J. Sansonetti & C. Parsot, (2005) The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14046-14051.
- Kinchen, J.M. & K.S. Ravichandran, (2008) Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**: 781-795.
- Kintarak, S., S.A. Whawell, P.M. Speight, S. Packer & S.P. Nair, (2004) Internalization of *Staphylococcus aureus* by human keratinocytes. *Infect Immun* **72**: 5668-5675.
- Knighton, D.R., N.H. Xuong, S.S. Taylor & J.M. Sowadski, (1991a) Crystallization studies of cAMP-dependent protein kinase. Cocrystals of the catalytic subunit with a 20 amino acid residue peptide inhibitor and MgATP diffract to 3.0 Å resolution. *Journal of molecular biology* **220**: 217-220.
- Knighton, D.R., J.H. Zheng, L.F. Ten Eyck, V.A. Ashford, N.H. Xuong, S.S. Taylor & J.M. Sowadski, (1991b) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**: 407-414.
- Knighton, D.R., J.H. Zheng, L.F. Ten Eyck, N.H. Xuong, S.S. Taylor & J.M. Sowadski, (1991c) Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**: 414-420.
- Krebs, E.G. & E.H. Fischer, (1956) The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **20**: 150-157.
- Kristich, C.J., C.L. Wells & G.M. Dunny, (2007) A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3508-3513.
- Krupa, A. & N. Srinivasan, (2005) Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes. *BMC genomics* **6**: 129.
- Kubica, M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. Maciag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster & J. Potempa, (2008) A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **3**: e1409.
- Lee, P.C., T. Umeyama & S. Horinouchi, (2002) afsS is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **43**: 1413-1430.
- Lima, A., R. Duran, G.E. Schujman, M.J. Marchissio, M.M. Portela, G. Obal, O. Pritsch, D. de Mendoza & C. Cervenansky, (2011) Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *J Proteomics* **74**: 1720-1734.
- Lin, S.L., T.X. Le & D.S. Cowen, (2003) SptP, a *Salmonella typhimurium* type III-secreted protein, inhibits the mitogen-activated protein kinase pathway by inhibiting Raf activation. *Cellular microbiology* **5**: 267-275.
- Liu, G.Y., A. Essex, J.T. Buchanan, V. Datta, H.M. Hoffman, J.F. Bastian, J. Fierer & V. Nizet, (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes

- virulence through its antioxidant activity. *The Journal of experimental medicine* **202**: 209-215.
- Lowy, F.D., (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine* **339**: 520-532.
- Lux, R. & W. Shi, (2005) A novel bacterial signalling system with a combination of a Ser/Thr kinase cascade and a His/Asp two-component system. *Mol Microbiol* **58**: 345-348.
- Madec, E., A. Laszkiewicz, A. Iwanicki, M. Obuchowski & S. Seror, (2002) Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol* **46**: 571-586.
- Manai, M. & A.J. Cozzone, (1979) Analysis of the protein-kinase activity of *Escherichia coli* cells. *Biochemical and biophysical research communications* **91**: 819-826.
- Matsumoto, A., S.K. Hong, H. Ishizuka, S. Horinouchi & T. Beppu, (1994) Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**: 47-56.
- Maurin, M. & D. Raoult, (1999) Q fever. *Clinical microbiology reviews* **12**: 518-553.
- McDade, J.E., C.C. Shepard, D.W. Fraser, T.R. Tsai, M.A. Redus & W.R. Dowdle, (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England journal of medicine* **297**: 1197-1203.
- McGowan, J.E., Jr., (1983) Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. *Reviews of infectious diseases* **5**: 1033-1048.
- Meadow, N.D., D.K. Fox & S. Roseman, (1990) The bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Annual review of biochemistry* **59**: 497-542.
- Meiklejohn, G., L.G. Reimer, P.S. Graves & C. Helmick, (1981) Cryptic epidemic of Q fever in a medical school. *The Journal of infectious diseases* **144**: 107-113.
- Miller, M., S. Donat, S. Rakette, T. Stehle, T.R. Kouwen, S.H. Diks, A. Dreisbach, E. Reilman, K. Gronau, D. Becher, M.P. Peppelenbosch, J.M. van Dijl & K. Ohlsen, (2010) Staphylococcal PknB as the first prokaryotic representative of the proline-directed kinases. *PLoS One* **5**: e9057.
- Molle, V. & L. Kremer, (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol Microbiol* **75**: 1064-1077.
- Moreillon, P. & P.A. Majcherczyk, (2003) Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scandinavian journal of infectious diseases* **35**: 632-641.
- Munoz-Dorado, J., S. Inouye & M. Inouye, (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* **67**: 995-1006.
- Nariya, H. & S. Inouye, (2005) Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **58**: 367-379.
- Neu, J.M., S.V. MacMillan, J.R. Nodwell & G.D. Wright, (2002) StoPK-1, a serine/threonine protein kinase from the glycopeptide antibiotic producer *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009, affects oxidative stress response. *Mol Microbiol* **44**: 417-430.
- Ng Yan Hing, J.D., M. Desjardins & A. Descoteaux, (2004) Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C-alpha in phagosome maturation. *Biochemical and biophysical research communications* **319**: 810-816.
- Novick, R.P., (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1429-1449.
- Novick, R.P. & E. Geisinger, (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annual review of genetics* **42**: 541-564.

