



# La réponse au stress chez les bactéries : réponse au stress métallique chez *Pseudomonas putida* et au stress rencontré en cours d'infection de plante chez le phytopathogène *Dickeya dadantii*

Kévin Royet

## ► To cite this version:

Kévin Royet. La réponse au stress chez les bactéries : réponse au stress métallique chez *Pseudomonas putida* et au stress rencontré en cours d'infection de plante chez le phytopathogène *Dickeya dadantii*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1206 . tel-02426000

**HAL Id: tel-02426000**

**<https://theses.hal.science/tel-02426000>**

Submitted on 1 Jan 2020

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

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



N°d'ordre NNT : xxx

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale : ED341**  
**Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation**

**Spécialité/discipline de doctorat : Microbiologie moléculaire**

Soutenue publiquement le 24/10/2018, par :  
**Kévin Royet**

---

**La réponse au stress chez les bactéries: réponse au stress  
métallique chez *Pseudomonas putida* et au stress rencontré  
en cours d'infection de plante chez le phytopathogène  
*Dickeya dadantii*.**

---

Devant le jury composé de :

WISNIEWSKI, Florence  
NOEL, Laurent  
SCHALK, Isabelle  
COLLET, Jean-François  
GUEGUEN, Erwan  
RODRIGUE, Agnès

Professeur Université Lyon1  
Directeur de recherche INRA de Toulouse  
Directeur de recherche Université de Strasbourg  
Directeur de recherche Institut de Duve, Louvain  
Maître de conférences Université Lyon1  
Maître de conférences INSA de Lyon





# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

## **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE



## Remerciements

Ce manuscrit concrétise un travail de recherche de trois années au sein du laboratoire Microbiologie Adaptation et Pathogénie. Il n'aurait pas pu exister sans la contribution de plusieurs personnes que je souhaite remercier.

En premier lieu, je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Un très grand merci également à Erwan Gueguen, mon directeur de thèse. Je te suis reconnaissant pour m'avoir formé en microbiologie moléculaire et au métier de la recherche durant ces trois années. Tes conseils, ton dynamisme et ta bonne humeur m'ont permis d'être là où j'en suis aujourd'hui. Etant ton premier doctorant, j'espère que je ne t'ai pas épuisé et que tu souhaiteras continuer l'aventure avec d'autres. Enfin j'espère que ces travaux te satisferont.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de pilotage Bérengère Ize, Sylvie Elsen, Sabine Favre-Bonte pour leurs conseils et discussions sur le sujet. Vos avis m'ont permis d'avoir un autre regard sur les résultats que j'ai obtenu au cours de cette thèse. Plus particulièrement je tiens à remercier Xavier Charpentier, un des mes anciens encadrants de stage et président de mon comité de pilotage. Tes conseils ont toujours été pertinents, merci pour tout.

Je tiens à remercier toute l'équipe « Trafic et signalisation membranaires », plus particulièrement les historiques Julien Cayron et Manon Gault, les actuelles : Kevin Rome, Agnès Rodrigue, Michel Droux, Guy Condemine, Vladimir Shevchik, Nicole Cotte Pattat, Céline Borde et Géraldine Effantin avec qui j'ai beaucoup échangé tout au long de la thèse. J'ai eu le plaisir d'encadrer plusieurs étudiantes de Master 1 dont Morgane Roussin, actuellement en thèse à son tour, qui n'a donc pas été totalement écœurée par un sujet difficile. Parmi les autres stagiaires, je remercie Charlotte Oriol et Laura Kergoat. Vous avez réalisé un très bon travail qui a grandement contribué à l'avancée de ma thèse. Votre joie de vivre et votre humour ont été un plaisir au quotidien. Je vous souhaite tout le meilleur dans la suite de vos études. Ce travail n'aurait pas pu être effectué sans une assistance technique plus qu'efficace. Je remercie donc Véronique Utzinger et Marie-André Lavital, pour leur travail essentiel à la bonne marche du laboratoire mais aussi leur gentillesse au quotidien.

La thèse m'a également permis de faire de belles rencontres. Merci aux membres de l'équipe « Génétique moléculaire des levures » notamment senseï Marc Lemaire et Alexandre Soulard pour vos conseils et votre humour, également Julien Wawrzyniak et

Mégane Gaston pour les bons moments passés. Je salue mon fidèle acolyte en la personne de Kevin Rome (aussi connu comme la future victime d'ours brun) avec qui j'ai passé d'excellents moments, entre partage de repas équilibrés à base de carottes et de jus martiniquais riches en vitamines. Je remercie aussi Jade Ravent, pour tous les excellents moments passés ensemble, son aide pour corriger ce manuscrit et son self contrôle. Merci aussi à Céline Borde d'avoir apporté sa bonne humeur au laboratoire. J'ai apprécié vous côtoyer au quotidien. Votre joie de vivre et les nombreux vers que nous avons écrits ensemble resteront dans ma mémoire.

Enfin, je finirai par remercier mon entourage le plus proche, mes parents à qui je ne dis pas assez merci et qui ont toujours été présents, mes frères qui pensent que mes études ne finiront jamais et qui auraient préféré que je devienne un « vrai docteur » et enfin ma copine qui supporte ma vie « d'étudiant » au quotidien.





## Résumé

Les bactéries environnementales font face à de très nombreux stress dans leur milieu de vie. Ces dernières doivent s'acclimater rapidement pour faire face à des variations de température, des changements d'osmolarité, des changements de pH ou encore des carences nutritives afin de survivre et de prospérer dans leur environnement naturel. Ce travail de thèse s'inscrit dans l'étude de la réponse aux stress chez les bactéries environnementales en prenant l'exemple du stress engendré par les métaux chez la bactérie modèle *Pseudomonas putida* et du stress rencontré en cours d'infection de plante chez le phytopathogène *Dickeya dadantii*. La présence d'un excès d'ions métalliques ainsi que les défenses d'une plante sur un phytopathogène entraînent tout deux un stress oxydatif et peut provoquer une altération membranaire ainsi que protéique. Ces stress, à première vue éloignés, pourraient ainsi induire des mécanismes de réponses similaires chez les bactéries. La plupart des études de résistance aux stress chez les bactéries portent sur l'étude de gènes sur ou sous exprimés et peuvent alors manquer des gènes importants pour la réponse à un stress donné dont l'expression reste inchangée. Afin d'identifier de nouveaux facteurs de résistance aux stress métalliques chez *P. putida* ainsi que de nouveaux facteurs de résistance/virulence chez le phytopathogène *D. dadantii*, un crible Tn-seq (Transposon-Sequencing) a été réalisé à l'aide de banques de mutants très denses. Les deux cribles ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de régulateurs de transcription ainsi que l'importance des mécanismes d'efflux dans la réponse à un stress. Les deux cribles ont aussi mis en évidence l'importance des voies de biosynthèses en acides aminées et acides nucléiques. Enfin, de nombreux gènes à fonction inconnue participent à la survie des deux bactéries en condition de stress. Les résultats obtenus pourraient permettre de développer de nouveaux antimicrobiens chez *D. dadantii*. Les mécanismes de résistance aux métaux et aux antibiotiques peuvent être similaires. Nos travaux améliorent la compréhension des mécanismes de résistance aux métaux et pourraient ainsi permettre de trouver de nouvelles molécules à activité antimicrobienne.

MOTS-CLÉS: cobalt, cadmium, zinc, cuivre, stress, efflux, résistance, Tn-seq, *Pseudomonas putida*, *Dickeya Dadantii*, maladie de la pourriture molle, mobilité, métabolisme, glycosylation





## Summary

Environmental bacteria have to deal with a number of stresses in their living environment. The bacteria have to adapt quickly to changes in temperature, osmolarity, pH changes or nutrient deficiencies in order to survive and thrive in their natural environment. This thesis work is related to the study of stress response in environmental bacteria by taking the example of stress caused by metals in the bacterium *Pseudomonas putida* model and stress encountered during plant infection in the phytopathogen *Dickeya dadantii*. The presence of an excess of metal ions as well as the defences of a plant on a phytopathogen both cause oxidative stress and can cause membrane and protein alteration. These stresses, at first sight distant, could thus induce similar response mechanisms in bacteria. Most stress resistance studies in bacteria focus on the study of over- or under-expressed genes and may then lack genes important for the response to a given stress whose expression remains unchanged. In order to identify new metal stress resistance genes in *P. putida* and new resistance/virulence factors in *D. dadantii* phytopathogen, a Tn-seq (Transposon-Sequencing) screen was performed using very dense mutant banks. Both screens highlighted the major role of transcription regulators as well as the importance of efflux mechanisms in the response to stress. Both screens also highlighted the importance of amino acid and nucleic acid biosynthesis pathways. Finally, many genes with unknown function participate in the survival of both bacteria in stress conditions. The results obtained could lead to the development of new antimicrobials in *D. dadantii*. The mechanisms of resistance to metals and antibiotics may be similar. Our work is improving our understanding of metal resistance mechanisms and could lead to new molecules with antimicrobial activity.

KEYWORDS: cobalt, cadmium, zinc, copper, stress, efflux, resistance, Tn-seq, *Pseudomonas putida*, *Dickeya Dadantii*, soft-rot disease, motility, metabolism, glycosylation



# Table des matières

<b>Liste des figures .....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>6</b>
<b>A- Introduction bibliographique.....</b>	<b>7</b>
<b>I- les mécanismes de réponse au stress .....</b>	<b>7</b>
1.1 Généralités.....	7
1.2 Le stress acide.....	9
1.2.1 Importance de la force protomotrice .....	9
1.2.2 Mécanismes de protection du périplasme .....	10
1.2.3 Mécanismes de protection du cytosol.....	12
1.2.3.1 Rôle des régulateurs et des systèmes à deux composants .....	12
1.2.3.3 Systèmes enzymatiques.....	15
1.3 Stress osmotique .....	17
1.3.1 Généralités .....	17
1.3.2 Accumulation de composés organiques.....	19
1.3.3 Accumulation de composés inorganiques.....	20
1.3.4 Les autres mécanismes de protection.....	22
1.4 Le stress oxydatif.....	24
1.4.1 Protection enzymatique .....	25
1.4.2 Protection non enzymatique .....	27
1.4.3 Réparation des dommages du stress oxydatif.....	29
1.4.3.1 Réparation des dommages aux protéines.....	29
1.4.3.2 Réparation des dommages causés à l'ADN .....	30
1.5 Stress nutritionnel .....	31
<b>II. Les métaux, un générateur de stress chez les bactéries.....</b>	<b>35</b>
2.1 Origines et intérêt de les étudier .....	35
2.2 Essentialité des métaux.....	36
2.3 Toxicité des métaux.....	38
2.3.1 Toxicité : Liaison aspécifique.....	38
2.3.2 Toxicité et nature du métal :.....	39
2.3.3 Toxicité : stress oxydant : .....	40
2.4- Les métaux au centre des interactions Hommes-bactéries et plantes-bactéries : Rôle bénéfique et néfaste dans ces deux interactions.....	42
2.4.1 Interaction Homme/micro-organismes.....	42
2.4.1.1 Effet néfaste du métal sur les bactéries .....	42

2.4.1.2 Effet néfaste du métal sur l'hôte.....	44
2.4.1.3 Importance des métaux dans les interactions symbiotiques .....	45
2.4.2 Interactions plantes/micro-organismes .....	45
2.4.2.1 Combat pour l'accès aux métaux entre la plante et le pathogène .....	45
2.4.2.2 Rôle néfaste des métaux dans les interactions plantes/micro-organismes.....	46
2.5 Comment les bactéries s'assurent d'acquérir le bon métal ? .....	48
2.5.1 Comment discerner le bon métal ? .....	48
2.5.2 Comment trouver l'équilibre ?.....	49
2.6 La résistance aux métaux chez les bactéries dont <i>Pseudomonas</i> .....	51
2.6.1 Réduction de la perméabilité membranaire.....	52
2.6.2 Séquestration des ions métalliques.....	52
2.6.3 Système de transport actif .....	53
2.6.4 Modification enzymatique du métal vers une forme moins toxique .....	53
2.6.5 Réparation d'une protéine cible .....	54
<b>III. Les stress rencontrés dans la plante par <i>Dickeya Dadantii</i> et ses mécanismes de virulence .....</b>	<b>55</b>
3.1 Généralité sur <i>Dickeya</i> .....	55
3.2 Les mécanismes de résistance à un environnement acide.....	56
3.3 Les mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens.....	58
3.4 Adaptation aux conditions d'anaérobiose dans les tissus de la plante .....	59
3.5 Adaptation aux dérivés réactifs de l'oxygène produit par la plante en cours d'infection .....	60
3.6 Adaptation au stress osmotique .....	61
3.7 Résumé des mécanismes de virulence et de sa régulation .....	64
3.7.1 Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.....	64
3.7.2 Régulation de la production des CWDE de <i>D. dadantii</i> durant l'infection.....	66
3.7.3 La virulence ne se limite pas aux CWDE .....	67
3.7.4 Importance du fer dans l'infection.....	68
<b>IV. Le Tn-seq comme moyen d'étude de la réponse au stress chez <i>P. putida</i> et <i>D. dadantii</i> .....</b>	<b>70</b>
4.1 Principe de la méthode .....	70
4.1.1 Historique.....	70
4.1.2 Les différentes façon d'utiliser des banques de mutants.....	70
4.1.3 Principe général du Tn-seq .....	71
4.1.4 Les différentes variantes du Tn-seq .....	72
4.1.5 Analyse des données.....	74
4.1.6 Le RB-Tnseq.....	76
4.2 Les applications possibles .....	76

4.2.1 assigner un gène à une fonction .....	76
4.2.2 Etude de gènes non codants .....	77
4.3- Avantages et inconvénients.....	78
4.3.1 Transposon : Mariner vs Tn5.....	78
4.3.2 Les goulots d'étranglement.....	78
4.3.3 Les analyses avec annotations dépendantes/indépendantes .....	80
<b>V. Objectifs de thèse .....</b>	<b>82</b>
<b>B-Matériels et Méthodes.....</b>	<b>84</b>
<b>I-Souches bactériennes, plasmides et techniques de microbiologie .....</b>	<b>84</b>
1.1 Tableaux souches et plasmides .....	84
1.2 Composition des milieux de culture (LB, M63) .....	92
1.2.1 Milieu riche LB.....	92
1.2.2 Milieu minimum M63 .....	92
1.3 Conditions de culture et conservation des souches bactériennes .....	92
1.4 Détermination du seuil de toxicité des métaux pour les différentes souches bactériennes et suivit de Luminescence/fluorescence. ....	93
1.4.1 Culture liquide en tube .....	93
1.4.2 Culture liquide en plaque.....	93
1.5 Conjugaison sur milieu solide .....	93
1.6 Construction des librairies de mutants par transposition .....	94
1.7 Compétitions de souches bactériennes en plaque .....	94
1.8 Culture individuelle en plaque 96 puits .....	94
1.9 Tests d'infection d'endives.....	95
2.1 Extraction d'ADN .....	95
2.2 Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaine (PCR).....	96
2.3 Transformation par de l'ADN plasmidique .....	96
2.3.1 Technique du TSS.....	96
2.3.2 Electroporation .....	97
2.4.1 Clonage par action d'endonucléase de restriction.....	97
2.4.2 Purification d'un fragment d'ADN.....	97
2.4.3 Ligature de fragments d'ADN.....	98
2.4.4 Clonage par SLIC [282] .....	98
2.5 Séparation par électrophorèse en gel d'agarose.....	98
2.6 Construction des souches mutantes ( <i>Pseudomonas</i> et <i>Dickeya</i> ).....	99
2.7 Préparation des librairies Tn-seq .....	99
3.1 Alignements de séquences protéiques.....	100
3.2 Prédiction de topologie protéique .....	101

3.3 Recherche de domaines protéiques .....	101
3.4 Analyses statistiques.....	101
3.5 Traitement de données de séquençage .....	101
<b>C- Résultats.....</b>	<b>102</b>
1. Présentation du travail de thèse.....	102
2. Choix des modèles de micro-organismes .....	103
3- Choix de l'outil Tn-seq .....	104
4.1 Genome Wide Identification Of Bacterial Genes Required For Plant Infection By Tn-Seq .....	106
4.1.1 Introduction d'article .....	107
4.1.2 Discussion .....	109
4.1.3 Résultats additionnels .....	117
4.2 Genome wide identification of metal resistance genes in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	120
4.2.1 Introduction d'article .....	121
4.2.2 Discussion .....	122
4.2.3 Résultats additionnels .....	130
<b>Conclusion générale &amp; perspectives.....</b>	<b>132</b>
<b>D- Bibliographie .....</b>	<b>134</b>
<b>E- Annexes .....</b>	<b>163</b>

# Liste des figures

FIGURE 1: STRESS ENVIRONNEMENTAUX LORS DE LA COLONISATION DE L'HOTE PAR LES ENTEROBACTERIES. ....	8
FIGURE 2: HOMEOSTASIE PH CHEZ LES BACTERIES.....	10
FIGURE 3: REPLIEMENT PROTEIQUE DANS LE PERIPLASME PAR L'INTERMEDIAIRE DE CHAPERONNE.....	11
FIGURE 4: GENES DE VIRULENCE INDUIS PAR OMPR EN REPONSE A L'ACIDITE CHEZ <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> .....	13
FIGURE 5: SYSTEME DE TRANSPORT DU CLC EN REPONSE A UN PH ENVIRONNANT TRES FAIBLE. ....	15
FIGURE 6: BILAN DES SYSTEMES DE REPONSE A UN FAIBLE PH.....	17
FIGURE 7: OSMOLARITE ET FLUX D'EAU DANS LA CELLULE.....	18
FIGURE 8: ENTREE DE SOLUTES COMPATIBLES EN REPONSE A UNE OSMOLARITE ELEVEE.....	20
FIGURE 9: HOMEOSTASIE DU POTASSIUM CHEZ <i>E. COLI</i> .....	22
FIGURE 10: SOURCE D' H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> DANS LA CELLULE.....	25
FIGURE 11: ENZYMES DE LUTTE CONTRE LE STRESS OXYDATIF.....	27
FIGURE 12: MECANISMES DE DEFENSE INDIRECTE AU STRESS OXYDATIF .....	29
FIGURE 13 : MECANISMES DE SYNTHESE ET D'HYDROLYSE DU (P)PPGPP PAR RELA ET SPOT ET LEURS MECANISMES D'ACTION.....	32
FIGURE 14: DIAGRAMME ILLUSTRANT LES DIFFERENTS ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DES BACTERIES AFFECTEES PAR (P)PPGPP. .....	34
FIGURE 15: ION COBALT COFACTEUR DE COBALAMINE.....	38
FIGURE 16: UN TABLEAU PERIODIQUE DES METAUX ET METALLOÏDES BENEFIQUES ET TOXIQUES.....	40
FIGURE 17: LES METAUX DANS LES INTERACTIONS HOMMES-BACTERIES.....	43
FIGURE 18: REPONSE DU MACROPHAGE DEPENDANTE DU CUIVRE LORS D'UNE INFECTION BACTERIENNE PAR <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> ET <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> . ....	44
FIGURE 19: LES METAUX DANS LES INTERACTIONS PLANTES-MICROBES. ....	47
FIGURE 20: LOCALISATION DU REPLIEMENT PROTEIQUE POUR LA SELECTION DU METAL. ....	49
FIGURE 21: LES DIFFERENTS SYSTEMES DE TRANSPORT DE METAUX EN FONCTION DE LA SERIE D'IRWING WILLIAMS CHEZ <i>E. COLI</i> . ....	51
FIGURE 22: LES PRINCIPAUX MECANISMES DE RESISTANCE AUX METAUX AVEC DES EXEMPLES CHEZ <i>PSEUDOMONAS</i> . ....	52
FIGURE 23: CYCLE DE VIE DE <i>DICKEYA</i> . ....	56
FIGURE 24: PROCESSUS D'INFECTION DE <i>D. DADANTII</i> . ....	59
FIGURE 25: SCHEMA BILAN DE LA PATHOGENICITE DE <i>D. DADANTII</i> CHEZ LA PLANTE.....	63
FIGURE 26: SCHEMA DES PRINCIPAUX REGULATEURS DE <i>D. DADANTII</i> PENDANT LA PATHOGENESE.....	67
FIGURE 27: PROCEDURE DU TN-SEQ. ....	72
FIGURE 28: QUATRE METHODES DE PREPARATIONS DES BORDURES DE TRANSPOSON POUR LE SEQUENÇAGE.....	74
FIGURE 29: LES GOULOTS D'ETRANGLEMENTS.....	80
FIGURE 30 : LES MUTANTS « TRICHEURS » EN TN-SEQ.....	109
FIGURE 31 BILAN DES SYSTEMES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DES FACTEURS DE VIRULENCE CHEZ <i>D. DADANTII</i> .....	116
FIGURE 32: INFECTION D'ENDIVE PAR LES MUTANTS DE DELETION DE <i>D. DADANTII</i> . ....	119



FIGURE 33 : BILAN DES SYSTEMES DE RESISTANCE AUX METAUX CHEZ <i>P. PUTIDA</i> DECOUVERT PAR TN-SEQ.....	129
FIGURE 34 : PP_5337 REGULE L'ACTIVITE DU GENE <i>ASPÁ</i> EN PRESENCE ET ABSENCE DE CUIVRE. ....	131

## Liste des tableaux

TABLEAU 1: METAUX DE TRANSITION ESSENTIELS A LA CHAINE DE TRANSPORT DES ELECTRONS. ....	36
TABLEAU 2: FONCTIONS BIOLOGIQUES DE QUELQUES METAUX DE TRANSITION. ....	38
TABLEAU 3: TENEURS THEORIQUES EN METAUX DANS L'EAU DE MER, BACTERIE ET PLANTE. ....	39

# A- Introduction bibliographique

## I- les mécanismes de réponse au stress

### 1.1 Généralités

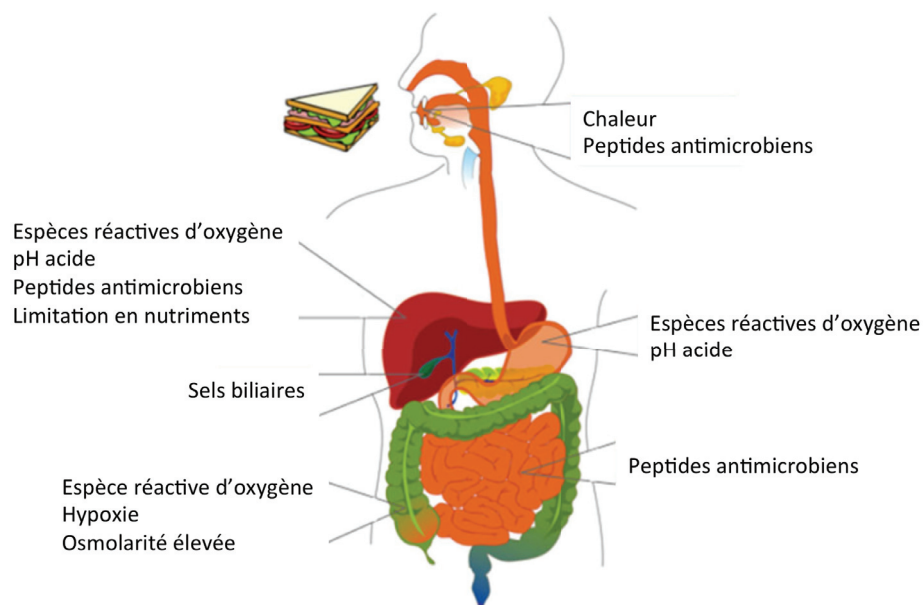
Les micro-organismes sont adaptés pour fonctionner de façon optimale dans leur habitat naturel. Ils doivent pourtant faire face à de nombreux stress tels que les variations de pH, une osmolarité changeante, une disponibilité variée en nutriments, des variations de température etc... La situation rencontrée par les entérobactéries en est une belle illustration. Les entérobactéries sont transmises de l'environnement à l'intestin du mammifère par l'intermédiaire de l'eau ou d'aliments. Au passage dans l'hôte, les entérobactéries sont confrontées à de grandes variations environnementales telles qu'un pH extrêmement bas dans l'estomac (pH 1,5-2) et une osmolarité élevée. Ces entérobactéries font aussi face aux défenses de l'hôte dans le système intestinal (Figure 1). Les pathogènes de plantes sont également confrontés à différents stress tels qu'une disponibilité en eau variable à la surface des plantes et des changements de température durant les saisons [1]. L'ampleur du changement des conditions de vie peut alors causer un défaut de croissance allant jusqu'à la mort [2]. La plupart des bactéries du sol sont capables de tolérer des changements d'amplitude variables dans leur milieu de vie en s'adaptant au cours du temps [3].

Ces changements des conditions environnementales loin des optimums de croissance engendrent l'induction de réponses au stress élaborées. Les stratégies employées sont généralement orientées pour favoriser la survie plutôt que la croissance.

Les mécanismes de réponse au stress peuvent être généraux ou spécifiques du stress rencontré. La réponse générale au stress est une réponse cellulaire commune qui peut être déclenchée par diverses conditions de stress, telles qu'une osmolarité élevée, une température basse, un pH acide ou un manque de nutriments [4]. La sous-unité sigma(S) de l'ARN polymérase (RpoS) est le régulateur central de nombreuses conditions de stress chez *E. coli*, ce qui augmente considérablement la spécificité des promoteurs des gènes impliqués dans les processus adaptatifs et diminue l'affinité de l'ARN polymérase (RNAP) pour les gènes non essentiels [5]. Les réponses spécifiques à un seul stress vont

quant à elles privilégier l'expression d'un petit nombre de gènes spécialement adaptés. Une interaction entre plusieurs stress est parfois possible, c'est le cas d'un pH faible qui amplifie la toxicité des radicaux oxygénés [6][7]. Les différents niveaux de réponses au stress montrent la complexité des systèmes de survie des bactéries.

Certains micro-organismes ont ainsi évolué et sont capables de s'adapter rapidement à un environnement en constante évolution, développant ainsi une tolérance ou une résistance à des "doses" accrues de stress particuliers. Différents types d'organismes possèdent des résistances inhérentes et des susceptibilités différentes au stress. Par exemple, les bactéries à Gram négatif sont considérées comme étant plus sensibles au choc thermique, à la réfrigération et à la congélation que les bactéries à Gram positif [8]. Les sections suivantes se concentreront sur la description des mécanismes de réponses aux principaux stress rencontrés par les bactéries dans leur environnement.



**Figure 1: Stress environnementaux lors de la colonisation de l'hôte par les entérobactéries.**

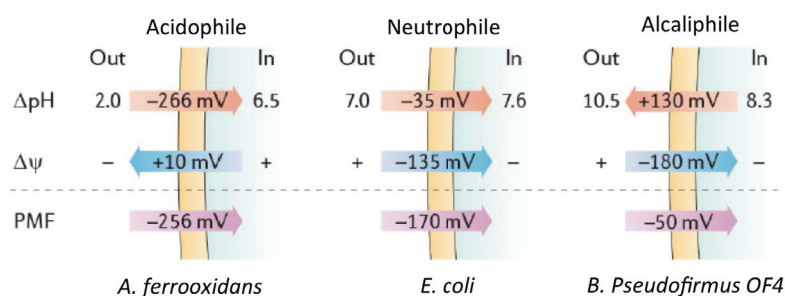
Après ingestion, les entérobactéries rencontrent différentes conditions de stress dans la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon de l'hôte. Les bactéries doivent également résister aux contraintes imposées par le système immunitaire suite à l'invasion de tissus plus profonds et de la circulation sanguine. Figure adaptée d'après [9].

## 1.2 Le stress acide

### 1.2.1 Importance de la force protomotrice

Les niches écologiques des bactéries sont variées, le pH peut varier de  $\sim 0$  dans certaines eaux acides près de sites miniers à  $\sim 13$  dans les lacs au pH le plus haut. Les organismes, tel que *Acidithiobacillus ferrooxidans*, dont la croissance optimale se situe entre pH  $\sim 0,5$ - $5,0$  sont appelés acidophiles. Au contraire, les alcaliphiles sont des organismes, comme *Bacillus pseudofirmus*, qui ont une croissance optimale dans des milieux dont le pH est supérieur à  $9,0$ . Entre ces deux valeurs extrêmes, les bactéries qui peuvent se développer comme *E. coli*, *Salmonella enterica* ou encore *Bacillus subtilis* sont dites neutrophiles [10]. Les bactéries maintiennent cependant leur pH interne (pHi) dans une gamme plus étroite, généralement proche du pH neutre (Figure 2). Par exemple, alors que le pH externe (pHo) passe de  $5,5$  à  $9,0$ , le pHi d'*E. coli* est maintenu à des conditions de croissance optimales entre  $7,4$  et  $7,8$ . L'acidophile *A. ferrooxidans* se développe à un pHo compris entre  $1,0$  et  $8,0$ , mais maintient son pHi entre  $6,0$  et  $7,0$  [11]. Cette stratégie de maintien d'un pH interne constant, appelé homéostasie du pH, joue un rôle fondamental dans la physiologie cellulaire, car le pH affecte l'activité enzymatique, la solubilité et la stabilité des protéines. Le pHi est tamponné par de petites molécules comme les acides aminés, ainsi que par des groupes ionisables présents sur les protéines et les polymères ionisables comme le polyphosphate ( $P_nO_n$ ).

La force protomotrice (PMF), à la base de la création de la monnaie bioénergétique cellulaire (ATP), comprend le gradient chimique des protons ( $\Delta pH$ ) et le gradient de potentiel électrique transmembranaire ( $\Delta \Psi$ ). La valeur de  $\Delta pH$  correspond à la force chimique, qui favorise le mouvement des protons du milieu le plus concentré au moins concentré à travers une membrane ; le  $\Delta \Psi$  représente la force électrique, qui attire ou repousse les protons. Comme le gradient de proton chimique et le gradient de potentiel électrique affectent le mouvement des protons, le maintien de l'homéostasie du pH affecte les deux composantes de la PMF [12]. Les différentes espèces qui se multiplient à différents niveaux de pH ont ainsi des modèles distincts de PMF (Figure 2). Ces divers modèles supposent que les bactéries ont réussi à s'adapter à des conditions de vie où le pH atteint des valeurs extrêmes (Figure 2).



**Figure 2: Homeostasie pH chez les bactéries**

Les bactéries ont divers modèles de force protomotrice (PMF) selon les valeurs de pH. La PMF d'*E. coli*, un neutrophile, est utilisé ici comme référence. Les acidophiles et les alcaliphiles modifient leur modèle pour réduire la PMF totale afin de maintenir l'homéostasie du pH. Par exemple, le  $\Delta\psi$  des acidophiles est inversé, ce qui compense le très grand  $\Delta\text{pH}$  ; l'alcaliphile maintient le  $\Delta\psi$  plus élevé que celui du neutrophile, ce qui compense l'effet du  $\Delta\text{pH}$  inversé. Adaptée de [12].

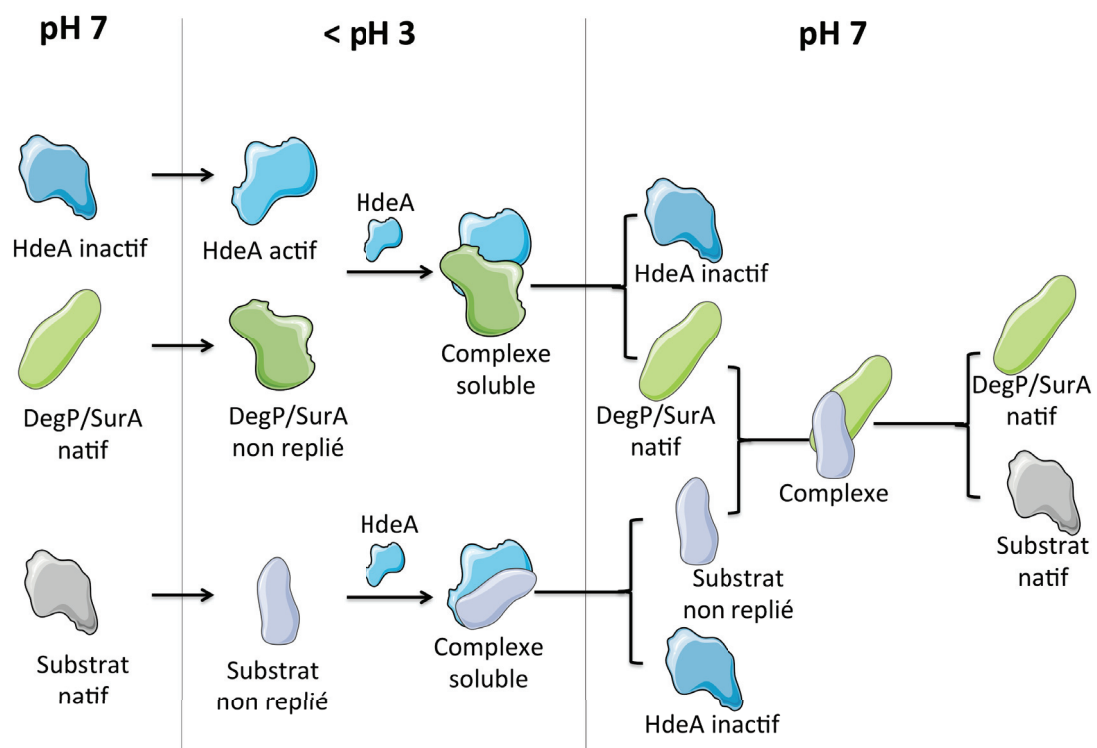
### 1.2.2 Mécanismes de protection du périplasme

En comparaison avec la membrane interne, la membrane externe est plus perméable aux protons. Le pH dans le périplasme chute très rapidement à un niveau quasi similaire au pH externe. Par conséquent, le périplasme est plus sensible aux dommages causés par l'acidité du milieu. Plusieurs protéines chaperonnes jouent un rôle important dans la protection des protéines périplasmiques contre la dénaturation et les dommages causés par l'acidité.

Les protéines HdeA et HdeB sont des chaperonnes périplasmiques qui réduisent l'agrégation des protéines périplasmiques induite par l'acidité du milieu. Ces protéines sont retrouvées chez différentes espèces, y compris *E. coli*, *Shigella flexneri* et *Brucella abortus* [13]. Lorsque le pH est inférieur à 3, HdeA change de conformation pour jouer son rôle de chaperonne. Au cours de cette renaturation, d'autres chaperons périplasmiques (DegP et SurA) aident HdeA à replier efficacement les substrats (Figure 3). HdeB a une fonction similaire à celle de HdeA, mais son optimum de pH est différent (pH=3). Ceci suggère que HdeA et HdeB collaborent ensemble pour protéger les bactéries contre les dommages causés par l'acide dans différentes gammes de pH (Figure 3).

Le gène *asr* code une protéine périplasmique en réponse aux chocs acides. Ce gène est transcrit lorsque le pH est compris entre 4,0 et 5,0 et ce chez plusieurs espèces

bactériennes incluant *E. coli* [14]. La croissance de la souche sauvage et de la souche mutée pour *asr* est semblable à pH 5,0, mais le gène *asr* est essentiel à la croissance à pH 4,5 [15]. Dans des conditions acides, l'expression du gène *asr* est directement activée par le système à deux composants RstA-RstB. L'activation de RstA-RstB peut être déclenchée par un pH faible ou par le système PhoP-PhoQ [16]. Cependant, le mécanisme de protection d'Asr n'a pas encore été élucidé. Asr est une protéine riche en lysine et pourrait servir de protéine tampon par la protonation et la déprotonation du groupe amine (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>).



**Figure 3: Repliement protéique dans le périplasme par l'intermédiaire de chaperonne.**

Lorsque les bactéries sont cultivées à un pH inférieur à trois, de nombreuses protéines, y compris certaines chaperonnes (p. ex. DegP et SurA) sont mal repliées. La chaperonne périplasmique HdeA passe d'un dimère replié inactif à un monomère actif déplié, puis se lie à ses substrats pour former des complexes solubles. Lors du retour à un pH neutre, HdeA libère le substrat et redevient inactif. La chaperonne DegP ou SurA peut aider efficacement au repliement d'autres protéines. Adaptée de [13].

### **1.2.3 Mécanismes de protection du cytosol**

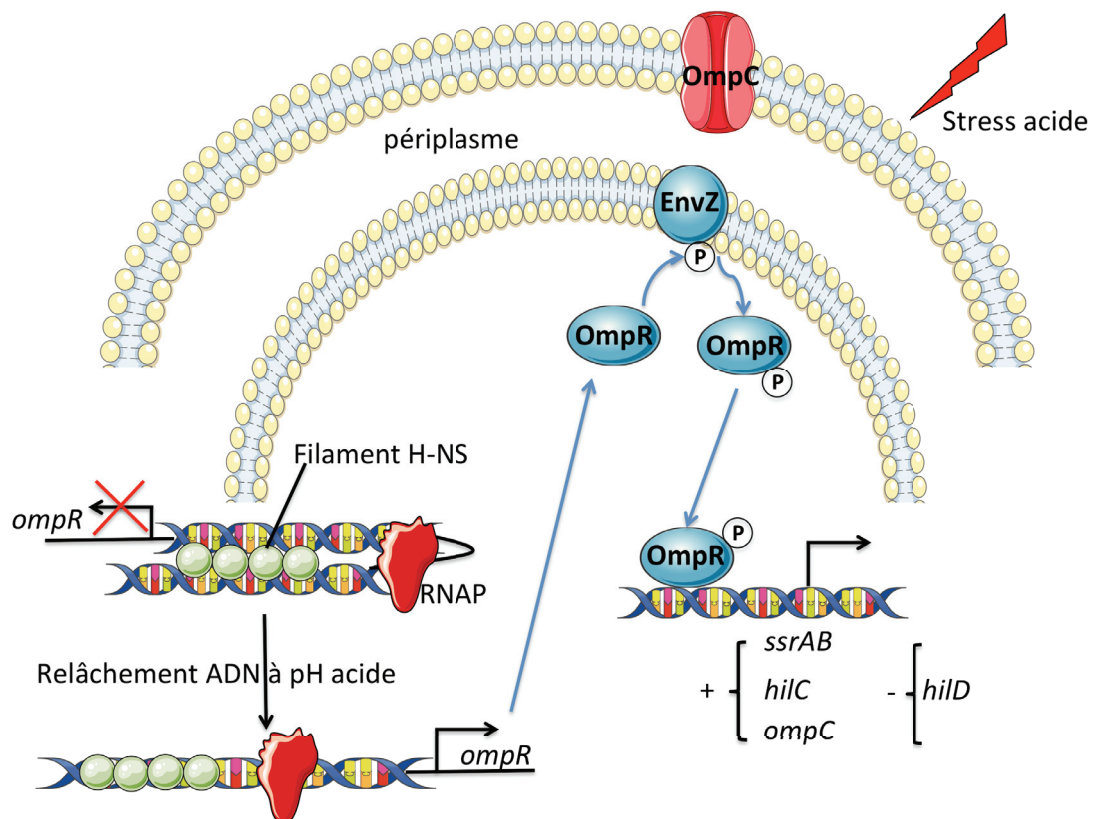
La membrane cytoplasmique est une barrière majeure à l'afflux de protons dans les cellules traitées à l'acide, cependant une réduction significative du pH peut aussi se produire dans le cytoplasme.

Pour répondre à ce stress, plusieurs systèmes de régulation (ex : PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB, OmpR/EnvZ) sont activés. Ces systèmes contrôlent de nombreux gènes impliqués dans la résistance aux acides. Les mécanismes cellulaires mis en jeu sont alors variés : consommation de protons intracellulaires par des réactions biochimiques (ex : décarboxylation d'acides aminés), expulsion des protons par la chaîne de transport d'électrons et les systèmes import/export (ex : transporteurs  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$ ), répression de l'ATP synthase pour inhiber l'afflux de protons, ou encore activation des gènes impliqués dans la modification de la membrane cellulaire afin de diminuer la perméabilité aux protons. L'ensemble de ces mécanismes sera décrit dans les prochains paragraphes.

#### **1.2.3.1 Rôle des régulateurs et des systèmes à deux composants**

Durant son cycle de vie, *Salmonella typhimurium* doit survivre au sein des macrophages où le pH atteint 5,5. Miller et al. [17] ont démontré que les mutants des gènes *phoP* et *phoQ* présentent un défaut de survie dans les macrophages ainsi qu'un défaut d'infection des souris. En parallèle, il a été découvert qu'une série de protéines de choc acide nommées ASPs sont induites lorsque le pH diminue. Ces ASPs sont principalement contrôlées par le système à deux composants PhoP-PhoQ [18]. Ainsi, plus de 100 ASPs différentes seraient produites en réponse à un choc acide et permettrait la survie au sein des macrophages [19]. Un second régulateur, OmpR est aussi impliqué dans la réponse au stress acide. Le stress acide provoque un relâchement de l'ADN à l'origine fortement enroulé chez *Salmonella typhimurium*, ce qui conduit à favoriser la transcription d'*ompR*. OmpR active alors la transcription de gènes cibles nécessaires à l'infection et à la survie à l'intérieur du macrophage de l'hôte [20][21] (Figure 4).





**Figure 4: Gènes de virulence induits par OmpR en réponse à l'acidité chez *Salmonella typhimurium***

Pendant l'infection, *S. typhimurium* s'adapte à la vacuole du macrophage, son ADN se désenroule en réponse à un pH acide. Le désenroulement de l'ADN inhibe l'effet répressif d'H-NS et augmente la transcription d'*ompR*. De l'autre côté, le relâchement de l'ADN augmente fortement la liaison d'OmpR à l'ADN. Ensemble, lors de l'exposition à l'environnement acide, OmpR induit les gènes de pathogénicité de *S. typhimurium* (SPI) impliqués dans la régulation du système de sécrétion de type III et ses effecteurs. OmpR induit également le gène *ompC* codant une porine de la membrane externe [22]. + : régulation positive. - : régulation négative

#### 1.2.3.2 Systèmes d'efflux et d'import

En respiration aérobie, l'énergie provenant du transfert d'électrons par une série de réactions d'oxydation-réduction est utilisée pour pomper les protons hors du cytoplasme. Les protons sont alors accumulés au sein du périplasma. Ces derniers forment le gradient électrochimique à la base de la synthèse d'ATP.

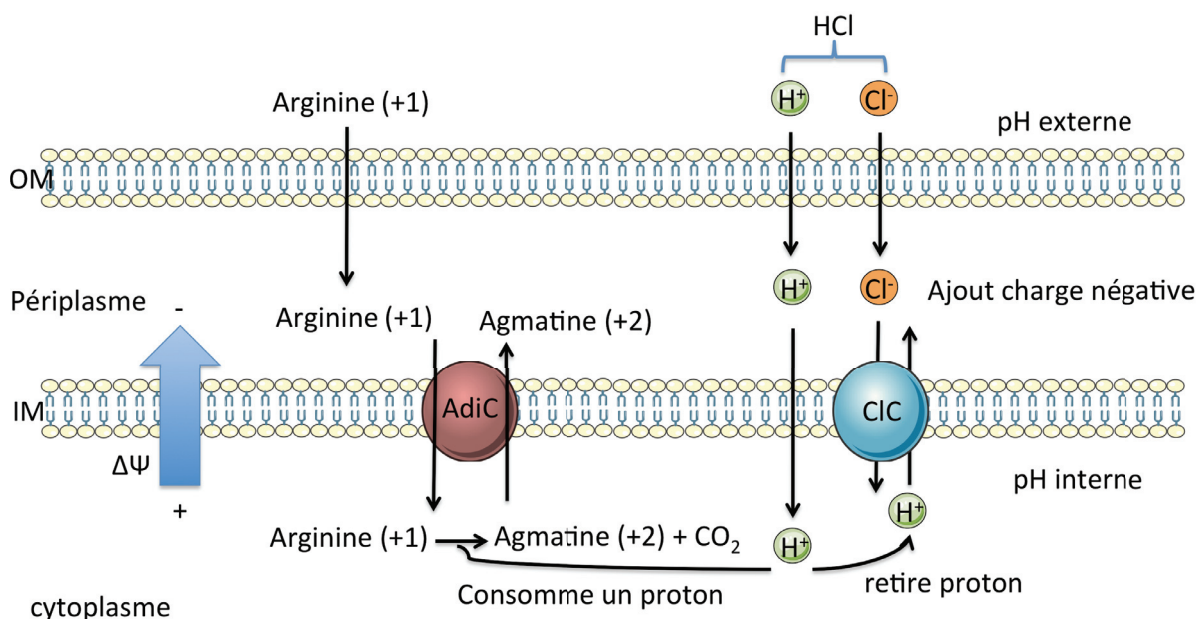
Chez *E. coli*, la synthèse du complexe F1F0-ATPase est régulée négativement en réponse à une acidité modérée [23], tandis que sa synthèse est fortement augmentée dans des conditions alcalines [6]. Néanmoins, la délétion de gènes codant des enzymes productrice d'AMP (ex : *purA* et *purB*) ou de l'ADP (ex : *adk*) augmente



considérablement la sensibilité à un environnement extrêmement acide (pH 2,5). De plus, la synthèse d'ATP est aussi nécessaire pour les systèmes de réparation de l'ADN en conditions acides [24]. Ces résultats suggèrent que la répression et l'induction de la synthèse d'ATP dépendent du pH. Le fait que la synthèse de la F1F0-ATPase soit régulée négativement lors d'une exposition à un pH subléthal peut s'expliquer par le fait que les cellules tentent de prévenir le flux entrant excessif de protons via cette ATPase. Au contraire, lors d'une exposition à un pH encore plus faible (léthal pour la bactérie), la synthèse de la F1F0-ATPase, dont l'activité va produire de l'ATP, peut être régulée positivement pour fournir l'énergie nécessaire à la survie de la cellule malgré l'entrée excessive de protons.

Selon le modèle de Iyer et ses collaborateurs, en cas de stress acide extrême (pH 2-3), le HCl, en tant que molécule non chargée, peut diffuser dans la cellule. Le pH interne (pH=4,5) étant alors plus élevé que le pH externe, le HCl se dissocie en ions  $H^+$  et  $Cl^-$ . Les protons sont alors éliminés via la réaction de décarboxylation des acides aminés, les anions chlorure s'accumulent eux dans le cytoplasme. Un excès d'ions chargés négativement peut causer une hyperpolarisation de la membrane. *Iyer et al.* ont donc proposé un premier modèle dans lequel les transporteurs ClC (canal à ions chlorures) empêcheraient l'hyperpolarisation de la membrane en catalysant l'efflux d'ions chlorures. *Iyer et al.* ont en effet prouvé que les mutants dépourvus de canaux ClC ne parviennent pas à survivre à des conditions d'extrême acidité [25]. Cependant, Foster et ses collaborateurs ont prouvé que lorsque les cellules sont exposées à une extrême acidité, le potentiel électrique de la membrane s'inverse [26]. Ce phénomène est d'autant plus important en présence de glutamine ou d'arginine dans le milieu extérieur [26]. La charge interne positive peut alors, par répulsion, ralentir l'entrée de proton dans la cellule. Comment expliquer ce phénomène ? Au contraire du modèle de *Iyer et al.*, Foster et ses collaborateurs proposent que sous des conditions d'acidité extrême, les protons entreraient dans la cellule sans être associé aux anions chlorures. L'entrée de protons augmente alors les charges positives à l'intérieur de la cellule. Les protons sont ensuite éliminés par la réaction de décarboxylation des acides aminés. Cette réaction permet de maintenir un pH optimal mais laisse subsister les charges positives conduisant ainsi à la mise en place d'un  $\Delta\Psi$  positif (Figure 5). Un transporteur ClC  $H^+/Cl^-$  peut alors rétablir l'équilibre des charges et éliminer l'excès de proton en important du

$\text{Cl}^-$  en échange de protons. Ce mécanisme diminue ainsi les risques d'hyperpolarisation membranaire d'une direction opposé à celle proposé par Iyer et ses collaborateurs [26]. Ce modèle est présenté dans la figure 5.



**Figure 5: système de transport du ClC en réponse à un pH environnant très faible.**

À pH 2,5, les protons pénètrent probablement dans la cellule sans chlorure associé, ce qui réduit le pH cytoplasmique d'environ 7,5 à 4,5. La décarboxylation dépendante des acides aminés est induite pour consommer des protons, mais la charge positive associée perdure dans le produit final. Par exemple, la décarboxylation de l'arginine (charge +1) produit de l'agmatine avec une charge +2. Les charges positives provenant des protons et des produits de décarboxylation positivement chargés inversent le potentiel de la membrane électrique ( $\Delta\Psi$ ) de intérieur-négatif à intérieur-positif. Le transporteur ClC  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$  catalyse l'échange transmembranaire du chlorure contre les protons, pour contrebalancer les charges positives intracellulaires excessives et éliminer les protons en excès. Cela empêcherait l'hyperpolarisation (ici excès de charge positive) de la membrane et aiderait la cellule à retrouver un  $\Delta\Psi$  interne négatif. Adaptée de [26].

### 1.2.3.3 Systèmes enzymatiques

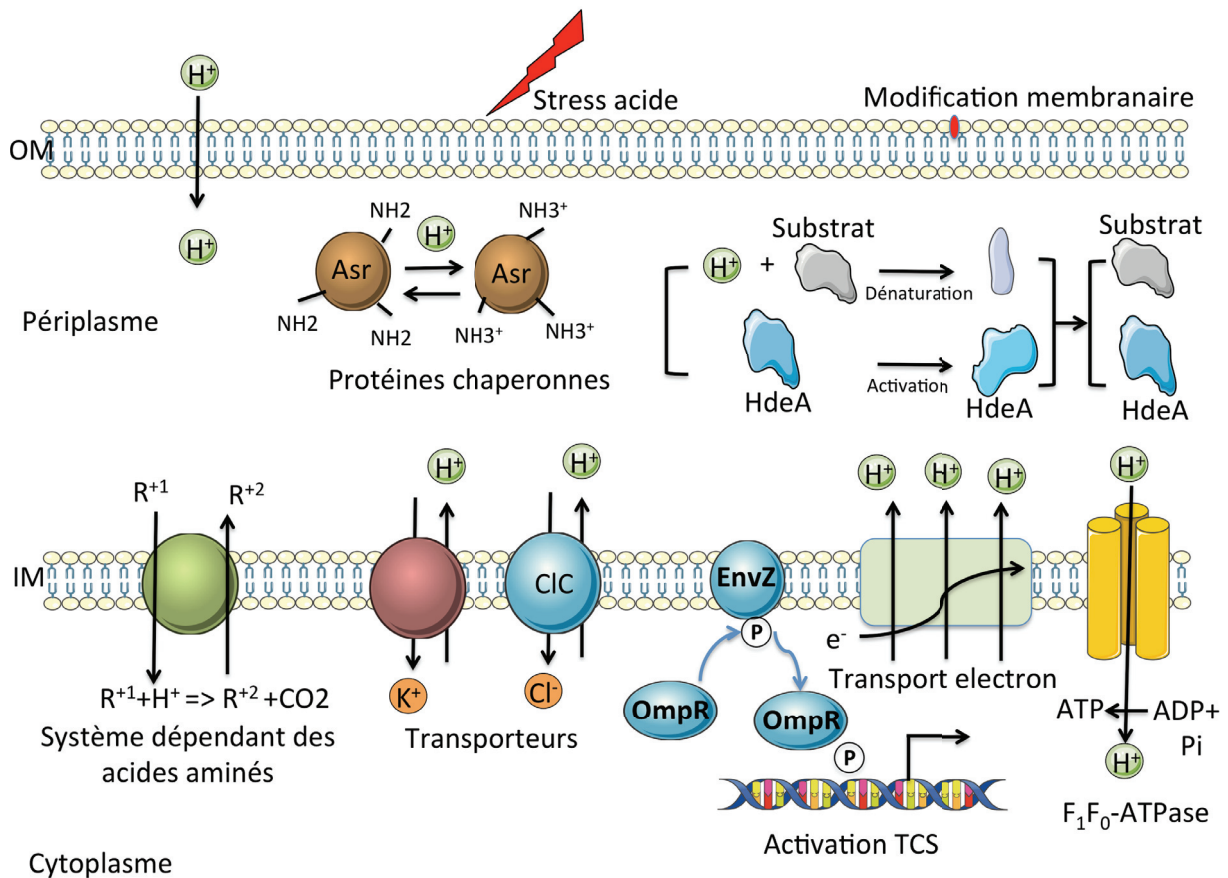
Certains organismes possèdent des systèmes de résistance aux acides qui permettent aux cellules de survivre dans un environnement extrêmement acide (pH 2 à 2,5) [13]. Par exemple, *E. coli* est un neutrophile qui préfère être cultivé à pH neutre, mais qui peut survivre à pH 2 pendant plusieurs heures. *E. coli* a donc dû développer de nombreux systèmes de résistance. Ces systèmes comprennent un système de résistance à l'acide

réprimé par le glucose (AR1) et trois systèmes de résistance dépendants des acides aminés, à savoir les systèmes dépendants du glutamate, de l'arginine et de la lysine (AR2-AR4) [26].

La stimulation du système AR1 permet aux bactéries de survivre à une exposition à des conditions de pH 2,5. Le facteur sigma (stress alternatif) RpoS et la protéine CRP sont nécessaires à son expression. Les composantes structurelles d'AR1 et son mécanisme d'action n'ont pas été élucidés. Cependant, il a été démontré que l'activité de la F1F0-ATPase et la présence de GadC, l'antitransporteur de glutamate/GABA, est importante pour la protection des cellules par AR1 [27][28].

Les systèmes de résistance aux acides dépendant des acides aminés, sont induits en présence de glutamate ou d'autres acides aminés. Chaque système de résistance aux acides, acides aminés dépendants, implique une décarboxylase d'acides aminés cytoplasmique qui convertit les acides aminés en un produit neutre et un transporteur qui catalyse l'efflux des produits finaux de décarboxylation en échange de plus d'acides aminés. Au cours de ce processus, un proton cytoplasmique est consommé et une molécule de CO<sub>2</sub> est produite (Figure 6). De plus, les décarboxylases d'acides aminés ont des valeurs de pH optimales distinctes. La glutamate décarboxylase a une activité optimale à pH <4, tandis que les arginine- et lysine-décarboxylase ont un pH optimal supérieur à environ 5-6 [13]. Des études comparatives ont démontré que le système dépendant du glutamate est le plus efficace parmi les quatre systèmes [27][29]. *S. Typhimurium* et *Vibrio cholerae*, qui n'ont pas de système de résistance à l'acide dépendant du glutamate, ne peuvent pas survivre dans des conditions de pH <2,5 ; *E. coli* et *Shigella flexneri*, qui possèdent ce système, peuvent survivre à pH < 2 [13]. La régulation de ces systèmes de résistance au stress acide est complexe et contrôlée par de multiples régulateurs dont H-NS [30].