- Obadia, B., S. Lacour, P. Doublet, H. Baubichon-Cortay, A.J. Cozzone & C. Grangeasse, (2007) Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells. *Journal of molecular biology* **367**: 42-53.
- Odendall, C., N. Rolhion, A. Forster, J. Poh, D.J. Lamont, M. Liu, P.S. Freemont, A.D. Catling & D.W. Holden, (2012) The *Salmonella* kinase SteC targets the MAP kinase MEK to regulate the host actin cytoskeleton. *Cell host & microbe* **12**: 657-668.
- Ostrovsky, P.C. & S. Maloy, (1995) Protein phosphorylation on serine, threonine, and tyrosine residues modulates membrane-protein interactions and transcriptional regulation in *Salmonella typhimurium*. *Genes Dev* **9**: 2034-2041.
- Otto, M., (2008) Staphylococcal biofilms. *Current topics in microbiology and immunology* **322**: 207-228.
- Otto, M., (2010) Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* **64**: 143-162.
- Otto, M., (2012) MRSA virulence and spread. *Cellular microbiology* **14**: 1513-1521.
- Pares, S., N. Mouz, Y. Petillot, R. Hakenbeck & O. Dideberg, (1996) X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nature structural biology* **3**: 284-289.
- Parkinson, J.S. & E.C. Kofoid, (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annual review of genetics* **26**: 71-112.
- Patti, J.M., B.L. Allen, M.J. McGavin & M. Hook, (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**: 585-617.
- Pereira, S.F., L. Goss & J. Dworkin, (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 192-212.
- Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz & M. Fallman, (1997) The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *The EMBO journal* **16**: 2307-2318.
- Persson, C., R. Nordfelth, K. Andersson, A. Forsberg, H. Wolf-Watz & M. Fallman, (1999) Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol Microbiol* **33**: 828-838.
- Petrickova, K. & M. Petricek, (2003) Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology* **149**: 1609-1621.
- Plata, K., A.E. Rosato & G. Wegrzyn, (2009) *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta biochimica Polonica* **56**: 597-612.
- Poh, J., C. Odendall, A. Spanos, C. Boyle, M. Liu, P. Freemont & D.W. Holden, (2008) SteC is a *Salmonella* kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling. *Cellular microbiology* **10**: 20-30.
- Prehna, G., M.I. Ivanov, J.B. Bliska & C.E. Stebbins, (2006) *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**: 869-880.
- Raoult, D., T. Marrie & J. Mege, (2005) Natural history and pathophysiology of Q fever. *The Lancet. Infectious diseases* **5**: 219-226.
- Romano, P.S., M.G. Gutierrez, W. Beron, M. Rabinovitch & M.I. Colombo, (2007) The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cellular microbiology* **9**: 891-909.
- Roseman, S. & N.D. Meadow, (1990) Signal transduction by the bacterial phosphotransferase system. Diauxie and the crr gene (J. Monod revisited). *J Biol Chem* **265**: 2993-2996.

- Scherr, N., P. Muller, D. Perisa, B. Combaluzier, P. Jenö & J. Pieters, (2009) Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G. *J Bacteriol* **191**: 4546-4554.
- Shah, I.M., M.H. Laaberki, D.L. Popham & J. Dworkin, (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* **135**: 486-496.
- Shorr, A.F., (2007) Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **45 Suppl 3**: S171-176.
- Sinha, B. & M. Fraunholz, (2010) *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *International journal of medical microbiology : IJMM* **300**: 170-175.
- Soulat, D., J.M. Jault, B. Duclos, C. Geourjon, A.J. Cozzone & C. Grangeasse, (2006) *Staphylococcus aureus* operates protein-tyrosine phosphorylation through a specific mechanism. *J Biol Chem* **281**: 14048-14056.
- St-Denis, A., V. Caouras, F. Gervais & A. Descoteaux, (1999) Role of protein kinase C- α in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *Journal of immunology* **163**: 5505-5511.
- Steele-Mortimer, O., J.H. Brumell, L.A. Knodler, S. Meresse, A. Lopez & B.B. Finlay, (2002) The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cellular microbiology* **4**: 43-54.
- Stock, A.M., V.L. Robinson & P.N. Goudreau, (2000) Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* **69**: 183-215.
- Sutherland, E.W., Jr. & W.D. Wosilait, (1955) Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* **175**: 169-170.
- Tamber, S., J. Schwartzman & A.L. Cheung, (2010) Role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300. *Infect Immun* **78**: 3637-3646.
- Thakker, M., J.S. Park, V. Carey & J.C. Lee, (1998) *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun* **66**: 5183-5189.
- Thakur, M. & P.K. Chakraborti, (2008) Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis. *The Biochemical journal* **415**: 27-33.
- Theeya, N., A. Ta, S. Das, R.S. Mandal, O. Chakrabarti, S. Chakrabarti, A.N. Ghosh & S. Das, (2015) An inducible and secreted eukaryote-like serine/threonine kinase of *Salmonella enterica* serovar Typhi promotes intracellular survival and pathogenesis. *Infect Immun* **83**: 522-533.
- Thomasson, B., J. Link, A.G. Stassinopoulos, N. Burke, L. Plamann & P.L. Hartzell, (2002) MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **46**: 1399-1413.
- Tiwari, D., R.K. Singh, K. Goswami, S.K. Verma, B. Prakash & V.K. Nandicoori, (2009) Key residues in *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host. *J Biol Chem* **284**: 27467-27479.
- Toman, R. & L. Skultety, (1996) Structural study on a lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* strain Nine Mile in avirulent phase II. *Carbohydrate research* **283**: 175-185.
- Toman, R., L. Skultety & R. Ihnatko, (2009) *Coxiella burnetii* glycomics and proteomics--tools for linking structure to function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1166**: 67-78.
- van der Woude, A.D., E.J. Stoop, M. Stieess, S. Wang, R. Ummels, G. van Stempvoort, S.R. Piersma, A. Cascioferro, C.R. Jimenez, E.N. Houben, J. Luirink, J. Pieters, A.M. van der Sar & W.