L'ensemble des mécanismes de réponse à un faible pH est résumé à la Figure 6 suivante.



**Figure 6: Bilan des systèmes de réponse à un faible pH.**

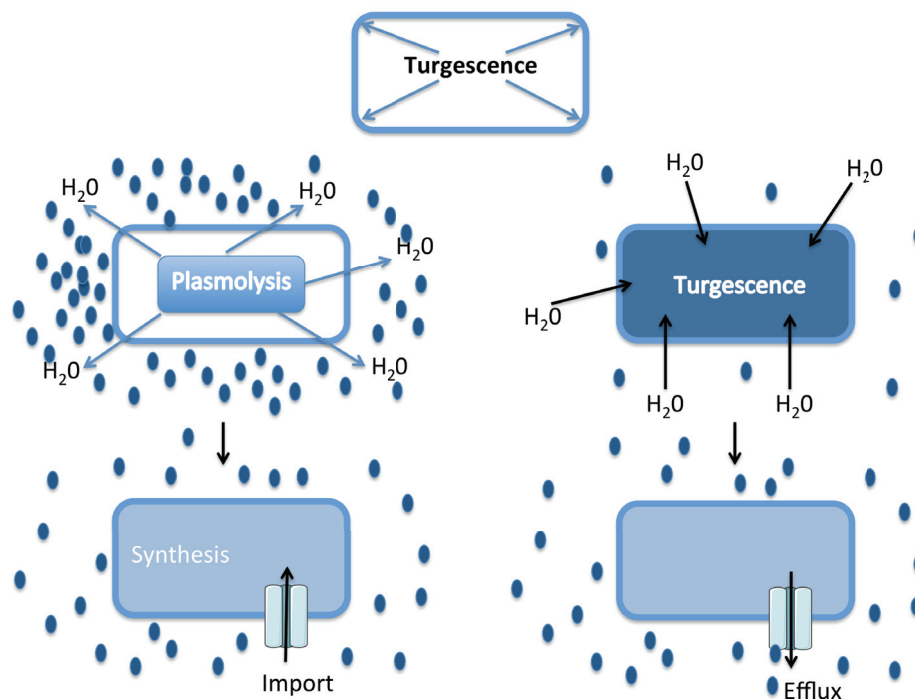
La diminution de la perméabilité de l'enveloppe cellulaire par remodelage de la membrane est la première ligne de défense bactérienne contre le stress acide. Les chaperons sont incités à compenser les dommages produits par le traitement à l'acide. Les systèmes à deux composants sont capables de détecter l'acidité et d'activer la réponse d'adaptation à l'acide. Différents mécanismes sont activés pour séquestrer ou pomper les protons hors de la cellule.

## 1.3 Stress osmotique

### 1.3.1 Généralités

Une augmentation de la concentration extracellulaire des solutés ioniques ou non ioniques est l'une des nombreuses conditions face à laquelle les micro-organismes doivent faire face. Dans un milieu hypertonique (solution concentrée), la cellule perdra de l'eau, ce qui entraînera un début de plasmolyse cellulaire. Au contraire, dans des conditions hypotoniques, l'eau entre dans la cellule, ce qui augmente la turgescence (Figure 7). Les flux d'eau transmembranaires peuvent menacer la structure et la

fonction des cellules. Pour éviter la lyse dans des conditions de faible osmolarité ou la déshydratation dans des conditions de forte osmolarité, les bactéries ont développé un certain nombre de mécanismes pour s'adapter à une large gamme d'osmolarité. Les sels sont les solutés prédominants dans de nombreux milieux naturels. Certaines bactéries, classées comme halophiles comme *Salinibacter*, peuvent s'épanouir à des concentrations élevées de sel. D'autres bactéries tolèrent des variations de pressions osmotiques comme *E. coli*, *S. enterica* et *D. dadantii*. Dans la section suivante, nous nous concentrerons sur la réponse au stress hyperosmotique chez les bactéries.



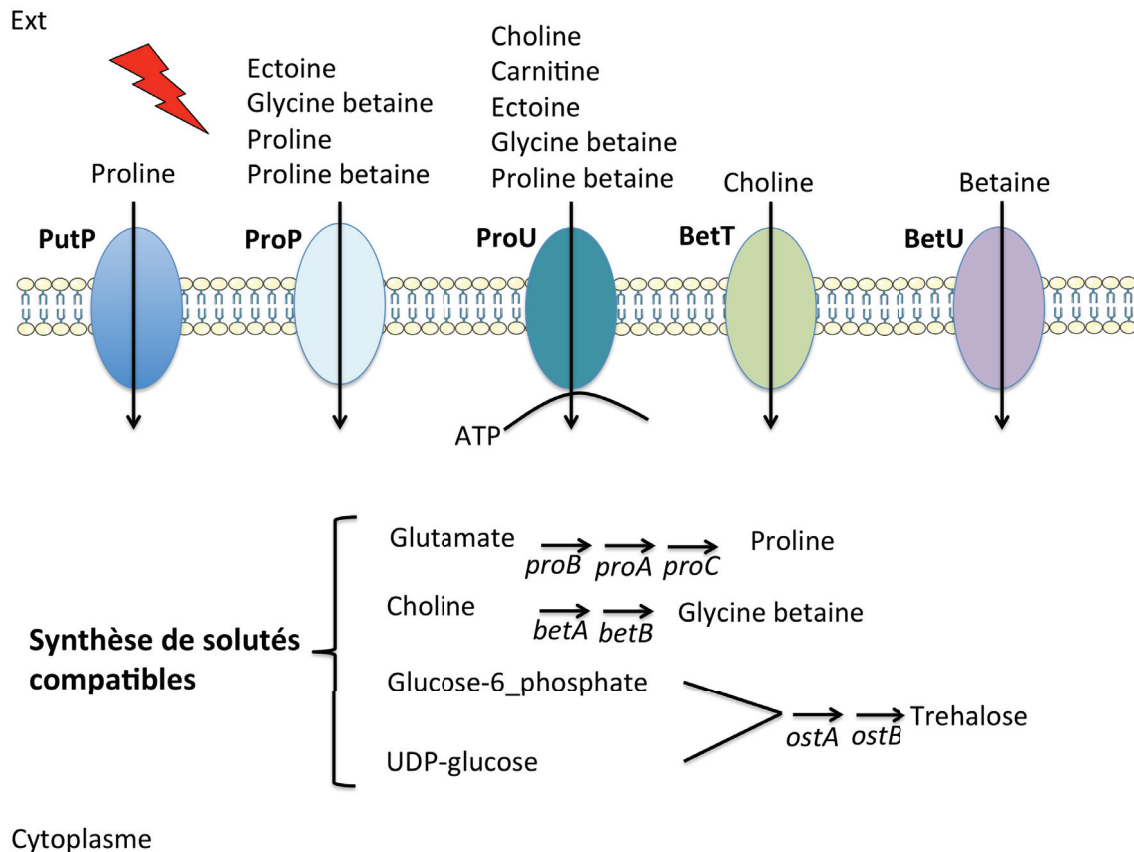
**Figure 7: Osmolarité et flux d'eau dans la cellule**

La pression turgescence d'une cellule est largement maintenue par osmose. Dans les environnements hypertoniques, l'eau sort de la cellule, provoquant un rétrécissement de son cytoplasme. Au contraire, l'eau pénètre dans la cellule dans des conditions hypotoniques, ce qui entraîne un gonflement et éventuellement une cytolyse. Pour rétablir l'équilibre osmotique, la cellule synthétise ou importe des osmolytes pour augmenter l'osmolarité en réponse à un stress hyperosmotique, tandis que la cellule libère des osmolytes du cytoplasme en réponse à un stress hypoosmotique.

### **1.3.2 Accumulation de composés organiques**

Pour faire face aux conditions hyperosmotiques, un grand nombre de procaryotes accumulent de petites molécules organiques très solubles. Leur accumulation conduit à réduire le mouvement de l'eau hors du cytoplasme. Comme ils ne perturbent pas le métabolisme central et les processus cellulaires vitaux à des concentrations élevées ( $> 1 \text{ mol kg}^{-1} \text{ eau}$ ), ils sont communément appelés solutés compatibles [31]. Les solutés exogènes compatibles (ex: glycine bêtaïne, proline, ectoine) permettent aux bactéries de se développer dans des conditions d'osmolarité défavorables [32]. Ces composés s'accumulent dans les cellules soit par absorption soit par synthèse (Figure 8). Cette stratégie, également adoptée par les eukaryotes, est conservée dans les trois branches du vivant [33]. Comme la biosynthèse des osmolytes est un processus énergiquement coûteux et plutôt lent, la cellule préfère l'import plutôt que la synthèse. De plus, l'accumulation de solutés compatibles d'origine externe inhibe généralement la synthèse endogène [31]. A titre d'exemple, chez *E. coli*, la synthèse de glycine bêtaïne et de trehalose est inhibée en présence de glycine bêtaïne dans le milieu externe [34]. En plus du rôle majeur des solutés compatibles dans la balance osmotique, ceux-ci améliorent également la résistance à d'autres stress, y compris à la dessiccation, au choc thermique et aux chocs de congélation-décongélation. Les solutés agissent comme des chaperons chimiques en prévenant la dénaturation des protéines [35].





**Figure 8: Entrée de solutés compatibles en réponse à une osmolarité élevée**

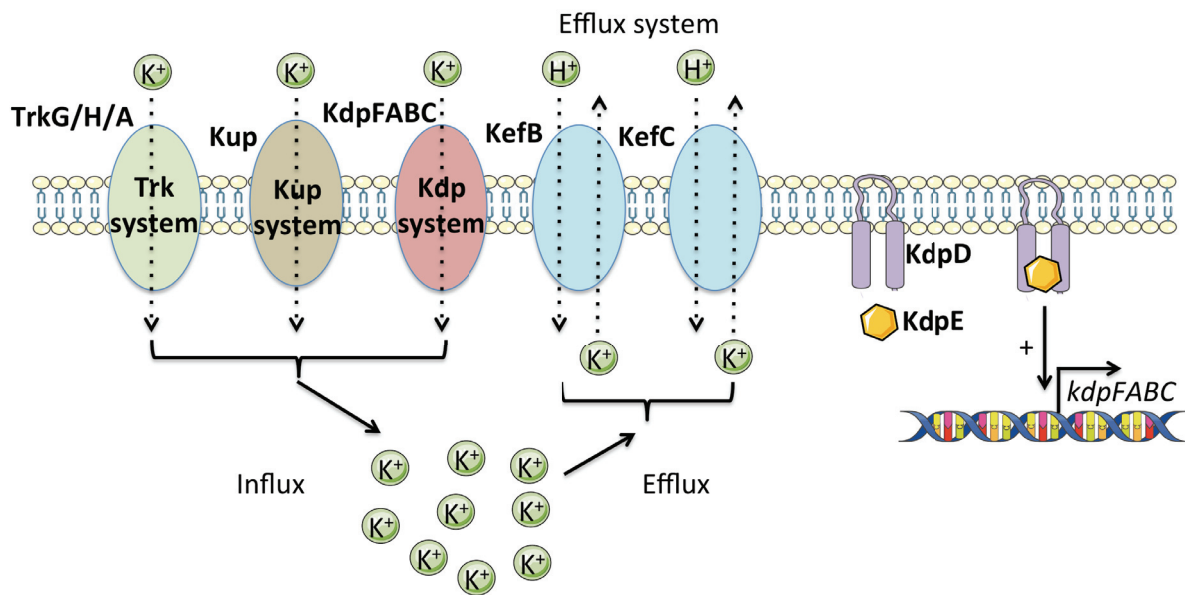
Les solutés compatibles peuvent être synthétisés ou être importés par différents transporteurs (PutP, ProP, ProU, ProU, BetT et BetU).

### 1.3.3 Accumulation de composés inorganiques

Certaines bactéries halophiles utilisent des cations inorganiques pour ajuster l'équilibre osmotique de la cellule. Ils maintiennent principalement des concentrations intracellulaires élevées en potassium ( $K^+$ ), ainsi que son contre anion  $Cl^-$ . Cette stratégie pose un problème majeur : l'ensemble de la machinerie intracellulaire (enzymes, protéines structurales, etc...) est affecté par des concentrations ioniques élevées. Par conséquent, les bactéries doivent réaliser des modifications pour adapter la machinerie intracellulaire à une osmolarité élevée. Par exemple, les protéines des bactéries halophiles ont subi d'importantes substitutions d'acides aminés, dont un enrichissement en acides aminés acides [31]. L'accumulation de solutés compatibles ne nécessite que peu ou pas d'ajustement génétique. Pour cette raison, l'accumulation d'ions inorganiques comme osmolytes primaires ne semble pas être une adaptation optimale. Ce mécanisme n'est utilisé que par les bactéries halophiles et les archées halophiles.

Pour de nombreuses bactéries non halophiles, il a été démontré que le pool intracellulaire de  $K^+$  n'est modifié qu'après une augmentation soudaine de la salinité, ce qui entraîne une accumulation transitoire de  $K^+$  (Figure 9). Le potassium n'étant pas le principal osmolyte de ces bactéries, l'accumulation de  $K^+$  agit transitoirement comme un osmolyte pour restaurer la pression de la turgescence et le volume des cellules jusqu'à ce qu'il soit remplacé par des solutés compatibles [36]. Pendant ce temps, la synthèse du glutamate est activée afin de contrebalancer l'augmentation des charges positives dans le cytoplasme. Cependant, une étude a montré qu'un stress hyperosmotique sévère (8 % de NaCl) provoquait un efflux net de  $K^+$  de la cellule, tandis qu'une faible concentration externe de NaCl (1 % de NaCl) entraînait une absorption transitoire de potassium [37]. À des niveaux élevés de NaCl externe, l'afflux massif de  $Na^+$  à travers la membrane plasmique peut entraîner une dépolarisation de la membrane. La voie d'efflux du  $K^+$  est activée par cette dépolarisation provoquant la fuite de  $K^+$  de la cellule. La sévérité du stress hyperosmotique semble ainsi déterminer la direction du flux de  $K^+$  cellulaire.





**Figure 9: Homéostasie du potassium chez *E. coli***

Les bactéries ont développé divers transporteurs de  $K^+$  pour maintenir une concentration interne optimale de  $K^+$ . Il y a trois systèmes d'absorption du potassium chez *Escherichia coli*, à savoir Trk, Kup et Kdp. Le système Trk est un transport à faible affinité. Le système Kdp est un système de transport de potassium à haute affinité qui est codé par l'opéron *kdpFABCDE*. Le système de régulation à deux composants KdpD-KdpE contrôle la transcription de *kdpFABC* en réponse à un stress osmotique ou à de faibles concentrations de  $K^+$  intracellulaire. La fonction première du système Kdp est de compenser la carence du système Trk, en particulier en limitant les concentrations de  $K^+$ . Contrairement aux systèmes Kdp et Trk, le système Kup est le principal système d'absorption de  $K^+$  en cas de stress hyperosmotique à faible pH. Les systèmes d'efflux (KefB, KefC) sont activés par un taux de sel élevé.

#### 1.3.4 Les autres mécanismes de protection

Comme la stabilité et le repliement des protéines sont profondément affectés par les changements d'osmolarité, les cellules doivent promouvoir un repliement correct des protéines en réponse à une pression osmotique externe accrue. Les protéines chaperonnes jouent un rôle important dans ce processus de protection. Les protéines du choc thermique (par exemple, les complexes chaperons DnaK-DnaJ-GrpE et GroEL-GroES) sont induites par une osmolarité élevée chez les espèces à Gram négatif et Gram positif, comme *E. coli*, *B. subtilis*, *Lactococcus lactis* et *Campylobacter jejuni* [38],[20], [39], [40]. Leur rôle durant le stress osmotique est de sauver ou de piéger des protéines dénaturées. Par exemple, un mutant *dnaK* d'*E. coli* est déficient dans le transport de  $K^+$

(absence de protection de la pompe Trk) et ne peut pas retrouver un état de turgescence lorsque la pression osmotique externe augmente [38].

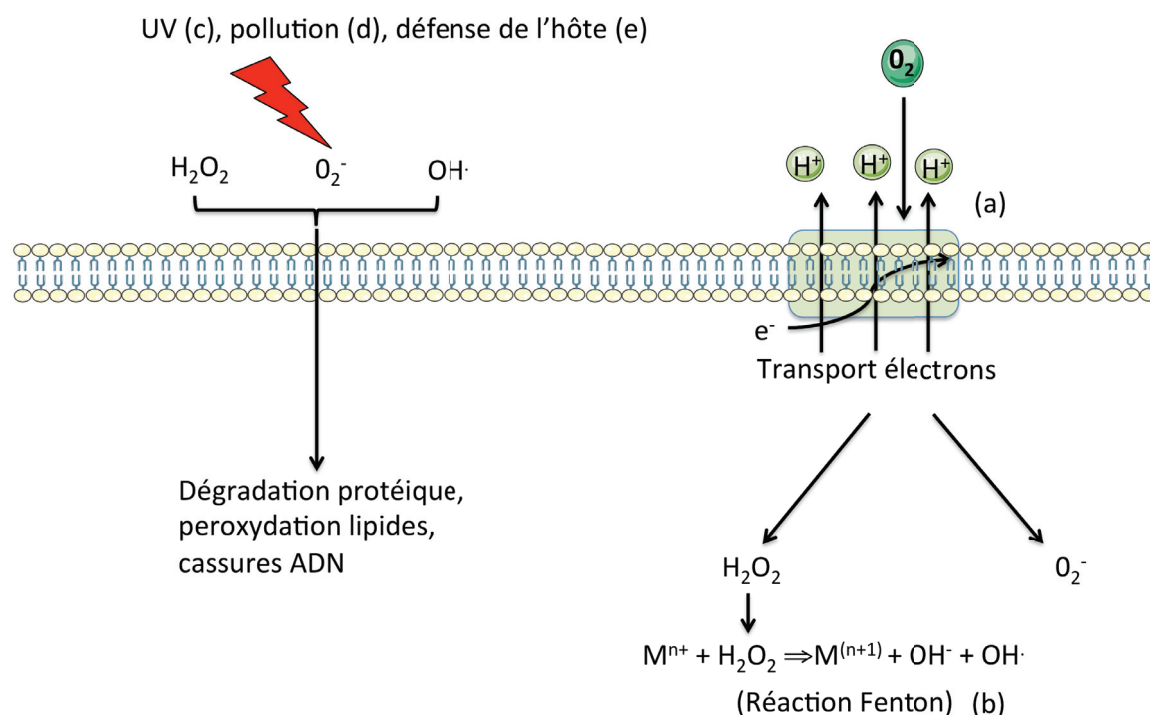
*E. coli* contient deux principales porines dans la membrane externe, OmpF et OmpC, qui servent de canal de diffusion passif à travers la membrane externe. A faible osmolarité, OmpF est la porine principale de la membrane externe et à osmolarité élevée, la production d'OmpF est réprimée et OmpC devient la porine principale de la membrane externe. Comme OmpF forme un pore plus grand que OmpC [41], la régulation de la taille des pores de diffusion passive à travers la membrane externe est vitale pour *E. coli*, qui vit dans des environnements à osmolarité variable. Par exemple, il a été proposé que la plus grande taille du pore formé par OmpF est importante pour une absorption efficace des nutriments dans les milieux pauvres en nutriments, alors que le plus petit pore OmpC est important pour exclure des sels biliaires toxiques ou d'autres composés chargés à travers la membrane externe [42].

Chez *E. coli* les systèmes de régulation à deux composants EnvZ-OmpR et KdpD-KdpE ont été identifiés comme étant les systèmes de réponse au stress osmotique. Ces deux systèmes sont composés d'un senseur histidine kinase et d'un régulateur de réponse. Les régulateurs de réponse OmpR et KdpE appartiennent à la même famille de protéines de liaison à l'ADN et agissent comme activateurs en réponse à la modification de l'osmolarité du milieu [43]. D'autres études ont révélé que le système EnvZ-OmpR module de nombreux gènes de virulence chez *E. coli* et chez de nombreux pathogènes, y compris *D. dadantii* et *Salmonella enterica* [44], [20]. Chez *D. dadantii*, OmpR régule de façon différentielle deux porines KdgM et KdgN impliquées dans l'entrée d'oligogalacturonides [45]. Comme mentionné précédemment, des études récentes réalisées sur *E. coli* et *S. enterica* ont également identifié OmpR comme un régulateur majeur de l'adaptation au stress acide [21], [23]. OmpR apparaît donc comme un régulateur polyvalent et flexible.

## 1.4 Le stress oxydatif

En présence d'oxygène, les micro-organismes font face à certains problèmes. Bien qu'ils aient besoin d'oxygène pour la production d'énergie, l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont générés en continu au cours de ce processus (Figure 10). Généralement, la réduction complète de l'oxygène entraîne la formation d'eau. Mais dans certains cas, les électrons s'accumulent sur les déshydrogénases, et l'interaction entre les électrons et l'oxygène produit de l' $O_2^-$  et de l' $H_2O_2$ . L' $H_2O_2$  peut ensuite produire des radicaux hydroxyles hautement réactifs ( $HO\cdot$ ) par interaction avec le fer (Figure 10). D'autre part, l' $O_2^-$  et l' $H_2O_2$  réagissent rapidement avec d'autres éléments cellulaires. Certains micro-organismes échappent au stress oxydatif en résidant dans des micro-habitats dépourvus d'oxygène ; tous les autres doivent faire face à ces ROS intracellulaires.

Outre ces mécanismes endogènes de génération de ROS, la cellule est exposée à une grande variété de ROS provenant de sources exogènes, telles que le dioxygène lui-même, l'irradiation UV, la pollution (Figure 10) et l'irradiation  $\gamma$  [46]. L'interaction des bactéries pathogènes avec les cellules immunitaires de l'hôte peut également produire des ROS à l'encontre des pathogènes (Figure 10). La formation continue de ROS cause des dommages à différentes biomolécules :  $HO\cdot$  est très réactif avec toutes les macromolécules cellulaires (tels que l'ADN), tandis que l' $O_2^-$  et l' $H_2O_2$  endommagent directement les groupements fer-soufre d'importantes enzymes [47]. Par conséquent, le stress oxydatif entraîne la dégradation des protéines, la peroxydation des lipides et la rupture des brins d'ADN, provoquant la mort cellulaire et le vieillissement progressif de l'organisme. Dans la défense des plantes, les ROS agissent non seulement comme des toxines, capables de tuer ou de ralentir directement la croissance de l'agent pathogène, mais aussi comme faisant partie d'une cascade de signalisation qui peut conduire à des défenses multiples, y compris la réponse hypersensible [48]. Des études récentes révèlent que la tolérance aux ROS joue un rôle important non seulement dans la résistance des pathogènes dans la plante hôte, mais aussi dans la résistance aux produits chimiques antimicrobiens d'origine végétale et à d'autres facteurs de stress chimiques rencontrés dans l'environnement au contact des plantes tels que les antibiotiques produits par des bactéries et champignons associés aux plantes. Par conséquent, la capacité de prévenir ou de tolérer des concentrations élevées de ROS est d'une importance particulière pour tous les pathogènes des plantes [49], [50].



**Figure 10: Source d'  $H_2O_2$  dans la cellule**

Les sources endogènes de stress oxydatif pour les bactéries comprennent (a) la respiration aérobie, (b) la réaction de Fenton ( $M$ =Métal). De plus, les ROS sont également produits par divers facteurs environnementaux, tels que (c) l'irradiation UV, (d) la pollution de l'air. La défense immunitaire de l'hôte stimule également la génération de ROS pour prévenir l'invasion de pathogènes (e).

#### 1.4.1 Protection enzymatique

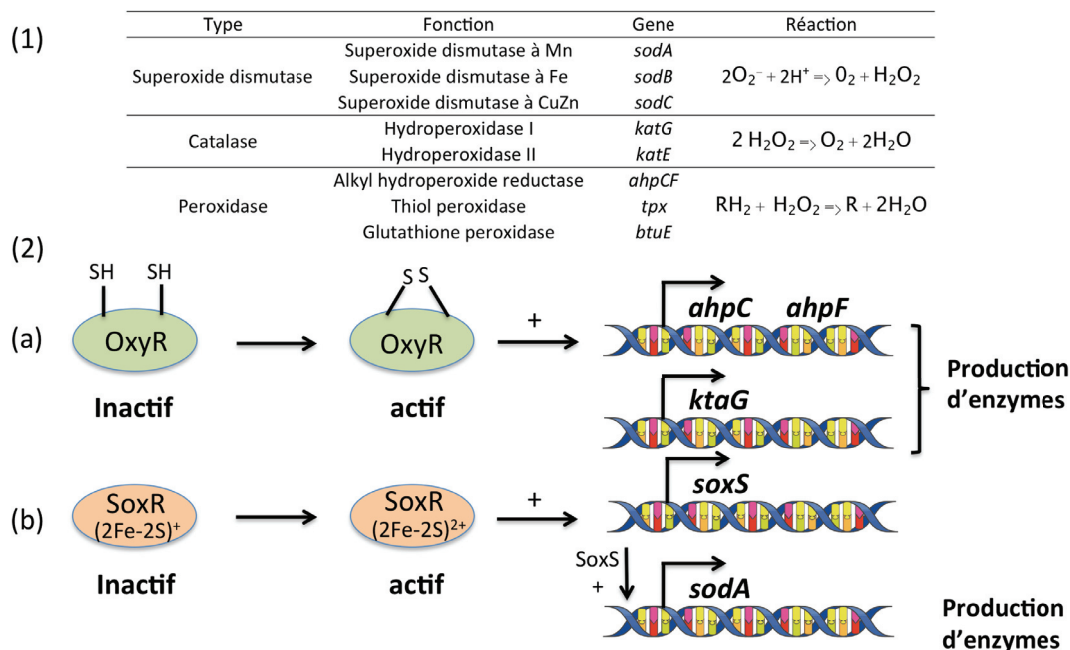
Une grande variété d'enzymes protectrices face aux ROS ont été identifiées au fil des ans dans diverses bactéries y compris *E. coli* [51]–[53] (Figure 11 a) : les superoxydes dismutases, les catalases et les peroxydases.

Les superoxydes dismutases sont omniprésentes chez les organismes aérobie, catalysant le passage du superoxyde en oxygène plus peroxyde d'hydrogène. Il existe trois superoxydes dismutases, à savoir MnSOD, FeSOD et CuZnSOD. Elles diffèrent par leur cofacteur, leur structure et leur masse moléculaire, et sont impliquées dans la virulence de nombreuses espèces. Par exemple, un mutant de *D. dadantii* défectueux pour la MnSOD ne parvient pas à macérer les feuilles de *Saintpaulia ionantha*, alors qu'il est capable de macérer les tissus végétaux après une supplémentation en SOD purifiée [54].

Le produit final  $H_2O_2$  peut être éliminé par les catalases et les peroxydases. Toutes les peroxydases partagent le même mécanisme catalytique, dans lequel un résidu cystéine du site actif est oxydé en acide sulfénique par le substrat peroxyde. Pour compléter le cycle de réaction, des réducteurs (ex: thiorédoxines et glutaredoxines) sont nécessaires pour catalyser le recyclage de l'acide sulfénique en thiol [55].

Les catalases et l'hydroperoxyde réductase (Ahp) agissent distinctement en fonction des différentes concentrations d'  $H_2O_2$  [53]. Lorsque la concentration en  $H_2O_2$  est faible, l'Ahp, qui possède une grande affinité pour l'  $H_2O_2$ , peut le dégrader. Cette dégradation nécessite un petit métabolite comme réducteur. Au contraire, les catalases agissent en conditions de concentration élevée d' $H_2O_2$ . Cette différence est probablement due au fait que les catalases produisent un intermédiaire réactif potentiellement toxique pour les cellules. Lorsque l'  $H_2O_2$  intracellulaire dépasse 20  $\mu M$ , l'Ahp ne joue plus un rôle suffisant car les réducteurs sont rares, et les catalases, qui n'ont pas besoin de réducteurs, deviennent les enzymes principales de piégeage d'  $H_2O_2$  [51].

Pour produire ces enzymes, plusieurs régulateurs majeurs sont activés pendant le stress oxydatif. OxyR et SoxR sont les principaux régulateurs d'*E. coli*. Ils subissent des changements conformationnels en présence de radicaux de peroxyde d'hydrogène et de superoxyde respectivement pour devenir actif (Figure 11). OxyR régule alors près de 40 gènes [52]. En plus des catalases et des peroxydases, OxyR active également plusieurs gènes impliqués dans diverses voies de protection contre le peroxyde d'hydrogène (voir la section suivante). SoxR serait activé directement ou indirectement par les radicaux superoxydes. Cependant, de récentes études ont montré que l'oxydation de SoxR (état actif) serait due à une oxydation directe par des agents redox, généralement des phénazines ou des quinones, qui sont produits par les plantes ou des bactéries [56]. Le système SoxR-SoxS existe dans de nombreuses bactéries, telles que *Salmonella*, *Shigella*, *Pantoea*, *Erwinia amylovora*, mais il est absent de certains pathogènes de plantes, tels que *Dickeya* et *Pectobacterium*.



**Figure 11: Enzymes de lutte contre le stress oxydatif.**

(1) Liste des enzymes de lutte contre le stress oxydatif

(2) Activation de régulateurs transcriptionnels en réponse au stress oxydatif chez *E. coli*.

(a) En présence d'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le résidu soufre d'OxyR est oxydé pour former une liaison disulfure. Le changement allostérique qui en résulte permet la liaison d'OxyR à l'ADN, pour réguler positivement *ahpCF* (codant l'hydroperoxyde-réductase d'alkyle) et *katG* (codant la catalase).

(b) En présence d' $\text{O}_2^-$ , l'oxydation du cluster fer-soufre de SoxR provoque un changement dans sa conformation, ce qui entraîne la stimulation de la transcription de *soxS*. SoxS active alors l'expression de *sodA* (qui code la superoxyde dismutase).

#### 1.4.2 Protection non enzymatique

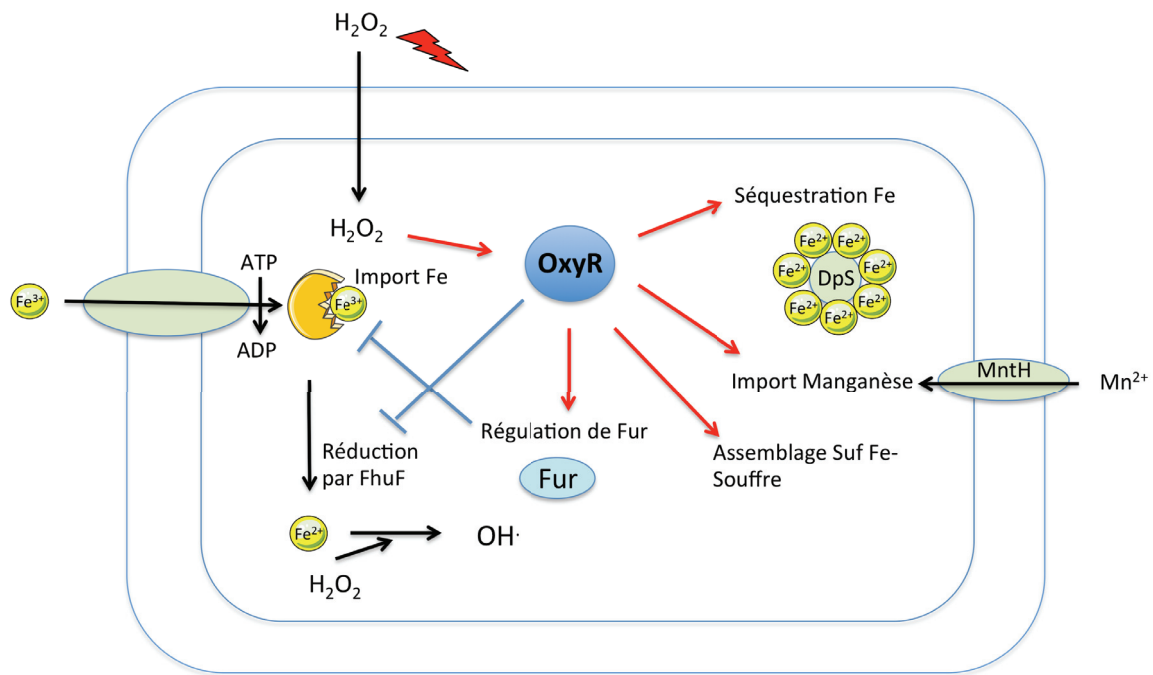
Le glutathion est un tripeptide de faible poids moléculaire à groupement thiol présent chez les protéobactéries et les cyanobactéries, ainsi que chez quelques espèces de bactéries à Gram positif. Il agit comme cofacteur des peroxydases pour protéger la cellule du stress oxydatif. Lorsque les peroxydases éliminent une molécule d'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , deux molécules de glutathion agissent comme réducteurs et sont oxydées pour former un pont disulfure. Chez *E. coli*, un mutant déficient dans la production de glutathion est plus susceptible de mourir en présence d'  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De plus, le glutathion agit également comme un régulateur post-traductionnel de la fonction des protéines dans des conditions de stress oxydatif, par modification directe des protéines par "glutathionylation". Cette modification génère des liaisons disulfures entre le glutathion et les résidus cystéines, ce

qui protège les protéines à groupement thiol d'une sur-oxydation en acide sulfinique [57].

Le manganèse peut former des complexes avec le phosphate et d'autres métabolites pour protéger les cellules des dommages oxydatifs. De plus, le manganèse sert également de cofacteur à la SOD. Le fer, quant à lui, peut générer un radical hydroxyle par réaction de Fenton. Le fer peut ainsi augmenter les dommages oxydatifs et pose des problèmes de toxicité pour les cellules. Pour ces raisons, les bactéries doivent contrôler finement l'homéostasie du fer afin de limiter la production de ROS[58]. Un rapport Mn/Fe intracellulaire élevé est corrélé avec un niveau élevé de résistance aux radiations et un faible niveau d'oxydation des protéines chez les bactéries [47]. Par exemple, *D. radiodurans* a un rapport manganèse/fer intracellulaire élevé ( $>1$ ), alors que le rapport est inférieur à 0,1 dans la bactérie *E. coli* plus sensible aux UV [59].

Les bactéries ont ainsi mis au point plusieurs stratégies pour réguler rapidement le rapport manganèse/fer intracellulaire. Chez *E. coli*, OxyR active plusieurs gènes impliqués dans l'acquisition du manganèse et le maintien de l'homéostasie du fer (Figure 12). L'induction de *dps*, codant pour une protéine séquestrant le fer, est généralement impliquée dans la diminution de la quantité de fer libre. En contre partie, un importeur de manganèse (MntH) est simultanément activé pour importer du manganèse comme métal de remplacement. La suppression du système d'import de manganèse ou du senseur associé nuit à la virulence et à la viabilité de nombreuses bactéries pathogènes Gram positif et Gram négatif, telles que *Yersinia pestis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* [59]. L'expression de Fur, principal régulateur de l'homéostasie du fer chez *E. coli*, est également régulée positivement par OxyR (Figure 12). En tant que répresseur des gènes d'import du fer, Fur inhibe l'import de fer durant le stress oxydatif. OxyR et Fur peuvent réprimer conjointement le gène *fhuF* qui est nécessaire à la libération du fer à partir des sidérophores. Des études ont révélé qu'un autre régulateur, HypT, un facteur de transcription spécifique de l'hypochlorite (HOCl, une espèce réactive d'oxygène antimicrobienne), est également impliquée dans l'homéostasie du fer. Il réprime l'acquisition du fer pendant le stress oxydatif chez *E. coli* [60][58].





**Figure 12: Mécanismes de défense indirecte au stress oxydatif**

Aperçu de l'expression des gènes régulés par OxyR et impliqués dans la protection contre les dommages oxydatifs. OxyR est activé par le peroxyde d'hydrogène, ce qui lui permet de réguler positivement un ensemble de gènes (*dps*, *mntH*, *sufABCDSE*, *fur*) et de réguler négativement le gène *fhuF*. Fur réprime ensuite les gènes d'import du fer. Les flèches rouges représentent l'induction d'un gène ; les barres bleues représentent la répression d'un gène.

### 1.4.3 Réparation des dommages du stress oxydatif

Malgré l'utilisation d'une grande variété d'enzymes, le niveau intracellulaire des ROS n'atteint jamais zéro. Toutes les macromolécules, à savoir l'ADN, les lipides et les protéines, peuvent subir une oxydation plus ou moins importante. Ainsi, de nombreux mécanismes de réparation supplémentaires sont mis en place pour protéger les bactéries contre le stress oxydatif.

#### 1.4.3.1 Réparation des dommages aux protéines

Les protéines contenant des clusters fer-soufre peuvent être oxydées d'une forme active (cluster [4Fe-4S]) à une forme inactive (cluster [3Fe-4S]<sup>+</sup>) par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ou l' $\text{O}_2^-$ . Chez *E. coli*, Isc et son cluster Fe-S peuvent être inactivés par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en concentration submicromolaire (0,5-1  $\mu\text{M}$ ). Un autre système Fe-S dépendant, Suf, est induit par OxyR lors d'un stress oxydatif. Le système Suf permet de réparer une importante déshydratase à groupement fer-soufre (isopropylmalate isomérase) [61] (Figure 12). Ce



rôle important du système Suf peut maintenir les activités de toutes les enzymes Fe-S dépendantes durant un stress oxydatif. Les mutants *suf* de *D. dadantii* présentaient une sensibilité accrue au stress oxydatif et une capacité réduite à causer des maladies sur les feuilles d'endive et de *S. ionantha* [62].

#### 1.4.3.2 Réparation des dommages causés à l'ADN

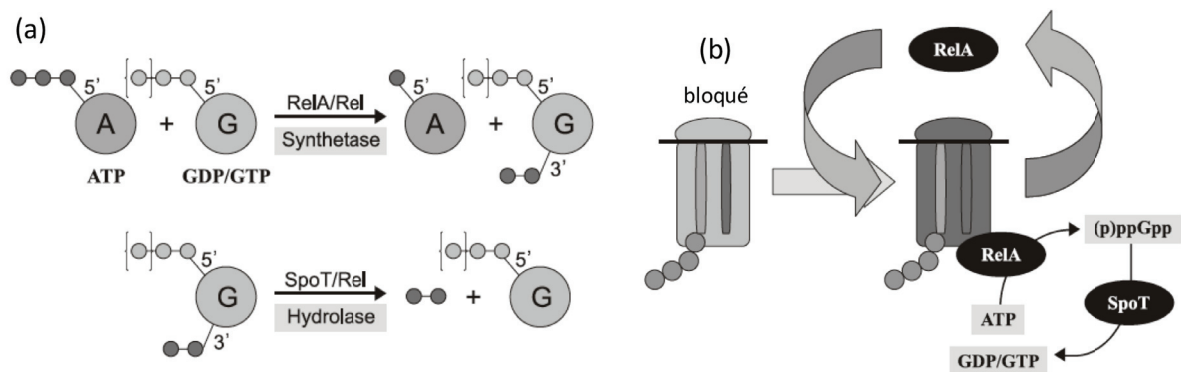
Le stress oxydatif est connu pour causer des lésions à l'ADN. Ces lésions peuvent affecter la réplication et/ou la transcription. Les lésions d'ADN les plus abondantes résultant du stress oxydatif sont les dérivés de base endommagés. Pour contrer ces effets délétères, les bactéries réparent principalement les dommages oxydatifs causés à l'ADN par la voie de réparation par excision de base (BER), qui élimine les petites lésions de base sans distorsion de l'hélice du génome. Ce mécanisme repose sur les glycosylases de l'ADN, qui reconnaissent et éliminent des bases spécifiques endommagées ou inappropriées, formant des sites apuriniques ou apyrimidiniques. Ces sites sont ensuite clivés par des endonucléases. Chez *E. coli*, plusieurs gènes sont impliqués dans le codage des glycosylases de l'ADN, tels que *ung*, *mutY* et *mug*. L'endonucléase III (codée par le gène *nth*) et l'endonucléase VIII (codée par le gène *nei*) peuvent reconnaître la perturbation de l'hélice d'ADN et cliver les régions endommagées afin de générer des sites sans bases azotés. L'endonucléase IV (codée par le gène *nfo*) et l'exonucléase III (codée par le gène *xth*) sont responsables d'un clivage sur les sites apuriniques et apyrimidiniques de l'ADN endommagé. Les mutants dépourvus à la fois des gènes *nth* et *nei* meurent rapidement en présence d'  $H_2O_2$ . Les mutants des gènes *nfo* et *xth* montrent tous deux une sensibilité accrue aux peroxydes par rapport à la souche sauvage [51].

Les lésions de l'ADN activent également la réponse SOS afin de réparer l'ADN endommagé. LexA, un régulateur clé de la réponse SOS, réprime les gènes SOS dans des conditions normales. Après un dommage à l'ADN, la protéine RecA est activée par liaison à de l'ADN simple brin et stimule alors le clivage autocatalytique de LexA, qui génère des fragments de LexA [63]. Cette induction conduit à la stimulation de plus de quarante gènes SOS. Plusieurs de ces gènes codent des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN ou la tolérance aux dommages, y compris la réparation par excision des nucléotides, la réparation par recombinaison de l'ADN et la division cellulaire.

## 1.5 Stress nutritionnel

La carence en nutriments peut être définie comme une condition de privation, entre l'excès et l'absence totale de nutriments [64]. Les bactéries ont généralement des stratégies distinctes pour lutter contre cette carence selon la source de nutriments mais ont développé une stratégie de réponse plus globale appelée réponse stringente [64]. Les micro-organismes pathogènes font très souvent face à des carences nutritives au sein de leur hôte. Par exemple, *Mycobacterium* a la capacité de survivre assez efficacement à l'intérieur de l'hôte, où la réponse stringente semble jouer un rôle important [65], [66].

La réponse stringente est mise en place en cas de carence en acide aminé, en phosphate, en azote, en acide gras ainsi qu'à divers stress tels que les chocs hyperosmotiques et le stress oxydatif. Cette réponse est possible grâce à deux acteurs majeurs, RelA et SpoT, qui contrôlent la synthèse et la dégradation de l'alarmone ppGpp (guanosine 3',5'-bisphosphate) [67] [68] [69] [70] (Figure 13). Lors d'une carence nutritive, l'alarmone ppGpp s'accumule. Cette dernière peut se lier à l'ARN polymérase et réguler négativement la production d'ARN ribosomiaux et d'ARN de transfert diminuant ainsi globalement la synthèse protéique [71]. De manière générale, lors d'une accumulation de ppGpp, la biosynthèse des protéines diminue et leur hydrolyse augmente, la cellule ralentit/stoppe sa division et privilégie sa survie en activant des gènes de réponse au stress et de biosynthèse d'acide aminés [69]. L'accumulation de (p)ppGpp dépend de la double activité de SpoT sous forme de (p)ppGpp-hydrolase ou ppGpp-synthétase. La détection du stress se fait par l'intermédiaire de RelA qui détecte le blocage d'un ribosome sur un ARNt non chargé d'un acide aminé. Le mécanisme d'action de RelA et SpoT est représenté Figure 13.



**Figure 13 : Mécanismes de synthèse et d'hydrolyse du (p)ppGpp par RelA et SpoT et leurs mécanismes d'action.**

(a) Représentation des mécanismes de synthèse et d'hydrolyse de (p)ppGpp par RelA/SpoT. La première réaction se produit en présence de  $Mg^{2+}$ , tandis que la seconde se produit en présence de  $Mn^{2+}$ . Les phosphates sont représentés sous forme de petits cercles. A signifie Adénosine ribonucléoside et G représente Guanosine ribonucléoside.

(b) Représentation du mécanisme d'action de RelA et SpoT. Un ribosome se bloque lors de l'entrée d'un ARNt non chargé, ce qui signale à RelA de se lier au ribosome, provoquant la synthèse de (p)ppGpp. RelA peut alors être transféré de ce ribosome à un autre ribosome bloqué. Inversement, SpoT provoque la dégradation de (p)ppGpp lorsqu'il n'est pas nécessaire. Adaptée de [69].

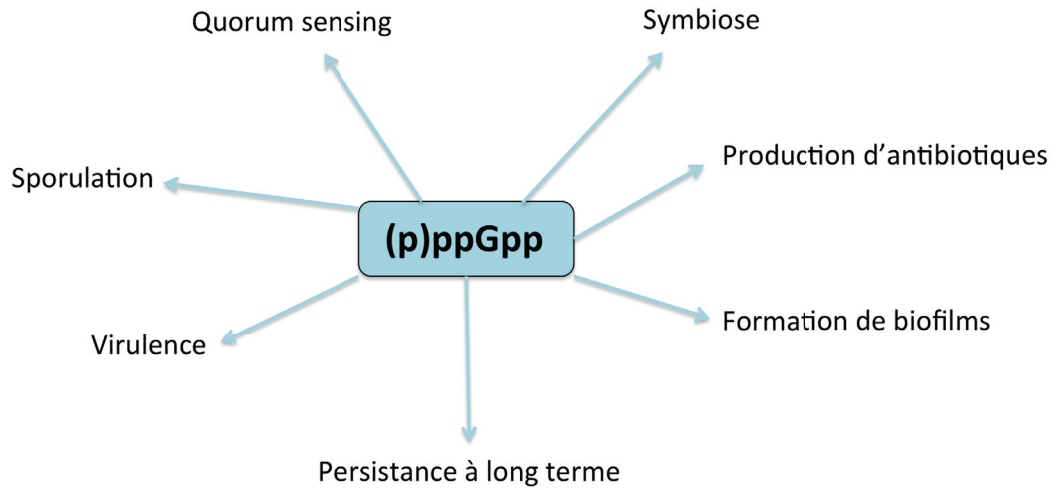
En se liant à deux sites de l'ARN polymérase, l'alarmone ppGpp augmente la production de  $\sigma^S$  [72]. En condition de carence nutritive,  $\sigma^S$  est alors plus présent et régule négativement les gènes de ménage dépendants de  $\sigma^{70}$ , tels que les gènes du cycle TCA et ceux impliqués dans la réplication d'ADN et la division cellulaire [73]. De plus, le ppGpp influence la compétition entre les différents facteurs sigma dans la liaison à l'ARN polymérase au détriment de  $\sigma^{70}$  [74] et de la disponibilité de l'ARN polymérase [67]. La réponse stringente est donc caractérisée par une expression réduite des gènes typiquement associés à la croissance et une expression accrue des gènes de survie qui économisent l'utilisation de nutriments rares par un processus connu sous le nom de commutation transcriptionnelle (Diminution de l'activité du facteur sigma 70 au profit d'autres facteurs sigma) [75]. Le ppGpp réprime ainsi la transcription d'ARNs stables, comme l'ARNt et l'ARNr, et régule positivement des gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés. Des facteurs accessoires, tel que le

facteur de transcription DksA chez *E. coli*, peuvent renforcer l'action de ppGpp [76]–[78][79].

La gestion des sources carbonées implique la régulation du chimiotactisme (contrôle des mouvements cellulaires). Cela indique que les cellules poursuivent une stratégie "offensive" afin d'exploiter la faible quantité de sources de carbone disponible dans l'environnement [67]. D'autre part, le ppGpp régule aussi la concentration des ribosomes et le taux de croissance cellulaire. Ceci pourrait être considéré comme une stratégie "défensive", car le ppGpp régule ainsi la production d'énergie en contrôlant le métabolisme central du carbone [67].

Le ppGpp joue un rôle important dans la survie des bactéries dans différentes conditions environnementales avec des fonctions dans la persistance au sein de l'environnement, la symbiose et la production d'antibiotiques, ainsi qu'un rôle dans la virulence [69]. Le (p)ppGpp a en effet des implications directes sur la virulence, la pathogénèse et la survie des micro-organismes à l'intérieur de l'hôte. Des pathogènes, tels que *Vibrio cholerae* et *Salmonella*, et des pathogènes opportunistes, tels que *Pseudomonas* et *Legionella*, ont également été décrits pour avoir leur virulence contrôlée par le ppGpp [80]–[82]. *Campylobacter jejuni*, un pathogène humain, présente une régulation positive de *spoT* pendant l'infection de l'épithélium humain, de façon coordonnée avec le(s) facteur(s) de virulence. La réponse stringente de cette bactérie est nécessaire à sa survie dans la phase stationnaire et dans des conditions de faible teneur en CO<sub>2</sub>/haute teneur en O<sub>2</sub> [83]. Une régulation négative des facteurs de virulence en l'absence du gène *relA* a été observée chez *Vibrio cholerae*. Un niveau accru de (p)ppGpp est observé dans des conditions où les gènes de virulence sont induits (ex: toxine cholérique) alors que les mutants dépourvus de *relA* ne produisent pas ces facteurs de virulence [81]. La virulence d'un pathogène est également régie par sa capacité à adhérer à la surface de l'hôte et de former un biofilm. Le ppGpp joue un rôle crucial car un mutant *relA* de *Listeria monocytogenes* perd sa capacité d'adhésion et d'infection d'un modèle murin [84]. Chez une souche de *Salmonella typhimurium* présentant des mutations dans les gènes *relA* et *spoT*, l'absence de synthèse de ppGpp provoque également un défaut de virulence [85]. Un ajustement des niveaux de ppGpp a aussi été observé chez *P.*

*aeruginosa* lors d'une infection de *Drosophila* [86]. Un schéma bilan de l'action de ppGpp dans la cellule est présenté figure 14.



**Figure 14: Diagramme illustrant les différents aspects physiologiques des bactéries affectées par (p)ppGpp.**

## II. Les métaux, un générateur de stress chez les bactéries

### 2.1 Origines et intérêt de les étudier

La Terre est apparue il y a 4,5 milliards d'années. Les gaz composant son atmosphère étaient le méthane ( $\text{CH}_4$ ), le dihydrogène ( $\text{H}_2$ ) et le sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ). L'appauvrissement en méthane, l'enrichissement en oxygène dans l'atmosphère et la présence de métaux sur terre ont été des événements majeurs pour le développement de la vie, les métaux conduisant à un grand événement oxydatif [87]. Il y a 2,4 milliards d'années, l'activité volcanique qui induisait la diffusion de métaux dans l'environnement a diminué. Il y a 2 milliards d'années, les cyanobactéries ont remplacé les organismes méthanogènes grâce à leur faculté à solubiliser les ions métalliques [88]. Ces transformations chimiques ont été possibles grâce à l'apport énergétique de la lumière (photosynthèse) qui est à l'origine du relargage progressif d' $\text{O}_2$  libre dans l'atmosphère. L'existence de gisements de fer dans des roches très anciennes témoigne de cette activité photosynthétique. Dans l'eau, le fer existait à l'état soluble  $\text{Fe}^{2+}$  [89]. Les cyanobactéries, qui oxydent le fer en  $\text{Fe}^{3+}$ , ont permis son accumulation au fond de l'océan. Les métaux vont avoir un rôle ubiquitaire et rester des éléments essentiels à la vie.

L'utilisation des métaux a aussi eu une importance capitale chez l'Homme. L'or, découvert 6000 ans avant J-C, a été le premier métal extrait. Les métaux ont d'abord été utilisés à des fins décoratives pour ensuite être utilisés pour la confection d'armes, d'ustensiles et d'outils. Au VIII<sup>e</sup> siècle, des métaux, comme l'arsenic, ont commencé à être utilisés en tant que poisons. D'autres, comme le plomb ou le mercure étaient utilisés pour traiter certaines maladies de peau. Le mercure fut même par la suite utilisé lors de traitement parasitaire et maladies chroniques.

Aujourd'hui, les métaux sont largement répandus dans les industries métallurgiques à cause de leur propriété de conduction électrique (ex : cuivre) ou thermique (ex : aluminium). Ils sont aussi utilisés en agriculture en tant qu'antimicrobiens, comme le sulfate de cuivre.

Certains métaux, toxiques pour l'organisme, sont pourtant essentiels aux micro-organismes pour vivre, coloniser ou conserver leur pouvoir pathogène. Leur étude améliore la compréhension du fonctionnement des micro-organismes et des interactions possibles avec des hôtes.

## 2.2 Essentialité des métaux

Les métaux sont impliqués dans des réactions d'oxydo-réduction consistant à un transfert d'électrons d'un donneur (agent réducteur) vers un accepteur (agent oxydant). Exemple de réaction d'oxydo-réduction:



Cette réaction peut être décomposée en deux demi-réactions ou couples rédox :



Ces demi-réactions ont lieu au niveau de la chaîne respiratoire lors du transfert vital d'électrons au sein du cytochrome C oxydase. Ce transport d'électrons est indispensable aux activités bioénergétiques comme la respiration cellulaire. Au cours de ce transfert, l'énergie libre transfère des électrons depuis la NADH ou le FADH<sub>2</sub>, processus couplé à la synthèse d'ATP. Les ions Fe et Cu assurent ces réactions d'oxydoréduction. A titre d'exemple, la chaîne de transport des électrons des mitochondries compte plus de 31 clusters Fe-S ainsi que deux ions Cu [90] (tableau 1).

Complexes	Enzymes	Métaux de transition
I	NADH-coenzyme Q oxydoréductase	22 à 24 Fe-S
II	succinate-coenzymeQ oxydoréductase	7 à 8 Fe-S dans 3 centres
III	coenzyme Q- cytochrome C oxydoréductase	2 centres Fe-S
IV	cytochrome c-oxydase	2 ions Cu <sup>2+</sup>

**Tableau 1: Métaux de transition essentiels à la chaîne de transport des électrons.**

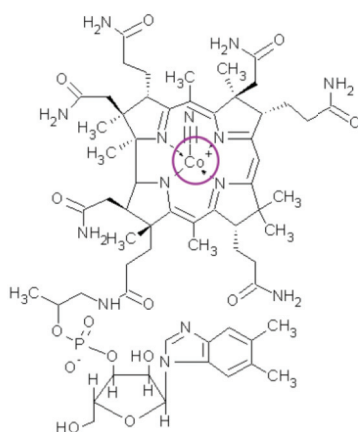
Exemple de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie [90].

Les plantes à chlorophylle, organismes photosynthétiques, ont dans leur centre réactionnel des métaux, comme c'est le cas pour le Photosystème II (PSII). Le PSII contient deux hèmes, un cluster  $Mn_3CaO_4$  et un cation  $Fe^{2+}$  [91].

Chez les vertébrés, l'exemple le plus courant est celui du transport du dioxygène réalisé par des protéines appelées hémoglobines. Ses quatre sous unités sont reliées entre elles et chacune lie un seul groupe hème par des liaisons non covalentes. La liaison avec l'oxygène se fait par le complexe fer-porphyrine qui subit un changement conformationnel à la suite de la fixation de l' $O_2$ .

Ces exemples illustrent parfaitement le rôle indispensable des métaux dans les grandes fonctions cellulaires. Ces métaux, en plus d'avoir une fonction redox, jouent également un rôle structural au sein des protéines. En effet, chez les bactéries, plus d'un tiers des protéines lient un métal indispensable à leur fonction [92]. On parle de métalloprotéines. Le métal le plus abondant chez les bactéries est le zinc avec une concentration de  $10^{-4}M$  chez *E. coli* alors qu'il est retrouvé à  $10^{-7}M$  dans un milieu riche de type Luria Broth [93]. Le Zn est ainsi capable de se lier à plus de 100 protéines différentes suggérant que les bactéries ont une forte capacité à chélater le Zn [94]. Par exemple, La sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase et plusieurs protéines ribosomales fixent des ions Zn. D'autres métaux peuvent également accomplir la fonction de cofacteur comme l'ion Co au sein de la cobalamine (vitamine B12) (figure 15). Chez *E. coli*, aucun système d'import spécifique des ions  $Co^{2+}$  n'a été décrit. Afin d'importer des ions Co, les bactéries peuvent ainsi importer la vitamine B12 directement. Le nickel a également un rôle de cofacteur catalytique d'enzymes. Sa fonction est parfois essentielle chez les eubactéries et les archées. Des uréases contenant du nickel sont retrouvés chez les champignons et les plantes mais ces ions sont utilisés de manière plus limitée [95], [96]. Aucune fonction n'a jusqu'à aujourd'hui été identifiée chez les vertébrés malgré le fait qu'elle y paraisse nécessaire car une carence en nickel induit une pathologie [97].





**Figure 15: ion cobalt cofacteur de cobalamine**

Structure de la vitamine B12 (cobalamine) et de son cofacteur, l'ion Co, entouré en rose.

Le tableau 2 suivant présente diverses fonctions de quelques métaux

Elements	Fonctions
Co	Oxydase; transfert de groupement alkyle
Cu	Oxydase; transfert d'oxygène; transfert d'électrons
Fe	Oxydase; transport et stockage de l'oxygène; transfert d'électrons
Mn	Oxydase; photosynthèse; structure
Mo	Oxydase; fixation d'azote; transfert d'oxygène
Ni	Hydrolase; hydrogénase
Zn	Hydrolase; structure

**Tableau 2: Fonctions biologiques de quelques métaux de transition.**

Tableau de [98].

## 2.3 Toxicité des métaux

### 2.3.1 Toxicité : Liaison aspécifique

L'une des premières causes de la toxicité des métaux est leur capacité à former des liaisons aspécifiques. Ces liaisons aspécifiques sont générées lorsque le métal est en excès. Chaque organisme possède des teneurs en métaux différentes (tableau 3). Lorsqu'un organisme se retrouve avec un excès d'ions, ces derniers vont pouvoir se fixer

sur les chaînes latérales des protéines ou des acides nucléiques par exemple. Les métaux comme l'Ag, le Cd ou le Hg ont une plus grande affinité pour les composés soufrés et vont bloquer les groupes fonctionnels de certaines molécules [92]. Les liaisons aspécifiques des métaux sur les protéines peuvent empêcher la création de ponts disulfure et gêner le repliement correct des protéines [99]. Une carence en métaux peut au contraire être létale pour les organismes. En effet, si le métal carencé est essentiel aux grandes fonctions cellulaires, l'organisme fera face à un stress.

Eléments	Concentration dans l'eau de mer (1)	Concentration chez <i>E. coli</i> (2)	Concentration dans la plante (en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec) (3) (*)
Sodium	457 mM	236 mM	n.d
Magnésium	55,5 mM	44 mM	n.d
Potassium	9,72 mM	210 mM	n.d
Calcium	9,98 mM	0,3 mM	n.d
Manganèse	36,4 nM	1,7 mM	10-100
Fer	179 nM	180 $\mu\text{M}$	50-150
Cobalt	4,78 nM	0,5 $\mu\text{M}$	1-20
Nickel	92,0 nM	5 $\mu\text{M}$	15-22
Cuivre	47,2 nM	18 $\mu\text{M}$	n.d
Zinc	153 nM	270 $\mu\text{M}$	15-50

**Tableau 3: Teneurs théoriques en métaux dans l'eau de mer, bactérie et plante.**

[93], [93], [100] (\*) Les concentrations des métaux dans les plantes peuvent varier en fonction de l'espèce, du génotype, de l'organe, du tissu ou des conditions de croissance. n.d= non déterminé

### **2.3.2 Toxicité et nature du métal :**

Un autre facteur à prendre en considération quant à la toxicité des métaux est la fonctionnalité du métal. Certains métaux sont en effet plus essentiels que d'autres au sein de la cellule et sont ainsi moins toxiques à forte concentration. La Figure 16 présente les différents éléments en fonction de leur degré de toxicité. Les éléments comme le sodium, magnésium, potassium ou le calcium sont des éléments majeurs et

sont en quantité très importante dans la cellule (tableau 3). Ils sont essentiels car ils participent au métabolisme de base de la cellule. On trouve d'autres éléments traces comme le manganèse, le fer, le cobalt, le nickel, le cuivre et le zinc. Ces métaux, en plus faible quantité que ceux évoqués précédemment sont des éléments impliqués dans de nombreux processus cellulaires et peuvent être toxiques à forte concentration. Les éléments uniquement toxiques, sans fonction dans la cellule, sont entre autres, le cadmium, le chrome, l'argent, l'or le mercure et le plomb. Ces éléments sont en très faible quantité (picomolaire) et n'ont pour la plupart aucun rôle biologique dans la cellule.

1																	18
H	2											13	14	15	16	17	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Unq	Unp	Unh	Uns	Uno	Une	Unn								

**Figure 16: Un tableau périodique des métaux et métalloïdes bénéfiques et toxiques.**

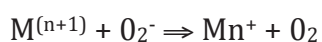
Le bleu indique les métaux bénéfiques pour la cellule ; le violet indique les éléments bénéfiques mais qui peuvent être toxiques à des concentrations élevées. Le rouge indique les éléments qui sont toxiques ou qui n'ont aucun avantage pour la plupart des organismes. Tableau adapté d'après [101].

### 2.3.3 Toxicité : stress oxydant :

Les espèces réactives oxygénées (ROS) induisent un stress oxydant. Ces ROS, composés de l'ion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène, sont produits de manière physiologique dans tous les organismes vivants utilisant l'oxygène et ils sont continuellement générés au cours du processus de respiration cellulaire. (Voir chapitre 1.3 pour plus de détails).

La présence de Fe et Cu entraîne la production du radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ). Les réactions associées sont les suivantes :

Réaction de Fenton :  $\text{M}^{n+} + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{M}^{(n+1)} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$  M=Métal



Réaction d'Haber-Weiss :  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \Rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$

La formation massive du radical hydroxyle est la résultante de la présence simultanée des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et des métaux. Ces radicaux libres causent de nombreux dégâts dans la cellule.

Les lipides sont des cibles majeures lors d'un stress oxydatif [102]. Les acides gras polyinsaturés vont être attaqués par les radicaux libres au niveau des membranes ce qui initie la peroxydation des lipides. Cette peroxydation entraîne une diminution de la fluidité membranaire altérant les propriétés de la membrane et perturbant les protéines qui y sont présentes.

Certains acides aminés comme, la cystéine, l'arginine, la lysine, l'histidine et la proline vont aussi être oxydés par le radical hydroxyle. Cette oxydation provoque la formation de liaisons aspécifiques inter ou intramoléculaires et la fragmentation des protéines [103]. En plus du stress oxydant, les métaux sont capables de prendre la place d'autres métaux au sein des protéines. A titre d'exemple, le mercure et le cadmium, deux métaux toxiques sans rôle biologique dans la cellule (Figure 16), peuvent remplacer le zinc sur une protéine, plus spécialement pour les protéines contenant une cystéine dans le site de fixation du zinc. Le Cd et le Hg ont en effet une forte affinité pour l'élément soufre des groupements thiol des cystéines [92]. Les ions Co à forte concentration ont eux la faculté de rentrer en compétition avec les ions Fe. Les ions Co altèrent donc les voies métaboliques dépendantes des enzymes possédant des clusters fer-soufre [104].

Le stress oxydatif entraîne des cassures simples et doubles brins de l'ADN. Des modifications comme des dépurinations et des dépyrimidations sont engendrées par

l'oxydation des bases. Les liaisons ADN-protéines sont également altérées et les sucres phosphates peuvent être modifiés [105]. Les dégâts du stress oxydatif sur l'ADN sont fortement augmentés en présence d'ions Fe et de Cu. Plusieurs expériences suggèrent que les ROS les plus agressives pour l'oxydation de l'ADN sont les radicaux hydroxyles. Les radicaux superoxydes n'ont pas ou très peu d'effet sur l'oxydation de l'ADN en l'absence de métaux ce qui suggère que les radicaux superoxydes ont tout simplement un rôle dans la réaction chimique d'Haber-Weiss pour produire le radical hydroxyle véritable responsable de l'oxydation de l'ADN [105].

## **2.4- Les métaux au centre des interactions Hommes-bactéries et plantes-bactéries : Rôle bénéfique et néfaste dans ces deux interactions**

### ***2.4.1 Interaction Homme/micro-organismes***

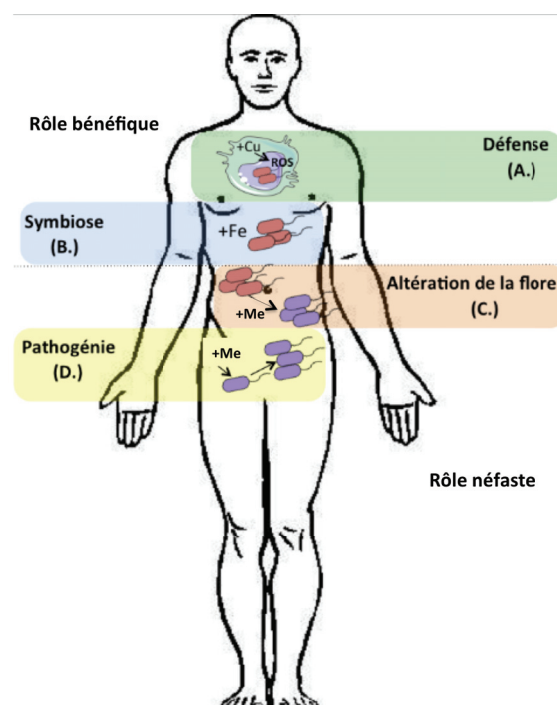
Au sein des interactions entre les micro-organismes et l'Homme, les métaux jouent un rôle important. Les métaux peuvent ainsi jouer un rôle bénéfique dans les mécanismes de défense contre les pathogènes ou dans les interactions symbiotiques mais peuvent aussi avoir un effet néfaste sur ces interactions en altérant par exemple la composition de la flore intestinale ou en permettant la pathogénie de certains micro-organismes (Figure 17).

#### ***2.4.1.1 Effet néfaste du métal sur les bactéries***

Les cellules macrophages de l'Homme utilisent les métaux, notamment les ions Cu, pour lutter contre les infections bactériennes (Figure 17A) [106]. La virulence de *Salmonella typhimurium*, un pathogène à Gram négatif, ou de *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose, est déterminée par leur capacité à survivre et à se répliquer dans les macrophages. Ces derniers interviennent lors de la réponse innée en phagocytant un intrus qui se retrouve alors piégé dans un phagosome. Le phagosome subit plusieurs étapes de maturation au cours desquelles des enzymes et des toxines bactéricides s'accumulent en plus que le pH interne diminue. De même, des ROS sont créées par action de la NADPH oxydase sur l'oxygène pour tuer les micro-organismes. Du cuivre peut être importé par des systèmes d'import spécifiques tels que CTR1 au sein du macrophage puis par ATP7A au sein du phagosome (Figure 18). La réaction de Fenton

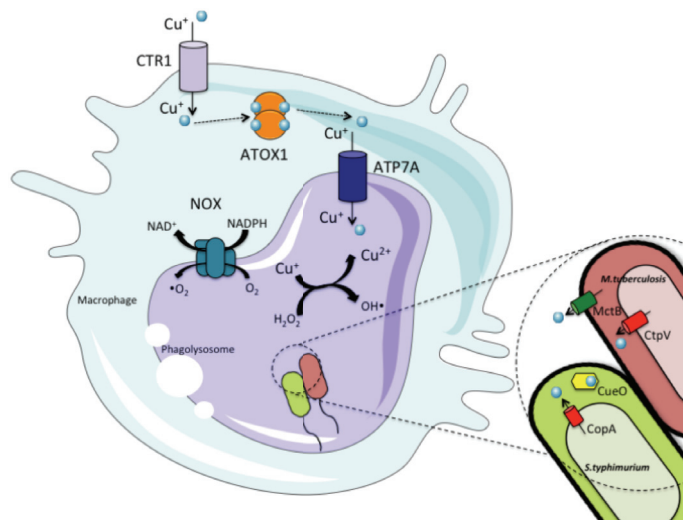
est ensuite réalisée entre les ions Cu et les peroxydes d'hydrogène (voir réaction précédente). Cette réaction forme des ROS à activité bactéricide dans le phagolysosome. Pour échapper à cela, les pathogènes produisent des protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre, tels que les pompes à efflux CltV et MetB chez *M. tuberculosis* et la pompe à efflux CopA ou une enzyme de détoxification CueO chez *S. typhimurium* [106].

Dans certains cas, la présence de fortes concentrations de métaux peut nuire aux interactions micro-organismes/hôtes si aucun système de défense n'est employé. Des travaux ont montré que l'ingestion de plomb et de cadmium par des souris changeait drastiquement la flore intestinale du modèle murin [107].



**Figure 17: Les métaux dans les interactions hommes-bactéries**

Afin de lutter contre les infections microbiennes, l'hôte peut utiliser les métaux comme le Cu pour produire des ROS (A). Les métaux peuvent aussi influencer les interactions d'ordre symbiotique (B). Le fer, notamment, permet le développement des bactéries symbiotes de l'intestin. Les métaux peuvent aussi avoir un effet néfaste en altérant la composition de la flore bactérienne (C). Les métaux peuvent être d'importants facteurs de pathogénie, essentiels pour la survie de micro-organismes pathogènes (D). Adaptée de [108].



**Figure 18: Réponse du macrophage dépendante du Cuivre lors d'une infection bactérienne par *Mycobacterium tuberculosis* et *Salmonella typhimurium*.**

Les lipopolysaccharides bactériens stimulent l'absorption du Cu chez le macrophage en induisant l'expression de la pompe CTR1 pour l'entrée des ions  $\text{Cu}^{2+}$ . Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  sont pris en charge par la protéine chaperonne ATOX1 puis les ions sont apportés au phagolysosome et importés par l'ATPase ATP7A. Lors de l'infection, la NADPH oxydase (NOX) est produite, permettant la production d'  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L' $\text{H}_2\text{O}_2$  et les ions Cu provoquent la réaction de Fenton entraînant la production de ROS. Les bactéries, en réponse à ce stress, synthétisent des systèmes de défense. Figure adaptée d'après [106].

#### 2.4.1.2 Effet néfaste du métal sur l'hôte

Dans d'autres cas, des bactéries pathogènes peuvent utiliser les métaux environnants à leur avantage. C'est le cas d'*helicobacter pylori*, un colonisateur d'intestion responsable d'ulcères et de cancer [109]. Cette bactérie synthétise une uréase, capable de catalyser la réaction d'hydrolyse de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniacque afin d'augmenter le pH environnant. Cette enzyme a besoin de deux ions Ni pour fonctionner [110]. D'autres enzymes, telles que les hydrogénases indispensables à la croissance d'*helicobacter pylori*, sont nickel ou fer dépendante. *H. pylori* utilise en effet l'hydrogène produit par d'autres bactéries colonisatrices de l'estomac comme sources d'énergie [111].

#### *2.4.1.3 Importance des métaux dans les interactions symbiotiques*

La majorité des millions de micro-organismes du corps humain est inoffensive et a même un rôle bénéfique. Le microbiote intestinal est un organe complexe jouant un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du tractus intestinal [112]. Des études ont montré que la supplémentation en fer dans l'alimentation de souris augmentait la concentration de butyrate d'origine bactérienne dans les intestins [113]. Le butyrate microbien est une source d'énergie pour les cellules du colon de mammifères [114]. Ces résultats montrent l'effet bénéfique que peuvent avoir les métaux dans l'interaction micro-organismes symbiotiques/cellules hôtes.

#### **2.4.2 Interactions plantes/micro-organismes**

Comme pour les interactions bactéries/Homme, les métaux peuvent avoir un rôle bénéfique ou nocif pour la bactérie ou sa plante hôte. La Figure 19 référence quelques grandes fonctions des métaux dans les relations entre les micro-organismes et les plantes.

##### *2.4.2.1 Combat pour l'accès aux métaux entre la plante et le pathogène*

La disponibilité des métaux dans les tissus végétaux est un enjeu majeur pour la croissance du pathogène. De plus, les métaux peuvent également être impliqués dans la régulation des gènes de pathogénie et de virulence (Figure 19). L'exemple le plus révélateur est celui du régulateur transcriptionnel FUR. FUR contrôle l'expression des systèmes d'entrée et de stockage du fer de manière fer dépendante. Chez *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*, pathogène du tabac, des mutants  $\Delta fur$  ont une virulence diminuée [115]. Cette perte de virulence est due à une diminution de la production de toxines provoquant ainsi un défaut de croissance [115].

L'assimilation des métaux va entraîner une compétition entre les deux organismes durant laquelle la plante va chercher à carencer le pathogène des métaux essentiels à sa pathogénicité. Le métal le plus pertinent à prendre en considération est donc le fer. Le fer est l'un des éléments les plus abondants sur terre, mais en condition aérobie, il existe surtout sous forme insoluble  $Fe^{3+}$ , ce qui le rend très faiblement biodisponible [116]. Lors de cette compétition, les bactéries ainsi que la plante produisent des chélateurs de fer nommés sidérophores (Figure 19). Par exemple, lorsque *Dickeya dadantii* infecte la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, la plante augmente sa production de son



sidérophore ferritine. Ce moyen de défense est induit par la détection des sidérophores du pathogène indiquant à la plante que la concurrence pour les ions Fe s'installe [117]. La compétition pour les métaux peut ainsi induire les systèmes de défense de la plante contre le pathogène qu'elle détecte.

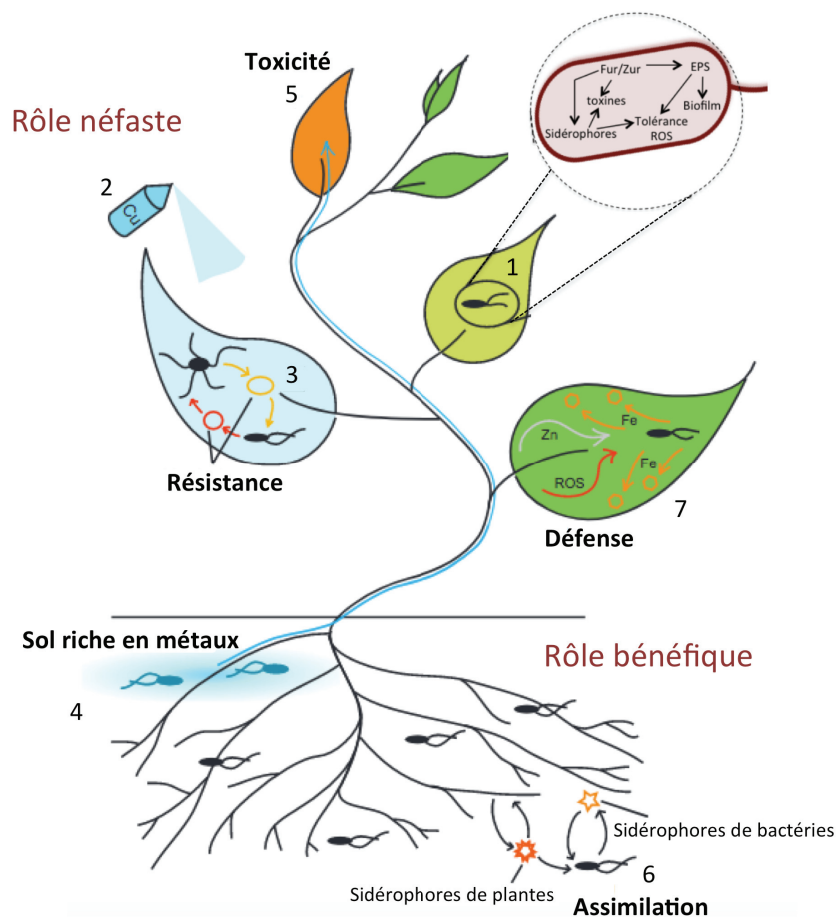
Les cellules végétales, de la même façon que les mammifères et en plus de l'exemple précédent utilisent le fer comme système de défense dans l'attaque des pathogènes via la production de ROS (Figure 19) [118].

#### 2.4.2.2 Rôle néfaste des métaux dans les interactions plantes/micro-organismes

De nombreux problèmes sont rencontrés suite à l'utilisation prolongée de cuivre comme c'est le cas lors de traitements de zones agricoles avec la « bouillie bordelaise ». En effet, les souches bactériennes peuvent acquérir des systèmes de défense et devenir résistantes aux métaux. Ceci peut notamment s'effectuer par transferts horizontaux de gènes de résistance d'une souche à une autre et permettre ainsi à certains pathogènes de pouvoir infecter de nouveau son hôte. (Figure 19) [119]. Par exemple, un plasmide conférant une résistance accrue au cuivre est retrouvé chez plus de douze souches de *Pseudomonas syringae* [120]. Les métaux en excès ont ainsi des effets néfastes sur la plante elle même (Figure 19).

Certains micro-organismes ont cependant la capacité de protéger la plante contre un excès d'ions métalliques (Figure 19). Des études chez *Kluyvera ascorbata* ont montré qu'un mutant surproducteur de sidérophores favorisait la croissance de différentes plantes en présence de nickel, plomb ou zinc [121]. Cette capacité de protection serait reliée au fait que les bactéries fourniraient suffisamment de fer aux plantes d'après les auteurs de l'étude. Une autre hypothèse serait que les sidérophores produits en excès chélateraient les ions métalliques environnants, protégeant ainsi la plante d'un excès de métal. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les sidérophores peuvent chélater des métaux différents du fer, comme c'est le cas chez *Pseudomonas aeruginosa* [122].

Toutes les interactions évoquées au cours de ce chapitre sont dépendantes de la nature de l'élément métallique ainsi que sa concentration. La teneur en métaux est ainsi finement régulée au sein des micro-organismes, on parle d'homéostasie métallique.



**Figure 19: Les métaux dans les interactions plantes-microbes.**

Les métaux peuvent influencer sur l'expression de divers types de facteurs de virulence bactérienne, y compris les toxines, les exopolysaccharides (EPS) et les gènes *hrp*, les senseurs de métaux Fur et Zur et des systèmes d'assimilation des métaux, en particulier les sidérophores (1). Les métaux ont également un rôle à jouer dans la protection de la plante contre les infections, en particulier dans le cas du cuivre, qui peut être appliqué directement sur les cultures en tant qu'antimicrobien (2). Cette approche peut conduire au développement de souches résistantes aux métaux, accéléré par le transfert horizontal de gènes de résistance (3). L'accumulation de métaux dans le sol peut affecter les communautés microbiennes (4), avec effets potentiels sur les interactions microbes-plantes et peut donner lieu à une surexposition aux métaux de la plante, causant des symptômes de toxicité (5). Les plantes et les microbes se disputent aussi les métaux. L'assimilation du métal se produit via les composés chélateurs du fer tels que les siderophores et les bactéries du sol sont parfois en mesure de capter les sidérophores produits par la plante, en plus des leurs (6). Dans la plante, la concurrence pour les métaux peut également être importante, avec la rétention des métaux, en particulier le fer, étant une défense importante. De plus, les plantes peuvent utiliser des métaux comme moyens de défense, comme générateurs de ROS par exemple (7). Adaptée de [123].

## 2.5 Comment les bactéries s'assurent d'acquérir le bon métal ?

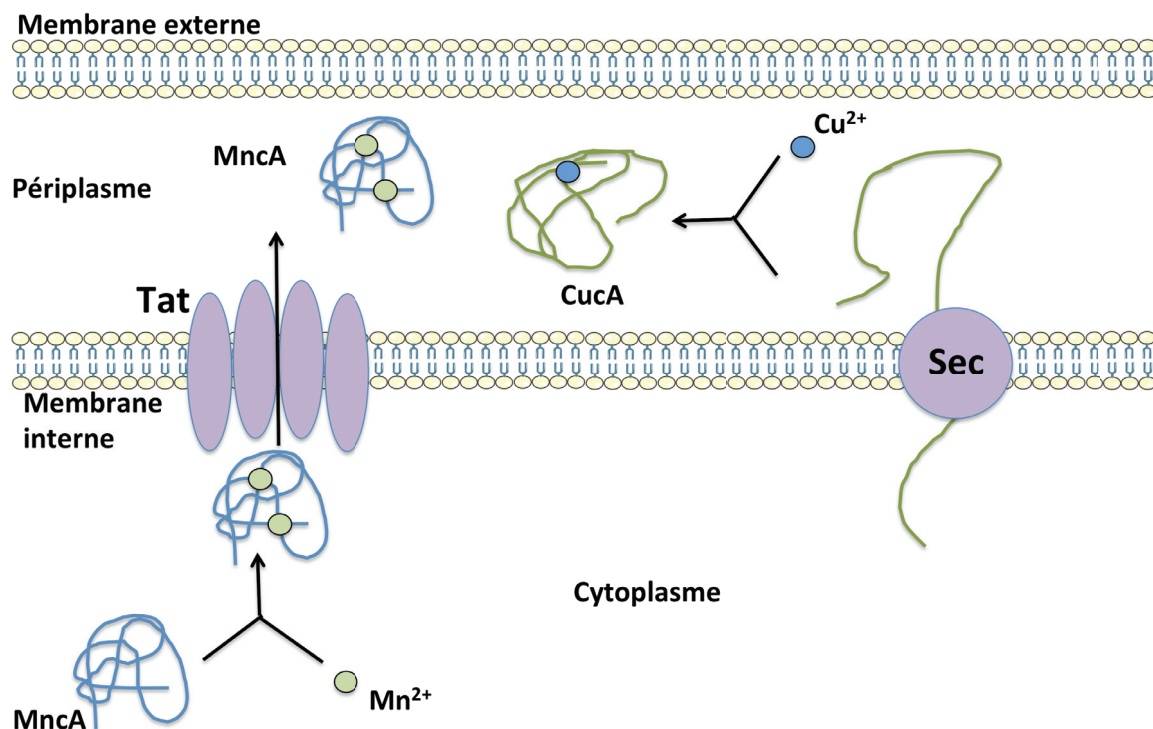
Afin de maintenir l'homéostasie pour l'ensemble des métaux, la cellule doit être capable de différencier chacun d'eux. Pour cela, les métalloprotéines sont les principales actrices du maintien de l'homéostasie métallique en discernant le bon métal.

### 2.5.1 Comment discerner le bon métal ?

Pour comprendre le défi lié à l'association correcte de chaque métalloprotéine avec son métal, il est nécessaire de se familiariser avec la série Irving-Williams [124], [125]. Parce que les protéines sont flexibles, elles offrent une sélection stérique imparfaite pour les métaux. Dans ces conditions, les affinités pour les métaux ont tendance à suivre un ordre de préférence universel, qui pour les métaux divalents essentiels est la série Irving-Williams ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (liaison la plus faible)  $< Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$ ). Le cuivre divalent est très compétitif et devrait se lier étroitement aux métalloprotéines, en particulier celles qui contiennent des ligands soufrés et azotés. Le cuivre monovalent, qui devrait prédominer dans un cytosol réducteur, et le fer trivalent, qui devrait prédominer dans un périplasme oxydant, sont également très compétitifs, tout comme plusieurs métaux non essentiels, comme le cadmium, le mercure et l'argent. Comment une cellule peut-elle contenir simultanément certaines protéines qui nécessitent du cuivre ou du zinc et d'autres qui nécessitent des métaux moins compétitifs, comme le magnésium ou le manganèse ? Dans un modèle très simpliste dans lequel les protéines prélèvent des éléments d'un cytosol dans lequel tous les métaux divalents sont présents et abondants, toutes les protéines se lieraient au cuivre. Les métaux au sommet de la série de stabilité doivent être tenus à l'écart des sites de liaison pour ceux qui se trouvent plus bas [92].

Afin d'expliquer les stratégies employées par un organisme pour faire le bon choix protéines-métal, il est intéressant de prendre l'exemple de la *cyanobactérie Synechocystis*. Cette bactérie a besoin d'une grande quantité de cuivre et de manganèse pour réaliser la photosynthèse. Les protéines MncA et CucA fixent respectivement du manganèse et du cuivre. Ces deux cations divalents se trouvent aux extrémités de la série Irving Williams. Selon cette série, il faudrait beaucoup plus d'ions  $Mn^{2+}$  que d'ions  $Cu^{2+}$  afin que la protéine MncA fixe du manganèse et évite la fixation du cuivre. L'intégration du métal au sein des protéines est réalisée dans des compartiments cellulaires différents afin d'éviter la compétition entre les métaux. En effet, MncA,

possédant une séquence Tat [126], est déjà repliée avant son exportation dans le périplasma (Figure 20). Les ions  $Mn^{2+}$  sont donc fixés dans le cytoplasme où très peu de cuivre libre circule [127]. Une fois fixés, les ions sont piégés au sein de la protéine qui est ensuite exportée dans le périplasma par le système Tat. La protéine CucA possède une séquence signal de type Sec. Cette protéine est repliée après son exportation dans le périplasma où elle fixe les ions  $Cu^{2+}$ . CucA et MntA peuvent donc coexister dans le périplasma sans interférence entre leur métal à compétitivité différente.



**Figure 20: Localisation du repliement proteique pour la sélection du métal.**

Chez *Synechocystis sp.*, le Cu et le Mn sont fixés respectivement par CucA et MncA afin de réaliser la photosynthèse. CucA est exportée dans le périplasma via le système Sec alors que MncA est exportée dans le périplasma via le système Tat. Le repliement de MncA dans le cytoplasme permet le piégeage du  $Mn^{2+}$ . Au sein du périplasma, CucA fixe les ions  $Cu^{2+}$  après l'exportation de la protéine non repliée par le système Sec. Figure adaptée d'après [92].

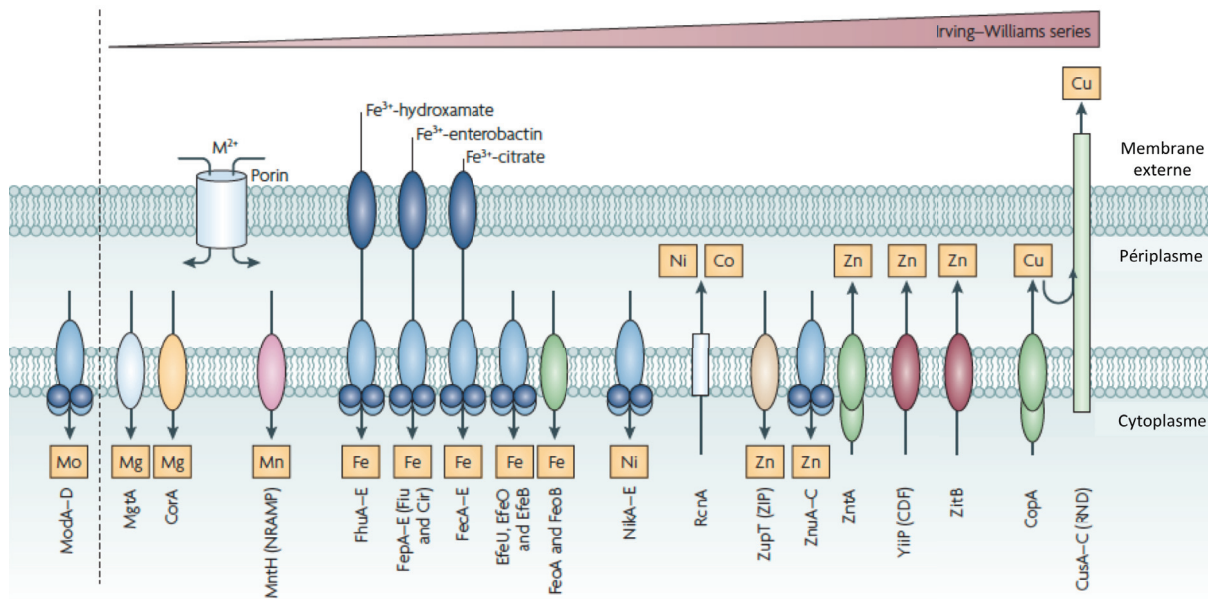
### 2.5.2 Comment trouver l'équilibre ?

Les cellules limitent le nombre d'atomes métalliques dans le cytoplasme de telle sorte que les métaux n'entrent pas en compétition pour les métalloprotéines. La cellule va favoriser la concurrence entre les protéines pour fixer leur cofacteur métallique plutôt que de concentrer les métaux à l'intérieur de la cellule. La bactérie doit alors contrôler la

teneur intracellulaire de chaque métal en régulant finement l'entrée et l'efflux des métaux. Pour cela, la cellule possède de très nombreux transporteurs présentés Figure 21. Chez *E. coli*, le nombre de système d'efflux pour les métaux qui sont à la fin de la série d'Irwing-Williams est plus important que les systèmes d'imports [92].

La transcription des gènes qui codent les transporteurs de métaux est généralement sous le contrôle de senseurs. Plus de sept familles de senseurs métalliques solubles ont été identifiées [128]–[132]. De plus, il existe de multiples systèmes à deux composants impliquant des histidines kinases et des régulateurs de réponses [133]. Ces senseurs conduisent à l'activation ou répression d'un ou plusieurs gènes codant des transporteurs de métaux. L'affinité des senseurs pour les métaux est d'une importance cruciale car elle définit la limite entre l'excès et la carence en métaux. Par exemple, l'affinité de CueR, un senseur du cuivre chez *E. coli*, régulant des systèmes d'efflux du cuivre, a été estimée à  $10^{-21}$  molaire [127].

Les senseurs de métaux régulent le nombre de ligands pour un métal spécifique en plus de contrôler l'accumulation des métaux dans la cellule. Par exemple, certaines espèces de cyanobactéries et de *pseudomonas* expriment des métallothionéines [134], [135] sous le contrôle de capteurs de zinc, tels que SmtB [136] pour lier et séquestrer étroitement les atomes de zinc excédentaires. L'association avec un cofacteur métallique peut aussi permettre le repliement correct de nombreuses enzymes comme le couple manganèse-MncA [137]. Seul le bon métal serait piégé avec un taux d'erreur négligeable. Selon ce scénario, l'excès de métaux compétitifs a le potentiel pour interférer dans le repliement correct des protéines en augmentant le taux de protéines incorrectement repliées.



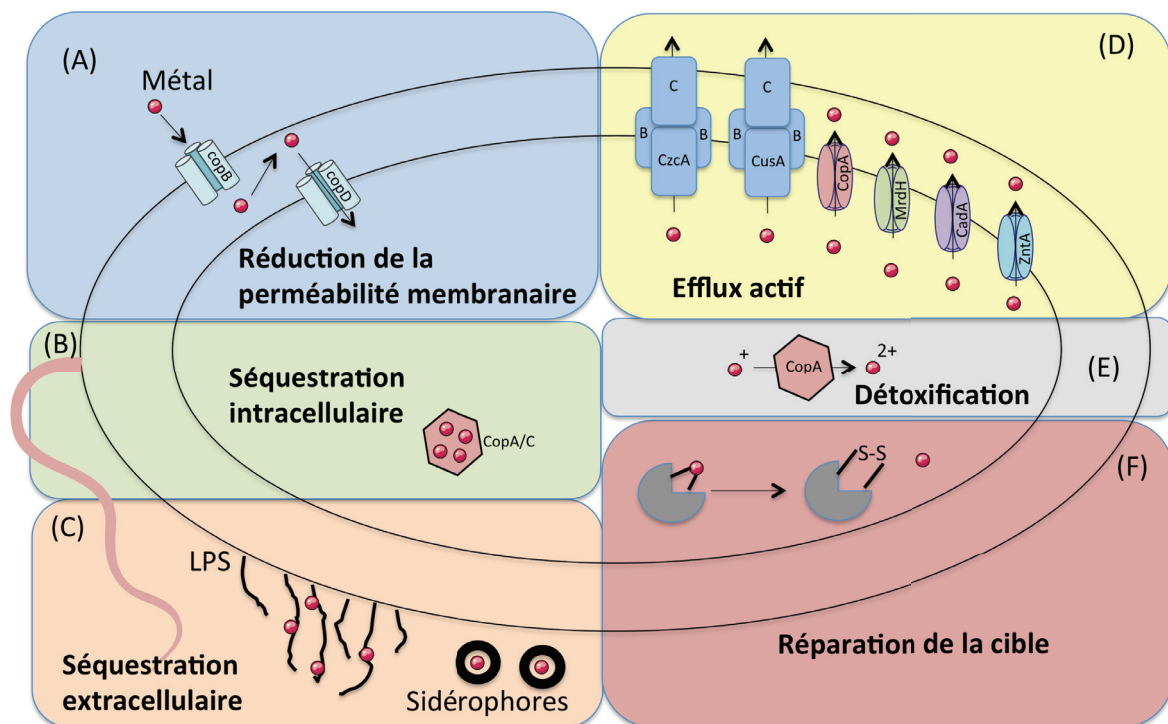
**Figure 21: Les différents systèmes de transport de métaux en fonction de la série d'Irving-Williams chez *E. coli*.**

La quantité de métaux dans la cellule est dépendante de l'import et de l'export de ces ions. Le maintien de la teneur en ions est régulé par des transporteurs de métaux spécifiques d'entrée et d'efflux. Figure de [92].

## 2.6 La résistance aux métaux chez les bactéries dont *Pseudomonas*

Avant de clore ce chapitre concernant le stress métallique, nous allons aborder les mécanismes mis en jeu par les bactéries afin de lutter contre un excès d'ions métalliques qui sont comme nous l'avons montré responsables de nombreux désordres dans la cellule. Les principaux mécanismes de défense sont résumés figure 22 et seront documentés par la suite en prenant l'exemple principal de *Pseudomonas putida* qui a la particularité de survivre dans des environnements contaminés par divers composés tels que des composés aromatiques, des hydrocarbures ou des métaux [138].





**Figure 22: Les principaux mécanismes de résistance aux métaux avec des exemples chez *Pseudomonas*.**

(A) Les micro-organismes peuvent diminuer la perméabilité de leur membrane pour empêcher l'entrée des métaux. La séquestration du métal, intra (B) ou extra cellulaire (C) permet de protéger la cellule contre les métaux. (D) Résistance par transport actif via des pompes à efflux. (E) Enzymes détoxifiantes qui transforment le métal en une forme moins toxique. (F) Réparation des cibles cellulaires sensibles aux métaux. Adaptée de [139].

### 2.6.1 Réduction de la perméabilité membranaire

Afin de protéger le cytosol d'un excès d'ions métalliques, les micro-organismes sont capables d'altérer leur paroi ou leur membrane cellulaire (Figure 22A) [140]. A titre d'exemple, chez *E. coli*, la synthèse de la porine OmpF est diminuée lors d'un stress  $\text{Cd}^{2+}$ . La baisse de production de cette porine diminue ainsi la quantité d'ions  $\text{Cd}^{2+}$  entrant dans la cellule. Chez *Pseudomonas*, la diminution de la synthèse de CopB/D diminue l'entrée d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  au sein de la cellule conduisant à une plus grande résistance à un excès de ce métal.

### 2.6.2 Séquestration des ions métalliques

Les bactéries sont capables de produire des protéines chélatrices spécifiques des métaux afin de réaliser une séquestration intra ou extracellulaire (Figure 22B et C). Les

métaux les plus fréquemment piégés sont le cadmium, le cuivre et le zinc [130]. Les protéines périplasmiques CopA et CopC sont capables de séquestrer onze et un atome de cuivre respectivement chez *Pseudomonas syringae* [141]. Des séquestrations peuvent aussi être mises en place dans le cytosol bactérien par des metallothioneins tel que SmtA chez *Synechecoccus PCC7942* [135], [142]. Des structures d'exopolysaccharides cellulaires sont aussi produites pour absorber et fournir des sites de fixation aux cations métalliques dans le but d'empêcher les interactions des métaux avec les composants cellulaires [143]. Les sidérophores produits par les bactéries peuvent aussi jouer un rôle dans l'homéostasie du métal. Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, la pyoverdine, son sidérophore principal, est capable de chélater de nombreux métaux avec une affinité moindre que pour le fer et protéger ainsi la cellule des effets délétères des métaux [144]. Au contraire, chez *Staphylococcus aureus*, l'affinité de son métallopeptide staphylopine pour le zinc est si forte que cela lui permet de survivre à la carence en zinc imposée par son hôte [145].

### **2.6.3 Système de transport actif**

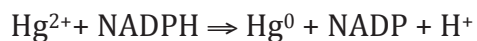
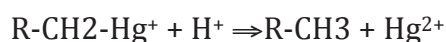
Les métaux, en excès dans l'environnement, peuvent rentrer dans la cellule par des transporteurs spécifiques ou par diffusion facilitée via des porines. Lors d'un excès d'ions métalliques dans le cytoplasme ou le périplasma, les métaux peuvent rapidement être exportés par des systèmes d'efflux ce qui représente les systèmes principaux de résistance aux métaux (Figure 22D). Plusieurs transporteurs sont connus : les pompes à efflux de type RND (resistance nodulation cell division), de type CDF (cation diffusion facilitator), de type MFS (major facilitator superfamily) et les ATPases de type P. Plusieurs de ces transporteurs sont présents chez les bactéries dont *P. aeruginosa* et *P. putida*. [130], [138], [146], [146][147]. De nombreuses pompes d'efflux pour différents métaux ont ainsi été identifiées chez *Pseudomonas*, dont CusA pour l'efflux de  $\text{Cu}^+$ , CnrA/NccA pour l'efflux de  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ , RcnA pour l'efflux de  $\text{Ni}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ , ZitB pour l'efflux de  $\text{Zn}^{2+}$ , ZntA pour l'efflux de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , et CadA et CzcA pour l'efflux respectif de  $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ .

### **2.6.4 Modification enzymatique du métal vers une forme moins toxique**

La détoxification enzymatique correspond à la transformation chimique, par modification de l'état d'oxydo-réduction par exemple, d'un ion métallique toxique en une espèce moins nocive pour la cellule (Figure 22E). L'exemple le plus connu est la



réduction du mercure par les protéines MerB et MerA [140] catalysant les réactions suivante :



Les ions  $\text{Hg}^0$  sont volatils et pourront diffuser à travers les membranes vers le milieu extracellulaire.

D'autres exemples existent, chez *E. coli* on retrouve par exemple l'oxydase périplasmique CueO qui protège la cellule contre la toxicité du cuivre en oxydant les ions  $\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$ , forme moins toxique (ou CopA chez *Pseudomonas* qui joue le même rôle) [148].

#### **2.6.5 Réparation d'une protéine cible**

Les micro-organismes sont aussi capables de s'adapter à la présence du métal toxique en réparant les composants cellulaires ciblés par le métal considéré (Figure 22F) [139]. Certaines protéines, comme les protéines à ponts disulfures dans cet exemple, deviennent non fonctionnelles suite à la fixation d'un métal. Des enzymes ou chaperonnes peuvent alors réparer la protéine endommagée [139].

Tous les mécanismes cités précédemment contribuent à maintenir l'homéostasie métallique dans la cellule, mais ils ne sont cependant pas tous présents chez l'ensemble des organismes.

L'utilisation généralisée de métaux et leur dissémination dans l'environnement peut contribuer à l'adaptation des bactéries, entraînant le développement d'une résistance aux agents antibactériens tels que les antibiotiques [149]. En effet, les mécanismes de résistance peuvent être similaires pour les antibiotiques et les métaux [150]. Chez *Listeria monocytogenes*, la pompe à efflux MdrL permet la résistance simultanée aux antibiotiques de la classe des macrolides, à la cefotaxime ainsi qu'aux métaux tels que le zinc, le cobalt et le chrome [151]. La compréhension des mécanismes de résistance aux métaux est donc importante pour tenter de développer de nouvelles molécules à activité antimicrobienne. Ceci est d'autant plus important du fait de l'utilisation des métaux comme thérapie antimicrobienne dans le secteur de la santé [152]–[154].

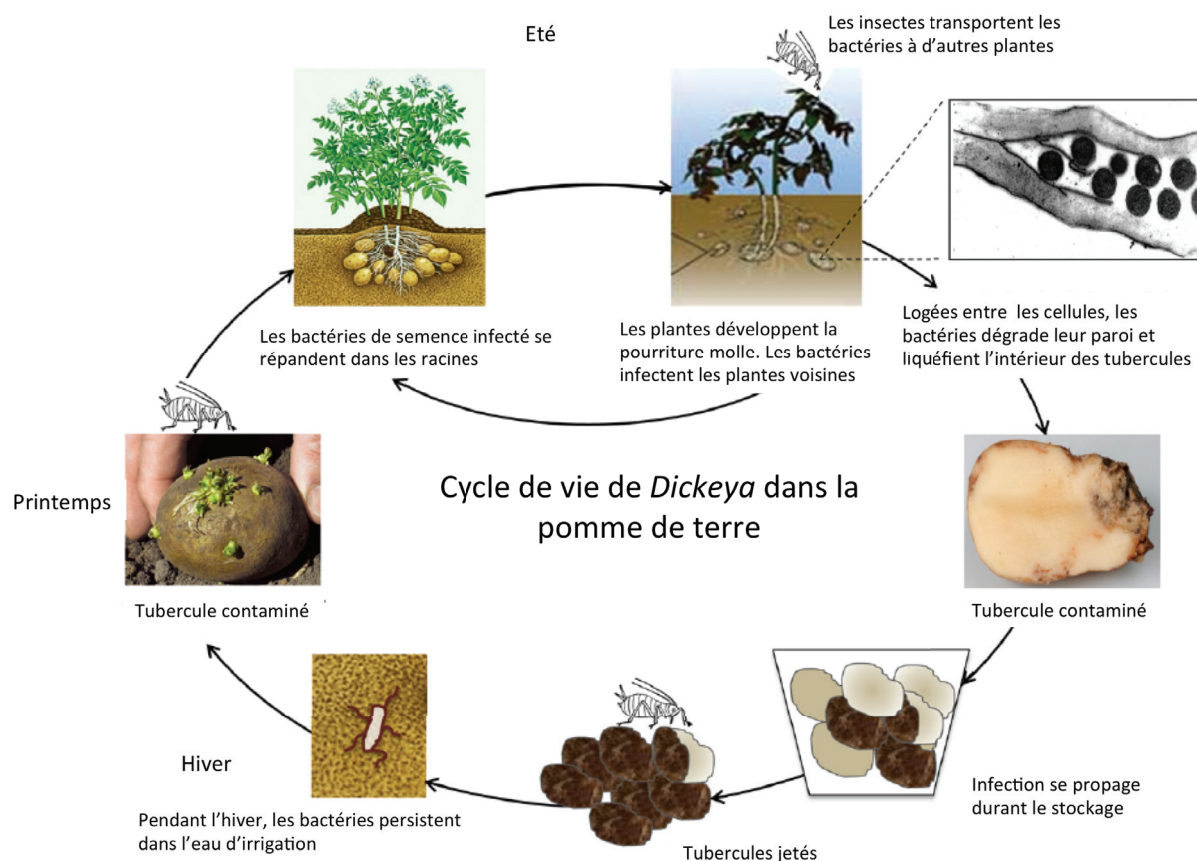
### III. Les stress rencontrés dans la plante par *Dickeya Dadantii* et ses mécanismes de virulence

#### 3.1 Généralité sur *Dickeya*

Les bactéries pathogènes des plantes sont constamment exposées à des conditions environnementales changeantes et sont souvent confrontées à des environnements dangereux. Elles doivent faire face au rayonnement ultraviolet, à la disponibilité faible ou fluctuante de l'eau à la surface de la plante, aux changements de température pendant les saisons, et à la présence de métabolites antimicrobiens d'origine végétale. Elles survivent dans divers environnements non seulement en tant que pathogènes, mais aussi en tant que saprophytes à l'extérieur de leurs hôtes. Les *Dickeya* sont des agents pathogènes nécrotrophiques à Gram négatif qui provoquent la pourriture molle chez de nombreuses plantes, y compris de nombreuses plantes d'importance économique comme la pomme de terre, la tomate et l'endive dans le monde entier [155]. Ils peuvent également infecter la plante modèle *Arabidopsis thaliana* [156]. Ces bactéries ont d'abord été trouvées dans les régions tropicales chaudes. Cependant, ces dernières années, *Dickeya* s'est solidement implanté en Europe (<http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>) où il a causé des dégâts considérables aux cultures de pommes de terre. Par conséquent, *Dickeya* est maintenant considéré comme un pathogène émergent dans les pays européens [157]. *Dickeya* peut rentrer en compétition avec d'autres microbes via des mécanismes d'inhibition de croissance par contact impliquant des systèmes de sécrétion de type V et de type VI [158]. *Dickeya* peut également infecter des insectes, qui peuvent alors servir de vecteurs de dissémination [159].

Les trois principales étapes de l'infection des plantes par *Dickeya* sont : (i) l'adhérence à la surface de la plante et la pénétration dans les tissus végétaux, soit par des blessures, soit par des ouvertures naturelles telles que les stomates; (ii) l'invasion d'apoplastes, ces deux étapes conduisant à la phase asymptomatique de l'infection ; et (iii) la dégradation de la paroi cellulaire végétale (phase symptomatique) par sécrétion de pectinases, cellulases et protéases que l'on regroupe sous le terme de « Plant Cell Wall Degrading Enzyme (CWDE) ». *Dickeya* peut résider dans les espaces intercellulaires végétales

causant une infection latente sans aucun symptôme [156]. Ensuite, si la bactérie rencontre des conditions favorables, telles que des températures douces (30°C), des niveaux d'humidité élevés et une faible disponibilité de l'oxygène, un changement vers un cycle infectieux s'installe. Le cycle de vie de *Dickeya* en cours d'infection est présenté Figure 23.



**Figure 23: cycle de vie de *Dickeya*.**

Durant le cycle infectieux, les insectes peuvent être impliqués dans le développement de la maladie en causant des blessures sur les organes des plantes sur lesquels ils se nourrissent permettant ainsi aux bactéries d'entrer dans la plante. De plus, lorsque les insectes rencontrent une plante infectée, ils récupèrent des bactéries et les transfèrent à d'autres plantes où ils pourraient causer la maladie. Adaptée de [1].

### 3.2 Les mécanismes de résistance à un environnement acide

En phase précoce d'infection de plante, *D. dadantii* colonise le liquide intercellulaire, dont le pH se situe entre 5,0 et 6,5 [160]. C'est le début d'une phase sans symptôme (Figure 24). A la fin du cycle infectieux, les bactéries induisent une lyse cellulaire, ce qui

entraîne une variation du pH de l'environnement intercellulaire. En conséquence, il a été démontré que le pH des tissus végétaux varie d'un pH acide à basique pendant l'infection par *D. dadantii* [161] (Figure 24). Pour faire face à l'environnement acide de l'apoplaste végétal, *D. dadantii* induit la production d'acide indole-3-acétique (IAA) [162], connu pour stimuler l'adaptation bactérienne au stress, comme l'irradiation UV ou la modification de la salinité et de l'acidité, améliorant ainsi la survie et la persistance dans l'environnement végétal [163]. De plus, il a été démontré que cette auxine favorise l'ouverture des stomates, ce qui favorise la progression de la maladie [164], [165]. *D. dadantii* utilise la voie de décarboxylation de l'oxalate *oxlT-oxdD* pour éliminer les protons du cytoplasme. La bactérie utilise aussi des hydrogénases, qui génèrent de l' $H_2$  à partir des protons libres du cytoplasme [162].

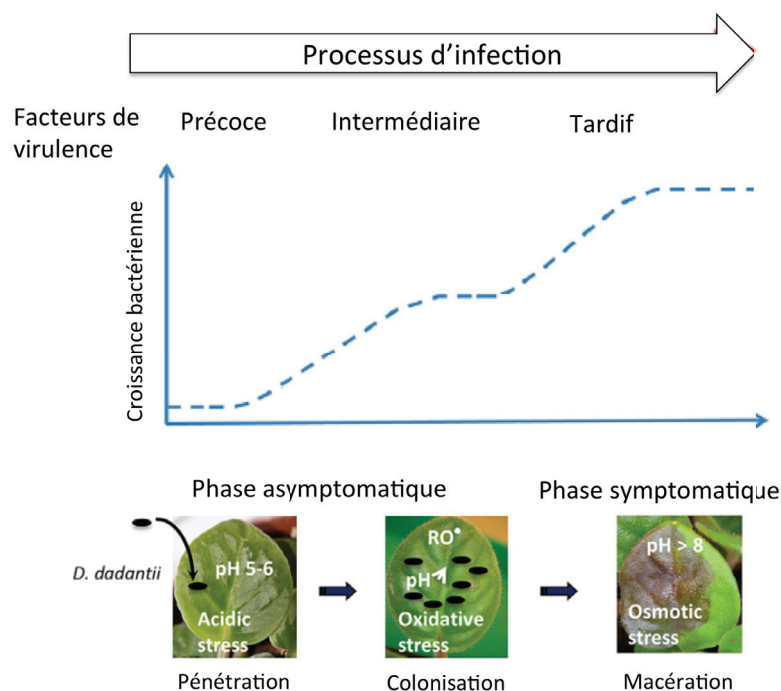
Comme deuxième stratégie, *Dickeya* module les activités des transporteurs de protons en régulant positivement les transporteurs qui évacuent les protons et négativement les transporteurs responsables de leur entrée. La réponse au niveau transcriptionnel de *D. dadantii* au stress acide comprend également le remodelage de l'enveloppe avec des modifications du lipopolysaccharide (LPS) neutralisant la charge négative du lipide A, diminuant l'interaction entre les composants chargés positivement et la surface bactérienne et en changeant la composition en phospholipides de la membrane interne [166]. Toutes ces modifications simultanées modulent les propriétés de perméabilité de l'enveloppe cellulaire en facilitant l'adaptation bactérienne au stress acide.