- Bitter, (2014) Analysis of SecA2-dependent substrates in *Mycobacterium marinum* identifies protein kinase G (PknG) as a virulence effector. *Cellular microbiology* **16**: 280-295.
- Voyich, J.M., K.R. Braughton, D.E. Sturdevant, A.R. Whitney, B. Said-Salim, S.F. Porcella, R.D. Long, D.W. Dorward, D.J. Gardner, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser & F.R. DeLeo, (2005) Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *Journal of immunology* **175**: 3907-3919.
- Waag, D.M., (2007) *Coxiella burnetii*: host and bacterial responses to infection. *Vaccine* **25**: 7288-7295.
- Walburger, A., A. Koul, G. Ferrari, L. Nguyen, C. Prescianotto-Baschong, K. Huygen, B. Klebl, C. Thompson, G. Bacher & J. Pieters, (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* **304**: 1800-1804.
- Walsh, D.A., D.B. Glass & R.D. Mitchell, (1992) Substrate diversity of the cAMP-dependent protein kinase: regulation based upon multiple binding interactions. *Current opinion in cell biology* **4**: 241-251.
- Walsh, D.A., J.P. Perkins & E.G. Krebs, (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**: 3763-3765.
- Wan, F., D.E. Anderson, R.A. Barnitz, A. Snow, N. Bidere, L. Zheng, V. Hegde, L.T. Lam, L.M. Staudt, D. Levens, W.A. Deutsch & M.J. Lenardo, (2007) Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* **131**: 927-939.
- Wang, J., C. Li, H. Yang, A. Mushegian & S. Jin, (1998) A novel serine/threonine protein kinase homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the host infection site and is required for full virulence in neutropenic mice. *J Bacteriol* **180**: 6764-6768.
- Wang, J.Y. & D.E. Koshland, Jr., (1978) Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **253**: 7605-7608.
- Wehenkel, A., M. Bellinzoni, M. Grana, R. Duran, A. Villarino, P. Fernandez, G. Andre-Leroux, P. England, H. Takiff, C. Cervenansky, S.T. Cole & P.M. Alzari, (2008) Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 193-202.
- Wertheim, H.F., D.C. Melles, M.C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh & J.L. Nouwen, (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet. Infectious diseases* **5**: 751-762.
- Wong, D., H. Bach, J. Sun, Z. Hmama & Y. Av-Gay, (2011) *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 19371-19376.
- Yarwood, J.M. & P.M. Schlievert, (2003) Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of clinical investigation* **112**: 1620-1625.
- Yeats, C., R.D. Finn & A. Bateman, (2002) The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends in biochemical sciences* **27**: 438.
- Zhao, X. & J.S. Lam, (2002) WaaP of *Pseudomonas aeruginosa* is a novel eukaryotic type protein-tyrosine kinase as well as a sugar kinase essential for the biosynthesis of core lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **277**: 4722-4730.
- Zheng, J.H., D.R. Knighton, J. Parello, S.S. Taylor & J.M. Sowadski, (1991) Crystallization of catalytic subunit of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Methods in enzymology* **200**: 508-521.
- Zhou, P., W. Li, D. Wong, J. Xie & Y. Av-Gay, (2015) Phosphorylation control of protein tyrosine phosphatase A activity in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS letters* **589**: 326-331.

- Zhou, Y., N. Dong, L. Hu & F. Shao, (2013) The *Shigella* type three secretion system effector OspG directly and specifically binds to host ubiquitin for activation. *PLoS One* **8**: e57558.
- Zurawski, D.V., C. Mitsuhashi, K.L. Mummy, B.A. McCormick & A.T. Maurelli, (2006) OspF and OspC1 are *Shigella flexneri* type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence. *Infect Immun* **74**: 5964-5976.
- Zurawski, D.V., K.L. Mummy, C.S. Faherty, B.A. McCormick & A.T. Maurelli, (2009) *Shigella flexneri* type III secretion system effectors OspB and OspF target the nucleus to downregulate the host inflammatory response via interactions with retinoblastoma protein. *Mol Microbiol* **71**: 350-368.

ADRESSE DU LABORATOIRE

CNRS UMR5235 – Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques
Université Montpellier 2 – Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5

RÉSUMÉ**Phosphorylation et interaction hôte/pathogène: analyse de deux facteurs bactériens sécrétés, la kinase CstK de *Coxiella burnetii* et la phosphatase PtpA de *Staphylococcus aureus*.**