Ce stress induit l'expression de gènes codant pour des systèmes à deux composants (TCS) responsables de la modification de l'enveloppe cellulaire, tels que PhoP-PhoQ, EnvZ-OmpR et PmrA-PmrB [162]. Il est important de noter que le système PhoP-PhoQ de *D. dadantii* est à la fois impliqué dans la survie au pH acide et régule aussi plusieurs déterminants de la virulence, dont certaines enzymes pectinolytiques et les processus métaboliques liés au fer [167]–[169]. En ce qui concerne le système EnvZ-OmpR, son rôle dans la virulence n'a pas encore été établi, mais une étude récente a révélé que le système EnvZ-OmpR est impliqué dans la survie à faible pH [162] et contrôle également l'expression alternative des deux porines à oligogalacturonide (oligosaccharide formé pendant la dégradation de la pectine) de *D. dadantii*, KdgM et KdgN [45]. Chez *Pectobacterium carotovorum*, le système à deux composants PmrB-PmrA est également impliqué dans la régulation de la virulence [170]. En effet, la délétion de *pmrB* a entraîné une diminution de la production des enzymes dégradant les parois cellulaires des

plantes et une réduction concomitante de la virulence chez la pomme de terre et chez *Arabidopsis*. Le rôle de PmrB n'a pas été étudié chez *Dickeya* mais les résultats obtenus chez *Pectobacterium* pourraient probablement être extrapolés à *Dickeya*. Enfin, la virulence des mutants PhoP-PhoQ et PmrA-PmrB de *D. dadantii* est grandement affectée [171].

### **3.3 Les mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens**

Les mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens jouent un rôle clé pendant l'infection. Ces mécanismes comprennent la dégradation protéolytique des peptides antimicrobiens, l'extrusion de ces composés par des systèmes d'efflux ou la modification de la cible antimicrobienne (l'enveloppe cellulaire microbienne). En effet, les mutants du système de transport Sap, qui retire les peptides antimicrobiens de la membrane et les dirige vers les voies de dégradation, sont fortement affectés dans la virulence [171]. De même, les mutants des gènes *ybjX* et *arnT*, qui sont liés à la modification du LPS, présentent une virulence atténuée chez divers hôtes végétaux et une résistance diminuée aux thionines et à la snakine-2, deux peptides antimicrobiens d'origine végétale [172][173]. Les systèmes PhoP-PhoQ et PmrA-PmrB, préalablement introduits, ainsi que CpxAR, sont également impliqués dans la sensibilité aux peptides antimicrobiens des plantes [174],[170], [172]. La production de ces derniers contribue à l'immunité des plantes.



**Figure 24: Processus d'infection de *D. dadantii*.**

Processus d'infection par *D. dadantii*. Le programme de pathogénicité de *Dickeya* comprend des phases asymptomatiques et symptomatiques. Dans la phase asymptomatique pendant la pénétration et la colonisation de la plante, les bactéries subissent un stress acide et oxydatif. Pendant la phase symptomatique, les bactéries subissent un stress osmotique. Dans les tissus macérés, les bactéries se multiplient davantage. Adaptée d'après [175].

### 3.4 Adaptation aux conditions d'anaérobiose dans les tissus de la plante

Dans les tissus végétaux, la disponibilité en oxygène est supposée faible. Cette faible disponibilité est l'un des facteurs clés dans le développement de la pourriture molle. En effet, la synthèse de pectate lyase est induite dans des conditions anaérobies [176]. Une analyse du transcriptome a révélé que plus de 7 % des gènes de ce phytopathogène sont exprimés de façon différentielle dans des conditions anaérobies [177]. La détection de l'anaérobiose est réalisée par FNR, un facteur de transcription, et deux systèmes à deux composants, NarXL et ArcAB [177][173]. FNR est un régulateur transcriptionnel contenant un cluster fer soufre qui se dimérise en l'absence d'O<sub>2</sub>. NarXL est responsable de l'activation des gènes impliqués dans le catabolisme du nitrate/nitrite en condition d'anaérobiose. Le système ArcAB détecte l'état d'oxydation des ubiquinones de la chaîne respiratoire et en condition d'anaérobiose, réprime les gènes nécessaires au

métabolisme aérobie. Contre intuitivement, chez *D. dadantii*, les gènes *ahpC*, *sodC* et *dps* impliqués dans la lutte contre le stress oxydatif sont régulés positivement dans des conditions d'anaérobiose. Babujee et al. [177] ont proposé que la croissance prolongée dans un environnement limité en O<sub>2</sub> mime la situation vécue par les bactéries provoquant la pourriture molle avant de rencontrer le « burst » oxydatif produit par l'hôte. Ceci suggère que *D. dadantii* est capable d'anticiper l'environnement oxydatif induit par l'hôte avant son apparition, afin d'augmenter les chances de survie dans la plante.

### **3.5 Adaptation aux dérivés réactifs de l'oxygène produit par la plante en cours d'infection**

Les réponses de défense des plantes à l'infection par *D. dadantii* ont été analysées dans le modèle *Arabidopsis* par Fagard et al. [178]. L'infection était accompagnée d'une production de ROS principalement réalisée par l'action de la NADPH oxydase AtrbohD avant l'apparition des symptômes (Figure 24), suivie d'une accumulation dans la structure de la paroi cellulaire de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) et de callose, un  $\beta$ -1,3-glucane qui agit comme une barrière physique supplémentaire [178]. Ces observations suggèrent que l'hôte perçoit la bactérie en tant qu'intrus et initie des réponses immunitaires (Figure 25). Par conséquent, les activités de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et des voies de signalisation de l'éthylène impliquées dans le réseau de réponse immunitaire de la plante sont induites [178]. Pour échapper à la réaction de défense de la plante, *D. dadantii* produit des antioxydants essentiels à sa virulence. Par exemple, les mutants de *D. dadantii* altérés dans les systèmes de réparation des dommages par oxydation des protéines (*mrsA* et *sufABCDSE*), ou dans la superoxyde dismutase de manganèse MnSOD (*sodA*), sont incapables de provoquer une invasion systémique chez *S. ionantha* [54], [179], [180]. De plus, l'analyse du transcriptome a révélé qu'en réponse au traitement par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Dickeya* induit la production d'enzymes antioxydantes telles que les catalases (KatG, KatE) et la peroxydase AhpCF, alors que le gène *ychF* codant une protéine inhibitrice de catalase est régulé négativement [166]. Il est intéressant de noter que, parmi les deux superoxydes dismutases SodA et SodC présentes chez *D. dadantii*, seul *sodC* est modérément, mais significativement induit par le stress oxydatif [162]. Cela pourrait être lié à



l'absence d'orthologues de *soxRS* chez *D. dadantii*. *D. dadantii* synthétise le pigment bleu indigoidine (gènes *indA*, *indB* et *indC*) conférant une résistance accrue au stress oxydatif [181](Figure 25). De plus, la production de glutathion, de la glutaredoxine et de la thiorédoxine (contrôlé par les gènes *gshB*, *gor*, *grxA*, *trxC*, *trxB*, *gstB*, *ABF-0020419*) qui réduisent la formation de liaisons disulfures et contrecarrent l'oxydation des protéines cytoplasmiques, est augmentée. Le glutathion en particulier agit comme cofacteur de la peroxydase en donnant les électrons nécessaires à la décomposition de l'  $H_2O_2$ . De plus, le système Suf, qui est impliqué dans la réparation des protéines à clusters Fe/S endommagées, est induit tandis que les gènes *rsxABCDE* impliqués dans la réduction des clusters fer-soufre sont régulés négativement [166]. La plupart des gènes codant les protéines de chimiotactisme sont également régulés positivement, probablement pour permettre aux bactéries d'échapper à des environnements hostiles et favoriser une invasion plus poussée. Enfin, le système à deux composants CpxAR est également impliqué dans la protection de *D. dadantii* contre le stress oxydatif [174].

A ce stade, il existe deux scénarios possibles : soit (1) les réactions de défense des plantes sont suffisamment fortes pour arrêter la progression bactérienne conduisant à l'arrêt de l'infection, soit (2) les bactéries s'adaptent au stress oxydatif, se déplacent dans les tissus voisins et continuent de croître jusqu'à ce qu'une certaine densité bactérienne soit atteinte activant le quorum sensing, ce qui déclenche la synthèse de CWDE [156]. Dans ce dernier cas, il y a macération des tissus végétaux et lyse cellulaire et, par conséquent, la libération de contenu vacuolaire dans l'apoplaste crée des conditions de choc osmotique pour les bactéries, c'est la phase symptomatique (Figure 24).

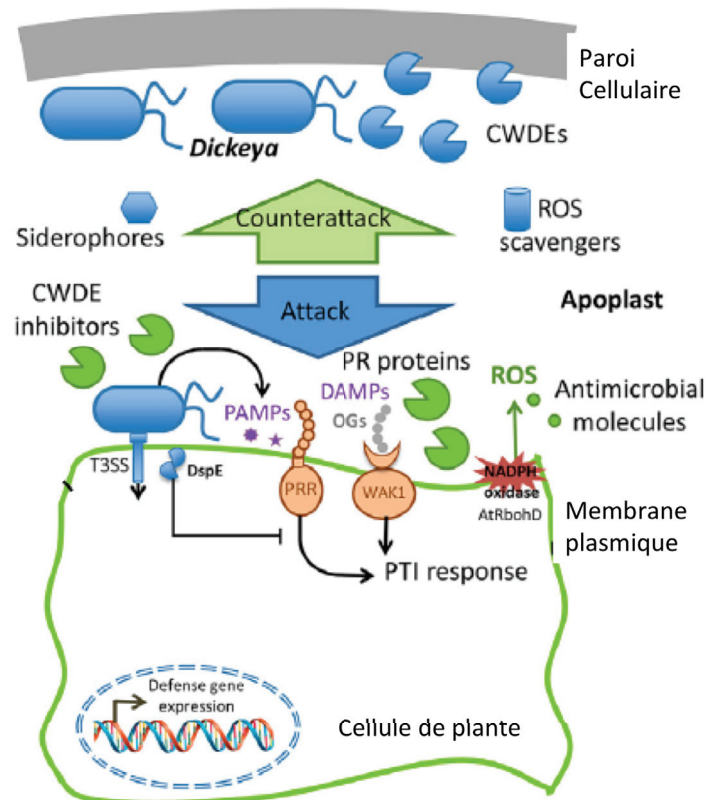
### 3.6 Adaptation au stress osmotique

Pour faire face au choc osmotique pendant l'infection en phase tardive (Figure 24), *D. dadantii* induit deux lignes de réponses. La première réponse implique l'absorption de potassium, alors que la seconde consiste en l'absorption d'osmoprotecteurs tels que la proline, la triméthylammonium glycine bêtaïne, la choline, la tétrahydropyrimidine ectoine et le pipicolate présents dans l'environnement, et la synthèse de grandes quantités de solutés compatibles pour éviter une augmentation délétère de la



concentration en ion et maintenir l'électroneutralité du cytoplasme. *Dickeya* est capable d'absorber tous les osmoprotecteurs [32] susmentionnés via deux transporteurs : OusA, homologue de ProP chez *E. coli*, responsable de l'absorption de glycine bêtaïne, proline, ectoine et acide pipécolique [182] et OusB, homologue de ProU de *E. coli* et responsable de l'absorption de la glycine bêtaïne seulement [183]. La synthèse de la glycine bêtaïne à partir de la choline est possible chez *D. dadantii* car elle possède deux gènes nécessaires à l'oxydation de la choline (*betB* et *betA*). L'accumulation de ces osmoprotecteurs réduit la production de pectate lyases [32]. Ainsi, un mutant d'*ousA* augmentent fortement la virulence de *D. dadantii* [184]. En l'absence d'osmoprotecteurs dans l'environnement, *D. dadantii* favorise l'accumulation de glutamine, de glutamate et d' $\alpha$ -glucosylglycérate, un osmolyte ionique également présent chez certains archées halophiles [185]. Durant un stress osmotique chez *D. dadantii*, la transcription de l'opéron *pggS-pggP* impliqué dans la biosynthèse des  $\alpha$  glucosylglycérate et de l'opéron *betABI* permettant la synthèse de la glycine bêtaïne à partir de la choline s'est révélée être augmentée [166].

En plus de l'afflux de  $K^+$ , une salinité élevée induit les gènes codant les transporteurs NhaA et YrbG, qui servent principalement à l'efflux d'ions sodium. L'extrusion d'ions sodium est cruciale pour permettre un métabolisme cellulaire normal, car des concentrations cytosoliques élevées de  $Na^+$  sont toxiques pour l'activité de nombreuses enzymes. L'expression accrue du facteur anti- $\sigma$  *rsd* observée dans les mêmes conditions faciliterait la concurrence de RpoH et de RpoE avec le facteur sigma RpoD pour l'ARN polymérase. Par conséquent, le stress osmotique a induit les gènes des chaperonnes de choc thermique et des protéines de repliement ainsi qu'un grand nombre de gènes codant les protéines liées à l'intégrité de l'enveloppe cellulaire, y compris les systèmes à deux composants *cpxR-cpxA*, *envZ-ompR* et *rscF* appartenant au phosphorelay RcsBCD. L'augmentation de l'osmolarité est l'un des principaux stimuli détectés par le système RcsBCD-RcsF, qui est responsable de l'accumulation d'exopolysaccharides pour protéger les cellules de la dessiccation et de l'inhibition de la motilité en réprimant directement le régulateur principal de la transcription du gène flagellaire *flhDC* [186], [187]. Ceci est en accord avec le fait que la mobilité bactérienne n'est pas nécessaire au stade tardif d'infection, où les bactéries dégradent massivement la pectine. A ce stade, les cellules cessent également de produire le signal de quorum sensing Vfm.



**Figure 25: Schéma bilan de la pathogénicité de *D. dadantii* chez la plante.**

Les bactéries se propagent dans les espaces extracellulaires des tissus végétaux. Les molécules libérées par les bactéries (PAMP ou « motifs moléculaires associés à des pathogènes ») dans l'apoplaste et les oligogalacturonides (DAMP ou « motifs moléculaires associés aux dommages ») résultant du clivage de la pectine par les pectinases bactériennes sont reconnues, respectivement, par les récepteurs végétaux (PRR) et par la kinase associée à la paroi (WAK1) conduisant à une induction de l'immunité activée par PAMP/DAMP (PTI). La plante produit des ROS, des molécules antimicrobiennes et des protéines liées à la pathogénèse (PR), dont certaines sont des inhibiteurs des CWDE. Pour faire face aux ROS, les bactéries produisent l'indigoidine ROS scavenger. *Dickeya* délivre l'effecteur DspE dans la cellule hôte par le T3SS. DspE est censé inhiber les PTI et faciliter la propagation bactérienne dans la plante. A l'intérieur de l'apoplaste, *D. dadantii* produit des sidérophores, ce qui permet à la bactérie de faire face à la biodisponibilité restreinte du fer dans la plante. OGs : oligogalacturonides. Adapté d'après [175].

## 3.7 Résumé des mécanismes de virulence et de sa régulation

### 3.7.1 Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire végétale est un maillage complexe et dynamique de polymères (cellulose, hémicellulose, pectine) et représente une barrière que *Dickeya* doit franchir pour coloniser le tissu végétal. Par conséquent, la virulence de *Dickeya* est corrélée à sa capacité à synthétiser et à sécréter des enzymes dégradant la paroi cellulaire des plantes (CWDE), dont un ensemble complet de pectinases [188], une glucuronoxylanase XynA [189], une endogalactanase périplasmique GanA [190], une cellulase CelZ [191] et quatre protéases PrtA, PrtB, PrtC, PrtC, PrtG [192]. Les pectinases et la cellulase sont sécrétées par le système de sécrétion de type-II [193] tandis que les protéases sont sécrétées par le système de sécrétion PrtDEF de type-I (SST1) [194]. La mutation du système de sécrétion de type-II (SST2) inhibe la macération des tissus végétaux tandis que les mutants dans le SST1 PrtDEF sont retardés dans la progression des symptômes, ce qui illustre l'importance des CWDE dans la pathogenèse des plantes [195], [196].

Le génome de *D. dadantii* contient vingt et un gènes codant des pectinases dont neuf endopectates lyases (PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL, PelN, PelZ) qui clivent la pectine et nécessitant un cation divalent comme cofacteur, deux exopectate lyases (PelX et PelW), cinq polygalacturonases qui clivent la pectine par un mécanisme d'hydrolyse classique (PehV, PehW, PehX, PehK, PehN), une rhamnogalacturonate lyase RhiE capable de couper les chaînes rhamnogalacturonane [197], deux méthylesterases de pectine (PemA, PemB), deux acétylsterases de pectine (PaeX, PaeY) et deux feruloyl estérases (FaeD, FaeT) [198].

Les oligogalacturonides (OG) libérés lors de dégradation de la pectine activent les défenses végétales qui limitent l'invasion et la colonisation [199]. Ces molécules végétales endogènes libérées lors d'une attaque pathogène sont désignées comme des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) (Figure 25).

WAK1 agit en tant que récepteur des OGs et active l'immunité innée de la plante [200]. Par conséquent, lorsque les pathogènes commencent à dégrader les composants de la paroi cellulaire de la plante, les plantes sont capables de percevoir la perte d'intégrité de la paroi et d'activer par la suite les voies de signalisation de défense [201]. Ainsi, pour une stratégie de pathogenèse efficace, il est crucial de prévenir la production de

pectinases au stade initial de l'infection afin d'éviter la libération de composants de la paroi cellulaire qui seront détectés comme des signaux de dommage par la plante.

PelA, PelD et PelE sont parmi les Pels les plus importants pour infecter *Saintpaulia* [202]. Cependant, la contribution de chaque Pel de façon individuelle dans la virulence dépend des plantes-hôtes. Par exemple, sur le pois, seul un mutant de *pelA* présentait une virulence réduite [166]. Par conséquent, la multiplicité des pectinases reflète probablement l'adaptation évolutive de la bactérie à coloniser une large gamme d'hôtes. La plupart des gènes produisant des pectinases sont fortement induits par la pectine pendant la phase stationnaire de croissance, à l'exception de *pelL*, *pelN* et *pehV*, qui peuvent agir plus spécifiquement sur d'autres glycanes [162]. La plupart des gènes codant pour les pectates lyases sont réprimés sous stress acide, conformément à leur activité optimale à pH alcalin (pH 8,0-9,5) [188] et à leur besoin au stade tardif de l'infection, lorsque le pH est légèrement basique [162]. Une exception est le gène *pelA*, qui est induit sous stress acide [161].

Contrairement aux pectinases dont l'expression est diminuée à pH acide caractéristique des premiers stades de l'infection, les gènes des polygalacturonases PehV, W, X sont régulés positivement à pH acide [162], pH optimal à leur activité [203]. En effet, la délétion du cluster *pehVWX* affecte seulement l'initiation de la dégradation des pectines [204].

La baisse d'expression de la plupart des gènes codant les enzymes de dégradation des parois cellulaires végétales au stade précoce de l'infection est de prévenir la détection précoce des produits de dégradation des plantes par l'hôte, en particulier les oligogalacturonides, qui révéleraient la présence du pathogène avant qu'il n'atteigne une densité de population appropriée pour une infection réussie [205]. Ainsi, l'expression des enzymes dégradant les parois cellulaires végétales, ainsi que l'expression de l'opéron codant pour le transporteur d'oligogalacturonide (*togMNAB*) est diminuée sous stress acide, de sorte que l'inducteur intracellulaire des gènes *pel*, le 2-céto-désoxy-gluconate (KDG), ne soit pas présent dans le cytoplasme [166].

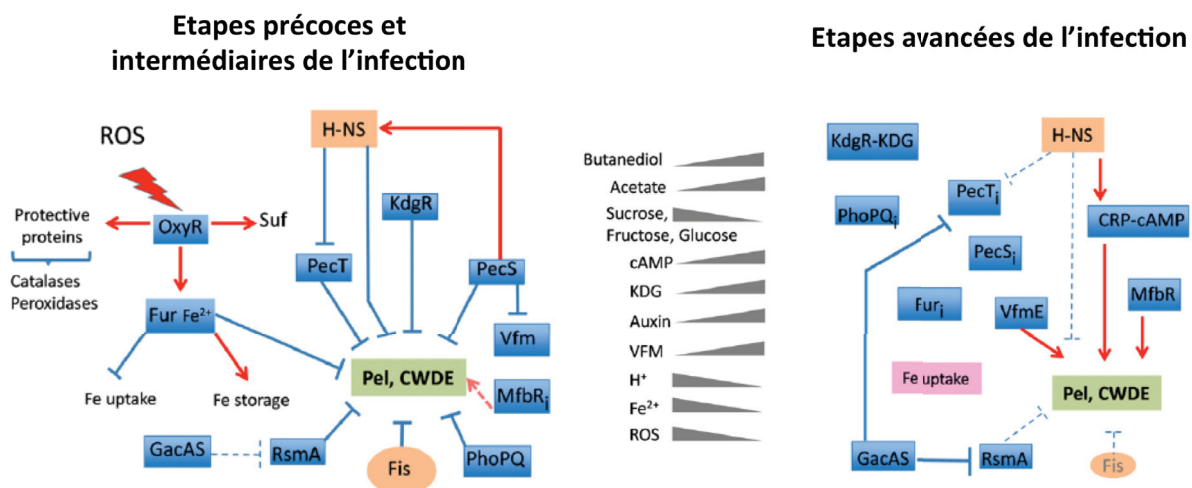
Comme les gènes *pel*, les gènes *gan* nécessaires à la dégradation de la galactane sont réprimés sous stress acide au début de l'infection, ce qui suggère que la pectine doit probablement être clivée en fragments plus petits au stade plus avancé de l'infection, avant que les enzymes Gan puissent dégrader les ramifications du galactane.

Enfin, la plupart des gènes codant les enzymes de dégradation de la paroi des cellules végétales, y compris ceux des protéases PrtABCG, cellulase CelZ et glucuronoxylanase XynA sont induits en phase stationnaire (correspondant au stade tardif de l'infection). De plus, tous ces gènes sont soumis au contrôle du quorum sensing [206].

### **3.7.2 Régulation de la production des CWDE de *D. dadantii* durant l'infection**

Les systèmes d'attaque du pathogène nécessitent d'être finement régulés afin de ne pas activer les défenses de la plante trop tôt dans le cycle infectieux ce qui pourrait conduire à une infection abortive. Pour cela plusieurs régulateurs contrôlent la production des pectinases, enzymes clés lors de la dernière étape d'infection de plantes. Plusieurs protéines associées au nucléoïde jouent un rôle : Fis et H-NS sont principalement synthétisées pendant la phase de croissance exponentielle et jouent un rôle de régulateur négatif sur l'activité Pel et des CWDE au stade précoce et intermédiaire d'infection [207][208] (Figure 26). D'autres régulateurs, tels que KdgR, PecS et PecT répriment également les gènes *pel* durant le processus d'infection initial [196], [209]. Le système PhoQ-PhoP, qui pour rappel détecte le pH acide, réprime certains gènes pectinolytiques alors que le régulateur MfbR est sous sa conformation inactive en condition acide et ne peut pas induire la production des CWDEs [210](Figure 26). La solubilité du fer augmente à faible pH et le complexe Fur-Fe<sup>2+</sup> réprime à la fois les gènes *pel* et les gènes impliqués dans l'absorption du fer. Pendant cette phase d'adaptation, le système à deux composants GacAS est inactif en raison de la faible concentration en acétate et en composés phénoliques végétaux [156]. Par conséquent, le niveau de RsmA est élevé et inhibe la production des CWDE (Figure 26). En cours d'infection, les bactéries se multiplieront en catabolisant le saccharose, le glucose et le fructose qui sont les principaux glucides présents dans l'apoplaste. Progressivement, le catabolisme de ces sucres entraîne une accumulation d'acétate. L'augmentation de la concentration d'acétate est détectée par le système GacAS, qui à son tour réprime à la fois *rsmA* et *pecT* et lève l'inhibition sur les CWDE [156]. Pour limiter la production d'acide, *D. dadantii* utilise la production de butanediol qui conduit à l'alcalinisation du milieu [211]. L'alcalinisation des tissus végétaux favorise l'inactivation de PhoP-PhoQ et l'activation de MfbR, ce qui déclenche la production des CWDE. Dans le même temps, la solubilité du fer diminue et Fur est inactivée. Progressivement, les signaux AMPc, auxine et VFM produits par les bactéries s'accumulent et conduisent aussi à l'activation des CWDE

[212](Figure 26). Il en résulte une dégradation efficace de la pectine avec production concomitante de KDG, qui est l'inducteur intracellulaire inactivant le répresseur KdgR. De plus, la concentration de Fis diminue. Tous ces événements se traduisent par une production massive et soudaine de CWDE permettant une macération végétale au bon moment du cycle infectieux.



**Figure 26: Schéma des principaux régulateurs de *D. dadantii* pendant la pathogenèse.**

Les flèches et les barres indiquent respectivement l'activation et la répression de l'expression génique. Des changements dans la concentration de diverses molécules au cours de la pathogenèse sont indiqués. Ces molécules ont un impact sur l'activité des régulateurs mentionnés ou sur la croissance de *D. dadantii*. Adapté d'après [206]

### 3.7.3 La virulence ne se limite pas aux CWDE

En plus des CWDE, *Dickeya* utilise des systèmes de sécrétion pour coloniser les tissus végétaux et améliorer la progression de la maladie. L'analyse de son sécrétome a révélé que la sécrétion des protéines telles que AvrL/M (protéines d'avirulence) et IbpS/IbpP est réalisée par le système de sécrétion de type II [213].

Pour faire face aux attaques microbiennes, les plantes ont développé un réseau sophistiqué de réponses, y compris un afflux rapide d'ions calcium, une explosion d'espèces réactives d'oxygène, l'activation des cascades de signalisation MAPK entraînant l'induction de gènes liés à la défense, le renforcement des parois cellulaires par dépôt de callose, et souvent la mort cellulaire localisée [214], [215]. L'immunité innée des plantes est activée par la perception de PAMP tels que la flagelline, le



lipopolysaccharide, le peptidoglycane, qui sont reconnus par des récepteurs transmembranaires (PRR) provoquant une réponse de résistance basale appelée immunité déclenchée par les PAMPs (PTI) [216] (Figure 25). Pour contrer les défenses basales des plantes, les bactéries pathogènes à Gram-négatif délivrent des protéines effectrices de virulence directement dans les cellules hôtes par l'intermédiaire du système de sécrétion de type III (SST3). Ces effecteurs suppriment la réponse immunitaire de la plante et favorisent la pathogenèse.

Contrairement à *P. syringae* ou *Xanthomonas campestris*, qui sécrètent de multiples effecteurs via le SST3 [217], un seul effecteur, DspE, a été identifié dans le génome de *D. dadantii* aux côtés des deux protéines HrpN et HrpW [218]. Ces protéines sont sécrétées par le SST3 mais sont ciblées sur l'espace extracellulaire des tissus végétaux, contrairement à la protéine effectrice DspE qui agit à l'intérieur des cellules végétales. HrpN et HrpW sont considérées comme des protéines facilitant l'injection de l'effecteur DspE dans les cellules végétales [219]. Ces dernières pourraient aussi former des pores membranaires favorisant le dysfonctionnement cellulaire et la mort.

#### **3.7.4 Importance du fer dans l'infection**

*D. dadantii* produit deux sidérophores, l'hydroxycarboxylate achromobactine, qui est produite lorsque le fer devient limitant [220], et le catécholate chrysobactine [221], qui prévaut en cas de carence sévère en fer [222]. Ces sidérophores sont nécessaires à la progression systémique des symptômes de macération chez les hôtes (Figure 25). En plus de son rôle nutritionnel, la chrysobactine semble être impliquée dans la manipulation du système de défense des plantes [117], [223]. En effet, l'infiltration des feuilles d'*Arabidopsis* avec la chrysobactine provoque l'activation des voies de défense des plantes [223]. Une telle activation ne se produit pas lorsque la chrysobactine est chargée en fer avant le traitement des feuilles. Par conséquent, l'activation de l'immunité des plantes dépend de l'activité de piégeage du fer du sidérophore. L'infiltration de chrysobactine dans les feuilles d'*Arabidopsis* entraîne une modification de la localisation du fer dans les tissus végétaux avec accumulation de fer dans la paroi des cellules végétales et son épuisement aux alentours [224].

Récemment, Aznar et al. [225] ont montré que la progression de *D. dadantii* dans les tissus foliaires entraîne une perte de fer des parois cellulaires des plantes et des compartiments cellulaires tels que les chloroplastes qui contiennent normalement de

grandes quantités de fer. La perte de fer des parois cellulaires coïncide avec la dégradation des parois cellulaires par les pectinases, alors que dans les tissus macérés, les bactéries sont chargées en fer, ce qui suggère qu'elles bénéficient de la libération d'une quantité élevée de ce métal utilisé pour la croissance. D'un autre côté, la libération de fer libre dans l'espace intercellulaire amplifie le stress oxydatif généré par le mécanisme de défense de l'hôte par la réaction de Fenton, produisant le radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  hautement toxique et réactif (voir partie 1.3). Les sidérophores bactériens peuvent interférer avec cette réaction en séquestrant le  $\text{Fe (III)}$ . Par conséquent, pour les bactéries, il est d'une importance cruciale d'être équipées de piègeurs de fer puissants pendant la progression dans les tissus de l'hôte pour faire face à l'excès de fer libre libéré par les cellules hôtes (Figure 25). *D. dadantii* produit plusieurs protéines de stockage du fer, FntA, Bfr et Dps, qui contribuent à sa virulence, soulignant l'importance d'un contrôle parfait de l'homéostasie du fer pendant l'infection [226]. Le fer joue également un rôle important en tant que signal régulateur de la pathogénicité de *Dickeya* via le répresseur Fur. En effet, non seulement Fur réprime les gènes impliqués dans le métabolisme du fer en utilisant les ions ferreux comme cofacteur, mais elle agit aussi comme répresseur des gènes de pectinases.

En résumé, pendant la phase précoce de l'infection, les tissus végétaux sont intacts, très peu de fer est disponible, les bactéries sécrètent des sidérophores et une faible quantité de pectinases. Les pectinases sécrétées sont inactives sous le pH acide de l'apoplaste, mais pendant l'interaction bactéries/plante, le pH augmente graduellement [161], [211], ce qui entraîne la dégradation de la pectine par Pels et la libération de fer libre dans l'espace intercellulaire. Il en résulte une répression des gènes de pectinases et de sidérophores par Fur dans les tissus macérés. Les bactéries se multiplieraient principalement dans les tissus macérés mais elles coloniseraient également les tissus végétaux intacts environnants où elles seraient de nouveau confrontées à une carence en fer. Une nouvelle série de production de pectinases et de sidérophores serait alors relancée jusqu'à ce que le fer soit libéré en raison de la dégradation de la pectine. Ces cycles successifs de production de Pel et de sidérophores sont pleinement compatibles avec la cinétique de l'expression des gènes de la pectinase et de la chrysobactine observée dans la plante [227], [228]. Un schéma bilan est présenté Figure 25.



## IV. Le Tn-seq comme moyen d'étude de la réponse au stress chez *P. putida* et *D. dadantii*

### 4.1 Principe de la méthode

#### 4.1.1 Historique

Au milieu des années 1970, les chercheurs ont commencé à utiliser les transposons comme outils " pour manipuler les gènes des bactéries, des phages et des plasmides " [229]. Les transposons ont été découverts à l'origine comme "des éléments de contrôle" chez le maïs par Barbara McClintock et ont été retrouvés depuis dans chaque branche du vivant [230]. Les transposons sont des éléments génétiques qui peuvent se déplacer à l'intérieur des génomes par des mécanismes de réplication dit « copier-coller » ou « couper-coller » grâce à une enzyme appelée la transposase. Cette enzyme reconnaît les séquences inversées répétées aux extrémités du transposon et reconnaît également une séquence cible, dans laquelle elle crée une coupure double brin et insère le transposon [231]. Ces transposons jouent un rôle important, notamment dans l'évolution de la spéciation et dans la résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes [230], [232]. L'application la plus fréquemment utilisée des transposons a été la mutagenèse insertionnelle, dans laquelle une librairie de souches bactériennes mutantes, où chaque mutant contient un seul transposon situé à une position aléatoire dans le génome, est construite.

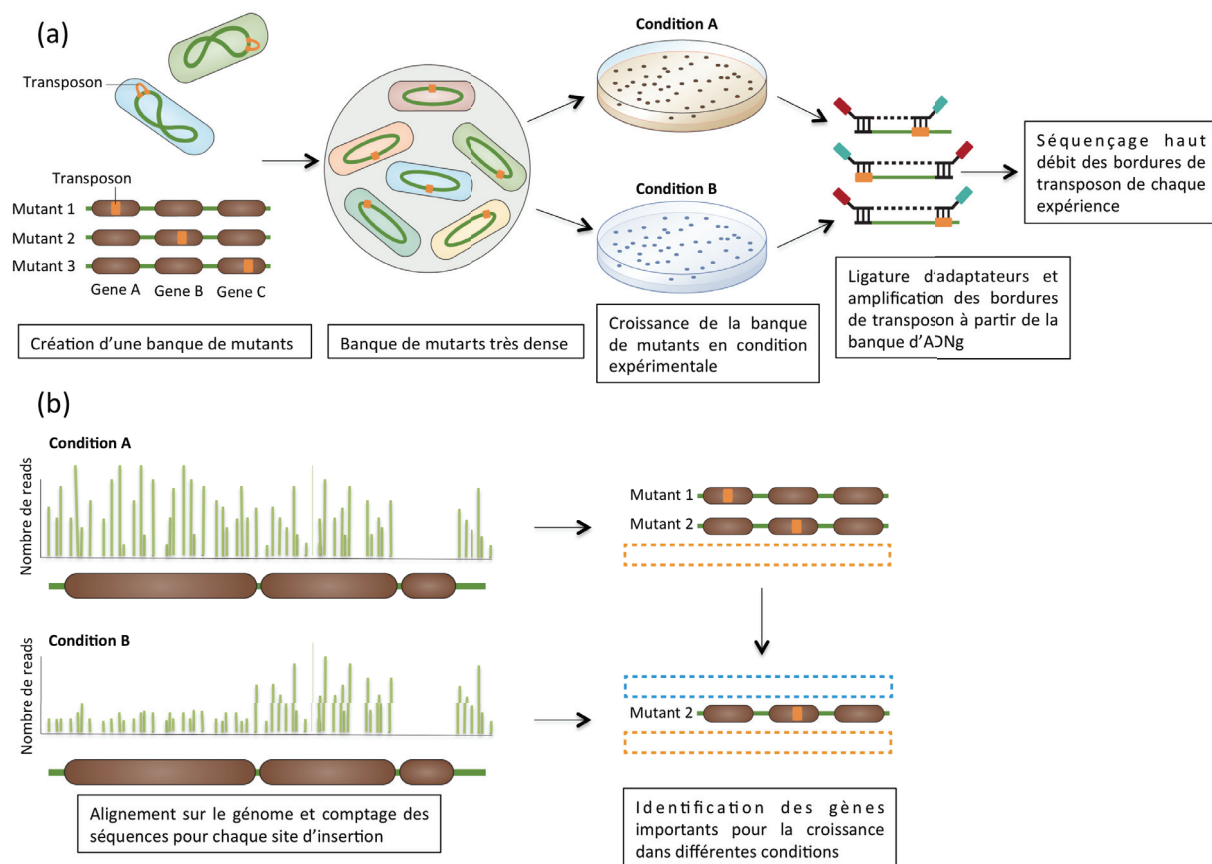
#### 4.1.2 Les différentes façon d'utiliser des banques de mutants

Définir le génome essentiel d'une bactérie dans un environnement donné à l'aide d'une banque de mutants peut être une méthode très longue et fastidieuse si chacun des mutants doit être testé de manière indépendante [233]. Plusieurs études utilisant des banques de mutants créées par insertion d'un transposon dans le génome ont été réalisées, notamment chez *E. coli* et *M. tuberculosis* [234], [235]. Afin de ne pas tester individuellement chaque mutant, ce qui peut être très fastidieux voir impossible pour une banque de mutants très dense, ces travaux utilisaient des puces à ADN pour détecter les mutants qui survivaient à une condition donnée [234], [235]. Cependant, cette technique n'est possible que dans les cas où une puce ADN de la souche étudiée est

disponible ce qui n'est pas le cas pour chaque espèce. Les dernières technologies de robotisation permettent d'automatiser les tests phénotypiques d'une banque de mutants, permettant ainsi de tester des milliers de mutants dans de multiples conditions de croissance et de déterminer le génome essentiel d'une bactérie pour un milieu considéré [233][236]. De tels travaux ont déjà été entrepris chez *E.coli* et *Bacillus subtilis* [236]. D'autres méthodes de dernière génération existent afin d'éviter de tester individuellement chaque mutant d'une banque pour une condition donnée et ce de manière moins onéreuse. La méthode que nous allons présenter allie une mutagénèse par transposon couplée à une méthode de séquençage à haut débit, dénommé Tn-seq pour « Transposon sequencing » [237]–[242]. Ce procédé a pu être mis en place grâce au développement des nouvelles technologies de séquençage (NGS).

#### **4.1.3 Principe général du Tn-seq**

L'approche Tn-seq nécessite la construction d'une librairie de mutants par insertion d'un transposon pour laquelle la totalité ou quasi-totalité des gènes non essentiels contiennent des insertions (Figure 27a). Le transposon peut être transmis directement par électroporation de la souche receveuse avec la transposase purifiée et le transposon lui même [243]. Cependant, les méthodes les plus efficaces pour obtenir une banque de mutants très dense consistent, lorsque c'est possible, à utiliser la compétence naturelle d'une souche receveuse ou l'utilisation d'un système conjugatif où une souche donneuse transfèrera un plasmide suicide portant le transposon et la transposase d'intérêt à une souche receveuse que l'on souhaite muter. Cette librairie est ensuite mise en croissance dans des conditions définies *in vitro* ou *in vivo* (infection d'un hôte). La fréquence relative de chaque mutant dans la population est déterminée au début et à la fin de l'expérience au moyen d'un séquençage massif des bordures des sites d'insertions des transposons. À partir de ces données, on peut quantifier la contribution de chaque gène relatif à une condition donnée (Figure 27b).



**Figure 27: Procédure du Tn-seq.**

(a) Une banque de mutants dense contenant de nombreuses insertions de transposon dans toutes les séquences d'ADN non essentielles est créée et mise en croissance dans différentes conditions (par exemple, condition sélective (condition B) et non sélective (condition A)). Les mutants viables pour les deux conditions sont récupérés. Les bordures de transposons pour la condition sélective et non sélective sont ligaturées avec des adaptateurs spécifiques pour le séquençage, amplifiées par PCR, puis sujets au séquençage à haut débit. (b) Les séquences sont alignées sur le génome d'intérêt et le nombre de *reads* pour chaque insertion est sujet à une analyse statistique afin de définir les locus qui semblent significativement sous représentés dans des conditions de croissance sélective (potentiel locus essentiel). Les insertions dans la condition non sélective (condition A) peuvent aussi être statistiquement évaluées afin de définir les locus essentiels à la croissance en condition optimale.

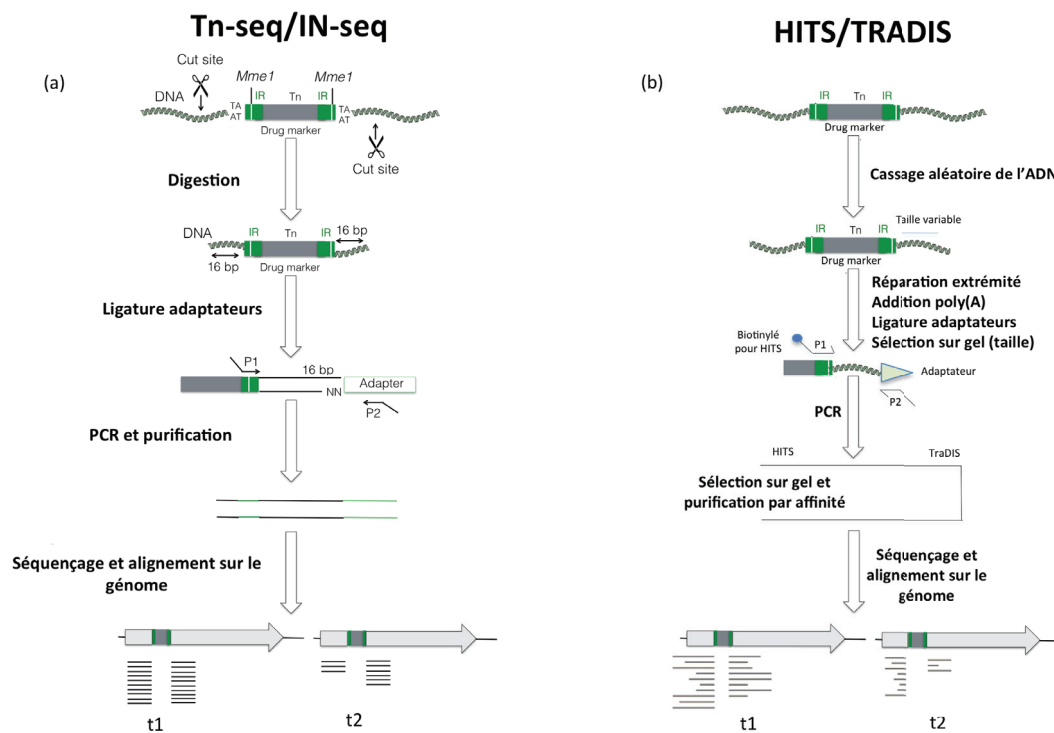
#### 4.1.4 Les différentes variantes du Tn-seq

Quatre principales techniques de Tn-seq ont été utilisées depuis 2009. Le Tn-seq et l'INSeq sont des méthodes presque identiques qui utilisent le transposon HimarI de type Mariner (Figure 28a). Cet élément transposable a d'abord été découvert dans la petite mouche *Haematobia irritans* [244] et a été adapté pour tous les types cellulaires par la

modification de codons rares. Ce transposon a la particularité de s'insérer au dinucléotide TA sans points chauds d'insertion [245]. C'est d'un grand intérêt afin d'avoir au moins une insertion par gène. Les équipes qui ont développé ces deux méthodes ont réalisé qu'un seul changement de nucléotides dans les séquences inversées répétées du transposon Mariner permettrait d'introduire les sites de reconnaissance de l'enzyme *MmeI* [238], [240]. *MmeI* est une endonucléase qui réalise une coupure 20 bases en aval de son site de reconnaissance et laissant 2 nucléotides sortants à l'extrémité 3' [246, p. 1][246, p. 1]. Ainsi, lorsque l'ADN d'une banque de mutants d'insertion par transposons est digéré par *MmeI*, des fragments comprenant les extrémités du transposon plus 16 pb d'ADN génomique flanquant sont produits (le site de reconnaissance de *MmeI* est situé 4 pb avant la fin de chaque répétition terminale). Ces 16 pb sont suffisants pour localiser avec précision l'emplacement du transposon dans le génome bactérien. Les 2 bases sortantes facilitent la ligature d'un adaptateur. En utilisant une amorce spécifique pour cet adaptateur et une autre spécifique pour le transposon, une séquence de taille définie peut être amplifiée par PCR, puis purifiée sur gel d'agarose ou par PAGE. Enfin, un séquençage haut débit est utilisé pour déterminer les séquences flanquantes de 16 bp.

HITS [247] et TraDIS [248] sont les deux autres méthodes principalement utilisées. Similaires aux précédentes, elles utilisent cependant des transposons qui n'ont pas de sites de restriction dans leurs séquences inversées répétées. Par conséquent, pour générer des fragments contenant les extrémités de transposons, l'ADNg est cassé par digestion enzymatique ou méthode physique tel que la sonication, puis plusieurs étapes supplémentaires sont nécessaires avant qu'un adaptateur puisse être ligaturé (Figure 28b). Pour la méthode HITS, une purification est réalisée pour éliminer l'ADN étranger avant le séquençage. Ces deux méthodes utilisent le plus souvent un dérivé du transposon Tn5. De façon similaire aux transposons Mariner utilisés dans les deux autres méthodes, le Tn5 est actif dans différentes espèces. Cependant, à la différence du transposon mariner qui cible les sites TA seulement du génome, ce transposon n'a à priori pas de sites préférentiels d'insertion. Il est cependant décrit comme ayant des points chauds d'insertion notamment pour des régions riches en GC [249], [250]. Son avantage par rapport au transposon Mariner est que sa transposase est purifiée et des kits sont en vente afin d'électroporer la transposase ainsi que le transposon d'intérêt directement chez la souche receveuse [243]. Ceci est d'une grande utilité pour les

souches incapables de conjuguer ou qui ne sont pas compétentes en condition de laboratoire. HITS et TraDIS sont des techniques dont l'avantage est de pouvoir utiliser tout type de transposon, même si les travaux les utilisant ont préféré l'utilisation d'un Tn5. D'autre part, le Tn-seq et l'INSeq ont les avantages d'un protocole de préparation de l'échantillon plus court.



**Figure 28: Quatre méthodes de préparations des bordures de transposon pour le séquençage.**

Les quatre principales méthodes de Tn-seq sont illustrées, à partir de l'extraction de l'ADNg du pool de mutants jusqu'au séquençage des bordures de transposon. Le nombre de « reads » pour chaque bordure de transposon peut varier en début d'expérience (t1) par rapport à la fin d'expérience (t2). Dans les deux exemples, les bordures de transposon sont en nombre moins important dans la condition testée, comme l'indiquent le peu de *reads* présents à la fin de l'expérience (t2) par rapport au début de l'expérience (t1) pour le mutant considéré. Adaptée de [240].

#### 4.1.5 Analyse des données

Outre le choix du transposon et de la méthode de préparation de l'échantillon, l'analyse des données est l'autre grande différence entre les quatre méthodes. Pour toutes, le nombre de « reads » (littéralement « séquences lues lors du séquençage ») pour une

insertion particulière correspond à la fréquence de ce mutant d'insertion dans la population. Le changement dans la fréquence d'insertion après sélection donne une idée de l'importance du gène muté dans le phénotype étudié. Ainsi, si la fréquence d'une insertion particulière ne change pas, cela indique que le gène dans lequel le transposon est inséré est neutre (c'est-à-dire que l'absence de la fonctionnalité du gène n'entraîne aucun défaut de croissance) dans la condition testée. Si une insertion particulière disparaît de la population, cela indique que le gène correspondant est essentiel dans les conditions expérimentales (Figure 27b). Inversement, si la fréquence d'un mutant augmente, la perturbation fonctionnelle du gène est bénéfique. Cette notion d'importance d'un gène est traduite par la notion de « fitness ».

La différence entre les méthodes citées précédemment intervient lors du traitement informatique des données. En effet, l'utilisation d'un transposon de type mariner, s'insérant seulement aux sites TA du génome, conduit à l'élimination systématique de toutes séquences contaminatrices non bordées par un site TA. L'utilisation d'un transposon Mariner facilite aussi l'interprétation dans l'essentialité des gènes car seul un nombre de sites TA défini à l'avance peut être muté (le nombre de TA est connu dans le génome d'intérêt). Ainsi un nombre maximal théorique de mutants est connu et peut être pris en compte par les algorithmes de calcul d'essentialité. De plus, l'utilisation de *MmeI* facilite le traitement des séquences qui sont toutes de même taille après amplification PCR évitant ainsi des biais dans l'analyse. Au contraire, lors de l'utilisation d'un transposon de type Tn5, les produits PCR sont de différentes tailles, conduisant à un potentiel biais d'amplification (les fragments d'ADN plus courts seront préférentiellement amplifiés). De plus, l'insertion d'un Tn5 est aléatoire mais contient des points chauds d'insertion comme expliqué précédemment, compliquant ainsi l'analyse informatique ultérieure. A défaut de conduire à une analyse informatique plus difficile, l'utilisation d'un Tn5 est fortement recommandée pour l'analyse de génome à haut pourcentage de GC.

Le développement du Tn-seq permet son utilisation pour de nombreux organismes non modèles tant qu'une mutagenèse par transposon est possible et que le génome est séquencé. De plus, avec la possibilité de multiplexer des échantillons en incorporant un code-barre dans l'adaptateur [240], le coût de la réalisation de ce type d'expériences a considérablement diminué.

#### **4.1.6 Le RB-Tnseq**

Même si le coût de réalisation d'une expérience de Tn-seq a beaucoup diminué grâce à la possibilité de multiplexer les échantillons sur une ligne du séquenceur, la préparation des librairies d'ADN (Figure 28) est assez lourde et ne permet pas d'envisager l'étude simultanée de multiples organismes dans de nombreuses conditions. Afin d'alléger le temps de préparation des librairies mais également le coût de mise en place lors d'une expérience de Tn-seq, Wetmore et ses collaborateurs [251] ont imaginé un système dans lequel chaque élément transposable contient un codebarre différent placé à côté du gène de résistance à un antibiotique. Ainsi, lors d'une mutagénèse avec cet élément transposable, chacun des différents mutants contient un élément transposable unique identifiable à son codebarre. La banque de mutants d'une espèce donnée est séquencée une seule fois selon le protocole habituel (Figure 28) afin d'associer un site d'insertion particulier à un codebarre particulier. Les banques de mutants peuvent alors être criblées dans de nombreuses conditions. A la fin des cribles, les codebarres sont amplifiés par PCR avec des oligonucléotides qui contiennent eux aussi d'autres codebarres afin de multiplexer les échantillons dans le séquenceur. Les produits de PCR sont directement séquencés et l'analyse des résultats permet de déterminer le fitness de chacun des gènes pour la condition de croissance testée. Le protocole dense de préparation des librairies pour chaque échantillon de Tn-seq (Figure 28) est ainsi remplacé par une simple PCR dans le RB-Tnseq. Cette technique, très récente, a été utilisée chez *Escherichia coli*, *Phaeobacter inhibens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella amazonensis* et *Shewanella oneidensis* dans l'étude des gènes essentiels pour l'utilisation de plusieurs sources carbonées conduisant à plus de 130 combinaisons bactéries-source de carbone différentes et à l'identification de 5196 gènes nécessaire à la croissance sur différents milieux [251].

## **4.2 Les applications possibles**

### **4.2.1 assigner un gène à une fonction**

L'utilisation du Tn-seq permet d'identifier de nouvelles fonctions pour certains gènes. Par exemple, le Tn-seq a été utilisé chez *Pseudomonas aeruginosa* afin de découvrir de nouvelles voies de résistance aux antibiotiques [237]. Ainsi, 117 gènes de résistance à la tobramycine ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa* [237]. Cette technique a aussi



été utilisée chez *Mycobacterium tuberculosis* [252] pour identifier les gènes essentiels à l'utilisation du cholestérol (source de carbone majeure durant l'infection). Le Tn-seq a aussi été utilisé chez de nombreux autres organismes tels que *Shewanella oneidensis* [253], le pathogène parodontal *Porphyromonas gingivalis* [254] et *Streptococcus pneumoniae* [255]. Les exemples d'utilisation du Tn-seq les plus récents portent sur l'étude des gènes de résistance à l'oxyde nitrique chez *Staphylococcus aureus* [256] ou encore sur les gènes de résistance à l'acide p-coumarique, un composé organique aromatique, chez *P. putida* [257]. De nombreuses études portant sur l'essentialité des gènes pour l'interaction hôte-micro-organismes ont émergé. Une étude a ainsi identifié 17 gènes essentiels pour la croissance de *Yersinia tuberculosis* au sein de la souris [258]. D'autres études ont porté sur l'analyse du génome essentiel de *P. aeruginosa* pour l'infection de souris [259] ou sur le génome essentiel pour la survie du phytopathogène *Pantoea stewartii ssp. stewartii* dans le xylème de plants de maïs [260]. Ces nombreux exemples montrent que le Tn-seq a été utilisé aussi bien en contexte *in vitro* qu'en contexte *in vivo* (infection d'animaux ou de plantes) et a permis la caractérisation de nombreuses voies de réponse à un stress.

#### **4.2.2 Etude de gènes non codants**

Le Tn-seq ne se limite pas à l'étude des régions codantes de l'ADN. Dans une étude [239], cette technologie a été utilisée pour construire une librairie dense de mutants d'insertion chez *Caulobacter crescentus* (avec une résolution de 8 pb). En plus de l'identification des gènes essentiels, 402 séquences régulatrices et 130 éléments non codants provenant de régions intergéniques se sont également révélés importants pour la croissance. Les régions intergéniques nécessaires à une croissance optimale ont aussi été identifiées chez *M. tuberculosis* [261] en utilisant une approche similaire. En combinant RNA-seq et Tn-seq, 56 nouveaux ARNs putatifs dans les régions non codantes de *S. pneumoniae* [262] ont été identifiés. Le séquençage de l'ARN a été effectué afin de déterminer l'activité transcriptionnelle complète du génome et de prédire la présence d'ARNs dans les régions intergéniques. Par la suite, le Tn-seq a été utilisé dans des modèles murins de colonisation (infection du nasopharynx), de pneumonie (infection du poumon) et de bactériémie (infection intraveineuse) pour révéler la contribution des ARNs prédits à la survie *in vivo*.



## 4.3- Avantages et inconvénients

### 4.3.1 Transposon : Mariner vs Tn5

Les dinucléotides TA sont distribués de façon relativement uniforme dans tout le génome, bien que la fréquence des TA puisse varier localement à l'intérieur du génome (par exemple, dans les régions d'ADN acquises horizontalement). Chez *Escherichia coli*, dont la teneur en GC est d'environ 50 %, il y a en moyenne >30 sites d'insertion potentiels pour 1 kb d'ADN. Bien que les loci ayant moins de sites d'insertion potentiels (comme ceux des espèces à forte teneur en GC) puissent avoir moins de puissance statistique, les transposons Mariner ont été utilisés avec succès pour définir les gènes essentiels à la croissance de l'organisme *Mycobacterium tuberculosis* riche en GC [261] ainsi que pour définir des loci essentiels aussi petits que 200 nucléotides chez *Vibrio cholerae* [263]. En général, nous privilégions l'utilisation de transposons de type Mariner, à la fois pour l'absence de biais d'insertion mais aussi parce que l'estimation de la saturation de la librairie de mutants est plus aisée (le nombre maximal de TA est connu dans un génome séquencé). Ces caractéristiques facilitent la discrimination entre les loci essentiels et non essentiels. L'insertion d'un transposon Tn5 n'est pas spécifique d'une séquence d'ADN particulière, ce qui permet une densité d'insertion et donc une résolution génomique potentiellement plus élevée que dans les études avec les transposons Mariner. Cependant, les transposons Tn5 ont une préférence pour les régions à forte teneur en GC [249], [250, p. 5] et le nombre de reads à ces points chauds peuvent refléter un biais d'insertion. L'insertion préférentielle aux points chauds peut également réduire la complexité globale de la librairie. Malgré certains désavantages des Tn5 par rapport aux transposons Mariner, les bibliothèques Tn5 ont été utilisées avec succès pour les études Tn-seq dans de nombreuses conditions [239], [264] et peuvent être préférables pour les espèces pour lesquelles la transposition avec un transposon type Mariner s'avère difficile à optimiser.

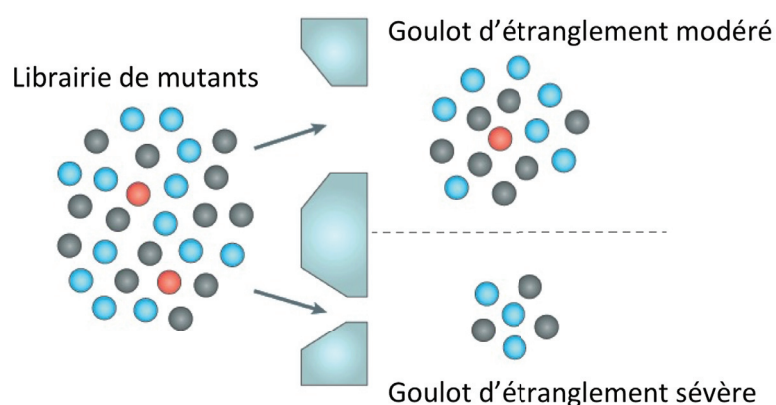
### 4.3.2 Les goulots d'étranglement

En théorie, seuls les mutants ayant une survie atténuée devraient diminuer en fréquence dans des conditions de croissance sélective. Cependant, les mutants d'insertion peuvent être perdus pendant la croissance sélective en raison de processus stochastique dû à des goulots d'étranglement expérimentaux (Figure 29). Si les goulots d'étranglement

expérimentaux sont significativement plus étroits que la complexité de la librairie testée, alors de nombreux mutants d'insertion seront entièrement perdus par hasard. Le fait de ne pas tenir compte des effets de ces goulots d'étranglement peut conduire à des conclusions erronées au cours de l'analyse statistique.

Les goulots d'étranglement sont souvent présents lors des études d'infection via Tn-seq dans lesquelles une librairie de mutants est utilisée pour infecter un hôte animal [265]–[269]. Par exemple, seulement  $10^4$ – $10^5$  des cellules de *V. cholerae* à partir des  $10^9$  cellules bactériennes initiales inoculées sont capables d'établir l'infection chez un lapin hôte, suggérant que plus de 99,99% des bactéries sont perdues [270]. Cette perte de population peut être le résultat du pH acide de l'estomac, qui est une barrière d'infection grave mais non spécifique pour ce pathogène [271]. Les effets de goulots d'étranglement peuvent être réduits expérimentalement en utilisant des sous-populations de librairie de transposons (à la même dose) qui sont moins complexes, de telle sorte que chacun des différents mutants aient de fortes chances de passer le goulot d'étranglement [238], [266], [268]. Cependant, cette approche peut nécessiter davantage de répétitions expérimentales avec différents échantillons de mutants afin que l'ensemble de la banque soit inoculé. Les conditions expérimentales peuvent également être modifiées pour « élargir » le goulot d'étranglement. Par exemple, dans les infections expérimentales avec *V. cholerae*, des antiacides peuvent être administrés à l'hôte [272], l'inoculum peut être suspendu dans une solution tampon [267], et l'agent pathogène peut être pré-conditionné avec des traitements pour favoriser la tolérance à l'acide avant l'inoculation intra-gastrique [273]. Bien que toutes ces mesures réduisent au minimum le goulot d'étranglement dû à l'acide gastrique, elles modifient également les conditions sélectives et pourraient sauver les mutants avec une sensibilité accrue à l'acide qui seraient originellement perdus pendant l'infection.

Le nombre de *reads* au niveau de l'origine de réplication peut aussi être surévalué rapport aux *reads* proches du terminus. En effet, plusieurs fourches de réplication sont créées lors de la division d'une cellule bactérienne ce qui conduit à la présence en plus grand nombre des gènes proches de l'origine de réplication. Ce biais de position peut être corrigé par la fonction de régression LOESS qui va normaliser les *reads* selon la position d'un gène sur le génome.



**Figure 29: les goulots d'étranglements.**

Un goulot d'étranglement est un événement qui réduit la taille d'une population et qui peut modifier la composition de la population en provoquant une fluctuation stochastique de l'abondance de certains génotypes (fluctuation modérée) ou même leur perte (fluctuation sévère). Adaptée de [263].

#### **4.3.3 Les analyses avec annotations dépendantes/indépendantes**

En général, le respect de trois critères facilite l'identification des loci essentiels : l'utilisation d'une librairie de mutants hautement saturée, dans laquelle les gènes non essentiels qui échappent à la transposition par hasard sont rares ; le séquençage à une profondeur suffisante pour détecter la grande majorité des mutants dans la librairie ; et la normalisation des *reads* en fonction de la localisation chromosomique. Les techniques d'analyses sont divisées en deux catégories : annotation dépendante (se base sur les gènes annotés dans le génome) et indépendante (ne considère aucune annotation connue). Les méthodes indépendantes de l'annotation permettent également de caractériser les régions intergéniques, qui sont souvent ignorées dans les analyses dépendantes de l'annotation et peuvent contenir de nouvelles caractéristiques d'intérêt. Enfin, comme les analyses annotation-dépendantes comparent tous les gènes les uns aux autres, les gènes ayant un nombre différent de sites d'insertion potentiels peuvent être analysés avec une puissance statistique différente et les petits gènes peuvent être classés avec moins de précision que les loci plus grands. Comme les insertions dans les extrémités 5' et 3' des régions codantes n'engendrent pas toujours un défaut fonctionnel, les insertions aux extrémités 5-15% des gènes ont été généralement ignorées dans ces analyses[274].

En résumé, l'outil Tn-seq est un outil puissant et applicable sur de nombreuses espèces bactériennes après croissance *in vitro* ou *in vivo*. Il est particulièrement bien adapté pour la recherche de gène de résistance aux métaux chez *P. putida* comme il a pu être utilisé chez *P. aeruginosa* pour la recherche de gène de résistance à la tobramycine [237]. De plus, très peu d'études utilisant le Tn-seq chez un phytopathogène ont vu le jour, ce qui rend la recherche de facteurs permettant la survie de *D. dadantii* dans la plante des plus novateurs et attractifs.

## V. Objectifs de thèse

Comme précédemment évoqué dans cette introduction, les bactéries environnementales font face à de très nombreux stress dans leur milieu de vie. Ces stress sont variables et changeants notamment à cause des variations climatiques. Les bactéries environnementales vont donc devoir s'acclimater rapidement pour faire face à des variations de températures, des changements d'osmolarité, des changements de pH ou encore des carences nutritives afin de survivre et de prospérer dans leur environnement naturel.

Au laboratoire, nous avons décidé de nous intéresser à deux types de stress : le stress métallique et le stress rencontré chez l'hôte par un pathogène. Comme nous avons pu le voir dans cette introduction, ces stress sont plus complexes que prévu. En effet, l'arrivée d'un métal en excès engendre la production d'un stress oxydant, mais provoque aussi d'autres problèmes tels que la déstabilisation des membranes, l'altération des protéines ou de l'ADN etc... Les métaux sont pourtant omniprésents chez les bactéries et sont devenus nécessaires à tous les organismes vivants au cours de l'évolution. Les cellules doivent alors réguler très finement l'homéostasie métallique pour maintenir un équilibre fragile indispensable à leur survie et leur croissance. Pour contrôler cette homéostasie métallique, les cellules ont mis en place divers systèmes au cours de l'évolution. De même, lorsqu'une bactérie phytopathogène pénètre et cherche à se développer dans une plante hôte, cette dernière se défend et cherche à anéantir son envahisseur. Les bactéries phytopathogènes font donc face à de nombreuses conditions défavorables telles qu'un pH variable, des variations osmotiques ou des espèces dérivées d'oxygène. Afin de survivre et de se nourrir, le phytopathogène a dû mettre en place des mécanismes de défense afin de prendre le dessus sur son hôte et faire en sorte que les avantages d'une infection soient supérieurs à un mode de vie non pathogène.

Afin d'étudier les mécanismes mis en jeu dans la résistance aux métaux nous avons utilisé une bactérie du sol modèle, *Pseudomonas putida*. Notre intérêt pour cette bactérie s'est porté sur le fait qu'elle est fréquemment isolée de sols pollués, et est donc capable de s'adapter à la présence en grande quantité de métaux. Elle est, de plus, facilement manipulable génétiquement. Le modèle utilisé pour étudier le stress rencontré chez la plante est *Dickeya dadantii*, un pathogène émergent en Europe et d'intérêt économique majeur tant cette bactérie est capable d'infecter un large spectre d'hôtes.

Le stress métallique ainsi que le stress rencontré chez la plante hôte chez *P. putida* et *D. dadantii* respectivement seront étudiés grâce à un outil commun : le Tn-seq. Cette technique, comme nous avons pu le voir nécessite la création d'une banque de mutants et son criblage dans une condition donnée. Elle a largement été utilisée chez d'autres organismes et a prouvé sa robustesse. Très peu de banques de mutants ont été réalisées et utilisées afin d'étudier le stress métallique chez *Pseudomonas* [275], [276] ou le stress rencontré en cours d'infection chez *Dickeya* ou même chez *Pectobacterium*[277]–[279]. De plus, le peu de banques utilisées ne comptaient que quelques milliers de mutants[275]–[279]. Des centaines de milliers de mutants, constituant une banque, ont ainsi été réalisés chez ces deux espèces et ont été criblés respectivement en présence de différents métaux (Cu, Zn, Co, Cd) et dans l'endive, le modèle de plante utilisé pour les infections par *Dickeya dadantii*. L'analyse des résultats a conduit à la découverte de voies de résistance majeures au stress chez ces deux espèces. L'ensemble des résultats de Tn-seq a ensuite été validé par une approche ciblée par la création et le phénotypage de mutants de délétion. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives de recherche tant sur la résistance aux métaux chez les bactéries du sol que sur la recherche de nouveaux composés afin de limiter la propagation des phytopathogènes sur des plantes d'intérêt économique.



# B-Matériels et Méthodes

## I-Souches bactériennes, plasmides et techniques de microbiologie

### 1.1 Tableaux souches et plasmides

Souches	Description	Références
<i>Escherichia coli</i>		
MFDpir	RP4-2-Tc::( $\Delta$ Mu1::aac(3)IV- $\Delta$ aphA- $\Delta$ nic35- $\Delta$ Mu2::zeo) $\Delta$ dapA::erm-pir) $\Delta$ recA	[280]
DH5 $\alpha$ $\lambda$ -pir	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK- mK+)/ $\lambda$ pir	[281]
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	KT2440 Wild-type	[146]
PP27	KT2440 $\Delta$ gshA	Ce travail
PP29	KT2440 $\Delta$ glnE	Ce travail
PP31	KT2440 $\Delta$ pcoB2 (PP_5379)	Ce travail
PP33	KT2440 $\Delta$ pcoA2 (PP_5380)	Ce travail
PP36	KT2440 $\Delta$ PP_5337	Ce travail
PP38	KT2440 $\Delta$ PP_0096	Ce travail
PP40	KT2440 $\Delta$ PP_5328	Ce travail
PP42	KT2440 $\Delta$ PP_5002	Ce travail
PP44	KT2440 $\Delta$ PP_0586	Ce travail
PP46	KT2440 $\Delta$ proB	Ce travail
PP48	KT2440 $\Delta$ dsbA	Ce travail
PP50	KT2440 $\Delta$ PP_0887 $\Delta$ PP_0888	Ce travail
PP52	KT2440 $\Delta$ PP_1663	Ce travail
PP54	KT2440 $\Delta$ czcA1 (PP_0043)	Ce travail



PP56	KT2440 $\Delta cadA3$ (PP_5139)	Ce travail
PP58	KT2440 $\Delta pvdMNOE$	Ce travail
PP60	KT2440 $\Delta PP\_5140$	Ce travail
PS12	KT2440 contenant le pUC18 mini-Tn7- <i>gfpmut3</i> inséré au site attTn7	Ce travail
PS9	KT2440 WT pJN105	Ce travail
PP63	KT2440 $\Delta PP\_5337$ pJN105	Ce travail
PP64	KT2440 $\Delta PP\_5337$ pJN105-PP_5337	Ce travail
PP65	KT2440 $\Delta PP\_1663$ pJN105	Ce travail
PP66	KT2440 $\Delta PP\_1663$ pJN105-PP_1663	Ce travail
PP67	KT2440 $\Delta PP\_5002$ pJN105	Ce travail
PP68	KT2440 $\Delta PP\_5002$ pJN105-PP_5002	Ce travail
PP69	KT2440 $\Delta dsbA$ pJN105	Ce travail
PP70	KT2440 $\Delta dsbA$ pJN105- <i>dsbA</i>	Ce travail
PP71	KT2440 $\Delta pvdMNOE$ pJN105	Ce travail
PP72	KT2440 $\Delta pvdMNOE$ pJN105- <i>pvdE</i>	Ce travail
PP73	KT2440 $\Delta PP\_0887$ $\Delta PP\_0888$ pJN105	Ce travail
PP74	KT2440 $\Delta PP\_0887$ $\Delta PP\_0888$ pJN105-PP_0887/88	Ce travail
PP83	PP63+pSEVA- <i>ppurE-gfp</i>	Ce travail
PP84	PP64+pSEVA- <i>ppurE-gfp</i>	Ce travail
PP85	PP63+pSEVA- <i>paspA-gfp</i>	Ce travail
PP86	PP64+pSEVA- <i>paspA-gfp</i>	Ce travail
PP87	PP63+pSEVA-pPP_5380- <i>gfp</i>	Ce travail
PP88	PP64+pSEVA-pPP_5380- <i>gfp</i>	Ce travail
PP89	PP63+pSEVA-J23100- <i>gfp</i>	Ce travail
PP90	PP64+pSEVA-J23100- <i>gfp</i>	Ce travail
PP91	PP63+pSEVA- <i>gfp</i>	Ce travail
PP92	PP64+pSEVA- <i>gfp</i>	Ce travail

### ***Dickeya dadantii***

3937	Wild type strain	Laboratoire
D7#1	<i>D. dadantii</i> 3937 <i>glmS::Tn7-gent</i> , <i>Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D8	3937 $\Delta rscmC$	Ce travail

D10	<i>D7#1 ΔdegQ, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D12	<i>D7#1 ΔglpD, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D14	<i>D7#1 ΔackA/ptA, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D15	<i>3937 ΔgcpA</i>	Ce travail
D17	<i>D7#1 ΔmetB, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D19	<i>D7#1 ΔlysA, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D21	<i>D7#1 ΔpurF, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D23	<i>D7#1 ΔpyrE, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D25	<i>D7#1 ΔclpSA, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D27	<i>D7#1 ΔguaB, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D29	<i>D7#1 ΔLeuA, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D31	<i>D7#1 ΔpurL, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D33	<i>D7#1 ΔcysJ, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D35	<i>D7#1 ΔhdfR, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D37	<i>D7#1 ΔflhDC, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D39	<i>D7#1 ΔcarA, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail
D42	<i>D7#1 ΔDda3937_03424, Gent<sup>R</sup></i>	Ce travail

Plasmides	Description	Références
pSAM_DGm	Gm <sup>R</sup> ,Amp <sup>R</sup> ,mariner-based transposon,C9 mariner transposase gene, oriR6K, oriT	[259]
pKNG101	Sm <sup>r</sup> ; gene replacement vector, <i>oriR6K</i> , <i>oriTRK2</i> , <i>sacB</i>	[282]
pKNG- <i>gshA</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>gshA</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>glnE</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>glnE</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>pcoB2</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>pcoB2</i> ( <i>PP_5379</i> ) gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>pcoA2</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>pcoA2</i> ( <i>PP_5380</i> ) gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>PP_5337</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_5337</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>PP_0096</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_0096</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>PP_5328</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_5328</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail

pKNG-PP_5002	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_5002</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG-PP_0586	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_0586</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>proB</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>proB</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>dsbA</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>dsbA</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG-PP_0887/0888	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_0887/PP_0888</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG-PP_1663	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_1663</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>czcA1</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>czcA1</i> ( <i>PP_0043</i> ) gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG-PP_5139	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_5139</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail

pKNG- <i>pvdMNOE</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>pvdMNOE</i> operon of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pKNG- <i>PP_5140</i>	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream <i>PP_5140</i> gene of <i>P. putida</i> KT2440	Ce travail
pJN105	Gm <sup>r</sup> , arabinose-inducible <i>araC</i> -P <sub>BAD</sub> expression vector	[283]
pJN105- <i>dsbA</i>	<i>dsbA</i> gene with RBS cloned in <i>Spe1/Sac1</i> digested pJN105 by SLIC [284]	Ce travail
pJN105- <i>PP_5337</i>	<i>PP_5337</i> gene with RBS cloned in <i>Spe1/Sac1</i> digested pJN105 by SLIC [284]	Ce travail
pJN105- <i>PP_5002</i>	<i>PP_5002</i> gene with RBS cloned in <i>Spe1/Sac1</i> digested pJN105 by SLIC [284]	Ce travail
pJN105- <i>PP_1663</i>	<i>PP_1663</i> gene with RBS cloned in <i>Spe1/Sac1</i> digested pJN105 by SLIC [284]	Ce travail
pJN105- <i>pvdE</i>	<i>pvdE</i> gene with RBS cloned in <i>Spe1/Sac1</i> digested pJN105 by SLIC [284]	Ce travail
pJN105- <i>PP_0887/0888</i>	<i>PP_0887/0888</i> operon with RBS cloned in <i>Spe1/Sac1</i> digested pJN105 by SLIC [284]	Ce travail
pSEVA421- <i>gfp</i>	Sm <sup>R</sup> , GFP expression vector without promoter	Ce travail

pSEVA421-J23100- <i>gfp</i>	Sm <sup>R</sup> , GFP expression vector with J23100 promoter cloned in a <i>Sma</i> I digested vector	Ce travail
pSEVA421- <i>ppurE-gfp</i>	Sm <sup>R</sup> , GFP expression vector with <i>purE</i> promoter cloned in a <i>Sma</i> I digested vector	Ce travail
pSEVA421- <i>paspa-gfp</i>	Sm <sup>R</sup> , GFP expression vector with <i>aspA</i> promoter cloned in a <i>Sma</i> I digested vector	Ce travail
pSEVA421-pPP_5380- <i>gfp</i>	Sm <sup>R</sup> , GFP expression vector with PP_5380 promoter cloned in a <i>Sma</i> I digested vector	Ce travail
pSAM-EC	Suicide mobilizable vector; Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> resistance gene bordered by mariner inverted repeat sequence containing MmeI restriction site, <i>himar1</i> -C9 transposase gene under the control of <i>Plac</i> .	[285]
pRE112	Suicide vector for allelic exchange in <i>D. dadantii</i> 3937, Cm <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , <i>oriT</i> RP4	[286]
pTn7-M	Km <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> , <i>oriR6K</i> , <i>Tn7L</i> and <i>Tn7R</i> extremities, standard multiple cloning site, <i>oriT</i> RP4	[287]
pTNS3	Ap <sup>R</sup> , <i>ori R6K</i> , <i>TnsABCD</i> operon, <i>oriT</i> RP4	[288]
pRE112 Δ <i>cysJ</i>	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>cysJ</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 Δ <i>gcpA</i>	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>gcpA</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail

pRE112 $\Delta degQ$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>degQ</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta flhDC$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>flhDC</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta guaB$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>guaB</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta metB$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>metB</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta lysA$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>lysA</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta pyrE$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>pyrE</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta purL$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>purL</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta purF$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>purF</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta carA$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>carA</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta clpS/A$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>clpS/A</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta hdfR$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>hdfR</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail

pRE112 $\Delta leuA$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>leuA</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail
pRE112 $\Delta rsmC$	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>rsmC</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	Ce travail

## 1.2 Composition des milieux de culture (LB, M63)

### 1.2.1 Milieu riche LB

NaCl 10 g.L<sup>-1</sup> ; bactotryptone 10 g.L<sup>-1</sup> ; extrait de levure 5 g.L<sup>-1</sup> ; pH 7. Ce milieu constitue un milieu nutritif complet utilisé en routine pour la croissance des bactéries. Il peut être utilisé sous forme solide (GL) par addition d'agar à 12 g.L<sup>-1</sup>.

### 1.2.2 Milieu minimum M63

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,6 g.L<sup>-1</sup> ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup> ; MgSO<sub>4</sub> 0,2 g.L<sup>-1</sup> ; FeSO<sub>4</sub> 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ; pH 7,2. Ce milieu sert de base minimale et doit être complété par du glucose (2 g.L<sup>-1</sup>) qui sert de source de carbone. Il peut être utilisé sous forme solide par addition d'agar à 12 g.L<sup>-1</sup>.

## 1.3 Conditions de culture et conservation des souches bactériennes

Les cultures sont effectuées à 37°C pour *E. coli*, 30°C pour *P. putida* et *D. dadantii* en milieu LB. Pour assurer une croissance en bonne aération, la culture est réalisée en milieu liquide sous agitation à 150 rpm en erlenmeyer rempli au 1/5<sup>ème</sup>. L'ensemencement s'effectue à 1 % à partir d'une préculture en phase stationnaire qui a été cultivée dans des conditions analogues à celles de la culture finale. Pour les croissances sur milieu solide, les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pour *E. coli* ou 30°C pour *P. putida* durant 24 heures, à 30°C durant 48 heures pour *D. dadantii*, le tout en aérobiose. Le nombre de bactéries est estimé par mesure de la turbidité, exprimée en unité de densité optique à 600 nm (D.O<sub>600nm</sub>), 1 unité de D.O<sub>600nm</sub> correspond à 4,5.10<sup>8</sup> bactéries par mL. Les souches sont conservées à +4° C sur boîtes de Pétri ou à -80°C dans leur milieu de culture additionné de glycérol à 15% final.



## **1.4 Détermination du seuil de toxicité des métaux pour les différentes souches bactériennes et suivi de Luminescence/fluorescence.**

### **1.4.1 Culture liquide en tube**

Des précultures liquides sont effectuées comme précédemment décrit en absence de métaux jusqu'à l'obtention d'une D.O<sub>600nm</sub> de 0,2. Puis des cultures de 5mL sont réalisées en milieu minimum ou milieu riche supplémenté par des concentrations croissantes de métaux. La D.O 600nm est lue après chaque heure de croissance à 30°C (pour *P. putida*) avec agitation pour estimer la croissance bactérienne des différentes souches.

### **1.4.2 Culture liquide en plaque**

Les bactéries sont mises en culture à 30°C sous agitation jusqu'à D.O<sub>600nm</sub>=0,6. Cette culture est utilisée pour inoculer au 1/50<sup>ème</sup> 200µL de milieu en présence ou non de différentes concentrations de métaux dans une microplaque 96 puits. La plaque est placée à 30°C sous agitation 280 rpm durant 24 heures dans l'incubateur du lecteur de microplaque Infinite® 200 PRO – (Tecan). La croissance bactérienne est mesurée toutes les 10 minutes par mesure de la densité optique à 600nm. Si nécessaire, la totalité des photons émis lors de la réaction de bioluminescence ainsi que la fluorescence de la GFP mut3 (excitation à 485 nm et émission à 530 nm) sont mesurées. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de luminescence ou de GFP normalisée par la D.O<sub>600nm</sub>.

## **1.5 Conjugaison sur milieu solide**

Entre 1-100 unités DO de la souche donneuse *E. coli* MFDpir contenant un plasmide d'intérêt et la souche receveuse (*E. coli*, *P. putida* ou *D. dadantii*) sont mélangées et centrifugées 10 min à 5000 g. Les bactéries sont remises en suspension en concentrant 20 fois en milieu 2YT additionné d'acide diaminopimélique. Le mélange est étalé sur boîte GL agar 2X. Après 3h (*P. putida* et *E. coli*) et 16h (*D. dadantii*) d'incubation à 30°C (37°C si un *E. coli* est receveur), les bactéries sont remises en suspension en LB puis la totalité est étalée sur un milieu de sélection approprié.

## 1.6 Construction des bibliothèques de mutants par transposition

La conjugaison est effectuée comme expliqué précédemment avec 100 unités D0 de donneur *E. coli* MFDpir/pSamD\_GM (pour *P. putida*) ou *E. coli* MFDpir/pSam\_EC (Pour *D. dadantii*) et du receveur *P. putida* ou *D. dadantii*. Après incubation du mélange donneur/receveur, un aliquot est dilué et étalé sur LB agar + antibiotique (gentamycine ou kanamycine) pour estimer l'efficacité de la mutagenèse. Le mélange restant est étalé sur LB agar + antibiotique et cultivé pendant 24 h à 30°C. Pour confirmer que les bactéries, qui se sont développées, étaient des souches de *P. putida*/*D. dadantii* avec un transposon inséré mais sans l'insertion du plasmide pSamD\_Gm/ pSam\_EC, nous avons vérifié que toutes les bactéries cultivées étaient Gm<sup>R</sup> (ou Kan<sup>R</sup> pour *D. dadantii*), amp<sup>S</sup> et prototrophes pour le diaminopimelate (DAP) (MFDpir est DAP<sup>-</sup>). Les bactéries ont ensuite été congelées dans 40% de glycérol à -80°C.

## 1.7 Compétitions de souches bactériennes en plaque

Un mutant de *P. putida* et la souche sauvage exprimant la GFPmut3 ont été mélangés à un rapport de 1:1 à DO initial = 0,0125 dans une plaque 96 puits contenant 200µL de LB ou LB+métal. Après 24 heures de croissance à 30°C dans l'incubateur du lecteur de microplaque Infinite® 200 PRO – (Tecan), 5µL des mélanges de culture ont été utilisés pour inoculer une nouvelle plaque de 96 puits et placés dans les mêmes conditions. Après un total de 48 heures de croissance (environ 10 divisions), les bactéries ont été diluées et étalées sur LB agar. Après 48 heures à 30°C, les colonies sauvages et les colonies mutantes ont été comptées sous lumière bleue. Un rapport a ensuite été calculé en divisant le nombre de colonies mutantes par le nombre de colonies sauvages dans chaque condition.

## 1.8 Culture individuelle en plaque 96 puits

Pour discriminer les mutants présentant un défaut de croissance en présence de métaux, le mutant et la souche sauvage à tester ont été inoculés indépendamment en plaque 96 puits en milieu LB et LB + métal à DO initiale= 0,0125 à partir de culture à DO=0,6. La plaque a été placée dans l'incubateur du lecteur de microplaque Infinite® 200 PRO – (Tecan) durant 24h à 30°C. La DO<sub>600nm</sub> a été mesurée toutes les 10 minutes après agitation. Les tests de complémentation ont été réalisés avec le même protocole. Des

concentrations inhibitrices en métaux (cobalt 150  $\mu$ M, cuivre 3,75mM, cadmium 150 $\mu$ M, zinc 1,25mM) ont été utilisées afin de tester une éventuelle sur-résistance des souches complémentées.

## 1.9 Tests d'infection d'endives

Pour déterminer l'indice de compétitivité des mutants de *D. dadantii*, la souche sauvage et le mutant à tester ont été cultivés 16h en milieu M63 + glycérol. Les bactéries ont ensuite été lavées en milieu M63 et la DO<sub>600nm</sub> a été ajustée à 1,0. Les bactéries ont été mélangées dans un rapport de 1:1 et diluées 10 fois. Pour les expériences de complémentation dans la plante, la dilution a été réalisée en milieu M63 avec 1mM de l'acide aminé considéré. 10  $\mu$ L du mélange ont été inoculés dans des feuilles d'endives blessées. La plaie a été recouverte d'huile minérale et les feuilles ont été incubées à 30 °C à une humidité élevée. Après 24 h, le tissu pourri a été collecté, homogénéisé, dilué en M63 et étalé sur LB agar et LB agar + antibiotique. Après 48 h à 30°C, les colonies ont été comptées. L'indice de compétitivité est le rapport (nombre de bactéries mutantes/nombre de bactéries WT) dans le tissu macéré / (nombre de bactéries mutantes/nombre de bactéries WT) dans l'inoculum. Pour les gènes dont l'absence confère un avantage de croissance dans l'endive selon l'expérience Tn-seq, les mutants ont été réalisés dans une souche sauvage. Les autres mutants ont été réalisés dans la souche 3937 Gm<sup>R</sup>.

## II-Méthodes génétiques et de biologie moléculaire

### 2.1 Extraction d'ADN

Les extractions des plasmides en grande et petite quantité, basées sur la technique de lyse alcaline, ont été réalisées avec respectivement les kits NucleoBond, Xtra Midi et Nucleospin Plasmid en suivant les indications du fournisseur. Les extractions d'ADN ont été réalisées avec le kit Wizard Genomic DNA purification (PROMEGA).

## 2.2 Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR permet d'amplifier un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques. Elle repose sur la synthèse enzymatique d'ADN par une ADN polymérase thermostable à partir de deux amorces de polarité opposée complémentaires de chacun des brins à amplifier. Un cycle de synthèse est constitué des trois étapes (ici exemple d'une Taq polymérase):

1. La dénaturation de la matrice ADN par chauffage à 95°C (30 s à 1 min).
2. L'hybridation des amorces réalisée à une température dépendante de la composition en base des oligonucléotides (1 min).
3. L'extension des amorces par l'ADN polymérase est réalisée à 72°C à raison de 1 min par kb recopié, en présence des dNTP.

Une amplification classique comporte 30 cycles, précédée d'une étape de dénaturation de 5 min à 95°C et s'achevant par une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C. La durée d'élongation doit cependant être adaptée en fonction de la taille du fragment à amplifier. Les cycles des chauffages successifs sont assurés par l'appareil Mycycler. Les PCR utilisées pour les différents clonages ont été effectuées avec l'enzyme Primestart (Takara) selon les instructions du fabricant. Les PCR de vérification ont été réalisées à l'aide de la DreamTaq polymérase (ThermoFisher).

## 2.3 Transformation par de l'ADN plasmidique

### 2.3.1 Technique du TSS

Les plasmides sont introduits par choc thermique au cours de la transformation dans les cellules hôtes bactériennes, rendues compétentes par un traitement au tampon de transformation TSS. Un volume de 5 ml de milieu LB estensemencé avec une goutte d'une préculture de la nuit de la souche bactérienne à transformer. Les cellules sont récoltées par centrifugation à une  $DO_{600} \approx 0,3$ , correspondant à  $1,5 \cdot 10^8$  cellules.ml<sup>-1</sup>. Le culot est repris délicatement par 0,1 ml d'une solution de TSS froide (PEG 3350 10 %, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, DMSO 5 %, dans du LB) conservée à 4°C. Les cellules peuvent être utilisées après maintien 30 min au moins dans la glace. Pour la transformation, 0,1 à 1 µg de plasmide est ajouté aux cellules compétentes. Le mélange

est laissé 30 min dans la glace, puis 900 µl de LB sont ajoutés et la culture est incubée à 37°C pendant 1 h minimum pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide. Les cellules sont ensuite étalées sur milieu sélectif approprié et incubées à température adéquate pendant 24 à 48 h.

### ***2.3.2 Electroporation***

La transformation par électroporation permet de faire pénétrer de l'ADN dans une cellule hôte bactérienne par un choc électrique. Afin d'éliminer les sels et d'augmenter la quantité d'ADN à transformer, une étape de dialyse a été réalisée préalablement en déposant l'ADN ligaturé sur un filtre de nitrocellulose de 0,2 µm de porosité au contact d'eau ultrapure. 50µL de cellules électrocompétentes sont placées dans une cuve d'électroporation stérile, refroidie dans la glace puis environ 1ng d'ADN plasmidique est ajouté dans la cuve. L'échantillon d'ADN en contact avec les cellules est soumis à un choc électrique très bref de l'ordre de la milliseconde mais de très forte intensité (résistance de 400Ω, capacité de 25 µFd, voltage de 12500 V.cm<sup>-1</sup>) (Micropulser Biorad). Après l'impulsion électrique, les cellules sont reprises dans 1mL de milieu LB et incubées 1h à 37°C. A la suite de cette culture d'expression, les cellules sont centrifugées et le culot étalé sur milieu sélectif puis incubé à température adéquate pendant 24h à 48h.

## **2.4 Clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur**

### ***2.4.1 Clonage par action d'endonucléase de restriction***

Ces enzymes reconnaissent des séquences palindromiques particulières d'ADN bicaténaire qu'elles clivent. Le clivage peut donner des bords francs ou des extrémités cohésives. Les enzymes sont utilisées à raison de 1 à 5 unités (U) par échantillon (500ng d'ADN) dans les tampons recommandés par le fournisseur. Les coupures sont réalisées pendant 1 à 2h à la température recommandée, en général 37°C.

### ***2.4.2 Purification d'un fragment d'ADN***

Le fragment d'intérêt est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. Le fragment d'ADN est excisé du gel puis purifié par le kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). La purification est basée sur l'absorption différentielle de l'ADN sur colonne de résine

anionique qui retient l'ADN et permet d'éliminer l'agarose, les sels et les impuretés (Vogelstein *et al* 1979). Le fragment est élué par 30 à 50µL de Tris HCL 10mM pH 8,5.

#### **2.4.3 Ligature de fragments d'ADN**

Le fragment d'ADN à insérer et le plasmide sont digérés par les mêmes enzymes de restriction ou par des enzymes de restriction qui génèrent des extrémités compatibles. L'insertion est réalisée au niveau du site de clonage multiple du vecteur. Elle sera possible grâce à la complémentarité de bases résultant de l'utilisation d'enzymes compatibles dans le cas d'extrémités cohésives. La ligature s'opère par l'action d'1 U d'ADN ligase du phage T4 (Invitrogen) créant une liaison phosphodiester entre les extrémités 5' phosphate et 3'hydroxyle en présence d'ATP. Afin d'éviter une recircularisation du vecteur sur lui-même, la proportion optimale entre l'ADN du vecteur et l'ADN à insérer doit être comprise entre 1 pour 3 et 1 pour 10.

#### **2.4.4 Clonage par SLIC [284]**

Le gène à cloner est amplifié par PCR avec des extrémités 5' du fragment amont et à l'extrémité 3' du fragment aval des séquences complémentaires au plasmide receveur (environ 20pb). Après avoir préparé le plasmide receveur en le linéarisant par digestion enzymatique, l'insert et l'ADN plasmidique avec ratio 4:1. 2,25 unités de T4 DNA polymérase (BIOLABS) sont rajoutées au mélange dans un volume final de 10µL. Le mélange réactionnel a été incubé à 25°C pendant 2 minutes et 30 secondes puis placé 10 minutes à 4°C. En ajoutant la T4 DNA polymérase sans ajout de nucléotides, seulement son activité exonucléasique 3' à 5' est activée, ce qui permet de créer des extrémités 5' sortantes sur les deux séquences d'ADN. Ces séquences complémentaires permettent l'hybridation entre l'insert et le plasmide et donc de créer un plasmide contenant la séquence d'intérêt après réparation dans la cellule bactérienne.

### **2.5 Séparation par électrophorèse en gel d'agarose**

Les différents fragments d'ADN, mélangés à une solution de charge (bleu de bromophénol 0,25% xylène cyanol 0,25%, EDTA 25mM, glycérol 50%), sont séparés en fonction de leur masse moléculaire et de leur degré d'enroulement dans un gel d'agarose à 1% préparé en tampon TBE (Tris-Borate 90mM, EDTA 2mM, pH 7,9) contenant du bromure d'éthidium (BET). Un marqueur de taille (DNA Ladder Mass Ruler, Fermentas) est mis à migrer en parallèle des échantillons. La séparation s'effectue en tampon TBE

sous l'influence d'un champ électrique de 5 V.cm<sup>-1</sup>, puis la visualisation se fait sous UV à 312 nm, l'agent intercalant BET provoquant la fluorescence des fragments d'ADN. Une photographie du gel est prise.

## 2.6 Construction des souches mutantes (*Pseudomonas* et *Dickeya*)

Pour créer des mutants de délétion, la méthode de contre-sélection utilisant le gène *sacB* a été utilisée comme décrit par [289]. Dans cette étude, les plasmides pKNG101 (pas de réplication chez *P. putida*) ou pRE112 (pas de réplication chez *D. dadantii*) portant le gène *sacB* et 500bp de la région en amont et en aval du gène à déléter (tableau plasmides) ont été transférés de MFDpir à *P. putida* ou *D. dadantii*. La sélection du premier événement de recombinaison a été effectuée sur LB agar complété par de la streptomycine (pKNG101) ou kanamycine (pRE112). Les transconjugants ont ensuite été étalés sur LB agar - NaCl avec un supplément de saccharose à 5% pour permettre le deuxième événement de recombinaison. Les mutants de délétions ont ensuite été vérifiés par PCR (Dreamtaq polymerase, Thermofisher).

## 2.7 Préparation des bibliothèques Tn-seq

Une fois les cribles réalisés en présence de métal pour *P. putida* ou dans l'endive pour *D. dadantii*, les pools finaux de mutants ont ensuite été aliquotés, centrifugés pour l'élimination du milieu de culture et stockés à -80°C. L'ADN génomique a été extrait. La préparation de l'ADN a été adaptée de Skurnik et al. 2013[259]. Toutes les extractions d'ADN contenu dans un gel ont été effectuées sur révélateur à lumière bleue avec coloration de l'ADN avec du gel green (Biotium) pour éviter les mutations de l'ADN et les cassures double brin. 50 µg d'échantillons d'ADN ont été digérés avec 50 U de *MmeI* dans un volume total de 1,2 mL pendant une heure à 37°C selon les instructions du fabricant, puis inactivés thermiquement pendant 20 minutes à 80°C, purifiés (QIAquick, kit de purification PCR Qiagen) et concentrés à l'aide d'un speedVac jusqu'à un volume final de 25 µL. Les échantillons d'ADN digéré ont migré sur un gel d'agarose à 1 %, la bande de 1,0 à 1,5 kb contenant le transposon et sa bordure (1201 pb d'élément transposable avec 32-34 pb d'ADN génomique) a été découpé et l'ADN a été extrait du gel selon les instructions du fabricant (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Une paire d'oligonucléotides complémentaires monocaténares contenant une séquence unique de



codes à barres de 5nt (LIB\_AdaptT et LIB\_AdaptB) a été mélangée et chauffée à 100°C, puis refroidie lentement dans un bain-marie pour obtenir des adaptateurs à double brin avec des extrémités de deux nucléotides sortantes. 1 µg d'ADN de chaque échantillon a été ligaturé aux adaptateurs (0,44 mM) avec 2000 U de T4 DNA ligase dans un volume final de 50 µL à 16°C pendant la nuit. Cinq réactions PCR identiques du produit de ligature ont été réalisées pour amplifier les bordures de transposon. Une réaction contenait 100 ng d'ADN, 1 unité d'ADN polymérase Q5 (Biolabs), 1X Q5 Buffer, 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM de l'amorce sens (LIB\_PCR\_5, qui s'hybride à la séquence P7 Illumina du transposon) et l'amorce antisens (LIB\_PCR\_3, qui s'hybride à l'adaptateur P5). Seuls 18 cycles ont été effectués pour conserver une amplification proportionnelle de l'ADN. Les échantillons ont été concentrés à l'aide d'un SpeedVac jusqu'à un volume final de 25 µL. L'ADN amplifié a été analysé sur un gel d'agarose à 1,8 % et la bande de 125 pb a été découpée et l'ADN extrait (QIAquick, kit de purification PCR Qiagen). L'ADN a finalement été dialysé (MF-Millipore™ Membrane Filters) pendant 4 heures. Le contrôle de qualité des banques d'ADN Tn-seq (taille des fragments et concentration) et le séquençage à haut débit sur HiSeq 2500 (Illumina) ont été réalisés par MGX (service de séquençage CNRS, Montpellier). Six bibliothèques d'ADN ont été multiplexées sur une ligne de séquençage. Après démultiplexage, le nombre total de *reads* se situait entre 19 et 35 millions.

## III-Analyse bioinformatiques

### 3.1 Alignements de séquences protéiques

Les séquences de protéines sont récupérées dans la base de donnée SWISSPROT. En plus des séquences primaires des protéines, cette base de données permet de déterminer quelques caractéristiques comme le point isoélectrique pI, la composition en acides aminés, la masse moléculaire etc... La recherche de protéines homologues a été effectuée grâce à l'algorithme BLAST disponible sur le site du NCBI. Ce programme permet de comparer des séquences protéiques et génèrent des résultats sous forme de pourcentage de similarité.



### 3.2 Prédiction de topologie protéique

Le serveur Signal P 3.0 permet de rechercher la présence de peptides d'adressage dans les séquences protéiques et indique leur site de clivage probable avec un coefficient de probabilité.

### 3.3 Recherche de domaines protéiques

La recherche de domaines caractéristiques a été effectuée sur la base de données Pfam. L'interrogation de cette banque permet de retrouver les bactéries possédant des protéines contenant ces domaines et potentiellement caractérisés.

### 3.4 Analyses statistiques

Pour déterminer si deux séries de données étaient significativement différentes, le logiciel R a été utilisé. Pour pouvoir utiliser le test  $t$  de student, les conditions d'application ont été vérifiées : le suivi de la normalité à l'aide du test de Shapiro-Wilk et l'égalité des variances à l'aide du test de Fisher-Snedecor. Si la normalité n'était pas respectée, le test de Wilcoxon Mann Whitney a été utilisé. Une étoile a été placée sur les graphiques pour symboliser les significativités statistiques : \*  $p < 0,05$ .

### 3.5 Traitement de données de séquençage

Les *reads* bruts des fichiers fastQ ont d'abord été filtrés à l'aide de cutadapt v1.11 (Martin) et seuls les *reads* contenant la séquence répétée du transposon Mariner (ACAGGGTTGATGATAAGTCCGTCCGGTCTT) ont été gardés et considérés comme de véritables gènes où le transposon s'est inséré. Les *reads* conservés ont ensuite été analysés à l'aide d'une version modifiée du script TPP disponible dans le logiciel TRANSIT v2.0.2 [290]. L'étape d'alignement a été modifiée pour ne sélectionner que les *reads* qui s'alignent à un unique endroit et sans mismatch dans le génome de *P. putida* KT2440 (Genbank AE015451.2) ou *D. dadantii* (Genbank). Ensuite, l'étape de comptage a été modifiée pour compter avec précision les *reads* s'alignant aux sites TA dans le génome de référence. Le nombre de reads par insertion a été normalisé à l'aide de la méthode LOESS décrite par Zomer et al. 2012 [291]. Nous avons ensuite utilisé le logiciel TRANSIT (version 2.0) pour comparer les données Tn-seq.

# C- Résultats

## 1. Présentation du travail de thèse

Mon travail de thèse s'est déroulé dans l'équipe dirigée par Agnès Rodrigue. Cette équipe s'intéresse originellement aux interactions entre les bactéries et les métaux en étudiant plus précisément les systèmes de résistances des bactéries *E. coli* et *P. putida* face à un excès d'ions métalliques. En début de thèse, notre équipe a fusionné avec l'équipe « Fonctionnement de la virulence du phytopathogène *D. dadantii* » s'intéressant au stress de l'enveloppe et aux mécanismes de virulence chez *D. dadantii*. Mon travail de thèse a tenté d'apporter une transversalité sur les sujets portés par les deux équipes originelles.

Durant ces 3 années, afin de conserver une continuité logique des travaux de l'équipe, je me suis tout naturellement intéressé aux stress engendrés par les métaux chez *P. putida* et au stress rencontré en cours d'infection de plante chez *D. dadantii*. Ces stress ont déjà été étudiés à plusieurs reprises chez ces espèces mais très peu par une approche globale. Quelques banques de mutants, peu denses, ont déjà été criblées chez *P. putida* mais jamais chez *D. dadantii*. Afin de caractériser tous les déterminants génétiques nécessaires à la résistance aux stress évoqués chez ces deux espèces, le même outil présenté en introduction, le Tn-seq, a été utilisé.

En début de thèse, mes travaux étaient les seuls à utiliser la technique de Tn-seq sur la souche *P. putida* et sur les phytopathogènes. Depuis peu, le Tn-seq a été utilisé lors de l'étude de stress à des composés aromatiques chez *P. putida* et sur l'étude des gènes importants pour la croissance d'un phytopathogène dans la plante [260]. Ces travaux montrent que le Tn-seq est un bon outil dans l'étude du stress notamment chez nos deux organismes modèles.

Le premier article présenté par la suite porte sur l'étude des gènes indispensables à la croissance de *D. dadantii* dans le modèle endive. Près de 100 gènes essentiels ou importants pour la survie du pathogène dans l'hôte ont été mis en évidence. Parmi eux, de nombreux gènes déjà connus dans la littérature pour leur rôle dans la virulence ont ainsi été révélés, validant notre crible. Cependant, de nombreux gènes dont la fonction dans la virulence n'était pas connue ont aussi été découverts.

Le second article qui est présenté porte sur l'étude du stress métallique chez la bactérie du sol *P. putida*. Cette souche possède de nombreux systèmes de résistance aux métaux. Notre étude a pu mettre en évidence l'implication de gènes dans la résistance aux métaux, dont des gènes de fonction inconnue ainsi que plusieurs régulateurs de réponse qui pourraient participer à de nouvelles voies de résistance au stress métallique jusqu'alors inconnues. Une fois encore, des gènes déjà connus dans la littérature pour être impliqués dans la résistance aux métaux ont été révélés. Les résultats obtenus apportent une vision plus aboutie des mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries.

Une grande partie des gènes de résistance aux stress découverts dans ces deux études ont été validés par une approche ciblée en criblant des mutants de délétion. Bien qu'à première vue éloignée, les mécanismes de réponses au stress métallique et à la réponse de l'hôte peuvent s'entrecroiser tant le rôle des métaux dans les interactions hôte pathogène est important (compétition pour l'acquisition des métaux essentiels et utilisation des métaux par la plante comme agents antimicrobiens) (voir chapitre 2).

## 2. Choix des modèles de micro-organismes

Le choix des modèles de microorganismes s'est porté selon plusieurs critères.

L'étude de la réponse au stress engendré par un excès d'ions métalliques nécessite l'utilisation d'une souche environnementale qui fait face à des fluctuations d'ions métalliques dans son milieu de vie. Pour cela, nous avons décidé d'étudier *Pseudomonas putida*, une bactérie du sol fréquemment isolée de sols pollués par les métaux et autres composés aromatiques.

De manière générale, l'utilisation de l'outil Tn-seq nécessite l'utilisation de souches séquencées et annotées. De plus, les souches remplissant ce critère nécessitent d'être mutagénisables assez facilement afin d'obtenir une banque de mutants la plus dense possible. Pour ces raisons, nous avons sélectionné *P. putida* KT2440, une souche séquencée et annotée, comme moyen d'étude. Elle est de plus facilement manipulable génétiquement : conjugable, transformable par des approches classiques (électroporation), capable de répliquer des plasmides à origine de répllication différente, sensible à plusieurs antibiotiques pour la sélection. Il est aussi facile de créer des

mutants de délétion par le système de contre sélection *sacB*. Enfin, *P. putida* n'est pas pathogène. Pour toutes ces raisons, cette souche est un très bon modèle d'étude pour la recherche de nouveaux mécanismes de résistance aux métaux.

L'étude des gènes indispensables à la croissance chez une plante hôte a été réalisée chez *D. dadantii*, un pathogène de nombreuses plantes d'intérêt économique et émergent en Europe. La souche utilisée est *D. dadantii* 3937, sélectionnée selon les critères précédemment évoqués : séquencée, annotée et facilement manipulable génétiquement. De plus, cette souche est capable d'infecter divers hôtes, ce qui peut être très utile afin de déterminer les facteurs de virulence généraux à différents hôtes dans de futures études.

### 3- Choix de l'outil Tn-seq

Pour vivre dans un environnement aux conditions changeantes, les bactéries possèdent des gènes impliqués dans la résistance à différents stress : pH, osmotique, oxydatif etc... En général, l'expression de ces gènes est activée lorsque le stress est rencontré, ce qui permet leur identification en effectuant un transcriptome ou protéome de la bactérie en absence ou en présence du stress étudié. Néanmoins, nous pensons que les bactéries possèdent également des gènes requis pour la croissance en présence d'un stress mais dont le niveau d'expression reste inchangé. A titre d'exemple, certains produits de ces gènes pourraient être impliqués dans la fabrication de la paroi bactérienne la rendant naturellement et constamment plus imperméable aux ions métalliques. Pour caractériser l'ensemble des déterminants génétiques impliqués dans la résistance à un stress particulier, la transcriptomique et la protéomique sont des techniques limitées. De plus, la nature des gènes impliqués dans la résistance peut être spécifique d'un stress en particulier et comprendre l'ensemble des mécanismes de ces résistances nécessite alors de tester de très nombreuses conditions rendant ce type d'approche fastidieux en absence d'une technique appropriée. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'utiliser l'outil Tn-seq afin de déterminer rapidement et efficacement tous les déterminants génétiques dans plusieurs conditions données. Les gènes sur/sous exprimés ainsi que ceux dont l'expression reste inchangée peuvent être détectés comme importants/essentiels à une condition donnée. Ce crible Tn-seq a permis de rechercher

des mutants incapables de survivre ou de se multiplier en présence de métaux chez *P. putida* ou dans la plante chez *D. dadantii*. Néanmoins cette technique a ses limites et ne permet pas de détecter les gènes essentiels dont les produits seraient utilisables par la communauté bactérienne, comme des sidérophores ou d'autres protéines sécrétées.

# Article 1

## 4.1 Genome Wide Identification Of Bacterial Genes Required For Plant Infection By Tn-Seq

Kevin Royet, Nicolas Parisot, Agnès Rodrigue, Erwan Gueguen and Guy Condemine

Article soumis à Molecular Plant Pathology





## Identification by Tn-seq of *Dickeya dadantii* genes required for survival in chicory plant

Journal:	<i>Molecular Plant Pathology</i>
Manuscript ID	MPP-OA-18-190.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	16-Jul-2018
Complete List of Authors:	ROYET, Kevin; Université Lyon, Villeurbanne, France, Laboratoire MAP CNRS UMR5240; Institut National des Sciences Appliquees de Lyon PARISOT, Nicolas; Institut National des Sciences Appliquees de Lyon, Laboratoire BF2I, INRA UMR0203; Université Lyon, Villeurbanne, France RODRIGUE, Agnes; Université Lyon, Villeurbanne, France, Laboratoire MAP CNRS UMR5240; Institut National des Sciences Appliquees de Lyon Gueguen, Erwan; Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire MAP CNRS UMR5240; Institut National des Sciences Appliquees de Lyon Condemine, Guy; Université Lyon, Villeurbanne, France, Laboratoire MAP CNRS UMR5240; Institut National des Sciences Appliquees de Lyon
Keywords:	<i>Dickeya dadantii</i> , Tn-Seq, soft-rot disease, motility, metabolism, glycosylation, stress



**Full Title:**

**Identification by Tn-seq of *Dickeya dadantii* genes required for survival in chicory plants**

Kévin Royet<sup>1</sup>, Nicolas Parisot<sup>2</sup>, Agnès Rodrigue<sup>1</sup>, Erwan Gueguen<sup>1\*#</sup> and Guy Condemine<sup>1\*</sup>

\* Both authors share co-last authorship

1 Univ Lyon, Université Lyon 1, INSA de Lyon, CNRS UMR 5240 Microbiologie  
Adaptation et Pathogénie, F-69622 Villeurbanne, France.

2 Univ Lyon, INSA-Lyon, INRA, BF2I, UMR0203, F-69621, Villeurbanne, France

# Corresponding author: [erwan.gueguen@univ-lyon1.fr](mailto:erwan.gueguen@univ-lyon1.fr)

**Running head:** *Dickeya dadantii* genes important in planta

**Keywords:** *Dickeya dadantii*, phytopathogen, Tn-Seq; soft-rot disease; chicory; motility, glycosylation, metabolism

Word count: 7266

**Accession numbers.** ENA database accession, PRJEB20574.

## Author summary

Identification of the virulence factors of plant pathogenic bacteria has relied on the test of individual mutants on plants, a time-consuming process. Tn-seq is a very powerful method for identifying those genes required for bacterial growth in their host. We used this method in a soft-rot pathogenic bacterium to identify the genes required for the multiplication of *Dickeya dadantii* in chicory. About 100 genes were identified showing decreased or increased fitness in the plant. Most of them had no previously attributed role in plant-bacteria interaction. Following our screening, *in planta* competition assays confirmed that the uridine monophosphate biosynthesis pathway and the purine biosynthesis pathway are essential to the survival of *Dickeya dadantii* in the plant since the mutants  $\Delta carA$ ,  $\Delta purF$ ,  $\Delta purL$ ,  $\Delta guaB$  and  $\Delta pyrE$  are unable to survive in the plant in contrast to the WT bacterium. This study also demonstrates that the biosynthetic pathways of leucine, cysteine and lysine are essential for bacterial survival in the plant and that RsmC and GcpA are important in regulating the infection process since the mutants  $\Delta rsmC$  and  $\Delta gcpA$  are hypervirulent. Finally, our study shows that *D. dadantii* flagellin is glycosylated and that this modification confers fitness to the bacteria during plant infection. Assay by this method of large collections of environmental pathogenic strains now available will allow an easy and rapid identification of new virulence factors.