Afin de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte et créer les niches nécessaires à leur survie, les bactéries pathogènes ont développé de nombreux mécanismes ciblant les voies de signalisation de la cellule hôte. L'un de ces mécanismes repose sur la sécrétion de protéines bactériennes dans les cellules cibles afin de moduler directement leurs réseaux de signalisation. Cependant, les signaux, les senseurs et les effecteurs impliqués dans ces régulations sont encore peu ou mal connus. La détection de l'environnement dans la cellule hôte lors de l'infection est l'élément clé d'une réponse adaptée, et les systèmes de signalisation basés sur les mécanismes de phosphorylation sont par conséquent indispensables à l'adaptation hôte-pathogène. Lors de ma thèse, j'ai tout d'abord étudié le rôle d'une nouvelle protéine kinase bactérienne identifiée chez *Coxiella burnetii*, nommée CstK (*Coxiella* serine threonine Kinase). *C. burnetii*, l'agent étiologique de la zoonose appelée fièvre Q, modifie les défenses de la cellule hôte, permettant sa réplication dans des vacuoles spécifiques au sein de la cellule infectée. Par ailleurs, la sécrétion d'un grand nombre d'effecteurs bactériens est indispensable au détournement du phagosome par *Coxiella*. Nous avons démontré que cette protéine kinase est capable de s'autophosphoryler et par conséquent possède une activité kinase. De plus, nous avons identifié différentes protéines spécifiques de la cellule hôte interagissant avec CstK à l'aide du modèle amibe *Dictyostelium discoideum*, un phagocyte professionnel eucaryote, permettant des études génétiques et biochimiques. Dans la deuxième partie de mon projet, j'ai étudié la régulation de la tyrosine phosphatase PtpA de *Staphylococcus aureus*, et démontré sa sécrétion. Bien connu dans les hôpitaux, ce pathogène humain est responsable de nombreuses maladies nosocomiales et l'apparition exponentielle de souches multi-résistantes en font un problème majeur. *S. aureus* est capable d'envahir et de persister dans différents types cellulaires en sécrétant des protéines effectrices qui vont moduler les réponses cellulaires. Nous avons démontré que PtpA était sécrétée durant la phase de croissance bactérienne, et pu déterminer que PtpA possédait une activité tyrosine phosphatase, régulée par la tyrosine kinase CapA1B2.

ABSTRACT**Phosphorylation and host/pathogen interactions : study of two bacterial secreted factors, the kinase CstK from *Coxiella burnetii* and the phosphatase PtpA from *Staphylococcus aureus*.**

Bacterial pathogens have developed diverse strategies towards host signalling pathways, in order to subvert the immune response and/or create permissive niches for their survival. One such strategy is based on the secretion of bacterial signalling proteins into the target host cells, thereby directly modulating the status of host signalling networks. Because the mechanisms involved are largely intractable to most *in vivo* analyses, very little is known about the signals, sensors, and effectors mediating these adaptations. Sensing the host environment is a key component to execute appropriate developmental programs, and the eukaryotic-like phosphosignaling systems in prokaryotes are emerging as equally important regulatory systems as the well-known eukaryotic systems, but the study of their functions is still in its infancy. The innovative aspect of this project resides in the study of the emerging role of secreted Ser/Thr kinases and phosphatases in the control of host-pathogen interactions thus modifying the global host response during infection. During my thesis, I first investigated the role of a novel bacterial protein kinase identified in *Coxiella burnetii* that we named CstK (*Coxiella* serine threonine Kinase). *C. burnetii*, the etiological agent of the emerging zoonosis Q fever, subverts host cell defenses, permitting its intracellular replication in specialized vacuoles within host cells. Secretion of a large number of bacterial effectors into host cell is absolutely required for rerouting the *Coxiella* phagosome. We demonstrated that this putative protein kinase identified by *in silico* analysis of the *C. burnetii* genome is able to autophosphorylate and undergoes *in vitro* phosphorylation. Moreover, we identified specific host cell proteins interacting with CstK, by the use of the model amoeba *Dictyostelium discoideum*, an eukaryotic professional phagocyte amenable to genetic and biochemical studies. In the second part of my project, I was interested in the role of a putative secreted protein tyrosine phosphatase (PtpA) from *Staphylococcus aureus*. Well-known in hospital-acquired diseases, *S. aureus* produces multiple virulence factors that lead to various severe diseases, and the increase of multi-resistant strains is a major concern. This pathogen has the ability to invade and persist in a number of different human host cell types, secreting effector proteins to modulate cellular responses. Here we demonstrated that PtpA is secreted during the bacterial growth. We also determined that PtpA presents a tyrosine phosphatase activity that is regulated by the tyrosine protein kinase CapA1B2 of *S. aureus*.

MOTS-CLÉS

Phosphorylation – Interactions hôte/pathogène – *Coxiella burnetii* – *Staphylococcus aureus* – Ser/Thr Kinase – Tyr Phosphatase