## Introduction

*Dickeya* are broad-host range phytopathogenic bacteria belonging to the Pectobacteriaceae family (Adeolu *et al.*, 2016) that provoke the soft rot disease on many plant species. They are the cause of considerable losses of economically important crops such as potato, chicory and ornamentals. Studies and identification of the virulence factors of these bacteria have been mostly performed on the model strain *D. dadantii* 3937 and they have

focused mainly on three aspects known to be important for disease development: plant cell wall degrading enzymes, the type III secretion system and iron metabolism (Charkowski *et al.*, 2012). Secretion of plant cell wall degrading enzymes has long been identified as the main bacterial virulence factor. Many studies have focused on the identification and characterization of these secreted enzymes, mostly pectinases (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996), of the regulators controlling their production (*kdgR*, *pecS*, *pecT*, *hns*, *gacA*), (Condemine & Robert-Baudouy, 1991, Reverchon *et al.*, 1994, Surgey *et al.*, 1996, Nasser *et al.*, 2001, Lebeau *et al.*, 2008) of the genes whose expression is coregulated with that of the secreted enzyme genes (Condemine *et al.*, 1999, Reverchon *et al.*, 2002), and of the mechanism of their secretion by the type II secretion system (Condemine *et al.*, 1992). Although of less importance for *Dickeya* virulence, the same type of approach has been used to identify type III secretion system regulators and effectors (Yang *et al.*, 2002); (Li *et al.*, 2015); (Yang *et al.*, 2010). Moreover, the struggle for iron within the plant is strong. *D. dadantii* acquires this metal through the production of two siderophores, chrysobactin and achromobactin (Franza *et al.*, 2005, Franza *et al.*, 1999, Franza & Expert, 1991). Omics approaches have also been used to identify genes whose expression is induced during plant infection (Okinaka *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2004, Chapelle *et al.*, 2015). These studies now provide a clearer picture of the complex network of factors required for *D. dadantii* virulence (Charkowski *et al.*, 2012, Reverchon *et al.*, 2016). However, these methods may have missed some important factors not targeted by the analyses such as the genes of metabolism constantly expressed at the same level but nevertheless essential to the survival of the bacterium in the plant. Libraries of transposon-induced mutants were tested on plants to find mutants showing reduced virulence with *Pectobacterium carotovorum* and *atrosepticum*, two other soft rot enterobacteria (Hinton *et al.*, 1989, Pirhonen *et al.*, 1991, Lee *et al.*, 2013). These studies identified pyrimidine, purine, leucine or serine auxotrophs and mutants

defective in the production or secretion of exoenzymes and in motility. Other mutants with a more complex phenotype were not characterized at this time. Moreover, the number of tested mutants was limited by the necessity to test each mutant individually on the plant. This type of work has never been performed on *Dickeya* strains. To acquire a more complete view of the genes required for the virulence of *Dickeya*, we used a high-throughput sequencing of a saturated transposon library (Tn-seq) to screen tens of thousands of random insertion mutants of *D. dadantii* in a laboratory medium and during infection of chicory. Tn-Seq involves creating large transposon libraries, growing the mutants in a control and in a selective condition, sequencing the transposon insertion sites with next-generation sequencing, mapping sequence reads to a reference genome and comparing the number of read in each gene in the two conditions. Tn-seq has been extensively used to reveal the essential genes required for mouse colonization by human pathogens *Vibrio cholerae* (Fu *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (Skurnik *et al.*, 2013) and *Streptococcus pneumoniae* (van Opijnen & Camilli, 2012), or plant root colonization by *Pseudomonas simiae* (Cole *et al.*, 2017) and multiplication of *Pantoea stewartii* in corn xylem (Duong *et al.*, 2018). This latter bacterium relies on the massive production of exopolysaccharides to block water transport and cause wilting. Thus, Tn-seq is a very powerful method for identifying the genes required for bacterial growth in their host. By applying this technique to screen a *D. dadantii* mutant library in chicory, we have identified metabolic pathways and bacterial genes required by a necrotrophic bacteria for growth *in planta*. Among them, we found a cluster of genes required for flagellin glycosylation, a modification known to be important for virulence in several plant pathogenic bacteria.

## Results and discussion

## Characterization of *D. dadantii* 3937 *HimarI* transposon library

Many tools are available for performing Tn-seq (van Opijnen & Camilli, 2013). For the Tn-seq experiment with *D. dadantii* 3937, we used a *Himar9* mariner transposon derivative carrying MmeI restriction sites in the inverted repeats (IR) and a kanamycin resistance cassette between the IRs (Wiles *et al.*, 2013). We carried out a biparental mating between *E. coli* and *D. dadantii* on M63 agar medium without a carbon source and or amino acids. We obtained approximately 300 000 colonies that were then pooled. Subsequent DNA sequencing (see below) showed the presence of transposon insertions in amino acid, vitamin, purine or pyrimidine biosynthesis pathways, demonstrating that mating on M63 minimal medium does not prevent the obtention of auxotroph mutants. To identify the essential genes, mutants were grown in LB medium for 10 generations. Two DNA libraries were prepared from two cultures and subjected to high-throughput sequencing. The mariner transposon inserts into TA dinucleotides. The TPP software (DeJesus *et al.*, 2015) was used to determine the number of reads at each TA site for each biological replicate. The *D. dadantii* genome has 171,791 TA sites that can be targeted by the *Himar9* transposase. Pairs of biological replicates were compared. 37,794 and 48,101 unique insertions in TAs were detected in each sample, which corresponds to 22 and 28% density of insertion respectively (Table 1). The average number of reads per TA was 88 and 75, respectively. The results were reproducible with a Pearson correlation coefficient of 72% (Fig. 1A). The location of the unique insertions showed an even distribution around the chromosome (Fig. 1C). For each gene, we calculated a log<sub>2</sub> fold change (FC) corresponding to the ratio between the measured number of reads and the expected number of reads. The density plot (Fig. 1D) indicates that essential and non-essential genes are easily distinguishable, confirming the good quality of our Tn-seq libraries.

Next, gene essentiality of the Tn-seq input libraries was determined using the TRANSIT software (DeJesus et al., 2015). We decided to use the Hidden Markov Model (HMM) which predicts essentiality and non-essentiality for individual insertion sites since it has been shown to give good prediction in datasets with a density as low as 20% (DeJesus et al., 2015). The HMM analysis led to the identification of 665 genes essential for growth in LB (ES), representing 14% of the genes of *D. dadantii* 3937. The transposon we used does not allow us to distinguish between either a direct effect of the insertion or a polar effect on the downstream genes. Goodall *et al.* (Goodall *et al.*, 2018) have shown that this technique overestimates the number of essential genes. Thus 665 must be considered as a maximum number of essential genes. 552 genes were categorized as Growth Defect genes (GD, i.e. mutations in these genes lead to a loss of fitness), 129 as growth advantage genes (GA, i.e. mutations in these genes lead to a gain of fitness) and 3319 as non-essential genes (NE) (Fig. 1D and Table S1).

**Genes necessary for chicory leaf maceration.** We used chicory leaf infection as a model to identify the *D. dadantii* genes required for growth in plant tissues. Biological duplicates were performed to insure the reproducibility of the results. Each chicory plant was inoculated with  $10^7$  bacteria from the mutant pool and after 2 days more than  $10^{10}$  bacteria (which represents 10 generations) were collected from the rotten tissue. Sequencing transposon insertion sites in these bacteria followed by the TPP analysis indicated a density of unique insertion in TAs comparable to that of the input datasets (23-24%). Surprisingly, the results were more highly reproducible than in LB with a very high Pearson correlation coefficient of 98% (Fig. 1B). No bottleneck effect was observed since we observe a strong correlation between our biological duplicates. This can be explained by the fact that  $10^7$  bacteria are injected directly into the injured tissue. Since we detected 37,794 and 48,101 unique insertions in TAs in LB,

all the mutants should be present within the leaf at the beginning of the infection.

In order to test the statistical significance of the identified genes conferring to *D. dadantii* a loss or a gain of fitness *in planta*, we performed the RESAMPLING (permutation test) analysis of the TRANSIT software. The RESAMPLING method is a variation of the classical permutation test in statistics that sums the reads at all TA sites for each gene in each condition. It then calculates the difference of the sum of read-counts between the input (LB) and the output (chicory) datasets. The advantage of this statistical method is to attribute for each gene an adjusted p-value (q-value). Genes with a significant difference between total read-counts in LB and chicory achieve a q-value  $\leq 0.05$ . The method also calculates a log<sub>2</sub> fold-change (log<sub>2</sub>FC) for each gene based on the ratio of the sum of read counts in the output datasets (chicory) versus the sum of read counts in the input (LB) datasets (DeJesus et al., 2015). Applied to our Tn-seq datasets and selecting only genes achieving a FDR adjusted p-value (q-value)  $\leq 0.05$ , we identified 122 genes out of 4666 required for fitness *in planta*, as shown with the volcano plot of RESAMPLING results comparing the replicates grown in LB versus those *in planta* (Fig. S1). For these 122 genes, we applied an additional cutoff by removing 20 genes with a mean read count in LB  $<5$  (less than 5 reads on average / TA). These 20 genes were categorized as ES or GD in LB. We also removed from the analysis 6 genes with a log<sub>2</sub>FC comprised between -2 and 2. By applying all these criteria, we retained only 96 genes for a further analysis (Table 2). 92 of them were identified as GD genes in the chicory (log<sub>2</sub>FC  $\leq 2$ ), and the remaining 4 as GA genes in the chicory (log<sub>2</sub>FC  $\geq 2$ ). A possible polar effect for genes constituting part of an operon was investigated (Table 2): if a GD gene is upstream of another GD gene in the same operon, a polar effect of insertions in the first gene on the second one cannot be excluded. Some of these genes, shown in bold in Table 2, were already known to play a role in *D. dadantii* virulence, confirming the validity of the Tn-

seq approach. Using the *Dickeya dadantii* 3937 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways database (KEGG) (Ogata *et al.*, 1999), we discovered that certain metabolic pathways and biological functions are very important for growth in chicory (Table S2). We highlighted some of these in the subsequent sections of this article.

## **Analysis of the genes of *D. dadantii* required for plant colonization.**

**(i) Metabolism.** Chicory plants appear to provide conditions in which amino acids, nucleic acids and some vitamins (pyridoxal) are scarce. Of the 92 genes identified as GD genes *in planta*, 8 are involved in purine and 7 in pyrimidine metabolism (Table S2). In the purine metabolism pathway, the inosine monophosphate (IMP) biosynthesis pathway that produces IMP from L-glutamine and 5-phosphoribosyl diphosphate is particularly important for *D. dadantii* *in planta* since 5 out of the 10 genes of this pathway are significant GD genes *in planta* (Fig. 2). IMP is the precursor of adenine and guanine and IMP can be converted into xanthosine 5'-phosphate (XMP) by the IMP dehydrogenase GuaB. The *guaB* gene is also a GD gene *in planta*, with a strong log<sub>2</sub>FC of -10.06 (Fig. 2). In pyrimidine synthesis, the uridine monophosphate (UMP) biosynthesis pathway that converts L-glutamine to UMP, a precursor of uracyl, is very important *in planta* since *carAB*, *pyrB*, *pyrC* and *pyrE*, involved in this enzymatic pathway, are all required for growth *in planta* (Fig. 2). This pyrimidine biosynthesis pathway is specific to bacteria. It is noteworthy that in the human pathogen *S. pneumoniae*, mutants of this pathway have a fitness defect in the nasopharynx of infected mice (van Opijnen & Camilli, 2012). Hence, it seems that the pyrimidine biosynthesis pathway is particularly important for the multiplication of some bacterial species in the host. Mutants in genes involved in the synthesis of sulfur-containing amino acids (*cysIJQ*, *metB*), lysine (*lysA*) and leucine (*leuABC*) are disadvantaged in chicory (Table 2 and Fig. S2). These amino acids are known to be present in low concentration in plant tissues (Azevedo *et al.*,



1997). Other amino acids seem to be present in sufficient quantities for the growth of *D. dadantii* auxotrophs. A low level of certain amino acids probably induces a stringent response in the bacteria. Reduced growth in the plant of the *relA* mutant, unable to synthesize the alarmone ppGpp, supports this hypothesis. Glucose is the main sugar in plant tissue, present as a circulating sugar or a cellulose degradation product. Mutants in the PTS glucose transport system genes *ptsI* and *ptsG* showed a reduced growth in bacteria (Table 2) indicating their importance as a carbon source *in planta*.

Degradation of cell wall pectin by a battery of extracellular enzymes is the main determinant of *Dickeya* pathogenicity. Mutants unable to produce or to secrete these enzymes by the type II secretion system were not disadvantaged in chicory since these mutants could use for their growth the pectin degradation compounds produced by enzymes secreted by other bacteria. The redundancy of oligogalacturonate specific porins (KdgM and KdgN) and inner membrane transporters (TogT and TogMNABC) allows entry of these compounds into the bacteria even in a mutant in one of these transport systems. However, *kduI* mutants, blocked in the intracellular part of the pectin degradation pathway, have limited growth *in planta*, confirming the importance of the pectin degradation pathway in the disease progression.

**(ii) Stress resistance.** Plants are an hostile environment for the bacteria having to cope with antimicrobial peptides, ROS, toxic compounds and acidic pH (Reverchon & Nasser, 2013). We observed that the pump AcrABTolC, that can efflux a wide range of compounds (Ravirala *et al.*, 2007), is important for survival in chicory (Fig. S2). Stress can lead to the accumulation of phospholipids in the outer membrane. This accumulation makes the bacteria more sensitive to small toxic molecules (Malinverni & Silhavy, 2009). This phospholipid accumulation probably occurs when the bacteria infect chicory since *mlaC* and *mlaF* mutants, which are unable to transport phospholipid from the outer to the inner membrane, have a reduced growth in plant. The production of exopolysaccharides (EPS) has been shown to

protect the bacteria during the first steps of infection (Condemine et al., 1999). We observed that *rffG* and *wzx* mutants unable to synthesize EPS have a growth defect in chicory. A set of genes required to repair or degrade altered proteins (*clpA*, *degQ*, *trxB*) is also important for survival *in planta*. No gene directly involved in the detoxification of ROS was detected in our analysis. However, ROS can create DNA damage. The two helicases involved in DNA repair, UvrD and HelD, give growth advantage in plant. Osmoregulated periplasmic glycans (OPG) are polymers of glucose found in the periplasm of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -proteobacteria. Their exact role is unknown but their absence leads to avirulence in certain bacteria such as *D. dadantii* (Page et al., 2001). This absence induces a membrane stress that is sensed and transduced by the Rcs envelope stress response system. This system controls the expression of many genes, including those involved in motility and those encoding plant cell wall degrading enzymes through the RsmA-RsmB system (Bouchart et al., 2010, Madec et al., 2014, Wu et al., 2014). Thus, mutants defective in OPG synthesis are expected to have reduced virulence. Indeed, in our experiment, mutants in the two genes involved in OPG synthesis, *opgG* and *opgH* were non competitive in chicory (Table 2).

**(iii) Iron uptake.** *D. dadantii* produces two types of siderophores, achromobactin and chrysobactin, that are required for the development of maceration symptoms in the iron-limited environment of plant hosts (Franza & Expert, 2013). Once the iron is loaded, the siderophores are imported into the bacteria. Import through the outer membrane requires a specific outer membrane channel and the energy transducing complex formed by TonB ExbB and ExbD. While the absence of synthesis of one of the siderophores can be compensated for by the presence of siderophore secreted by other bacteria in the growth medium, mutants of the TonB complex are totally unable to acquire iron and thus are unable to grow in the plant. Consequently, *tonB* was essential in chicory while the genes coding for siderophore synthesis

or secretion were not. Similarly a mutant devoid of the iron-loaded chrysobactin transport gene (*fct*) is non-competitive.

**(iv) Regulation.** Mutants in several genes controlling virulence factor production show a growth defect in the plant. The master regulator FlhDC acts as a regulator of both flagella and virulence factor synthesis in many bacteria such as *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* and *Ralstonia solanacearum* (Tans-Kersten *et al.*, 2004, Jozwick *et al.*, 2016, Xu *et al.*, 2014). In *D. dadantii* FlhDC has recently been shown to control, in addition to flagellar motility, a type III secretion system and virulence factor synthesis through several pathways (Yuan *et al.*, 2015). We observed that *flhC* gives a certain growth advantage in chicory. In addition, we discovered that some genes regulating *flhDC* in other bacteria regulate *D. dadantii* virulence, probably by controlling *flhDC* expression. *rsmC* is a poorly characterized gene in *D. dadantii* but it has been studied in *Pectobacterium carotovorum*. It negatively controls motility and extracellular enzyme production through modulating the transcriptional activity of FlhCD (Chatterjee *et al.*, 2009). HdfR is a poorly characterized LysR family regulator that controls the *std* fimbrial operon in *S. enterica* and FlhDC expression in *E. coli* (Ko & Park, 2000). *rsmC* mutants were overrepresented in the chicory (Fig. S2), indicating an increase in virulence for these mutants. *hdfR* conferred fitness benefits during growth in chicory and could also act in *D. dadantii* as activator of *flhDC* expression.

The GGDEF proteins are c-di-GMP synthase and their genes are often located next to their cognate EAL diguanylate phosphodiesterase gene. *ecpC* (*yhjH*) encodes an EAL protein that has been shown to activate virulence factor production in *D. dadantii* (Yi *et al.*, 2010). *gcpA*, which is located next to *ecpC* encodes a GGDEF protein. The role of *gcpA* in *D. dadantii* virulence has recently been described (Yuan *et al.*, 2018). We observed that *gcpA* mutants (Dda\_03858) were overrepresented in chicory (Table 2). This increased virulence, with an

opposite phenotype to the one described for the *ecpC* mutants, indicates that overproduction of c-di-GMP could reduce *D. dadantii* virulence.

Of the eighteen regulators of the LacI family present in *D. dadantii*, four of them were found to be involved in plant infection (Van Gijsegem *et al.*, 2008). One of those, LfcR, which has been found to play a major role in the infection of chicory, Saintpaulia and *Arabidopsis*, was seen to be important for chicory infection in our experiment. LfcR is a repressor of adjacent the genes (Van Gijsegem *et al.*, 2008). Surprisingly none of these genes appeared to play a role in chicory infection suggesting that there are other targets of LfcR that remain to be discovered.

Finally, it is worth mentioning that the *ackA* and *pta* genes are GD *in planta*. These genes constitute the reversible Pta-AckA pathway. The steady-state concentration of acetyl-phosphate (acetyl-P), a signaling molecule in bacteria, depends upon the rate of its formation catalyzed by Pta and of its degradation catalyzed by AckA (Wolfe, 2005). The GD phenotype of *D. dadantii* *ackA* and *pta* mutants during infection suggests that acetyl-P might play a crucial signaling role in the adaptation of *D. dadantii* to the plant tissue.

**(v) Motility.** Motility is an essential virulence factor of *D. dadantii* necessary for the bacteria to move across the surface of the leaf, to enter the wounds and to propagate within the plant tissue (Antunez-Lamas *et al.*, 2009, Rio-Alvarez *et al.*, 2015, Jahn *et al.*, 2008). Accordingly, all the genes required for flagella synthesis, the flagella motor and the genes regulating their synthesis (*flhC*, *flhD*, *fliA*) (see above) are necessary for fitness during chicory infection (Fig. S2). All the genes responsible for the transduction of the chemotaxis signal (*cheA*, *B*, *R*, *W*, *X*, *Y* and *Z*) also confer benefits *in planta* (Table 2). No methyl-accepting chemoreceptor gene mutant was found. Like other environmental bacteria, *D. dadantii* encodes many such proteins (47). They probably have a certain some redundancy in the recognized signal which prevented their detection in our screen.

297

#### 298 ***D. dadantii* flagellin is modified by glycosylation**

299 A group of six genes located between *fliA* and *fliC* retained our interest since insertions in one  
300 of these genes led to a growth defect in chicory (Fig. 3A). This effect does not result from  
301 insertions in the first gene of the group since they are not expressed in operon (Jiang *et al.*,  
302 2016). Dda3937\_03424 encodes an O-linked N-acetylglucosamine transferase and  
303 Dda3937\_03419 encodes a protein with a nucleotide diphospho sugar transferase predicted  
304 activity. The others could be involved in the modification of sugars (predicted function of  
305 Dda3937\_03423: nucleotide sugar transaminase, Dda3937\_03422: carbamoyl phosphate  
306 synthase, Dda3937\_03421: oxidoreductase; Dda3937\_03420: methyltransferase). Their  
307 location led us to suppose that this group of genes could be involved in flagellin  
308 glycosylation. Analysis by SDS-PAGE of FliC produced by the wild type, and mutants in the  
309 two glycosyltransferase genes Dda3937\_03424 and Dda3937\_03419, revealed that in the two  
310 latter strains the molecular weight of the protein diminished (Fig. 3B). The molecular weight  
311 determined by mass spectroscopy was 28,890 Da for FliC<sub>A4277</sub>, 31,034 Da for FliC<sub>A3422</sub> and  
312 32170 Da for the WT FliC. Thus, the presence in the gene cluster of two glycosyltransferases  
313 let suppose that in the wild type strain FliC is modified by multiple glycosylation with a  
314 disaccharide. The absence of any modification did not affect *D. dadantii* motility (data not  
315 shown). The flagellin of the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* and  
316 *Burkholderia cenocepacia* are also glycosylated and the absence of this modification lowered  
317 the ability of these bacteria to cause disease on tobacco and *Arabidopsis*, respectively  
318 (Taguchi *et al.*, 2010, Khodai-Kalaki *et al.*, 2015). Accordingly, in *D. dadantii*, FliC  
319 modification appears to be important for multiplication of the bacteria in the plant (Fig. 3C).

320

#### 321 **Validation of the Tn-seq results.**

To validate the Tn-seq results, we performed coinoculation experiments in chicory leaves with the wild type strain and various mutants in GA genes (*gcpA* and *rsmC*) or GD genes (*hdfR*, *clpSA*, *metB*, *flhDC*, *purF*, *cysJ*, *degQ*, *pyrE*, *carA*, *leuA*, *guaB*, *purL*, *lysA*) in a 1/1 ratio. We calculated a competitive index (CI) by counting the number of each type of bacteria in the rotten tissue after 24 h. We confirmed the ability of the  $\Delta rsmC$  and  $\Delta gcpA$  to overgrow the wild type strain. On the other hand, the wild type strain overgrew the other in frame deletion mutants that were tested (Fig. 4). The lowest competitive indexes were observed with the mutants in biosynthetic pathways such as  $\Delta leuA$ ,  $\Delta guaB$ ,  $\Delta purL$ ,  $\Delta lysA$ . Amino acid auxotroph mutants (Cys<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup> and Lys<sup>-</sup>) tested in coinoculation experiments could be phenotypically complemented *in planta*. Addition of both the non-synthesized amino acid and the auxotroph mutant to the wound totally or almost completely suppressed the growth defect of the auxotroph mutant *in planta* (Fig. 5) confirming the low availability of certain amino acids in chicory. These results confirmed that Tn-seq is a reliable technique to identify genes involved in plant colonization.

## Conclusion

This Tn-seq experiment highlights some new factors required for *D. dadantii* the successful rotting of chicory by *D. dadantii*. Many genes known to be important for pathogenesis were not found in this screen because their products are secreted and can be shared with other strains in the community. This includes all the proteins secreted by the type II secretion system and small molecules such as siderophores and butanediol. Other categories of genes, for example those involved in response to acidic or oxidative stresses were not found. Hence, chicory has been described as an inadequate model for studying the response of *D. dadantii* to oxidative stress (Santos *et al.*, 2001). Similarly, the type III *hrp* genes were not identified in our study. The Hrp system is not always required for *D. dadantii* virulence and in our

347 experimental conditions (high inoculum on isolated chicory leaves) the necrotrophic  
348 capacities of *D. dadantii* (production of plant cell wall degrading enzymes) are probably  
349 sufficient on their own to provoke the disease. Our results also reveal some previously  
350 unknown aspects of the infection process. The struggle between plant and bacterial pathogens  
351 for iron supply has been well described. However, a competition for amino acids and nucleic  
352 acid also seems to occur in the plant. The level of nucleic acids and of the cysteine, leucine,  
353 methionine, threonine and isoleucine amino acids is too low in chicory to allow an efficient  
354 multiplication of bacteria defective in their biosynthesis. *Pectobacterium carotovorum* subsp.  
355 *carotovorum* Pcc21 appears to encounter almost the same conditions of nutrient deprivation  
356 when infecting Chinese cabbage (Hinton et al., 1989, Pirhonen et al., 1991, Lee et al., 2013).  
357 Some enzymatic steps involved in their synthesis are specific to bacteria and fungi. Thus,  
358 they could constitute good targets for the development of specific inhibitors (Thangavelu *et*  
359 *al.*, 2015) to prevent *D. dadantii* infections. Regulation of *D. dadantii* virulence has been  
360 extensively studied (Charkowski et al., 2012, Reverchon et al., 2016). However, new  
361 regulatory genes were also detected in this study. For example an orphan LuxR family  
362 regulator seems to play an important role in virulence. New members of the FlhDC regulation  
363 pathway were also detected. A few genes of unknown function remain to be studied.

364 *D. dadantii* can infect dozens of plants. In addition to chicory, *D. dadantii* virulence tests are  
365 usually performed on potato plants, tubers or slices, *Arabidopsis thaliana*, saintpaulia and  
366 celery. The metabolic status or reaction defenses of these model plants are all different and  
367 the bacterial genes required for a successful infection will probably differ in each model.  
368 Testing several of them would reveal the full virulence repertoire of the bacteria.

369 While Tn-seq has been used to study genes required for the infection of animals, there has  
370 been no genome-wide study of the factors necessary for a necrotrophic plant pathogen to  
371 develop and provoke disease on a plant. In addition to the genes of known function described



in the Results section, this study identified of several genes of unknown function required for chicory rotting. Repetition of these experiments with other strains and on other plants will clarified whether these genes encode strain or host-specific virulence factors.

## Methods

**Bacterial strains and growth conditions.** Bacterial strains, phages, plasmids and oligonucleotides used in this study are described in Tables S3 to S5. *D. dadantii* and *E. coli* cells were grown at 30 and 37°C respectively in LB medium or M63 minimal medium supplemented with glycerol (2 g/L). When required antibiotics were added at the following concentration: ampicillin, 100 µg/L, kanamycin and chloramphenicol, 25 µg/L. Media were solidified with 1.5 g/L agar. Transduction with phage PhiEC2 was performed according to (Résibois *et al.*, 1984).

## Construction of the transposon library

Five mL of an overnight culture of *D. dadantii* strain A350 and of *E. coli* MFDpir/pSamEC were mixed and centrifuged for 2 min at 6000 g. The bacteria were resuspended in 1 mL of M63 medium and spread onto a 0.45 µm cellulose acetate filter placed on a M63 medium agar plate. After 8h, bacteria were resuspended in 1 mL M63 medium. An aliquot was diluted and spread onto LB agar + kanamycin plates to estimate the efficiency of mutagenesis. The remaining culture was inoculated in 100 mL of LB medium + kanamycin and grown for 24 h at 30°C. To confirm that the bacteria that grew were *D. dadantii* strains with a transposon but without plasmid pSamEC, we checked that all the grown bacteria were kan<sup>R</sup>, amp<sup>S</sup> and diaminopimelate (DAP) prototrophs (MFDpir is DAP<sup>-</sup>). The bacteria were frozen in 40% glycerol at -80°C and they represent a library of about 300 000 mutants.



## **DNA preparation for high-throughput sequencing**

An aliquot of the mutant library was grown overnight in LB medium + kanamycin. To identify the essential genes in LB, the culture was diluted 1000-fold in LB and grown for 6 h. To infect chicory, the overnight culture was centrifuged and resuspended at  $OD_{600} = 1$  in M63 medium. Chicories, bought at a local grocery store, were cut in half, inoculated with 10  $\mu$ L of this bacterial suspension and incubated at 30°C with maximum moisture. After 60 h, the rotten tissue was collected and filtered through a cheese cloth. The bacteria were collected by centrifugation and washed twice in M63 medium. DNA was extracted from 1.5 mL aliquots of bacterial suspension adjusted to  $OD_{600} 1.5$  with the Promega Wizard Genomic DNA purification kit. The subsequent steps of the DNA preparation methods were adapted from Skurnik et al., 2013 (Skurnik et al., 2013). All DNA gel-extractions were performed onto a blue-light transilluminator of DNA stained with gel-green (Biotium) to avoid DNA mutation and double-stranded breaks. 50  $\mu$ g of DNA samples were digested with 50 U MmeI in a total volume of 1.2 mL for one hour at 37°C according to the manufacturer's instructions, then heat-inactivated for 20 minutes at 80°C, purified (QIAquick, PCR purification kit Qiagen) and concentrated using a vacuum concentrator to a final volume of 25  $\mu$ L. Digested DNA samples were run on a 1% agarose gel, the 1.0–1.5 kb band containing the transposon and adjacent DNA was cut out and DNA was extracted from the gel according to the manufacturer's instructions (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen). This allowed recovery of all the fragments containing genomic DNA adjacent to the transposons (1201 bp of transposable element with 32-34 bp of genomic DNA). A pair of single-stranded complementary oligonucleotides containing a unique 5-nt barcode sequence (LIB\_AdaptT and LIB\_AdaptB) was mixed and heated to 100°C, then slowly cooled down in a water bath to obtain double-stranded adaptors with two-nucleotide overhangs. 1  $\mu$ g DNA of each sample was ligated to the barcoded adaptors (0.44 mM) with 2000 U T4 DNA ligase in a final

volume of 50  $\mu$ L at 16°C overnight. Five identical PCR reactions from the ligation product were performed to amplify the transposon adjacent DNA. One reaction contained 100 ng of DNA, 1 unit of Q5 DNA polymerase (Biolabs), 1X Q5 Buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.4  $\mu$ M of the forward primer (LIB\_PCR\_5, which anneals to the P7 Illumina sequence of the transposon) and the reverse primer (LIB\_PCR\_3, which anneals to the P5 adaptor). Only 18 cycles were performed to keep a proportional amplification of the DNA. Samples were concentrated using a vacuum concentrator to a final volume of 25  $\mu$ L. Amplified DNA was run on a 1.8% agarose gel, the 125 bp band was cut-out and gel extracted (QIAquick, PCR purification kit Qiagen). DNA was finally dialysed (MF-Millipore™ Membrane Filters) for 4 hours. Quality control of the Tn-seq DNA libraries (size of the fragments and concentration) and High-throughput sequencing on HiSeq 2500 (Illumina) was performed by MGX (CNRS sequencing service, Montpellier). After demultiplexing, the total number of reads was between 18 and 31 millions (Table 1).

#### **Bioinformatics analysis:**

Differences in sequencing yields between samples were normalized by randomly subsampling each sample (i.e. rarefaction) to the lowest sequencing yield (the chicory #1 sample with 18,748,028 reads). Raw reads from the fastQ files were first filtered using cutadapt v1.11 (Martin, 2011) and only reads containing the *mariner* inverted left repeat (ACAGGTTGGATGATAAGTCCCCGGTCTT) were trimmed and considered *bona fide* transposon-disrupted genes. Trimmed reads were then analyzed using a modified version of the TPP script available from the TRANSIT software v2.0.2 (DeJesus et al., 2015). The mapping step was modified to select only those reads mapping uniquely and without mismatch in the *D. dadantii* 3937 genome (Genbank CP002038.1). Then, the counting step was modified to accurately count the reads mapping to each TA site in the reference genome

according to the Tn-seq protocol used in this study. Read counts per insertion were normalized using the LOESS method as described in (Zomer *et al.*, 2012). Finally we used the TRANSIT software (version 2.0) to compare the Tn-seq datasets.

**Strain construction.** To construct the A4277 strain, gene Dda3937\_03424 was amplified with the oligonucleotides 19732+ and 19732-. The resulting fragment was inserted into the pGEM-T plasmid (Promega). A *uidA*-kan<sup>R</sup> cassette (Bardonnet & Blanco, 1991) was inserted into the unique AgeI site of the fragment. The construct was recombined into the *D. dadantii* chromosome according to (Roeder & Collmer, 1985). Recombination was checked by PCR. To construct the in-frame deletion mutants, the counter-selection method using the *sacB* gene was used (Link *et al.*, 1997). The suicide pRE112 plasmid containing 500 bp of upstream and downstream DNA of the gene to be deleted was transferred by conjugation from the *E. coli* *MFDpir* strain into *D. dadantii* 3937. Selection of the first event of recombination was performed on LB agar supplemented with chloramphenicol at 30 µg/L. Transconjugants were then spread on LB agar without NaCl and supplemented with 5 % sucrose to allow the second event of recombination. In-frame deletions were checked by auxotrophy analysis and/or by PCR (Dreamtaq polymerase, Thermofisher). In order to discriminate mutants from the wild strain during coinoculation experiments, a Gm<sup>R</sup> derivative of the WT strain was constructed by insertion of the mini-Tn7-Gm into the *attTn7* site (close to the *glmS* gene) (Zobel *et al.*, 2015). A 3937 Gm<sup>R</sup> strain was made by coelectroporation of pTn7-M (Zobel *et al.*, 2015) and pTnS3 (Choi *et al.*, 2008) plasmids into the *D. dadantii* 3937 strain. The mini-Tn7-Gm delivered by the pTn7-M vector (suicide plasmid in *D. dadantii*) was inserted into the *attTn7* site (close to the *glmS* gene) of the recipient strain thanks to the pTnS3 plasmid encoding the Tn7 site-specific transposition pathway. The Gm<sup>R</sup> strain obtained was then checked by PCR using attTn7-Dickeya3937-verif and 3-Tn7L primers (Table S5).

472

473 **Protein techniques.** Flagella were prepared from cells grown overnight in LB. Bacteria  
474 were pelleted, resuspended in 1/10 volume of water and passed 20-fold through a needle  
475 on a syringe. Cells and cell debris were removed by centrifugation 5 min at 20 000 x g  
476 (Shevchik *et al.*, 1994). Proteins were analyzed by SDS-polyacrylamide gel  
477 electrophoresis (SDS-PAGE). Molecular mass of flagellin was determined by MALDI-  
478 MS at the Biopark platform at Archamps.

479

480 **Celery inoculation experiments.** Celeries were bought at a local grocery store. Wild Type  
481 and A4277 (glycosylation) mutant were grown overnight in M63 + glycerol medium.  
482 Bacteria were washed in M63 medium and the OD<sub>600</sub> was adjusted to 1.0. Bacteria were  
483 diluted 10-fold in the same medium. 10 µL of the bacterial suspension were inoculated into a  
484 hole in the leaves that had been made with a pipet tip. The wound was covered with mineral  
485 oil and the leaves were incubated at 30°C at high humidity for 2 days (celery). The length or  
486 the rotten tissue was measured.

487

488 **Coinoculation experiments.** To determine the competitive index of the mutants, the wild  
489 type strain and the test mutant were grown overnight in M63 + glycerol medium. Bacteria  
490 were washed in M63 medium and the OD<sub>600</sub> was adjusted to 1.0. Bacteria were mixed at a  
491 1:1 ratio and diluted 10-fold. For complementation experiments *in planta*, the dilution was  
492 performed in M63 medium with 1mM of the required amino acid. 10 µL of the mixture were  
493 inoculated into chicory leaves. The wound was covered with mineral oil and the leaves were  
494 incubated at 30 °C at high humidity. After 24 h the rotten tissue was collected, homogenized,  
495 diluted in M63 and spread onto LB and LB + antibiotic plates. After 48 h at 30°C, the  
496 colonies were counted. The competitive index is the ratio (number of mutant bacteria/number

of WT bacteria) in the rotten tissue / (number of mutant bacteria/number of WT bacteria) in the inoculum. For the genes whose absence confers a growth advantage in chicory according to the Tn-seq experiment, in-frame deletions were realized in a WT strain. The other mutants were constructed in the 3937 Gm<sup>R</sup> strain. This allows an easy detection of clones of the underrepresented strain among those of the other strain.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The transposon sequence reads we obtained have been submitted to the ENA database under accession number PRJEB20574.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the CNRS, INSA and funded by a grant from the University Lyon I to E.G. (BQR UCBL). K.R was supported by a PhD grant from the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche. We thank Geraldine Effantin, Veronique Utzinger, Matthias Schulz, Andrea Flipio, Leana Corneloup and Barbara Gbaguidi for their technical assistance, the members of the MTSB team and Xavier Charpentier for their discussion, Nicole Cotte-Pattat and Sarah Bigot for their critical reading of the manuscript and James Paslesvert for his encouragements.

## **References**

Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S. and R, S. G. (2016) Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **66**, 5575-5599.

520 Antunez-Lamas, M., Cabrera-Ordonez, E., Lopez-Solanilla, E., Raposo, R., Trelles-Salazar, O.,  
 521 Rodriguez-Moreno, A., *et al.* (2009) Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of  
 522 *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology*, **155**, 434-442.  
 523 Azevedo, R. A., Arruda, P., Turner, W. L. and Lea, P. J. (1997) The biosynthesis and metabolism of  
 524 the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry*, **46**, 395-419.  
 525 Bardonnet, N. and Blanco, C. (1991) Improved vectors for transcriptional signal screening in  
 526 corynebacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **68**, 97-102.  
 527 Bouchart, F., Boussemart, G., Prouvost, A. F., Cogez, V., Madec, E., Vidal, O., *et al.* (2010) The  
 528 virulence of a *Dickeya dadantii* 3937 mutant devoid of osmoregulated periplasmic glucans is  
 529 restored by inactivation of the RcsCD-RcsB phosphorelay. *J Bacteriol*, **192**, 3484-3490.  
 530 Chapelle, E., Alunni, B., Malfatti, P., Solier, L., Pedron, J., Kraepiel, Y., *et al.* (2015) A  
 531 straightforward and reliable method for bacterial in planta transcriptomics: application to the  
 532 *Dickeya dadantii*/Arabidopsis thaliana pathosystem. *Plant J*, **82**, 352-362.  
 533 Charkowski, A., Blanco, C., Condemine, G., Expert, D., Franza, T., Hayes, C., *et al.* (2012) The role  
 534 of secretion systems and small molecules in soft-rot enterobacteriaceae pathogenicity. *Annu*  
 535 *Rev Phytopathol*, **50**, 425-449.  
 536 Chatterjee, A., Cui, Y. and Chatterjee, A. K. (2009) RsmC of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*  
 537 negatively controls motility, extracellular protein production, and virulence by binding FlhD  
 538 and modulating transcriptional activity of the master regulator, FlhDC. *J Bacteriol*, **191**,  
 539 4582-4593.  
 540 Choi, K. H., Mima, T., Casart, Y., Rholl, D., Kumar, A., Beacham, I. R., *et al.* (2008) Genetic tools  
 541 for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ*  
 542 *Microbiol*, **74**, 1064-1075.  
 543 Cole, B. J., Feltcher, M. E., Waters, R. J., Wetmore, K. M., Mucyn, T. S., Ryan, E. M., *et al.* (2017)  
 544 Genome-wide identification of bacterial plant colonization genes. *PLoS Biol*, **15**, e2002860.  
 545 Condemine, G., Castillo, A., Passeri, F. and Enard, C. (1999) The PecT repressor coregulates  
 546 synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant*  
 547 *Microbe Interact*, **12**, 45-52.

548 Condemine, G., Dorel, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and Robert-Baudouy, J. (1992) Some of the  
549 out genes involved in the secretion of pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi* are regulated by  
550 kdgR. *Mol Microbiol*, **6**, 3199-3211.

551 Condemine, G. and Robert-Baudouy, J. (1991) Analysis of an *Erwinia chrysanthemi* gene cluster  
552 involved in pectin degradation. *Mol Microbiol*, **5**, 2191-2202.

553 DeJesus, M. A., Ambadipudi, C., Baker, R., Sasseti, C. and Ioerger, T. R. (2015) TRANSIT--A  
554 Software Tool for Himar1 TnSeq Analysis. *PLoS computational biology*, **11**, e1004401.

555 Duong, D. A., Jensen, R. V. and Stevens, A. M. (2018) Discovery of *Pantoea stewartii* subsp.  
556 *stewartii* genes important for survival in corn xylem through a Tn-Seq analysis. *Molecular*  
557 *plant pathology*. doi: 10.1111/mpp.12669. [Epub ahead of print]

558 Franza, T. and Expert, D. (1991) The virulence-associated chrysobactin iron uptake system of *Erwinia*  
559 *chrysanthemi* 3937 involves an operon encoding transport and biosynthetic functions. *J*  
560 *Bacteriol*, **173**, 6874-6881.

561 Franza, T. and Expert, D. (2013) Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic  
562 bacteria: an 'a la carte' menu. *Molecular plant pathology*, **14**, 429-438.

563 Franza, T., Mahe, B. and Expert, D. (2005) *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport  
564 route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant  
565 infection. *Mol Microbiol*, **55**, 261-275.

566 Franza, T., Sauvage, C. and Expert, D. (1999) Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia*  
567 *chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 119-  
568 128.

569 Fu, Y., Waldor, M. K. and Mekalanos, J. J. (2013) Tn-Seq analysis of *Vibrio cholerae* intestinal  
570 colonization reveals a role for T6SS-mediated antibacterial activity in the host. *Cell host &*  
571 *microbe*, **14**, 652-663.

572 Goodall, E. C. A., Robinson, A., Johnston, I. G., Jabbari, S., Turner, K. A., Cunningham, A. F., *et al.*  
573 (2018) The essential genome of *Escherichia coli* K-12. *MBio*, **9**, e02096-17.



574 Hinton, J. C., Sidebotham, J. M., Hyman, L. J., Perombelon, M. C. and Salmond, G. P. (1989)  
575 Isolation and characterisation of transposon-induced mutants of *Erwinia carotovora* subsp.  
576 *atroseptica* exhibiting reduced virulence. *Mol Gen Genet*, **217**, 141-148.

577 Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. and Reverchon, S. (1996) Regulation of  
578 pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol*, **50**, 213-257.

579 Jahn, C. E., Willis, D. K. and Charkowski, A. O. (2008) The flagellar sigma factor *fliA* is required for  
580 *Dickeya dadantii* virulence. *Mol Plant Microbe Interact*, **21**, 1431-1442.

581 Jiang, X., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Greliche, N., Muskhelishvili, G., *et*  
582 *al.* (2016) Global transcriptional response of *Dickeya dadantii* to environmental stimuli  
583 relevant to the plant infection. *Environ Microbiol*, **18**, 3651-3672.

584 Jozwick, A. K., Graf, J. and Welch, T. J. (2016) The flagellar master operon *flhDC* is a pleiotropic  
585 regulator involved in motility and virulence of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *J Appl*  
586 *Microbiol*.

587 Khodai-Kalaki, M., Andrade, A., Fathy Mohamed, Y. and Valvano, M. A. (2015) *Burkholderia*  
588 *cenocepacia* lipopolysaccharide modification and flagellin glycosylation affect virulence but  
589 not innate immune recognition in plants. *MBio*, **6**, e00679.

590 Ko, M. and Park, C. (2000) H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR  
591 family protein. *J Bacteriol*, **182**, 4670-4672.

592 Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Cote, E., Nasser, W., *et al.* (2008) The  
593 GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi*  
594 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environ Microbiol*, **10**, 545-559.

595 Lee, D. H., Lim, J. A., Lee, J., Roh, E., Jung, K., Choi, M., *et al.* (2013) Characterization of genes  
596 required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in  
597 Chinese cabbage. *Microbiology*, **159**, 1487-1496.

598 Li, Y., Hutchins, W., Wu, X., Liang, C., Zhang, C., Yuan, X., *et al.* (2015) Derivative of plant  
599 phenolic compound inhibits the type III secretion system of *Dickeya dadantii* via HrpX/HrpY  
600 two-component signal transduction and Rsm systems. *Molecular plant pathology*, **16**, 150-  
601 163.



602 Link, A. J., Phillips, D. and Church, G. M. (1997) Methods for generating precise deletions and  
 603 insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame  
 604 characterization. *J Bacteriol*, **179**, 6228-6237.

605 Madec, E., Bontemps-Gallo, S. and Lacroix, J. M. (2014) Increased phosphorylation of the RcsB  
 606 regulator of the RcsCDB phosphorelay in strains of *Dickeya dadantii* devoid of  
 607 osmoregulated periplasmic glucans revealed by Phos-tag gel analysis. *Microbiology*, **160**,  
 608 2763-2770.

609 Malinverni, J. C. and Silhavy, T. J. (2009) An ABC transport system that maintains lipid asymmetry  
 610 in the gram-negative outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 8009-8014.

611 Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.  
 612 *EMBnet.journal*, **17**, 10-12.

613 Nasser, W., Faelen, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and Reverchon, S. (2001) Role of the nucleoid-  
 614 associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic  
 615 bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 10-20.

616 Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H. and Kanehisa, M. (1999) KEGG: Kyoto  
 617 Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*, **27**, 29-34.

618 Okinaka, Y., Yang, C. H., Perna, N. T. and Keen, N. T. (2002) Microarray profiling of *Erwinia*  
 619 *chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. *Mol Plant Microbe*  
 620 *Interact*, **15**, 619-629.

621 Page, F., Altabe, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix, J. M., Robert-Baudouy, J. and Bohin, J. P.  
 622 (2001) Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi*  
 623 pathogenicity. *J Bacteriol*, **183**, 3134-3141.

624 Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M.-B. and Palva, E. T. (1991) Identification of pathogenicity  
 625 determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. *Molecular*  
 626 *Plant-Microbe Interaction*, **4**, 276-283.

627 Ravirala, R. S., Barabote, R. D., Wheeler, D. M., Reverchon, S., Tatum, O., Malouf, J., *et al.* (2007)  
 628 Efflux pump gene expression in *Erwinia chrysanthemi* is induced by exposure to phenolic  
 629 acids. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 313-320.

630 Résibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, E. and Toussaint, A. (1984) phiEC2, a new  
 631 generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology*, **137**, 102-112.  
 632 Reverchon, S., Muskhelishvili, G. and Nasser, W. (2016) Virulence program of a bacterial plant  
 633 pathogen: the *Dickeya* model. *Progress in molecular biology and translational science*, **142**,  
 634 51-92.  
 635 Reverchon, S. and Nasser, W. (2013) *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of  
 636 virulence programme. *Environ Microbiol Rep*, **5**, 622-636.  
 637 Reverchon, S., Nasser, W. and Robert-Baudouy, J. (1994) *pecS*: a locus controlling pectinase,  
 638 cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol*, **11**, 1127-  
 639 1139.  
 640 Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D. and Nasser, W. (2002) Characterization of indigoidine  
 641 biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J*  
 642 *Bacteriol*, **184**, 654-665.  
 643 Rio-Alvarez, I., Munoz-Gomez, C., Navas-Vasquez, M., Martinez-Garcia, P. M., Antunez-Lamas, M.,  
 644 Rodriguez-Palenzuela, P., *et al.* (2015) Role of *Dickeya dadantii* 3937 chemoreceptors in the  
 645 entry to *Arabidopsis* leaves through wounds. *Molecular Plant Pathology*, **16**, 685-698.  
 646 Roeder, D. L. and Collmer, A. (1985) Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isozyme gene  
 647 in *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol*, **164**, 51-56.  
 648 Santos, R., Franza, T., Laporte, M. L., Sauvage, C., Touati, D. and Expert, D. (2001) Essential role of  
 649 superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol Plant*  
 650 *Microbe Interact*, **14**, 758-767.  
 651 Shevchik, V. E., Condemine, G. and Robert-Baudouy, J. (1994) Characterization of DsbC, a  
 652 periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase  
 653 activity. *Embo J*, **13**, 2007-2012.  
 654 Skurnik, D., Roux, D., Aschard, H., Cattoir, V., Yoder-Himes, D., Lory, S., *et al.* (2013) A  
 655 comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa*  
 656 using high-throughput sequencing of transposon libraries. *PLoS Pathog*, **9**, e1003582.

657 Surgey, N., Robert-Baudouy, J. and Condemine, G. (1996) The *Erwinia chrysanthemi* *pecT* gene  
658 regulates pectinase gene expression. *J Bacteriol*, **178**, 1593-1599.

659 Taguchi, F., Yamamoto, M., Ohnishi-Kameyama, M., Iwaki, M., Yoshida, M., Ishii, T., *et al.* (2010)  
660 Defects in flagellin glycosylation affect the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*  
661 6605. *Microbiology*, **156**, 72-80.

662 Tans-Kersten, J., Brown, D. and Allen, C. (2004) Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia*  
663 *solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant Microbe*  
664 *Interact*, **17**, 686-695.

665 Thangavelu, B., Bhansali, P. and Viola, R. E. (2015) Elaboration of a fragment library hit produces  
666 potent and selective aspartate semialdehyde dehydrogenase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, **23**,  
667 6622-6631.

668 Van Gijsegem, F., Wlodarczyk, A., Cornu, A., Reverchon, S. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2008)  
669 Analysis of the LacI family regulators of *Erwinia chrysanthemi* 3937, involvement in the  
670 bacterial phytopathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact*, **21**, 1471-1481.

671 van Opijnen, T. and Camilli, A. (2012) A fine scale phenotype-genotype virulence map of a bacterial  
672 pathogen. *Genome research*, **22**, 2541-2551.

673 van Opijnen, T. and Camilli, A. (2013) Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level  
674 analysis of microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, **11**, 435-442.

675 Wiles, T. J., Norton, J. P., Russell, C. W., Dalley, B. K., Fischer, K. F. and Mulvey, M. A. (2013)  
676 Combining quantitative genetic footprinting and trait enrichment analysis to identify fitness  
677 determinants of a bacterial pathogen. *PLoS Genet*, **9**, e1003716.

678 Wolfe, A. J. (2005) The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**, 12-50.

679 Wu, X., Zeng, Q., Koestler, B. J., Waters, C. M., Sundin, G. W., Hutchins, W., *et al.* (2014)  
680 Deciphering the components that coordinately regulate virulence factors of the soft rot  
681 pathogen *Dickeya dadantii*. *Mol Plant Microbe Interact*, **27**, 1119-1131.

682 Xu, T., Su, Y., Xu, Y., He, Y., Wang, B., Dong, X., *et al.* (2014) Mutations of flagellar genes *fliC12*,  
683 *fliA* and *flhDC* of *Edwardsiella tarda* attenuated bacterial motility, biofilm formation and  
684 virulence to fish. *J Appl Microbiol*, **116**, 236-244.

- Yang, C. H., Gavilanes-Ruiz, M., Okinaka, Y., Vedel, R., Berthuy, I., Boccara, M., *et al.* (2002) *hrp* genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 472-480.
- Yang, S., Peng, Q., Zhang, Q., Zou, L., Li, Y., Robert, C., *et al.* (2010) Genome-wide identification of HrpL-regulated genes in the necrotrophic phytopathogen *Dickeya dadantii* 3937. *PLoS One*, **5**, e13472.
- Yang, S., Perna, N. T., Cooksey, D. A., Okinaka, Y., Lindow, S. E., Ibekwe, A. M., *et al.* (2004) Genome-wide identification of plant-upregulated genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 using a GFP-based IVET leaf array. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**, 999-1008.
- Yi, X., Yamazaki, A., Biddle, E., Zeng, Q. and Yang, C. H. (2010) Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Mol Microbiol*, **77**, 787-800.
- Yuan, X., Khokhani, D., Wu, X., Yang, F., Biener, G., Koestler, B. J., *et al.* (2015) Cross-talk between a regulatory small RNA, cyclic-di-GMP signalling and flagellar regulator FlhDC for virulence and bacterial behaviours. *Environ Microbiol*, **17**, 4745-4763.
- Yuan, X., Tian, F., He, C., Severin, G. B., Waters, C. M., Zeng, Q., *et al.* (2018) The diguanylate cyclase GcpA inhibits the production of pectate lyases via the H-NS protein and RsmB regulatory RNA in *Dickeya dadantii*. *Molecular plant pathology*. doi: 10.1111/mpp.12665. [Epub ahead of print]
- Zobel, S., Benedetti, I., Eisenbach, L., de Lorenzo, V., Wierckx, N. and Blank, L. M. (2015) Tn7-based device for calibrated heterologous gene expression in *Pseudomonas putida*. *ACS synthetic biology*, **4**, 1341-1351.
- Zomer, A., Burghout, P., Bootsma, H. J., Hermans, P. W. and van Hijum, S. A. (2012) ESSENTIALS: software for rapid analysis of high throughput transposon insertion sequencing data. *PLoS One*, **7**, e43012.

## Legend of figures

**Fig. 1. Quality control of the Tn-seq *D. dadantii* 3937 libraries.** (A and B) Biological reproducibility of the Tn-seq results. Pairs of Tn-seq assay results are compared, with the total number of reads per gene plotted. Analysis of DNA samples corresponding to two independent cultures of the mutant pool grown (A) in LB medium (correlation coefficient  $R = 0.72$ ) and (B) in chicory (correlation coefficient  $R = 0.98$ ). Values represent average numbers of reads per gene from the pairs of biological replicates. (C) Frequency and distribution of transposon sequence reads across the entire *D. dadantii* 3937 genome. The localization of transposon insertions shows no bias throughout the genome of *D. dadantii* 3937. (D) Density plot of  $\log_2FC$  (measured reads/expected reads per gene).

**Fig 2. Scheme of the purine and pyrimidine biosynthesis pathways in *D. dadantii* that produce XMP (purine metabolism) and UMP (pyrimidine metabolism) from L-glutamine.** Pathways has been drawn based on the *Dickeya dadantii* 3937 KEGG database. The growth defect genes in chicory that pass the permutation test ( $q\text{-value} \leq 0.05$ ) are indicated in red. The genes for which the GD phenotype was tested and confirmed with in frame deletion mutants are shown in bold. The  $\log_2FC$  of read numbers between chicory and LB for each gene is indicated in brackets. Some genes do not pass the permutation test (in black) but have a strongly negative  $\log_2FC$ . PRPP: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate ; GAR: 5'-phosphoribosyl-1-glycinamide ; FGAM: 5'-phosphoribosyl-*N*-formylglycinamide ; AIR: 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole ; CAIR: 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole carboxylic acid ; SAICAR: 5'-phosphoribosyl-4-(*N*-succino-carboxamide)-5-aminoimidazole ; AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide ; IMP: inosine monophosphate ; XMP: xanthine monophosphate ; UMP: uridine monophosphate.

737

738 **Fig 3. Modification of FliC revealed by Tn-seq analysis and SDS-PAGE.** (A) The  
739 importance of 6 genes located between *fliA* and *fliC* for growth in chicory. Log<sub>2</sub>FC are  
740 indicated in brackets. Dda3937\_03425 and Dda3937\_03426 are duplicated transposase genes  
741 that have been removed from the analysis. Black arrow: GD in chicory (q-value  $\leq 0.05$ ) ;  
742 white arrow: genes that do not pass the permutation test (q-value  $> 0.05$ ). Small arrows  
743 indicate the presence of a promoter. (B) Analysis by SDS-PAGE of FliC produced by the  
744 wild type (lane 1), the A3422 (lane 2) and the A4277 (lane 3) strains. (C) Maceration of  
745 celery leaves by the Wild Type and the A4277 (glycosylation) mutant. Length of rotten tissue  
746 was measured 48 h post infection. Boxplot were generated by BoxPlotR from 9 data points.  
747 The calculated median value is 109 for the WT strain, 40 for the A4277 strain. Center lines  
748 show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R  
749 software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th  
750 percentiles. Statistical analysis were performed with the Mann–Whitney U test.

751

752 **Fig 4. Competitive Index (CI) of several mutant strains.** CI values were determined in  
753 chicory leaves as described in Methods. Each value is the mean of 5 experiments. Center  
754 lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R  
755 software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles  
756 and outliers are represented by dots. n = 5 sample points. Numbers above the boxes indicate  
757 the average competitive index in Log<sub>10</sub>. \* indicates a significant difference relative to the WT  
758 (p<0.05). Statistical analysis were performed with the Mann–Whitney U test.

759

760

**Fig 5. Complementation of auxotroph mutants *in planta*.** Each leaf was inoculated with  $10^6$  bacteria. The length of rotten tissue was measured after 24h. Bacteria were injected into the wounded leaf with or without amino acid. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles and outliers are represented by dots.  $n = 5$  sample points. Numbers above the boxes indicate the average competitive index in  $\text{Log}_{10}$ . \* indicates a significant difference relative to the WT ( $p < 0.05$ ). \*\* Indicates an absence of any significant difference relative to the WT ( $p > 0.05$ ). Statistical analysis were performed with the Mann–Whitney U test.

## **Supporting information legends**

**Fig S1. Volcano plot of resampling results comparing replicates grown in chicory versus in LB.** Significant hits have  $q < 0.05$  or  $-\log_{10} q > 1.3$ . Growth defect (GD) or growth advantage (GA) genes are indicated by a red frame.

**Fig S2. Examples of essential and important genes revealed by Tn-seq.** Number of reads at each transposon location in the sample grown either in LB or in chicory. Data are averaged from biological replicates and normalized as described in the methods section. Four regions of the genome representative of the Tn-seq results are shown, with the predicted genes indicated at the bottom of each panel. Peaks represent the read number at TA sites. Black arrows represent genes that passed the permutation test ( $q\text{-value} \leq 0.05$ ). Small arrows indicate the presence of a promoter (A) *dnaX* which encodes both the tau and gamma

785 subunits of DNA polymerase is represented by a grey arrow. *dnaX* is an essential gene in LB.  
786 *acrAB* genes represented by dark arrows are GD in chicory (q-value  $\leq 0.05$ ). (B) Essentiality  
787 of leucine biosynthetic genes in chicory. (C) Importance of genes involved in motility for  
788 growth in chicory. (C) Insertions in the 5' region of *rsmC* confer a growth advantage for the  
789 bacteria in chicory.

790

791 **Table S1: number of genes implicated in the KEGG pathway**

792 **Table S2: raw data of the HMM and resampling analysis by transit**

793 **Table S3: bacterial strains used in this study**

794 **Table S4: plasmids used in this study**

795 **Table S5: oligonucleotides used in this study**

796

797

798



Figure 1

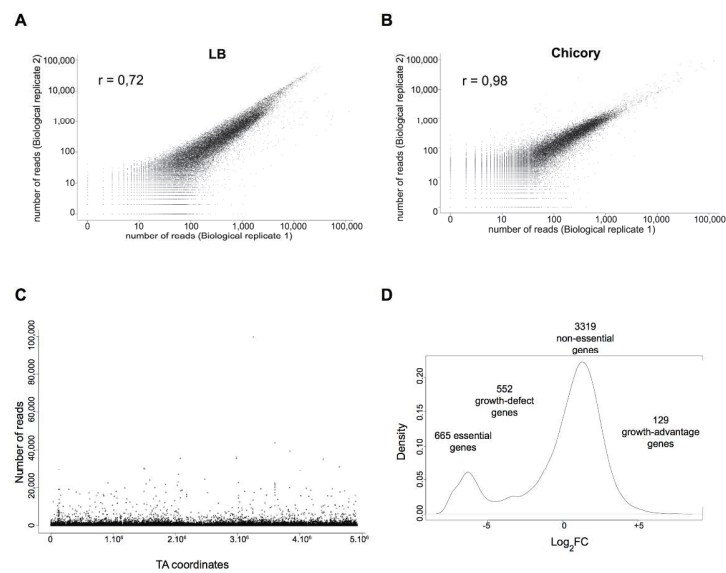


Fig. 1

210x297mm (300 x 300 DPI)

Figure 2

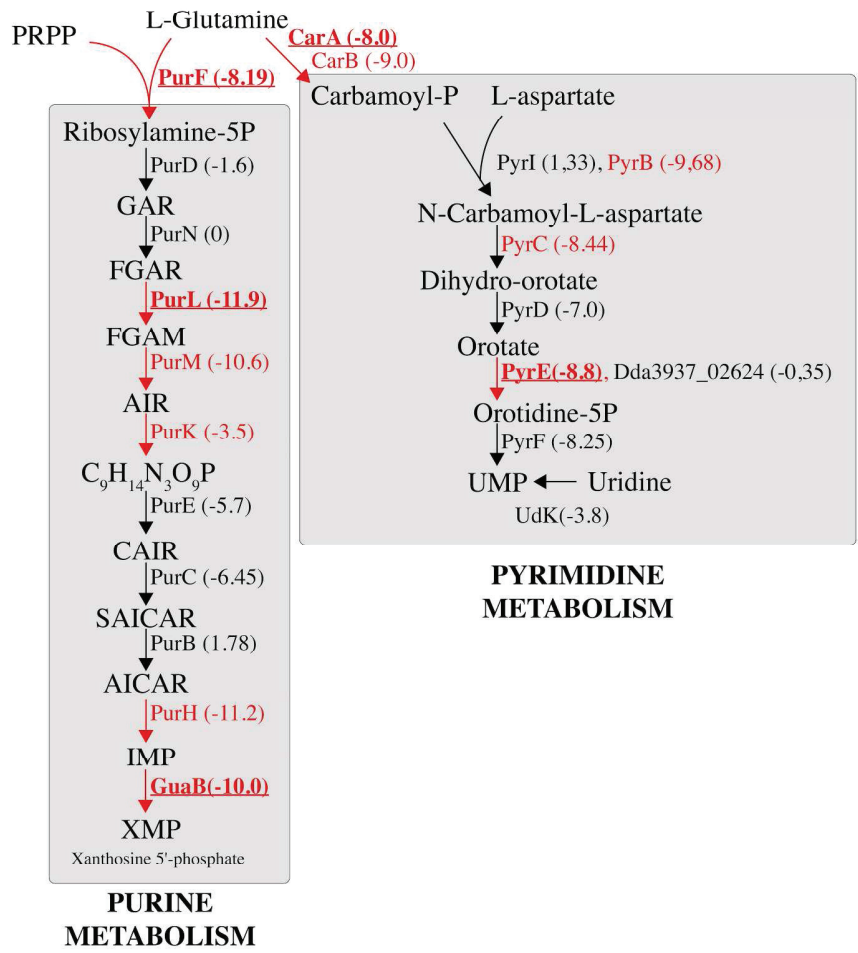


Fig. 2

236x299mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 3

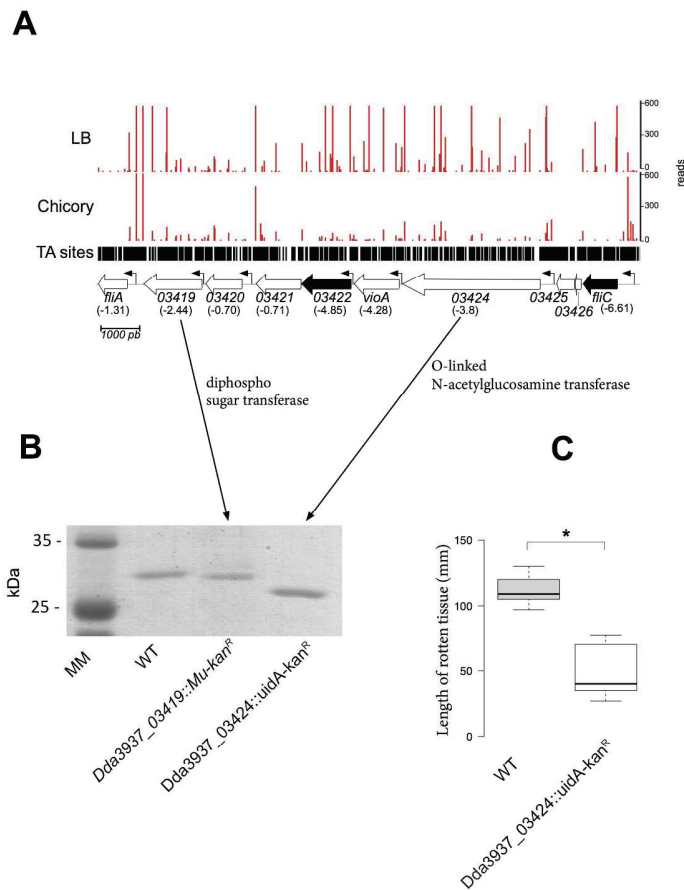


Fig. 3

210x297mm (300 x 300 DPI)

Figure 4

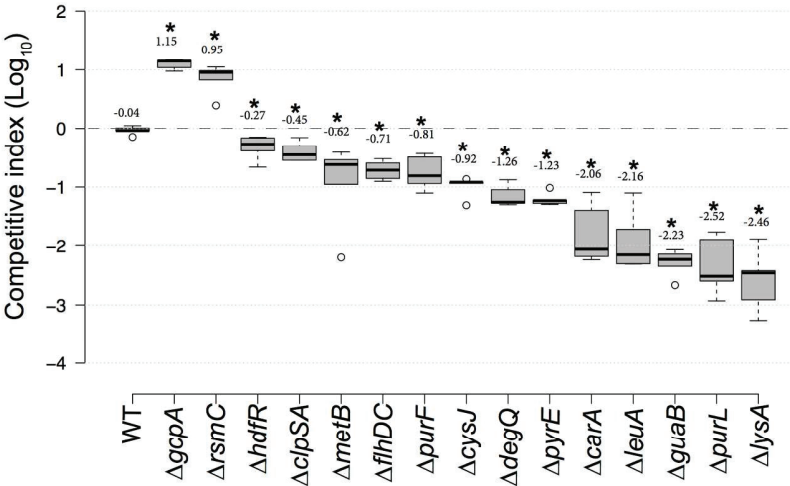


Fig. 4

187x186mm (300 x 300 DPI)

Figure 5

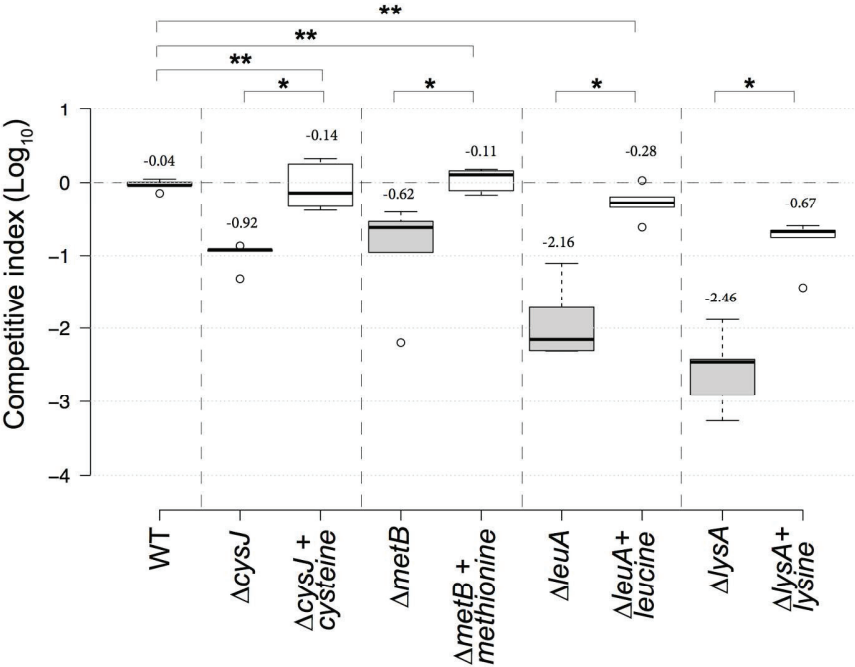


Fig. 5

173x187mm (300 x 300 DPI)

**TABLE 1** Tn-Seq analysis of *Dickeya dadantii* 3937

Mutant pool	Total no. of reads	No. of reads containing Tn end	No. of reads normalized <sup>a</sup>	No. of mapped reads to unique TA sites	No. of mapped reads to unique TA sites after LOESS correction	Density (%) <sup>b</sup>	Mean read count <sup>c</sup>
LB #1	23,152,186	22,647,343	18,748,028	13,166,770 (70 %)	12,904,900 (69 %)	28 %	75
LB #2	30,105,412	27,963,154	18,748,028	15,535,291 (83 %)	15,195,582 (81 %)	22 %	88
Chicory #1	18,925,029	18,748,028	18,748,028	17,535,146 (94 %)	14,906,888 (79 %)	24 %	87
Chicory #2	27,607,717	26,555,297	18,748,028	17,477,706 (93 %)	16,955,724 (90 %)	23 %	99

<sup>a</sup> The number of reads containing the sequence of a Tn end were normalized for each sample according to the number of reads for the sample Chicory #1

<sup>b</sup> *Dickeya dadantii* 3937 genome has 171,791 TA sites. The density is the % of TAs for which mapped reads has been assigned by the TPP software.

<sup>c</sup> the mean value of mapped reads per TA.

**TABLE 2** Genes identified by Tn-seq exhibiting a growth variation from LB to chicory. Datas obtained with TRANSIT software.

HMM		RESAMPLING							In operon <sup>g</sup> (state) <sup>h</sup>	
Locus <sup>a</sup>	Gene <sup>a</sup>	Function	State in LB <sup>b</sup>	Mean reads <sup>d</sup>			log <sub>2</sub> FC <sup>e</sup>	q-value <sup>f</sup>		
				No. of TAs <sup>c</sup>	LB	Chicory				ΔSum
Dda3937_00335	<i>glpD</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GD	33	650	0	-11,706	-12.56	0.00	N
Dda3937_03379	<i>purL</i>	phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase	NE	73	378	0	-21,944	-11.91	0.00	N
Dda3937_03564	<i>opgG</i>	Glucans biosynthesis protein G precursor	GA	40	1976	1	-90,843	-11.41	0.00	Y
Dda3937_00244	<i>purH</i>	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	NE	37	145	0	-2,896	-11.25	0.00	Y
Dda3937_00432	<i>hflK</i>	FtsH protease regulator	GD	28	339	0	-4,060	-11.12	0.03	Y
Dda3937_02515	<i>purM</i>	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	NE	21	344	0	-6,188	-10.57	0.00	Y
Dda3937_02627		4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	NE	26	129	0	-2,065	-10.06	0.00	Y
Dda3937_00004	<i>guaB</i>	IMP dehydrogenase	NE	33	151	0	-3,915	-9.97	0.00	N
Dda3937_03563	<i>opgH</i>	Glucans biosynthesis glucosyltransferase H	GA	62	1409	2	-90,073	-9.79	0.00	Y
Dda3937_01284	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	NE	17	159	0	-1,910	-9.68	0.00	Y
Dda3937_03924	<i>rffG</i>	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	NE	23	317	1	-3,167	-9.38	0.02	Y

Dda3937_01389	<i>carB</i>	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	NE	48	249	0	-7,967	-9.23	0.00	N	3.49) <i>rfbC</i> (-0.53) <i>rfbD</i> (-0.91)
Dda3937_03299	<i>acrA</i>	<b>MexE family multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit</b>	NE	34	196	0	-5,860	-9.03	0.00	Y	<i>acrA</i> (-9.03) <i>acrB</i> (-8.9)
Dda3937_03300	<i>acrB</i>	<b>multidrug efflux system protein</b>	NE	89	422	1	-31,986	-8.90	0.00	Y	<i>acrA</i> (-9.03) <i>acrB</i> (-8.9)
Dda3937_03258	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	NE	14	175	0	-2,788	-8.81	0.00	N	
Dda3937_02336	<i>nlpI</i>	lipoprotein	GD	33	27	0	-601,000	-8.69	0.00	N	
Dda3937_02506	<i>nlpB</i> ( <i>bamC</i> )	outer membrane protein assembly factor	NE	20	47	0	-841,000	-8.69	0.00	Y	<i>dapA</i> (+2.02) <i>bamC</i> (-8.69)
Dda3937_04018	<i>pta</i>	phosphate acetyltransferase	GD	36	579	2	-10,400	-8.59	0.02	N	
Dda3937_03554	<i>pyrC</i>	dihydro-orotase	NE	25	343	1	-7,534	-8.44	0.00	N	
Dda3937_04573	<i>lpxM</i>	acyl (myristate) transferase	NE	33	63	0	-1,764	-8.31	0.00	N	
Dda3937_01116	<i>glnG</i>	Nitrogen regulation protein NR(I), Two-component system	NE	26	39	0	-629,000	-8.22	0.00	Y	<i>glnL</i> (-0.2) <i>glnG</i> (-8.22)
Dda3937_02099	<i>purF</i>	amidophosphoribosyltransferase	NE	32	107	0	-2,779	-8.19	0.00	Y	<i>purF</i> (-8.19) <i>cvpA</i> (-1.92)
Dda3937_04019	<i>ackA</i>	acetate kinase A and propionate kinase 2	NE	29	45	0	-1,063	-8.16	0.00	Y	<i>Dda3937_04020</i> (-2.48) <i>ackA</i> (-8.16)
Dda3937_02189	<i>yejM</i>	Membrane-anchored periplasmic protein, alkaline phosphatase superfamily	GA	34	4160	15	-99,478	-8.08	0.00	Y	<i>yejL</i> (0) <i>yejM</i> (-8.08)
Dda3937_01390	<i>carA</i>	carbamoyl-phosphate synthase small subunit	NE	21	69	0	-956,000	-8.05	0.00	N	
Dda3937_01426	<i>ptsI</i>	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase of PTS system	NE	33	45	0	-1,176	-7.85	0.00	Y	<i>crr</i> (-2.66) <i>ptsI</i> (-7.85) <i>ptsH</i> (0)
Dda3937_00161	<i>cysQ</i>	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase	NE	16	44	0	-434,000	-7.81	0.02	N	
Dda3937_00210	<i>cysI</i>	sulfite reductase beta subunit	NE	40	252	1	-7,515	-7.65	0.00	Y	<i>cysH</i> (-8.93) <i>cysI</i> (-7.65) <i>cysJ</i> (-

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47



Dda3937_04075	<i>lysR</i>	LysR family transcriptional regulator	NE	13	2385	13	-18,976	-7.51	0.00	N	6.25)
Dda3937_02526	<i>yidR</i>	conserved protein	NE	18	50	0	-591,000	-7.50	0.00	N	
Dda3937_03888	<i>metB</i>	Cystathionine gamma-synthase	NE	21	118	1	-1,881	-7.34	0.01	Y	
Dda3937_00195	<i>relA</i>	(p)ppGpp synthetase I/GTP pyrophosphokinase	NE	55	256	2	-11,683	-7.12	0.00	Y	<i>metB (-7.34)</i> <i>metL (-3.23)</i> <i>relA (-7.12)</i> <i>rumA</i> <i>(-1.33)</i>
Dda3937_02532	<i>IfcR</i>	Fructose repressor FruR, LacI family	NE	15	399	3	-4,756	-7.04	0.00	N	<i>fliF (-7.02)</i> <i>fliG</i> (-4.26) <i>fliH</i> (-3.92) <i>fliJ (-6.56)</i> <i>fljU</i> (-5.44) <i>fliK</i> (-4.71) <i>flgE (-7)</i> <i>flgF</i> (-4.76) <i>flgG</i> (-5.91)
Dda3937_02226	<i>fliF</i>	Flagellar M-ring protein flIF	NE	46	476	4	-18,898	-7.02	0.00	Y	
Dda3937_02206	<i>flgE</i>	Flagellar hook protein flgE	NE	50	597	5	-29,608	-7.00	0.00	Y	
Dda3937_04507	<i>gnd</i>	phosphogluconate dehydrogenase (NADP(+)-dependent, decarboxylating)	GD	36	7	0	-190,000	-6.91	0.00	N	
Dda3937_00697	<i>degQ</i>	Protease	NE	28	80	1	-956,000	-6.87	0.01	N	
Dda3937_03631	<i>trxB</i>	thioredoxin-disulfide reductase	GD	25	16	0	-257,000	-6.85	0.03	N	
Dda3937_00361	<i>yrfF</i> <i>(igaA)</i>	intracellular growth attenuator protein	GD	38	22	0	-430,000	-6.78	0.03	N	
Dda3937_00588	<i>cysB</i>	Transcriptional dual regulator, O-acetyl-L-serine-binding protein	NE	29	90	1	-2,504	-6.75	0.00	N	
Dda3937_03783	<i>prc</i>	carboxy-terminal protease for penicillin-binding protein 3	NE	46	243	2	-11,557	-6.71	0.00	Y	<i>prc (-6.71)</i> <i>proQ</i> (-1.82)
Dda3937_00433	<i>hfIX</i>	predicted GTPase	GD	27	16	0	-187,000	-6.69	0.04	N	
Dda3937_03427	<i>fliC</i>	flagellar filament structural protein (flagellin)	NE	33	96	1	-1,520	-6.61	0.03	Y	
Dda3937_02223	<i>fliI</i>	Flagellum-specific ATP synthase flIF	NE	42	236	3	-7,009	-6.56	0.00	Y	<i>fliI (-7.02)</i> <i>fliG</i> (-4.26) <i>fliH</i> (-3.92) <i>fliJ (-6.56)</i> <i>fljU</i> (-5.44) <i>fliK</i> (-4.71)

Accession	Gene	Function	NE	29	117	1	-3,241	-6.34	0.00	N
Dda3937_04419	<u>hdfr</u>	DNA-binding transcriptional regulator	NE	29	117	1	-3,241	-6.34	0.00	N
Dda3937_00209	<u>cysJ</u>	sulfite reductase alpha subunit	NE	41	180	2	-6,746	-6.25	0.00	Y
Dda3937_02209	<u>flgH</u>	Flagellar L-ring protein flgH	NE	23	586	8	-13,875	-6.22	0.01	Y
Dda3937_02246	<u>fabF</u>	beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	GD	41	10	0	-273,000	-6.15	0.00	N
Dda3937_00301	<u>uvrD</u>	ATP-dependent DNA helicase UvrD/PcrA	NE	42	29	0	-678,000	-6.11	0.00	N
Dda3937_02212	<u>flgK</u>	Flagellar hook-associated protein flgK	NE	63	116	2	-4,808	-6.07	0.00	Y
Dda3937_04046	<u>purU</u>	Formyltetrahydrofolate deformylase	NE	28	51	1	-1,105	-5.84	0.00	N
Dda3937_03965	<u>flhA</u>	predicted flagellar export pore protein	NE	49	106	2	-3,532	-5.80	0.00	Y
Dda3937_02205	<u>flgD</u>	Flagellar basal-body rod modification protein flgD	NE	22	227	4	-4,905	-5.73	0.01	Y
Dda3937_01352	<u>leuC</u>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	NE	21	139	3	-2,457	-5.73	0.01	Y
Dda3937_02784	<u>flhC</u>	Flagellar transcriptional activator flhC	NE	20	477	9	-11,222	-5.66	0.01	Y
Dda3937_02782	<u>motB</u>	Flagellar motor rotation protein motB	NE	40	109	2	-4,067	-5.55	0.01	Y

Dda3937_02210	<i>flgI</i>	Flagellar P-ring protein flgI	NE	26	163	4	-3,191	-5.49	0.00	Y	<i>flgH</i> (-6.22) <i>flgI</i> (-5.49) <i>flgJ</i> (-7.16) <i>flIF</i> (-7.02) <i>flIG</i> (-4.26) <i>flIH</i> (-3.92) <i>flII</i> (-6.56) <i>flIJ</i> (-5.44) <i>flIK</i> (-4.71) <i>flIL</i> (-4.17) <i>flIM</i> (-5.4) <i>flIN</i> (-4.78) <i>flIO</i> (-6.89) <i>flIP</i> (-4.78) <i>flIQ</i> (-3.12) <i>flIR</i> (-4.56) <i>flhE</i> (-0.89) <i>flhA</i> (-5.8) <i>flhB</i> (-5.31) <i>Dda3937_04633</i> (-1) <i>cheZ</i> (-3.29) <i>cheY</i> (-4.52) <i>cheB</i> (-5.14) <i>cheR</i> (-4.67) <i>flhE</i> (-0.89) <i>flhA</i> (-5.8) <i>flhB</i> (-5.31) <i>Dda3937_04633</i> (-1) <i>cheZ</i> (-3.29) <i>cheY</i> (-4.52) <i>cheB</i> (-5.14) <i>cheR</i> (-4.67) <i>motA</i> (-5.06) <i>motB</i> (-5.55) <i>cheA</i> (-4.89) <i>cheW</i> (-5.39)
Dda3937_02222	<i>fliJ</i>	Flagellar protein fliJ	NE	14	182	4	-2,486	-5.44	0.03	Y	
Dda3937_02219	<i>fliM</i>	Flagellar motor switch protein flIM	NE	27	143	3	-3,339	-5.40	0.00	Y	
Dda3937_02774	<i>flhB</i>	Flagellar biosynthesis protein flhB	NE	32	186	5	-4,712	-5.31	0.00	Y	
Dda3937_02777	<i>cheB</i>	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase CheB	NE	31	282	8	-7,682	-5.14	0.00	Y	
Dda3937_02783	<i>motA</i>	Flagellar motor rotation protein motA	NE	24	39	1	-834,000	-5.06	0.00	Y	
Dda3937_00565	<i>tonB</i>	TonB protein	NE	14	106	3	-2,062	-5.00	0.05	N	

Dda3937_00427	<i>fbp</i>	fructose-bisphosphatase	GA	33	805	27	-28,026	-4.92	0.01	N	<i>motA</i> (-5.06)
Dda3937_02781	<i>cheA</i>	Chemotaxis protein CheA	NE	50	151	5	-5,838	-4.89	0.00	Y	<i>motB</i> (-5.55)
											<i>cheA</i> (-4.89)
											<i>cheW</i> (-5.39)
Dda3937_03422		Carbamoyl-phosphate synthase small subunit	NE	43	379	13	-11,713	-4.85	0.02	Y	<i>Dda3937_03422</i> (-4.85)
											<i>Dda3937_03421</i> (-0.71)
Dda3937_02577	<i>lysA</i>	diaminopimelate decarboxylase	NE	23	332	0	-3,989	-4.79	0.00	N	<i>flgE</i> (-7) <i>flgF</i> (-4.76) <i>flgG</i> (-5.91)
Dda3937_02207	<i>flgF</i>	Flagellar basal-body rod protein flgF	NE	21	35	1	-671,000	-4.76	0.00	Y	
Dda3937_02230	<i>fliD</i>	Flagellar hook-associated protein fliD	NE	47	93	3	-2,506	-4.75	0.00	N	
Dda3937_04301	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	NE	36	35	1	-944,000	-4.69	0.02	Y	<i>leuA</i> (-4.69) <i>leuB</i> (-4.63) <i>leuC</i> (-5.73) <i>leuD</i> (-6.26) <i>flhE</i> (-0.89) <i>flhA</i> (-5.8) <i>flhB</i> (-5.31)
											<i>Dda3937_04633</i> (-1) <i>cheZ</i> (-3.29) <i>cheY</i> (-4.52) <i>cheB</i> (-5.14) <i>cheR</i> (-4.67)
Dda3937_02778	<i>cheR</i>	Chemotaxis protein methyltransferase CheR	NE	30	462	18	-8,882	-4.67	0.05	Y	<i>fliS</i> (-6.36) <i>fliT</i> (-4.63)
											<i>leuA</i> (-4.69) <i>leuB</i> (-4.63) <i>leuC</i> (-5.73) <i>leuD</i> (-6.26) <i>fliL</i> (-4.17) <i>fliM</i> (-5.4) <i>fliN</i> (-4.78)
Dda3937_02228	<i>fliT</i>	Flagellar biosynthesis protein fliT	GD	16	8	0	-95,000	-4.63	0.05	Y	
Dda3937_04404	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	NE	16	285	12	-3,835	-4.63	0.05	Y	
Dda3937_02214	<i>fliR</i>	Flagellar biosynthesis protein fliR	NE	33	268	11	-5,653	-4.56	0.00	Y	

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47

Dda3937_02045	<i>envC</i>	murein hydrolase activator	NE	17	71	12	-825,000	-2.59	0.00	N	
Dda3937_01807	<i>nuoM</i>	NADH-quinone oxidoreductase subunit M	NE	29	57	10	-1,130	-2.47	0.03	Y	<i>nuoN</i> (-2.01)
Dda3937_03668	<i>sufB</i>	Fe-S cluster assembly protein	NE	32	116	21	-3,581	-2.44	0.00	Y	<b><i>nuoM</i> (-2.47)</b> <b><i>sufB</i> (-2.44)</b> <i>sufA</i> (-1.47)
Dda3937_02080	<i>trkH</i>	Potassium uptake protein	NE	36	65	13	-1,047	-2.33	0.05	Y	<i>pepQ</i> (-0.21) ; <i>yigZ</i> (+0.1) <i>trkH</i> (- 2.33) <i>hemG</i> (+1.15)
<b>Dda3937_03042</b>	<b><i>fct</i></b>	<b>ferrichrysobactin outer membrane receptor</b>	<b>NE</b>	<b>80</b>	<b>244</b>	<b>51</b>	<b>-14,622</b>	<b>-2.25</b>	<b>0.01</b>	<b>N</b>	
Dda3937_01287	<i>argI</i>	Ornithine carbamoyltransferase	NE	24	279	59	-4,383	-2.23	0.03	N	
<u>Dda3937_02456</u>	<u><i>rsmC</i></u>	global regulatory protein RsmC	NE	10	116	221,705	2,659,067	10.90	0.028	N	
<u>Dda3937_03858</u>	<u><i>gcpA</i></u>	hypothetical protein	GA	55	3728	140,136	9,002,975	5.23	0.00	N	
Dda3937_03971	<i>mltD</i>	outer membrane-bound lytic murein transglycosylase D	NE	46	276	10,885	445,590	5.30	0.00	N	
Dda3937_00363	<i>mrcA</i>	penicillin-binding protein 1A (PBPIA)	NE	53	85	468	16,879	2.47	0.021	N	

<sup>a</sup> Genes for which a role in *D. dadantii* virulence has been described before are in bold. Underlined genes have been deleted to study the mutants in further analysis.

<sup>b</sup> State of each gene in LB defined by the TRANSIT software using an Hidden Markov Model: NE, Non-Essential ; GD, Growth-Defect ; E, Essential ; GA, Growth-Advantage.

<sup>c</sup> Mean reads per TA site for a gene in each growth condition

<sup>d</sup> Difference of reads between chicory and LB growth condition

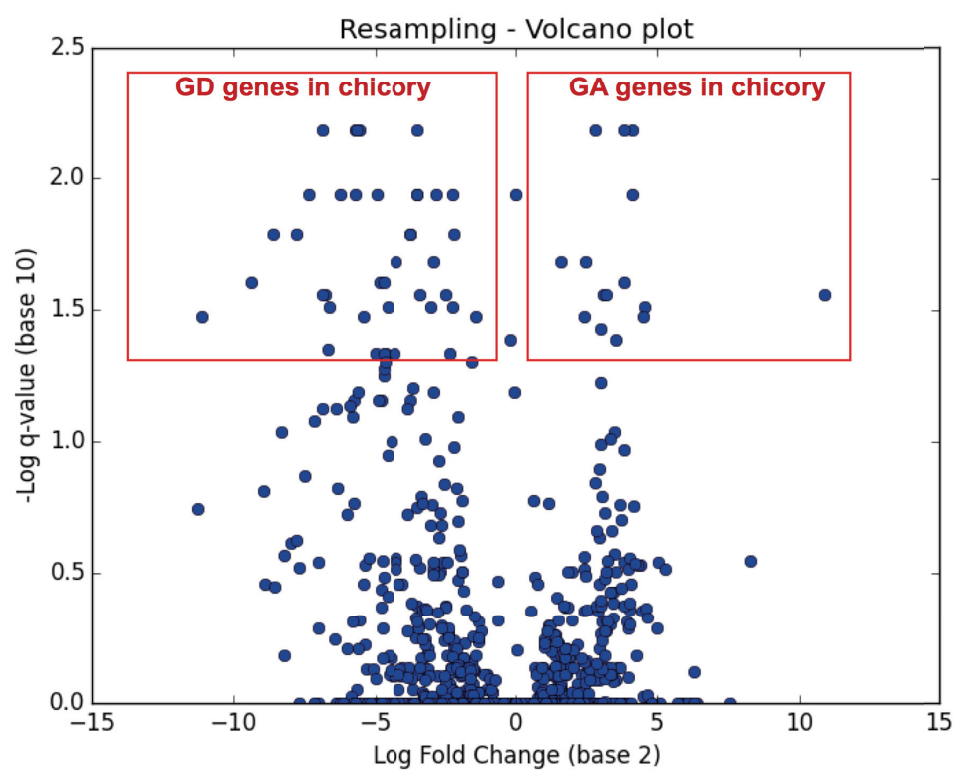
<sup>e</sup> Ratio of reads between chicory and LB condition expressed in log<sub>2</sub>

<sup>f</sup> P-values adjusted for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg procedure (See Transit manual) □

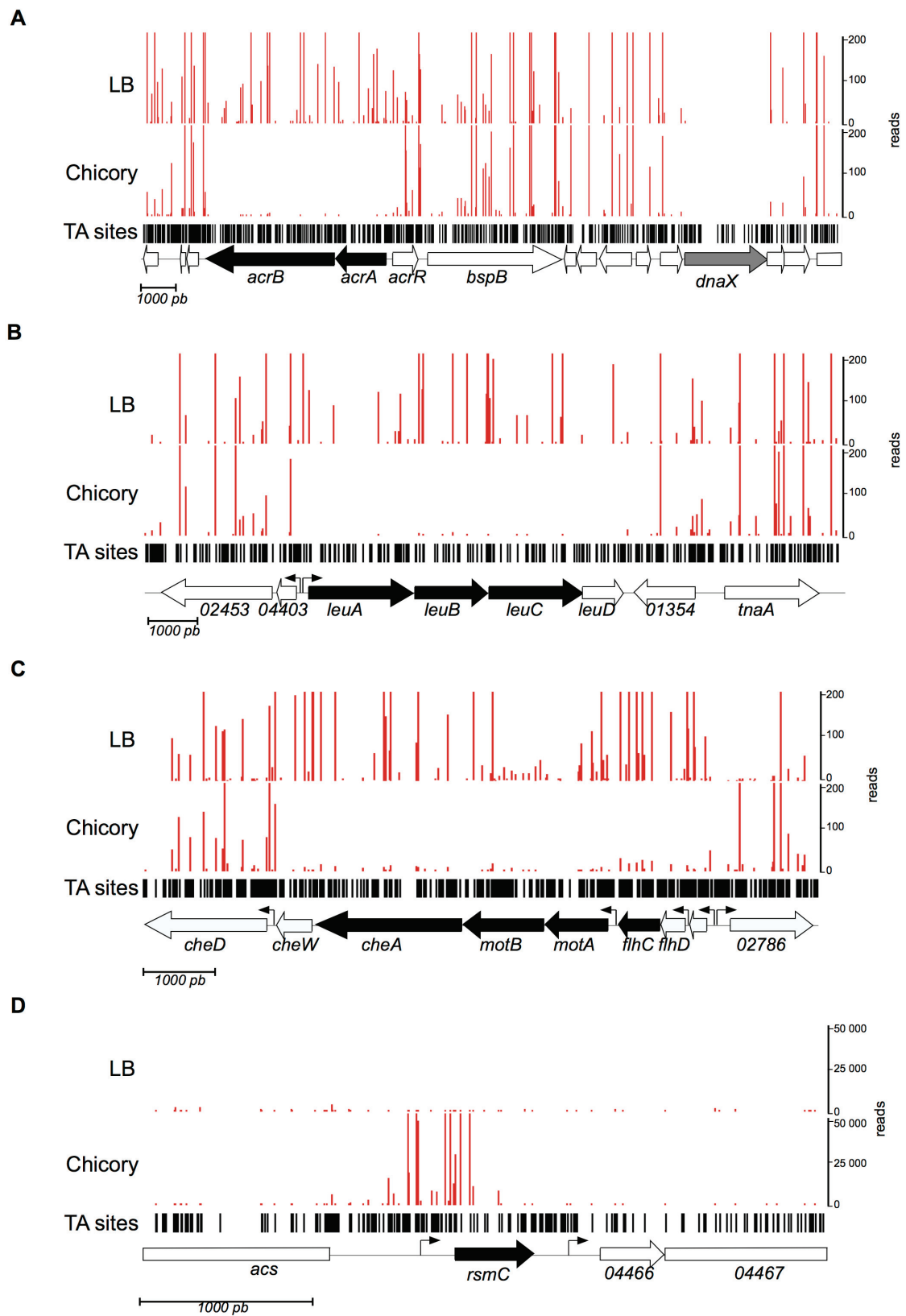
<sup>g</sup> Presence of the gene in an operon (Yes or No)

<sup>h</sup> Operon structure determined by analysis of *D. dadantii* 3937 RNA-seq datasets from Jiang X *et al*, Environ Microbiol. 2016 Nov;18(11):3651-3672. log<sub>2</sub>FC for each gene in operon are indicated in brackets, genes considered to be essential in chicory are indicated in bold (q-value <0.05).

**Figure S1**



# Figure S2





**TABLE S2** Number of genes implicated in KEGG pathway

<b>KEGG pathway No.</b>	<b>Pathway</b>	<b>No. of genes implicated</b>
ddd01100	Metabolic pathways	30
ddd02040	Flagellar assembly	19
ddd01110	Biosynthesis of secondary metabolites	15
ddd00230	Purine metabolism	8
ddd02020	Two-component system	8
ddd01120	Microbial metabolism in diverse environments	8
ddd00240	Pyrimidine metabolism	7
ddd02030	Bacterial chemotaxis	6
ddd00920	Sulfur metabolism	4
ddd00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	4
ddd01200	Carbon metabolism	4
ddd00680	Methane metabolism	3
ddd01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	3
ddd00620	Pyruvate metabolism	3
ddd00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3
ddd01503	Cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance	3
ddd00670	One carbon pool by folate	2
ddd02060	Phosphotransferase system (PTS)	2
ddd00430	Taurine and hypotaurine metabolism	2
ddd00450	Selenocompound metabolism	2
ddd00640	Propanoate metabolism	2
ddd00660	C5-Branched dibasic acid metabolism	2
ddd00030	Pentose phosphate pathway	2
ddd00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	2
ddd00750	Vitamin B6 metabolism	2
ddd02010	ABC transporters	2

Table S3: bacterial strains used in this study

Strain	Description	Reference
<i>Escherichia coli</i> K12		
MFDpir	RP4-2-Tc::( $\Delta$ Mu1::aac(3)IV- $\Delta$ aphA- $\Delta$ nic35- $\Delta$ Mu2::zeo) $\Delta$ dapA::erm-pir) $\Delta$ recA	[1]
DH5 $\alpha$ pir	$\lambda$ pir phage lysogen of DH5 $\alpha$	Laboratory collection
<i>Dickeya dadantii</i>		
3937	Wild type strain	Laboratory collection
A3422	Dda3937_03419::Mu-kan <sup>R</sup>	Laboratory collection
A4277	Dda3937_03424::uidA-kan <sup>R</sup>	Laboratory collection
D7#1	<i>D. dadantii</i> 3937 <i>glmS</i> ::Tn7-gent, Gent <sup>R</sup>	This study
D8	3937 $\Delta$ rsmC	This study
D10	D7#1 $\Delta$ degQ, Gent <sup>R</sup>	This study
D15	3937 $\Delta$ gcpA	This study
D17	D7#1 $\Delta$ metB, Gent <sup>R</sup>	This study
D19	D7#1 $\Delta$ lysA, Gent <sup>R</sup>	This study
D21	D7#1 $\Delta$ purF, Gent <sup>R</sup>	This study
D23	D7#1 $\Delta$ pyrE, Gent <sup>R</sup>	This study
D25	D7#1 $\Delta$ clpSA, Gent <sup>R</sup>	This study
D27	D7#1 $\Delta$ guaB, Gent <sup>R</sup>	This study
D29	D7#1 $\Delta$ leuA, Gent <sup>R</sup>	This study
D31	D7#1 $\Delta$ purL, Gent <sup>R</sup>	This study
D33	D7#1 $\Delta$ cysJ, Gent <sup>R</sup>	This study
D35	D7#1 $\Delta$ hdfR, Gent <sup>R</sup>	This study
D37	D7#1 $\Delta$ flhDC, Gent <sup>R</sup>	This study
D39	D7#1 $\Delta$ carA, Gent <sup>R</sup>	This study

1. Ferrières L, Hémerly G, Nham T, Guérout A-M, Mazel D, Beloin C, et al. Silent mischief: bacteriophage Mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. *J Bacteriol.* 2010;192: 6418–6427.

Table S4: plasmids used in this study

Plasmid	Description	Reference
pSAM-Ec	Suicide mobilizable vector; Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> resistance gene bordered by mariner inverted repeat sequence containing MmeI restriction site, himar1-C9 transposase gene under the control of <i>P<sub>lac</sub></i> .	[1]
pRE112	Suicide vector for allelic exchange in <i>D. dadantii</i> 3937, Cm <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , <i>oriT</i> RP4	[2]
pTn7-M	Km <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup> , <i>ori R6K</i> , <i>Tn7L</i> and <i>Tn7R</i> extremities, standard multiple cloning site, <i>oriT</i> RP4	[3]
pTNS3	Ap <sup>R</sup> , <i>ori R6K</i> , <i>TnsABCD</i> operon, <i>oriT</i> RP4	[4]
pRE112 $\Delta$ cysJ	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>cysJ</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ gcpA	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>gcpA</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ degQ	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>degQ</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ flhDC	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>flhDC</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ guaB	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>guaB</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ metB	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>metB</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ lysA	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>lysA</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ pyrE	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>pyrE</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ purL	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>purL</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ purF	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>purF</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ carA	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>carA</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ clpS/A	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>clpS/A</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ hdfR	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>hdfR</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ leuA	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>leuA</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study
pRE112 $\Delta$ rsmC	<i>Dickeya dadantii</i> 3937, <i>rsmC</i> deletion plasmid, Cm <sup>R</sup>	This study

1. Wiles TJ, Norton JP, Russell CW, Dalley BK, Fischer KF, Mulvey MA. Combining quantitative genetic footprinting and trait enrichment analysis to identify fitness determinants of a bacterial pathogen. *PLoS Genet.* 2013;9: e1003716.
2. Edwards RA, Keller LH, Schifferli DM. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene.* 1998 Jan 30;207(2):149-57.
3. Zobel S, Benedetti I, Eisenbach L, de Lorenzo V, Wierckx N, Blank LM. Tn7-Based Device for Calibrated Heterologous Gene Expression in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth Biol.* 2015 Dec 18;4(12):1341-51.
4. Choi KH, Mima T, Casart Y, Rholl D, Kumar A, Beacham IR, Schweizer HP. Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Feb;74(4):1064-75

Table S5: oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence <sup>a</sup>	Reference
19732+	GTGACCATGCCAGATACACAACC	This study
19732-	TCACAACAGGTTCTTTAACGCATC	This study
LIB_AdaptT	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNN	[5]
LIB_AdaptB	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA	[5]
LIB_PCR_5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAAGACCGGGGACTTATCATCCAACC TGT	[5]
LIB_PCR_3	AATGATACGGCGACCACCGAAGACTCTTTCCTACACGACGCTCTT CCGATCT	[5]
rsmC-sacl-up	CATGAATTCCCGGGAGAGCTCGGACGATATGATCAAACAAG	This study
rsmC-start-rev	TGACGCCATCAGACTCATATGTCCTCTGCTTC	This study
rsmC-stop-fwd	ATGAGTCTGATGGCGTCATAAAACCGGATG	This study
KpnI-rsmC	CAAGCTTCTTCTAGAGGTACCATCGCTCAGGGACACGACC	This study
pyrE-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAGAGCTCATTGGATTGCGATGTGTTG	This study
pyrE-start-rev	TTACACGCCGAAATAGGCTTTCATGACTCCCTC	This study
pyrE-stop-fwd	ATGAAAGCCTATTTCCGGCGTGTAACACAGTTC	This study
pyrE-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAGGTACCTGACAGCCTGATCGAATTTATTG	This study
purL-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAGAGCTCGAATCGTTTGCCAGTTTCG	This study
purL-start-rev	CCAACTGACTATTTCCATCATCTAAATTTCTCTCG	This study
purL-stop-fwd	TGATGGAAATAGTCAGTTGGGGTAATGCGATAAATTAATG	This study
purL-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAGGTACCTCGCCCGATGTGTGATAAAG	This study
purF-sacl-up	CATGAATTCCCGGGAGAGCTCATTGGATTGCGATGTGTTGC	This study
purF-start-rev	CACGCCGAAGTGGGCTTTCATGACTCCCTCTC	This study
purF-stop-fwd	ATGAAAGCCCAGTTCGGCGTGTAACACAG	This study
purF-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAGGTACCCGCATCAACCTGATTCTG	This study

carA-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAG <b>GAGCTC</b> GCTTGATGATATATAAACGGGAAG	This study
carA-start-rev	ATTATTTGGTGTTTGACTTAATCAAAACACCCTCC	This study
carA-stop-fwd	GATTAAGTCAAACACCAATAATCAGAATCCG	This study
carA-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAG <b>GTACCG</b> ATCTTCGCTTTATCGATGG	This study
clpS-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAG <b>GAGCTC</b> TGGTGACGGTGAATTG	This study
clpS-start-rev	TCAGTGAACACTATGATTTCCCATCTTCTATCC	This study
clpA-stop-fwd	GGAAATCATAGTGTTCACTGAGTGAATTGAATACG	This study
clpA-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAG <b>GTACCG</b> AGGATTCGATGGCCAAAG	This study
hdfR-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAG <b>GAGCTC</b> ATGAACCCAATCTTGCATCA	This study
hdfR-start-rev	GCTATGTTCAGTTTCCTCCAAAAATTTTATCGTCATG	This study
hdfR-stop-fwd	TTGGAGGAACTGAACATAGCTTCTTAAACCAC	This study
hdfR-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAG <b>GTACCA</b> ATCGGTGGTGCGGTAGTTC	This study
cysJ-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAG <b>GAGCTC</b> TCAAAGCGGGCATGTTGATA	This study
cysJ-start-rev	CTCTCTGATACGAAGTTGTCAATTGTGGTATCG	This study
cysJ-stop-fwd	ATGACAACTTCGTATCAGAGAGATGTGTACTAATGAGC	This study
cysJ-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAG <b>GTACCA</b> CTCCACCGGGTTAGAGGTG	This study
gcpA-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAG <b>GAGCTC</b> AGCAATCATAAGAGAAAGAACTG	This study
gcpA-start-rev	GTTTACTGGTGATCGAACAAATCGCATCACTG	This study
gcpA-stop-fwd	TTGTTCGATCACCAGTAAACGCCGATTCTG	This study
gcpA-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAG <b>GTACCG</b> ACGCCAGTGAAAACAAG	This study
degQ-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAG <b>GAGCTC</b> TCAGGAACTGGTCAGCCACT	This study
degQ-start-rev	CAACAGATACATTGATTGTAACTCTCTCACGA	This study
degQ-stop-fwd	GTTAACAATCAATGTATCTGTTGCTGCGTTAAGC	This study
degQ-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAG <b>GTACCA</b> GCAGATCGGTCAGGCTGTCT	This study
flhDC-Sacl-up	CATGAATTCCCGGGAG <b>GAGCTC</b> TGGTTGTAGAGTCGCGGTTT	This study
flhDC-start-rev	ACTGCATGAGAG <b>GTACCA</b> TCATATTCCCATC	This study

flhC-stop-fwd	ATG <b><u>GGTACC</u></b> TCTCATGCAGTCTGAGCCTGATG	This study
flhDC-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAG <b><u>GTACC</u></b> CAGAAAGGATGCGGGGATAA	This study
guaB-SacI-up	CATGAATTCCCGGGAGAG <b><u>CTC</u></b> ATGCTTTCCGCCAGCAACT	This study
guaB-start-rev	AGCCCATACACGTAACATGGCAATATCTCACC	This study
guaB-stop-fwd	CCATGTTACGTGTATGGGCTAAGCGCGTTAC	This study
guaB-KpnI-dwn	CAAGCTTCTTCTAGAG <b><u>GTACC</u></b> GTGGCTCATCCACACAT	This study
metB-Sac1-up	CATGAATTCCCGGGAGAG <b><u>CTC</u></b> TTCCACGTATCCGGGTC	This study
metB-start-rev	TTACCTCTTGGCTTTACGCGTCATCGGTGC	This study
KpnI-metB	CAAGCTTCTTCTAGAG <b><u>GTACC</u></b> AGGAAGGTACGGGCATCC	This study
metB-stop-fwd	GACGCGTAAAGCCAAGAGGTAACAATGAGTG	This study
lysA-Sac1-up	CATGAATTCCCGGGAGAG <b><u>CTC</u></b> AGATTGAGCGCCGGGTAAC	This study
lysA-start-rev	CACCCGCTCGTGTGGCATGGATATCGTACC	This study
KpnI-lysA	CAAGCTTCTTCTAGAG <b><u>GTACC</u></b> GATCGATTATCTGGTGCAGC	This study
lysA-stop-fwd	ATGCCACACGAGCGGGTGTAACCGCTC	This study
leuA-Sac1-up	CATGAATTCCCGGGAGAG <b><u>CTC</u></b> GAGCAATCTGCTGCTGAATG	This study
leuA-start-rev	TCACACTGTTTGGTTCATCGGTCTGGTTCC	This study
KpnI-leuA	CAAGCTTCTTCTAGAG <b><u>GTACC</u></b> TCGAAACGGTGATACACCTC	This study
leuA-stop-fwd	ATGAACCAAACAGTGTGATGACCAAGAGTTAC	This study
attTn7-3937-verif	CGAATAGGGTTTCACGACAAAAG	This study
3-Tn7L	ATTAGCTTACGACGCTACACCC	This study

<sup>a</sup> restriction sites are underlined and in bold ; homology region with the pRE112 plasmid are in italic

- Skurnik D, Roux D, Aschard H, Cattoir V, Yoder-Himes D, Lory S, et al. A comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries. PLoS Pathog. 2013;9: e1003582.



#### 4.1.1 Introduction d'article

Les entérobactéries qui provoquent la pourriture molle, tels que *Dickeya* et *Pectobacterium*, sont des pathogènes qui causent des maladies sur de nombreuses plantes d'intérêt économique. Ces pathogènes sont émergents en Europe. La plupart des travaux cherchant à identifier de nouveaux facteurs de virulence s'intéressent pour la plupart aux enzymes de dégradation de la paroi végétale sécrétées par le système de sécrétion de type 2. Durant de nombreuses années, l'identification de facteurs de virulence des pathogènes de plantes a été permise par l'utilisation de mutants individuels et par l'infection d'une plante hôte. Cette dernière méthode est très lente surtout si un grand nombre de mutants sont testés individuellement. La transcriptomique et la protéomique sont également utilisées mais permettent seulement l'identification de gènes sur ou sous exprimés durant l'infection. Les gènes importants pour la survie dans la plante mais dont le niveau d'expression reste inchangé ne sont pas détectés. Afin d'identifier de nouveaux facteurs de virulence ou du moins des gènes importants pour la croissance in planta, nous avons réalisé un crible par Tn-seq après infection d'une banque de mutants de *Dickeya dadantii* dans l'endive. Cette technique permet la détection de mutants ayant un défaut ou un avantage de croissance dans la plante.

Nous avons identifié près de 100 gènes dont l'absence de fonction provoque un défaut ou un avantage de croissance dans la plante. La plupart d'entre eux n'ont pas de rôle connu dans la virulence. De plus, les facteurs de virulence découverts dans notre étude peuvent différer des précédentes études car les facteurs sécrétés (sidérophores, enzymes dégradation de la paroi végétale et autres métabolites) ne sont pas détectés par ce type d'approche.

De nombreux gènes déjà connus pour être impliqués dans la virulence de *Dickeya dadantii* chez la plante ont été révélés par notre étude. Le rôle central de la cascade de signalisation initiée par FlhDC dans le contrôle de la virulence de *Dickeya* a été souligné avec l'identification de nouveaux membres de cette voie de régulation tels que RsmC comme régulateur négatif de FlhDC, HdfR comme régulateur positif de FlhDC et enfin GcpA (une c-di-GMP synthase) dont l'absence fonctionnelle favorise l'infection. D'autres régulateurs, ne faisant à priori pas partis de la cascade de signalisation de FlhDC ont été révélés. LfcR, un régulateur transcriptionnel dont le rôle dans la virulence reste à



déterminer est important pour la virulence. Enfin, la gestion du pool d'acétyl phosphate par AckA/PtA, une molécule signal chez les bactéries, semble jouer un rôle de signalisation majeur dans l'adaptation de *Dickeya* aux tissus de la plante.

De nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés et des acides nucléiques sont également très importants pour l'infection. En effet, quinze gènes impliqués dans le métabolisme des purines et pyrimidines sont essentiels à une infection réussie. Ceci a permis de souligner l'importance de la voie de biosynthèse d'inosine monophosphate (IMP) et d'uridine monophosphate (UMP) pour la pathogénèse. Des gènes de biosynthèse d'acides aminés (cystéine, lysine, méthionine et leucine) sont tous aussi importants durant l'infection. RelA, l'activateur de la réponse stringente chez les bactéries a ainsi été révélé essentiel durant l'infection.

Plusieurs gènes de réponse aux stress variés, rencontrés dans la plante, sont importants. Nous avons par exemple mis en évidence l'importance de la pompe à efflux AcrABTolC, d'un ensemble de protéines réparatrices ou dégradatrices de protéines altérées (ClpA, DegQ, TrxB) ou encore de protéines de réparation de l'ADN (UvrD, HelD). De plus, des facteurs de virulence bien connus comme OpgG/H se sont montrés indispensables à la croissance au sein de l'hôte.

Notre crible a aussi souligné l'importance cruciale de s'approvisionner en fer lors de l'infection. Les mutants des transporteurs des sidérophores TonB ExbB/D sont ainsi non compétitifs dans l'endive.

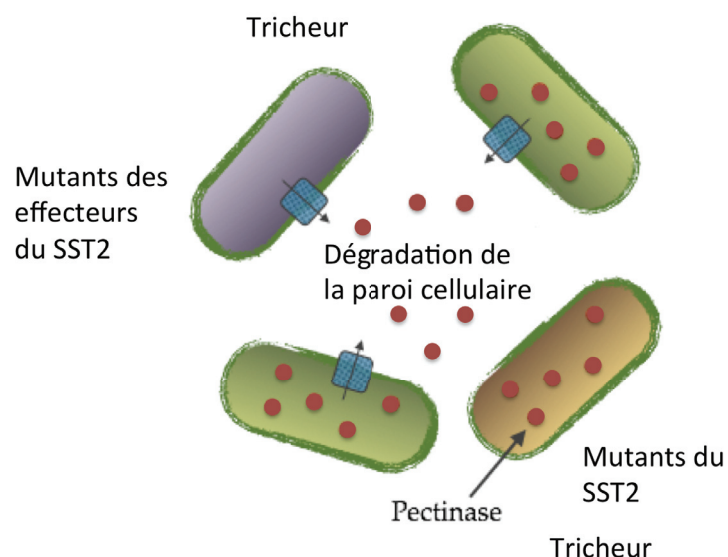
La mobilité bactérienne apparaît également essentielle. De nombreux gènes impliqués dans la synthèse du flagelle, son moteur, le chimiotactisme (*cheA, B, R, W, X, Y, Z*) et les gènes de régulation (*flhC/D, fliA*) associés sont nécessaires durant l'infection. De plus, notre étude a pu mettre en évidence l'importance de la glycosylation des flagelles, qui bien que non essentielle à la mobilité bactérienne est importante pour l'infection.

Enfin, de nombreux gènes ont un score de  $\log_2FC < -4$  qui est non significatif d'après le test statistique de permutation. Parmi ceux ci, on retrouve des gènes impliqués dans la biosynthèse d'acides aminés et d'acides nucléiques (*cysH, ilvC, pyrF, pyrD, purC, thrC, metA, cysK, lysC*), dans la synthèse du flagelle et le contrôle de la mobilité bactérienne (*flgJ, fliO, flgC, fliS, flgG, flgA, flgL, cheW, fliN, fliP, fliK, fliG, fliN*), dans le métabolisme de la pectine et du glucose (*kduD, pgi*), de la glycosylation du flagelle (*vioA*) et de la régulation (*zur, ecpC*). Tous ces gènes pourraient être importants pour la croissance *in planta*.

La première partie de l'étude porte sur la façon dont le Tn-seq a été utilisé sur une banque de mutants de *Dickeya*: caractérisation de la banque, crible réalisé et traitement informatique pour l'identification des gènes. La seconde partie analyse les gènes requis pour la colonisation de la plante hôte. La dernière partie porte sur la validation des résultats de Tn-seq par l'utilisation de mutants de délétion et des complémentations associées.

#### 4.1.2 Discussion

Nos résultats de Tn-seq ont mis en évidence les facteurs essentiels à la réussite de la macération chez l'endive. De nombreux gènes connus pour être impliqués dans la pathogénèse de *Dickeya dadantii* n'ont cependant pas été mis en évidence. C'est le cas des gènes codant les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type 2, des sidérophores ou d'autres molécules volatiles comme le butanediol. Ceci s'explique facilement par le fait qu'un mutant du SST2, ou d'un de ses effecteurs, par exemple, va se développer en utilisant les composés produits par d'autres mutants non affectés dans ces voies. On parle alors de mutants « tricheurs », comme explicité Figure 30.



**Figure 30 : Les mutants « tricheurs » en Tn-seq**

Un mutant incapable de produire le système de sécrétion de type 2 (SST2) ou un de ses effecteurs (bactéries violettes et marron) se multiplie avec d'autres mutants viables pour ces voies (bactéries vertes), profitant alors des effecteurs relargués dans le milieu extracellulaire.

Très peu de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif ont été identifiés. En effet, les gènes codants les catalases (*katG/E*), peroxydases (*ahpCF*), superoxyde dismutases (*sodA*) ou encore les systèmes de réparation de protéines endommagées (*sufABCDE*) ne semblent pas essentiels d'après notre crible. *trxB*, codant une thioredoxine reductase qui réduit de façon indirecte la formation de ponts disulfure et empêche l'oxydation des protéines cytoplasmiques est l'un des seuls gènes révélés en plus d'*uvrD* et *hldD*, dont les hélicases produites pourraient permettre de réparer les dommages causés à l'ADN par les ROS. Ces résultats ne sont pour autant pas surprenants car l'endive a déjà été décrite comme un modèle d'étude inadéquat pour le stress oxydatif [54]. De plus, la génération de ROS est un moyen de défense de la plante mis en place avant l'induction des CWDE bactériens. La quantité importante de bactéries injectée dans notre crible laisse supposer que les CWDE sont rapidement produites ce qui ne permet probablement pas à l'endive le temps d'initier cette voie de défense.

Aucun mécanisme de réponse au stress acide, rencontré en début d'infection, n'a également été identifié dans notre étude. Le système CpxR, impliqué dans le stress de l'enveloppe et connu pour répondre à un faible pH environnant est le seul des systèmes connus à conférer un défaut de croissance lorsque absent ( $\log_2FC$  de *cpxR* = -3,23) bien que son score de  $\log_2FC$  soit non significatif. De même, parmi les mécanismes mis en jeu en réponse aux stress anaérobie et aux peptides antimicrobiens, seuls les gènes *arcA* (qui détecte l'état d'oxydation des ubiquinones de la chaîne respiratoire et qui réprime les gènes du métabolisme aérobie,  $\log_2FC$  = -3,49) et *sapA* (système de transport qui internalise les peptides antimicrobiens de la membrane et les dirige vers des voies de dégradation,  $\log_2FC$  = -3) semblent respectivement jouer un rôle bien que leur score de  $\log_2FC$  soit non significatif également. Ceci pourrait s'expliquer selon plusieurs hypothèses : nos conditions expérimentales (inoculum très concentré en bactérie et feuille d'endive isolée) seraient avantageuses pour *Dickeya* qui n'a besoin d'activer que peu de systèmes de résistances aux stress avant la mise en place de sa stratégie d'infection. Seconde hypothèse, les systèmes de résistance seraient redondants ou se compenseraient entre eux. Ainsi, la perte d'un mécanisme ne permettrait pas forcément la mise en place d'une résistance la mieux adaptée à un stress mais les autres systèmes existants pour ce même stress seraient suffisants à la survie et à la croissance de la bactérie. Ces mutants ne seraient alors pas détectables par Tn-seq. L'hypothèse des

conditions expérimentales pourrait aussi expliquer le fait qu'aucun gène *hrp* du système de sécrétion de type 3 (utilisé pour manipuler les défenses de l'hôte) n'a été détecté dans l'analyse. Cependant, l'hypothèse la plus probable est que les mutants du SST3 vont pouvoir profiter des effecteurs produits par d'autres mutants non affectés pour cette voie.

Bien que certains systèmes de réponse à un stress déjà connus dans la littérature n'aient pas été révélés, plusieurs autres systèmes ont été montrés comme importants. La pompe à efflux AcrABTolC apparaît ainsi comme importante pour effluer bon nombre de composés toxiques [292]. L'accumulation de phospholipides au niveau membranaire est engendrée par un stress et rend les bactéries plus sensibles aux molécules toxiques, ce qui explique le défaut de croissance majeur des mutants des gènes *mlaC* et *mlaF* incapables d'empêcher cette accumulation. D'autres systèmes de défense comme la production d'exopolysaccharide ou la réparation de protéines endommagées apparaissent tout aussi importants chez *Dickeya*. Ainsi, notre crible révèle des lignes de défense au stress indispensables, non redondantes et qui ne se compensent pas entre-elles, sans lesquelles *Dickeya* ne peut pas survivre dans la plante.

Notre étude montre qu'une compétition entre la bactérie et la plante pour les nutriments fait rage. Ceci est bien connu pour la captation du fer et est confirmé par la détection des systèmes de captation des sidérophores tels que *tonB* et *fct* dont les mutants ont un défaut de croissance. Cependant, une compétition pour les acides aminés et nucléiques se déroule également lors d'une infection. En effet, la quantité d'acide aminé disponible, notamment la cystéine, leucine, méthionine, thréonine et isoleucine semble trop faible dans la plante pour permettre aux mutants incapables de les synthétiser de se développer. De même, de très nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse d'IMP et d'UMP, précurseurs des bases purines et pyrimidines, sont essentielles pour la croissance de *Dickeya* dans l'endive. Certaines de ces voies de synthèse sont spécifiques aux bactéries et aux champignons et pourraient être de bonnes cibles pour le développement de nouveaux antimicrobiens.

De façon non surprenante, une grande quantité de gènes impliqués dans la synthèse du flagelle, le chimiotactisme ou des systèmes énergétiques mis en place pour l'actionner sont importants lors de l'infection. Il est intéressant de noter que la mobilité reste

importante même lorsque les bactéries sont injectées directement dans les tissus de l'hôte, par une blessure, comme c'est le cas dans notre étude, elle n'est ainsi pas seulement indispensable à l'entrée du pathogène dans l'hôte ou à sa mobilité à la surface de la plante. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par le fait que *Dickeya* doit continuellement s'échapper des tissus où la plante installe ses mécanismes de réponses afin d'accéder aux tissus voisins et d'autre part pour coloniser des zones non macérées. De plus, la mobilité peut être indispensable afin de se déplacer vers les sources de carbone comme le glucose circulant dans les tissus ou vers les acides aminés qui sont rares dans les tissus de la plante. La glycosylation du flagelle apparaît comme essentielle dans la pathogénèse de *D. dadantii* dans l'endive, mais aussi dans celle de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* et *Burkholderia cenocepacia* sur le tabac et *Arabidopsis* respectivement [293], [294]. Cette glycosylation n'est pas requise pour le fonctionnement du flagelle car les mutants de ces gènes sont mobiles chez *D. dadantii* (données non présentées). Cependant la glycosylation pourrait être un moyen pour la bactérie de se cacher des défenses immunitaires de l'hôte. Les flagelles non glycosylés pourraient ainsi être rapidement détectés en tant que PAMP et activer les systèmes de réponses de la plante qui conduirait à une infection abortive.

La régulation des facteurs de virulence est nécessaire afin d'éviter la détection du pathogène dans la plante trop précoce et pour permettre une macération des tissus. FlhDC joue un rôle majeur dans cette régulation en contrôlant le fonctionnement des flagelles et des facteurs de virulence comme la production des CWDE et le SST3. Outre ce régulateur majeur déjà connu chez plusieurs pathogènes comme *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* et *Ralstonia solanacearum*, nous avons mis en évidence l'implication d'autres régulateurs jamais décrits chez *D. dadantii*. RsmC, qui contrôle FlhDC et ainsi la production de CWDE et du flagelle chez *Pectobacterium carotovorum* [295] est aussi important chez *Dickeya*. HdfR est le second régulateur mis en évidence chez *Dickeya* et contrôlant l'expression de FlhDC chez *E. coli* [296] (Figure 31).

D'autres niveaux de régulation connus, comme GcpA et EcpC, contrôlant le pool de c-di-GMP ou AckA/PtA contrôlant le pool d'acétyle phosphate, qui ont un rôle important dans la virulence de *D. dadantii* sont retrouvés par notre crible [297]–[299]. Une forte concentration de c-di-GMP réprime l'activité de RpoN impliquée dans la mise en place de la virulence par le SST3. Comme le SST3 n'apparaît pas important dans notre crible

mais que les gènes *gcpA* ( $\log_2FC = +5,23$ ), *ecpC* ( $\log_2FC = -5,74$ ) et *rpoN* ( $\log_2FC = -3,4$ ) sont importants pour la pathogénèse bien que leur score de  $\log_2FC$  ne soit pas toujours significatif (seul *gcpA* l'est parmi les trois), il est probable que ces trois gènes participent à une autre voie régulant les facteurs de virulence (Figure 31).

LfcR est un régulateur régulant les gènes qui lui sont adjacents [300] et qui apparaît aussi comme essentiel pour la virulence de *Dickeya*. Cependant, aucun des gènes adjacents qu'il régule n'est essentiel d'après notre crible ( $\log_2FC > -1$ ). Ceci indique que LfcR régulerait d'autres gènes probablement impliqués dans la virulence de *Dickeya*. La détermination de ses cibles pourrait conduire à décrire de nouveaux facteurs de virulence. Un schéma bilan des voies de régulation des systèmes de virulence mise en évidence par notre crible est présenté Figure 31. D'autres régulateurs, au score de  $\log_2FC$  non significatif dans notre crible mais dont l'implication dans la virulence a déjà été prouvée sont indiqués. C'est le cas de PecS/T [301][302], des régulateurs négatifs de virulence bien connus chez *D. dadantii* (Figure 31).

Un autre régulateur négatif de la famille LuxR est mis en évidence dans notre crible mais dont les cibles sont inconnues : Dda3937\_00840. La détermination de ses cibles pourrait une fois de plus permettre de déterminer de nouvelles voies contrôlant la virulence de *Dickeya*.

*zur* ( $\log_2FC = -11,27$ ) code un régulateur qui semble avoir une importance capitale pour la multiplication de *D. dadantii* dans l'endive malgré un score de  $\log_2FC$  non significatif. Zur est un régulateur qui lie des ions  $Zn^{2+}$  en tant que cofacteur et qui réprime les gènes *znuABC* responsable de l'entrée du zinc dans la cellule. Malgré son rôle essentiel de cofacteur, le zinc en forte concentration exerce une activité antimicrobienne [105], [303], [304]. Son activité antimicrobienne peut être directe, en se liant directement et de façon aspécifique à des enzymes. Le zinc conduit aussi à une hypersensibilité bactérienne en gênant l'import d'autres métaux essentiels comme le manganèse [305], [306]. Chez l'Homme, le système immunitaire inné utilise le zinc comme un puissant antimicrobien au sein du phagolysosome. C'est notamment un des système de défense utilisé contre les pathogènes *M. tuberculosis* ou *S. typhimurium* lors d'une infection [307]. Au sein de la plante, *Dickeya* doit probablement faire face à un excès d'ions  $Zn^{2+}$ , puissant antimicrobien utilisé par la plante comme système de défense. Ceci indique que

*Dickeya* a besoin de se prémunir d'un excès d'ions zinc dans sa cellule afin de survivre et de continuer son cycle infectieux.

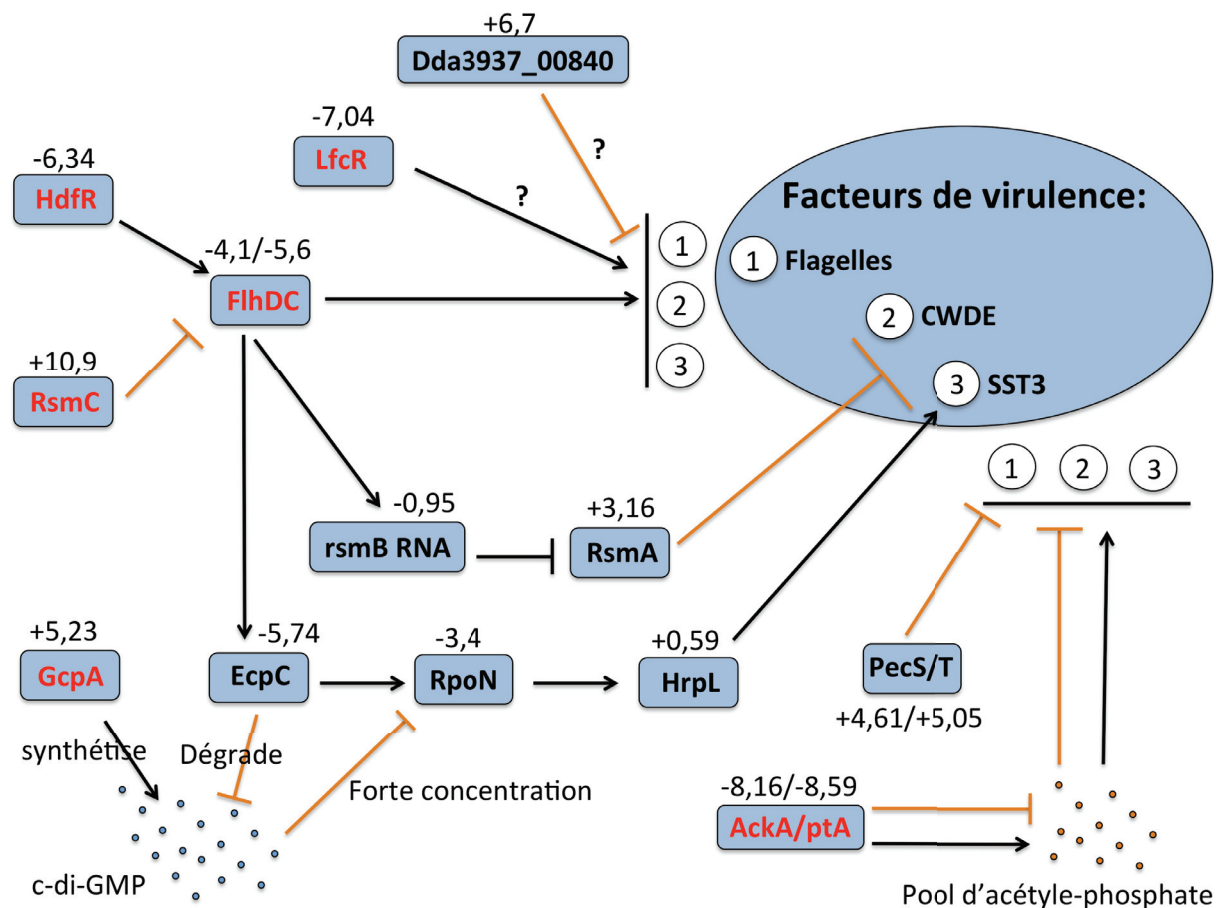
L'utilisation de l'outil Tn-seq sur les phytopathogènes n'est encore pas très répandue. Duong et ses collaborateurs ont été parmi les premiers à utiliser cet outil sur un phytopathogène [260]. Cette équipe a créé une banque de 40,000 mutants théoriques (d'après un dénombrement sur gélose) de *Pantoea stewartii* (précédemment appelé *Erwinia stewartii*) afin de déterminer les gènes nécessaires à la croissance dans le xylème de maïs. Cette banque de mutants a été créée via l'utilisation d'un transposon de type mariner comme lors de notre étude. La virulence de *Pantoea stewartii* dépend énormément du fonctionnement de son système de sécrétion de type 3 et de ses effecteurs dont les gènes sont portés sur des plasmides, ainsi que des protéines de quorum sensing nécessaires à la formation de biofilm qui va bloquer le transport de l'eau dans le xylem. Ces facteurs de virulence sont sécrétés et ne sont donc pas mis en évidence par Tn-seq. La plupart des gènes que les auteurs ont mis en évidence codent des protéines de la membrane externe (ex : OmpC/A), des transporteurs, des enzymes du métabolisme (ex : Lon), des régulateurs transcriptionnels (ex : LrhA/RcsA/OmpR), des protéines à fonction inconnue ainsi que des protéines impliquées dans l'homéostasie du fer (ex : EfeO, DSJ\_03320). L'acquisition du fer, comme dans notre crible, apparaît comme un mécanisme majeur pour le développement du phytopathogène dans son hôte. C'est également le cas de la synthèse de certains acides aminés comme le prouve par exemple le défaut de croissance des mutants des gènes *DSJ\_05970* et *DSJ\_14590* impliqués dans la biosynthèse de la thréonine et du tryptophane. La plante hôte apparaît dans cette étude et la nôtre comme un milieu carencé en acides aminés et en métaux essentiels comme le fer. Ce phénomène est probablement une stratégie de l'hôte afin de ralentir la progression d'un pathogène. LrhA est un régulateur de la mobilité de surface chez *Pantoea stewartii*. Comme chez *D. dadantii*, la mobilité est donc primordiale pour le pouvoir pathogène. OmpR, régulateur impliqué dans la réponse à de nombreux stress (pH, osmotique) et contrôlant les porines à oligogalacturonides KdgM/N chez *D. dadantii* apparaît aussi essentiel chez *P. stewartii*. Tout comme chez *D. dadantii*, quelques systèmes de réparation tels que l'hélicase RhlB et la protéine RadA jouent un rôle primordial pour la survie de *P. stewartii* dans le maïs. La plupart des voies nécessaires à la survie de *P. stewartii* dans le maïs ont aussi été mise en évidence dans



notre crible suggérant que les grands mécanismes de survie des deux phytopathogènes dans une plante hôte sont communs.

Les goulots d'étranglements sont souvent présents lors de l'infection d'un hôte animal ou végétale (voir partie 4.3.2). Nous avons estimé qu'un mutant sur quatre survie après quatre heures d'infection (la multiplication bactérienne est quasi nulle durant cette période [211]) d'une feuille d'endive (données non présentées). Afin de minimiser ce goulot d'étranglement lors de notre expérience de Tn-seq, plusieurs feuilles d'endive ont été infectées par la banque de mutants de *D. dadantii* et la macération de l'ensemble de ces feuilles a été récupérée puis mélangée. De cette manière, si un mutant meurt de manière stochastique dans une feuille d'endive, il peut être présent dans les autres. Enfin, le coefficient de corrélation de 0,98 obtenu après comparaison des duplicats biologiques indique que le goulot d'étranglement a été largement minimisé durant notre expérience. Ce goulot d'étranglement a cependant été assez important lors d'autres expériences de Tn-seq, notamment lors de l'étude des gènes importants pour la colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par *Pseudomonas simiae* ou lors de la caractérisation des gènes essentiels de *Pantoea stewartii* ssp. *Stewartii* pour l'infection du maïs[260], [308]. Par exemple, BJ. Cole et ses collaborateurs ont déterminé que seulement 100 à 1000 événements de colonisation des racines étaient possible après inoculation de  $10^7$  mutants, résultant d'un étroit goulot d'étranglement dans lequel 99,99% des mutants de *P. simiae* utilisés sont perdus par un processus aléatoire [308]. Un goulot d'étranglement étroit conduisant à une corrélation faible entre les duplicats biologique du Tn-seq de *P. stewartii* a également conduit Duong et ses collaborateurs à traiter ces duplicats de manières indépendantes [260].





**Figure 31 Bilan des systèmes impliqués dans la régulation des facteurs de virulence chez *D. dadantii***

Les facteurs de virulence, ici noté 1 (flagelles), 2 (CDWE) et 3 (SST3) sont régulés pas un grand nombre de protéines. FlhDC est le régulateur central et active ces trois facteurs de virulence. Il est lui même régulé positivement par HdfR et négativement par RsmC. FlhDC active aussi le petit ARN rsmB qui interagit avec RsmA afin de lever la répression sur les CWDE et les gènes codants le SST3. FlhDC active aussi EcpC qui régule négativement le pool de c-di-GMP et positivement le facteur sigma RpoN. GcpA a lui une action antagoniste à EcpC en favorisant la synthèse du c-di-GMP. Cette voie par l'intermédiaire de HrpL active la transcription des gènes du SST3. Les répresseurs PecS/T répriment les facteurs de virulence. La voie AckA/PtA régule le pool d'acétyle phosphate qui selon sa concentration active ou réprime les facteurs de virulence. D'autres régulateurs comme LfcR et Dda3937\_00840 ont un rôle inconnu dans la virulence. Flèche noir : activation. Barre orange: répression. Couleur rouge : gènes dont le score de log<sub>2</sub>FC est significatif en Tn-seq. Les chiffres représentent les valeurs de log<sub>2</sub>FC.

### 4.1.3 Résultats additionnels

Des infections individuelles ont été réalisées sur des feuilles d'endives avec les mutants de délétion construits dans le cadre de cette étude. Ces infections ont été réalisées de la même façon que les co-inoculations (voir Matériels et Méthodes), excepté qu'une seule souche à la fois est injectée dans l'endive. Cette expérience a pour but d'observer si les gènes mutés ont un impact important sur le pouvoir pathogène en recherchant un retard ou une absence complète de symptôme de macération. Ces résultats donnent une idée de l'importance d'un gène dans le pouvoir pathogène de la bactérie et sont un premier crible afin de déterminer de bonnes cibles pour le développement potentiel d'antimicrobiens.

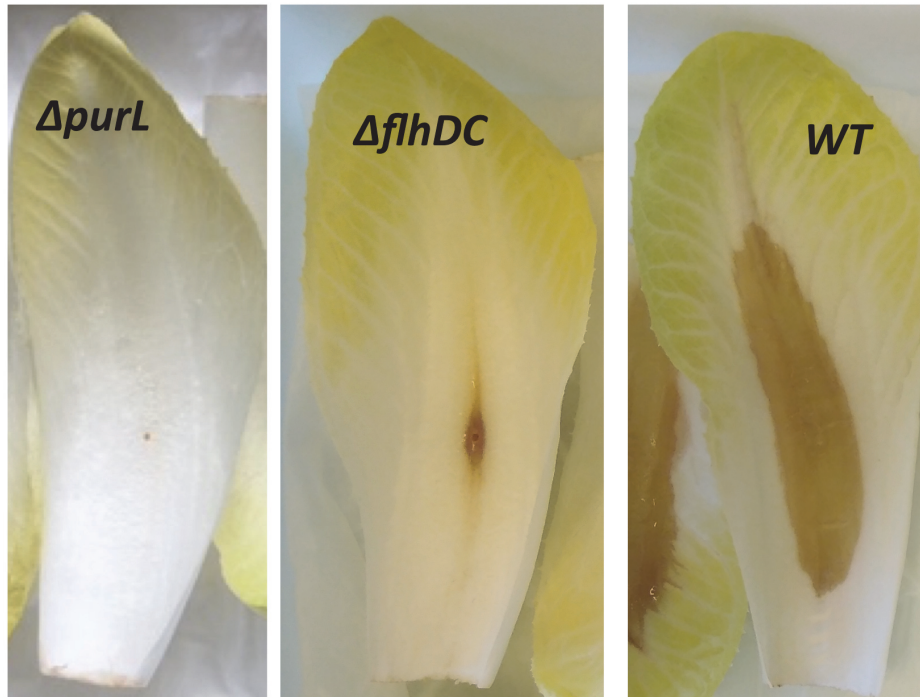
Les résultats sont présentés Figure 32 sous forme de photographies après 20 heures d'infection et de graphiques présentant la taille de la macération sur feuille d'endive. La souche sauvage a été utilisée comme référence. Une absence presque totale de macération est observable pour les mutants *ΔmetB*, *ΔflhDC*, *ΔpurF*, *ΔlysA*, *ΔglpD*, *ΔcarA*, *ΔpurL* et *ΔguaB* (Figure 32). Concernant les mutants *ΔdegQ*, *ΔleuA*, *ΔcysJ* et *ΔackA/pta*, un phénotype intermédiaire est observé. Certaines feuilles d'endives infectées présentent une macération importante alors que pour d'autres le phénotype est moins marqué et ce pour le même mutant. De plus, l'infection semble parfois avoir lieu mais elle apparaît plus lente que pour la souche sauvage. Les gènes impliqués sont donc importants pour un pouvoir pathogène optimal mais pourraient être dispensables selon la capacité de la plante à se défendre. Enfin, nous n'observons pas de différence significative pour les mutants *ΔclpSA*, *ΔhdfR*, *ΔDda3937\_03424*, *ΔgcpA* et *ΔrsmC* avec la souche sauvage. Ceci n'est pas surprenant à la vue des phénotypes peu marqués des mutants *ΔclpSA* et *ΔhdfR* lors des co-infections (voir publication). De plus, le mutant *ΔDda3937\_03424* présentait, à notre grande surprise, un défaut d'infection seulement dans le céleri. Enfin, les mutants *ΔgcpA* et *ΔrsmC*, censés conférer un avantage de croissance lors de l'infection, n'ont pas été validés lors de cette expérience. Une infection sur des plants entiers ou avec un inoculum plus faible pourrait permettre de confirmer leur importance dans la virulence de *D. dadantii*.

Ces résultats confirment l'importance majeure des voies de biosynthèse des acides aminés et acides nucléiques entre autres dans le pouvoir infectieux de *Dickeya Dadantii*. Ces voies pourraient ainsi être de bonne cible pour le développement d'antimicrobiens. *Dickeya* peut infecter une dizaine d'hôtes différents (pommes de terre, céleris,

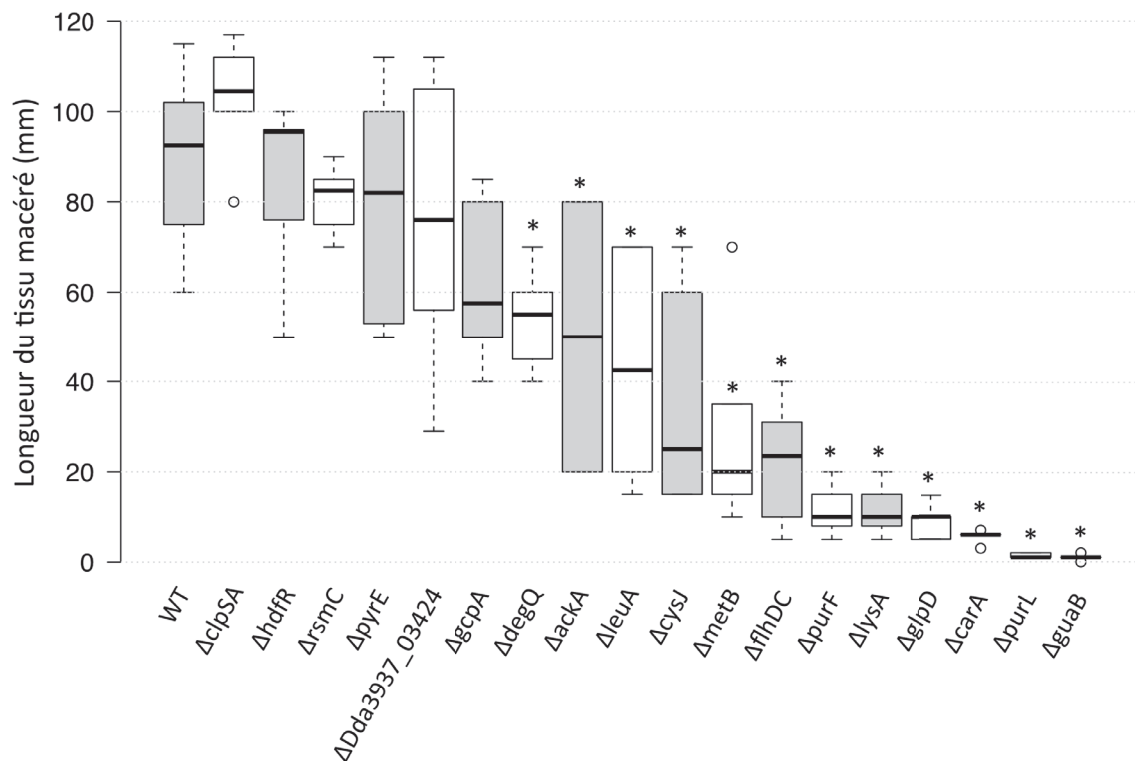
ornementales etc...). Les systèmes de défense ainsi que les voies métaboliques de chaque plante peuvent varier. Les gènes requis pour l'infection de tous ces hôtes peuvent alors varier considérablement. Il serait intéressant de tester ces mutants sur de nombreux hôtes, notamment des plantes entières, afin de déterminer les voies globales et indispensables au pouvoir pathogène de cette bactérie.

Le Tn-seq a souvent été utilisé chez des pathogènes humains ou animaux, mais très peu d'études avaient été réalisées sur un pathogène de plante. Notre étude a permis d'identifier de nombreux gènes à fonctions inconnues indispensables au pouvoir pathogène de *Dickeya* et pouvant être de nouveaux facteurs de virulence.

(a)



(b)



**Figure 32: Infection d'endive par les mutants de délétion de *D. dadantii*.**

(a) Exemples de mutants avirulents en comparaison avec la souche sauvage. (b) Macération de feuilles d'endives après infection individuelle par les différents mutants de délétion ainsi que par la souche sauvage. \* : p-value < 0,05 (test U de Mann Whitney).



# Article 2

## 4.2 Genome wide identification of metal resistance genes in *Pseudomonas putida* KT2440

Kevin Royet, Nicolas Parisot, Charlotte Oriol, Laura Kegoat, Agnès Rodrigue and Erwan Gueguen

Article en préparation pour soumission à Environmental Microbiology



1 full title:

2 **High-throughput Tn-seq screens identify new players in**  
3 **the resistance of *Pseudomonas putida* KT2440 to an excess**  
4 **of copper, cobalt and cadmium.**

5  
6 Kevin Royet<sup>1</sup>, Nicolas Parisot<sup>2</sup>, Charlotte Oriol<sup>1</sup>, Laura Kergoat<sup>1</sup>, Agnes  
7 Rodrigue<sup>1</sup> and Erwan Gueguen<sup>1\*</sup>

8 \*Corresponding author. [erwan.gueguen@univ-lyon1.fr](mailto:erwan.gueguen@univ-lyon1.fr)

9  
10 Running title: *Pseudomonas putida* metal resistance genes

11  
12 1 Univ Lyon, Université Lyon 1, INSA de Lyon, CNRS UMR 5240 Microbiologie  
13 Adaptation et Pathogénie, F-69622 Villeurbanne, France.

14 2 Univ Lyon, INSA-Lyon, INRA, BF2I, UMR0203, F-69621, Villeurbanne, France

15  
16  
17  
18 **Running head:** *Pseudomonas putida* genes important for metal resistance

19  
20 **Keywords:** cobalt, cadmium, zinc, copper, stress, efflux, resistance



## Abstract

Chemical waste with toxic effect are released in the environment by industrial and urban activities. *Pseudomonas putida*, a rhizospheric bacterium, harbors a large variety of genes able to tackle hydrocarbons, heavy metals or even xenobiotic compounds in its natural life environment. We used in this study a Tn-seq approach to determine the whole essential genome of *Pseudomonas putida* to survive in presence of an excess of metals in a culture medium. Most of studies that identify genes involved in metal resistance in *P. putida* are focused in over/underexpressed genes and could so miss other genes important for metal resistance whose expression does not change. Tn-seq allowed the detection of mutants with reduced fitness in presence of metals. We validated our screen by the identification of known metal resistance gene such as *czcA1* (PP\_0043), *cadA3* (PP\_5139) and *pcoA2* (PP\_5380). Their mutants were underrepresented in presence of zinc, cadmium and copper respectively. In this study, we also demonstrate that PP\_1663 and PP\_0887 (Cd), PP\_5337 (Cu) and PP\_5002 (Co) are genes involved in metal resistance in *P. putida*. These genes have never before been described as having a link to metal resistance, confirming that metal resistance mechanisms are not completely understood in *P. putida*.

## Introduction

*Pseudomonas putida* is an ubiquitous saprophytic bacterium that can utilize various source of carbons and energy. This soil microorganism was massively used as an experimental model to studied the biodegradation of aromatic compounds or hydrocarbons (Timmis 2002; Wu et al. 2011). This bacterium is able to colonize various habitats and was isolated from water, soil and plant rhizosphere sometimes polluted by various compounds (Clarke 1982; Nelson et al. 2002). Complete genome analysis revealed that *P. putida* harbors a large variety of genes involved in metal homeostasis or resistance, suggesting that the bacteria can survive in metal polluted environment (Cánovas et al. 2003).

Metals play a central role in the cell processes of microorganisms. Some metals such as nickel, cobalt, copper, zinc and other are required as nutrients and are thus essential. Indeed, they function as stabilizers of protein structures or bacterial cell walls, as catalysts for biochemical reactions and serve in maintaining osmotic balance (Bruins et al. 2000). However, some of them can be very toxic for cells. Metal toxicity occurs in a variety of ways: oxidative damage due to the production of reactive oxygen species, DNA damage, protein damage through the displacement of essential metals from their native binding sites,

binding to respiratory enzymes, etc (Bruins et al. 2000). Although some metals are essential for cells living, there are all toxic in excess. Concentrations of metal ions in cell should be tightly regulated to maintain an optimal cellular activity. To maintain its metal homeostasis, bacteria use a variety of system such as uptake/efflux of metals, chelation or sequestration (Bruins et al. 2000). Plenty of these systems have been identified in *Pseudomonas putida* which involve P-type ATPase (for instance CadA for cadmium resistance or CzcA for cadmium, zinc and cobalt resistance), sequestration proteins (for instance CopA for copper resistance), uptake (ZnuB/C or NiKABCDE), regulators or proteins involved in oxydo-reduction mechanisms (Cánovas et al. 2003; Miller et al. 2009; Manara et al. 2012). Regarding to metal stresses, complete genome analysis has shown that *P. putida* genome contains 61 open reading frame probably involved in metal tolerance or homeostasis and seven more possibly involved in metal resistance (Cánovas et al. 2003). Proteomic technologies have also been employed to elucidate the response of *P. putida* to an inhibitory concentration of different metals (Ray et al. 2013; Manara et al. 2012; Miller et al. 2009; Cheng et al. 2009). These studies showed that a large number of *P. putida* genes are involved in homeostasis, tolerance and resistance to a different panel of metals.

Although considered as a powerful approach, omics approaches (proteomics and transcriptomics) are limited by detectability and by the fact that only genes whose expression change (under/over expression) between two conditions are detectable. These approaches may have missed some important factors not targeted by these analyses. Subsequently, more global screens need to be performed to identify new factors involved in metal resistance in *P. putida*. Screening of *P. putida* CD2 mutants obtained by Tn5 insertions was also realized in presence of cadmium and confirmed and completed the overview of the *P. putida* stress responses (Molina-Henares et al. 2010; Hu & Zhao 2007). However, the saturation of the Tn5 libraries was low indicating that some genes could be missed during these analyses. Moreover, the number of tested mutants was limited by the necessity to test individual mutant in each condition.

To have a more complete view of the genes required for the metal resistance of *P. putida*, we used in this work a high-throughput sequencing of a saturated transposon library (Tn-seq) to screen tens of thousands random insertion mutants of *P. putida* in presence of metals (van Opijnen et al. 2009). Tn-seq has been used to characterize a variety of essential genes in different conditions and different species, such as essential genes for gut human colonization of *Bacteroides thetaiotaomicron*, mouse colonization by human pathogens *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Streptococcus pneumoniae*, tobramycin resistance genes of *P.*

*aeruginosa* and even toxic compounds resistance genes in *P. putida* (Fu et al. 2013; Skurnik et al. 2013; Gallagher et al. 2011; van Opijnen et al. 2009; Goodman et al. 2009; Calero et al. 2018). Thus, Tn-seq is a very powerful method to identify genes required for bacterial growth in presence of a stress. However, this technology has not yet been employed to discover genes involved in metal resistance. By applying this technique to screen a *P. putida* KT2440 mutant library in presence of metals in the culture medium, we identified genes required for growth in a cobalt, copper, zinc (essential metals) or cadmium (non essential metal) rich culture medium. Among them, we found *czcA1*, *cadA3* and *pcoA2* already known to be involved in zinc, cadmium and copper resistance respectively, validating the approach employed. Moreover, genes never described in metal resistance were also discovered and were validated by in-frame deletion. We thus demonstrated that PP\_1663 and PP\_0887 (Cd), PP\_5337 (Cu) and PP\_5002 (Co) are genes involved in metal resistance in *P. putida*.

## Results and discussion

### Characterization of *P. putida* KT2440 Himar1 transposon library

Tn-seq screening has been performed many times with the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. A elegant strategy that was developed is the use of a modified Himar9 mariner transposon derivative carrying *MmeI* restriction sites in the inverted repeats (IR) and a gentamicin resistance cassette between the IRs (Skurnik et al. 2013). As Mariner transposon inserts specifically into the genome in TA sites, the number of TA sites that can be targeted by this transposon in *P. putida* KT2440 is 129,002. We used this transposon in *P. putida* KT2440 to generate a pool of ~ 1,000,000 colonies. Two DNA libraries were prepared from this pool and subjected to high-throughput sequencing. The TPP software (DeJesus et al. 2015) was used to determine the number of reads at each TA site for each technical replicate. 91,882 and 93,147 unique insertions in TAs were detected in each sample sequencing, with an average numbers of 91 and 96 reads per TA respectively (Table 1). The Tn-seq library preparation was highly reproducible with a Pearson correlation coefficient of 98% (Fig.S1). From our initial pool of mutants, the density of Tn insertion was ~ 70% and the location of the unique insertions showed an even distribution around the chromosome (Fig.1A). This indicates very good quality and coverage of our *P. putida* Tn-seq library.

Next, gene essentiality of the Tn-seq input libraries was determined with the TRANSIT software (DeJesus et al. 2015) that use the Hidden Markov Model (HMM) method to predict

essentiality and non-essentiality for individual insertion sites (DeJesus & Ioerger 2013). A  $\log_2FC$  value was calculated for each gene corresponding to the ratio between the measured number of reads and the expected number of reads. The distribution of  $\log_2FC$  values show a bimodal distribution with the left peak corresponding to putative essential genes (Fig. 1B).

Out of the 5564 genes of *Pseudomonas putida* KT2440 identified in the *Pseudomonas* database (comprising CDS, ncRNA, rRNA, tRNA and tmRNA), the HMM analysis led to the identification of 600 genes essential for growth onto LB agar, representing 10.8% of the genes of *P. putida* KT2440. 223 genes were categorized as Growth Defect genes (GD, i.e. mutations in these genes lead to loss of fitness), 435 as growth advantage genes (GA, i.e. mutations in these genes lead to gain of fitness) and 4458 as non-essential genes (NE) (Fig. 1B).

#### **Screening of genes important for metal resistance.**

To determine the genes involved in metal resistance in *P. putida* KT2440, we tested three essential metals (copper, zinc, cobalt) and one non essential metal (cadmium). We chose the LB rich medium in our screens instead of minimal medium to avoid the loss during growth of auxotrophic mutants of biosynthesis pathways that could be important for metal resistance. Cultures were made in LB rich medium supplemented with sub-inhibitory concentration of one metal ions solution. As a control, a culture was made under the same condition without metal in excess. For each metal, the maximum concentrations to be used have been determined so that no difference in growth rates during the exponential phase could be observed between the cultures (Fig. S2). We hypothesized that in these conditions, only homeostatic mechanisms would selectively be activated rather than pleiotropic responses to metal toxicity. In the screens in LB, metals were thus added independently at the following subinhibitory concentration: cobalt 10  $\mu M$ , copper 2.5 mM, Zinc 125  $\mu M$  and cadmium 12.5  $\mu M$ .

Biological replicate were performed to insure the reproducibility of the method. The cultures were inoculated with  $10^7$  bacteria from the mutant pool. After twelve divisions in presence of metals in the culture medium, at 28°C, the final pools of mutant were collected. Sequencing transposon insertion sites of the final pools followed by the TPP analysis indicated that the results were highly reproducible with a Pearson coefficient correlation > 90% for each dataset (Figure S1).

In order to test the statistical significance of the identified genes conferring to *P. putida* a loss or a gain of fitness in metal rich medium, we performed the RESAMPLING (permutation

test) analysis of the TRANSIT software. We systematically compared the results obtained after metal-free cultivation and after cultivation with a surplus of a metal. Applied to our Tn-seq datasets and selecting only genes achieving a FDR adjusted p-value (q-value)  $\leq 0.05$ , we identified 9 genes involved in cobalt resistance, 14 in copper resistance, 3 for zinc resistance, 8 for cadmium resistance. From these 28 genes, we applied an additional cutoff by removing 3 genes with a mean read count in LB  $< 2$  (less than 2 reads in average per TA) and that are classified as essential or growth defect in LB. We finally retained 25 genes for further analysis (Fig. 2). 23 of them were classified as non essential in LB, the 2 left as growth defect and growth advantage. Some of these genes, in bold in Figure 2, were already known to play a role in metal resistance in *P. putida*, confirming the validity of the Tn-seq approach.

## **Analysis of the genes of *P. putida* required for metal resistance**

### **Copper resistance.**

We determined the essential genome of KT2440 required for copper resistance using an subinhibitory concentration of copper (Fig. S2). The essential copper metal is required as a cofactor for electron transport and redox enzyme systems for aerobic bacteria. Copper exists in two different states in the bacteria, the less toxic Cu(II) oxidised state that could be transform in the reduced Cu(I) state under redox system, with higher toxic properties. Copper is toxic in cells by its ability to displace other metals from essential complexes and by binding in unspecifically manner to diverser biomolecules. 14 candidate genes were found to be possibly involved in copper resistance.

#### *inner membrane protein Cu<sup>+</sup>-ATPase*

The role of *P<sub>IB</sub>-type ATPases* in copper resistance has been particularly well studied in *P. aeruginosa* PAO1. Transmembrane inner membrane protein *P<sub>IB</sub>-type ATPases* CopA are responsible for cytoplasmic Cu<sup>+</sup> efflux. *P. aeruginosa* PAO1 owns two homologous Cu<sup>+</sup>-ATPases, CopA1<sub>PAO1</sub> (PA3920) and CopA2<sub>PAO1</sub> (PA1549). CopA1<sub>PAO1</sub> was expressed in response to high Cu (Teitzel et al. 2006; Quintana et al. 2017), and its deletion induced copper sensitivity (González-Guerrero et al. 2010). However, CopA2<sub>PAO1</sub> is not important for copper resistance but plays a role in the loading of copper into cytochrome c oxidase subunits. Both enzymes export cytoplasmic Cu<sup>+</sup> into the periplasm (González-Guerrero et al. 2010). In *P. putida* KT2440, only one copper Cu<sup>+</sup>-ATPase is found. Encoded by *PP\_0586*, the protein was named CadA2 or PacS (we keep the name *cadA2*<sub>KT2440</sub> in the further section, which is the name indicated in the pseudomonas database). It was previously shown that

CadA2<sub>KT2440</sub> is highly produced in presence of copper in minimal salts medium (Miller et al. 2009). In our Tn-seq screen in presence of copper, cadA2<sub>KT2440</sub> mutants are strongly disadvantaged (Fig. 2 and Table 2). Interestingly, cadA2<sub>KT2440</sub> is the orthologous gene of CopA1<sub>PAO1</sub>, which confirms the importance of this Cu<sup>+</sup>-ATPase in the *Pseudomonas* genus. In *P. aeruginosa*, copA1<sub>PAO1</sub> is positively regulated by CueR (Teitzel et al. 2006; Quintana et al. 2017). This transcriptional regulation was not verified in *P. putida* but the operon structure of cueR<sub>KT2440</sub> (PP\_0585) and cadA2<sub>KT2440</sub> suggest that cadA2<sub>KT2440</sub> is regulated by CueR<sub>KT2440</sub>.

#### *Outer membrane protein PcoB*

In some bacterial species, an outer membrane porin (PcoB) appears to contribute to periplasmic Cu<sup>+</sup> efflux. PcoB is often found with PcoA, a putative periplasmic multi-copper oxidase (Lee et al. 2002). PcoAB were initially described as part of a copper resistance Cop operon in *Pseudomonas syringae* (Cha & Cooksey 1991). For this reason, PcoA proteins were sometimes named CopA, whereas they are functionally different from the previously described CopA proteins which are ATPases of the inner membrane (Cha & Cooksey 1991) (Miller et al. 2009). In *P. syringae*, PcoA and pCoB binds copper (Cha & Cooksey 1991). In *P. aeruginosa*, the orthologous system named PcoA/B (encoded by PA2065 and PA2064) is induced up to 70 fold in presence of high copper sulfate concentration (Teitzel et al. 2006; Quintana et al. 2017). In *P. putida* KT2440, the orthologous genes of PA2065 and PA2064 are PP\_5379 (copB2) and PP\_5380 (copA2) respectively. For clarity, we decided to rename these genes pcoB2 (PP\_5379) and pcoA2 (PP\_5380) respectively. Mutants of these genes harbors a growth-defect phenotypes in presence of copper (Fig. 2, Table 2). *P. putida* KT2440 has a second PcoAB system encoded by PP\_2204/PP\_2205 but mutants of these genes do not present any growth-defect in presence of copper. As only pcoA2/B2 seems essential for copper resistance, the other PcoA1/B1 system may not be expressed in our laboratory condition, or is less efficient than the PcoA2/B2 system.

pcoA2 and pcoB2 are highly transcribed after Cu treatment and PcoB2 accumulates in cells treated with copper in *P. putida* KT2440 (Miller et al. 2009). In some strain of *E. coli* that harbor an episomal gene cluster pcoABCD<sub>RSE</sub>, the pco operon is mediated by the PcoRS two component system. In *P. aeruginosa* PAO1, PcoA/B expression is suppressed in the ΔcopR strain (Teitzel et al. 2006; Quintana et al. 2017). In *P. putida* KT2440, we searched for the consensus CopR binding site TGACANNNTGTNAT and found its presence in the intergenic region upstream copRI (PP\_2158) and pcoA1 (PP\_2205). Since no putative CopR binding site was detected within the promoter region of pcoA2/B2, it suggests that these genes may be activated differently under copper stress. Nevertheless, *P. putida* has two CopR



regulators, CopR1 (PP\_2158) and CopR2 (PP\_5383). The spatial proximity between *copR2* and *pcoA2/B2* suggests a probable regulation of *pcoA2/B2* par CopR2. However, this hypothesis has not been investigated so far.

It is noteworthy that *pcoA2/B2* of *P. putida* KT2440 surround PP\_5732 encoding a putative cytochrome C oxidase. PcoA2 could thus be involved in metallation of cytochrome c oxidases (Trasnea et al. 2016).

#### *The Cus system*

In *P. putida* KT2440, PP\_5379 (*pcoB2*) and PP\_5380 (*pcoA2*) lie adjacent to a cluster of the 5 genes *copR1/S1* and *cusCBAF*. *cusCBA* encodes a putative cation/proton antiporter spanning the outer and inner membranes, that has been proposed to be implicated in copper and silver efflux (Cánovas et al. 2003). The two-component system CusR/S senses periplasmic copper and regulates the Cus RND-type transport system (Outten et al. 2001; Gudipaty et al. 2012). However, our Tn-seq datasets did not reveal any potential role of the CusCBAF system and CopRS two-component regulatory systems in copper resistance. This confirms an earlier observation showing that *cusC* expression is not activated in the presence of copper (Miller et al. 2009). The *cusCBAF* operon that might be involved in copper resistance according to *casanova et al. 2003* (Cánovas et al. 2003) could respond to a different concentration of copper.

#### *Other genes probably implicated in copper resistance*

Among the other 6 genes involved in copper resistance, we found *gshA* (PP\_0243) that produces the glutamate cysteine ligase that form the glutamyl-cysteine from L-glutamate and appears to be essential for copper resistance with a log2FC of -1.5 (Fig. 2 and Table 2). Glutamyl-cysteine is itself used by *gshB* to produce glutathione. Glutathione is a key player in metal homeostasis in *E. coli* (Helbig et al. 2008). The thiol group and cysteine residues of glutathione can directly bind to metals ions, protected the cells from their deleterious properties. Surprisingly, the log2FC of *gshB* (PP\_4993) was not statistically significant for copper resistance (log2FC of -1.04) (Fig. 2, Table 2). It is noteworthy that a mutant of the *proB* gene (PP\_0691), involved in proline biosynthesis, gives a growth advantage in presence of copper. *proB* encodes the glutamate 5 kinase which transform the L-glutamate in L-proline. However, L-glutamate is also the substrate of the glutamate cysteine ligase, produced by *gshA*. As *gshA* gene appears to be essential for copper resistance, it is not surprising that a *proB* mutant confers a growth advantage in presence of copper. *htrB* (PP\_1735) is an other gene essential in presence of copper in the culture medium. It is known to be involved in lipid A biosynthesis. Membrane is the first shield against external aggression, maintaining its

integrity is then important for cell survive in presence of copper that might oxidized the membrane components, including LPS. *PP\_2767*, also essential for copper resistance, encodes an ABC transporter domain that may be involved in the extrusion of toxic compounds. Regarding to the other genes, *gltA* (PP\_4194) encodes a citrate synthase enzyme involved in the very first step of the Krebs cycle. Finally, *cysH*, a phosphoadenosine phosphosulfate reductase may also be important for copper resistance. The product of this gene catalyzed the production of sulfite from 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in a reaction involving PAPS sulfotransferase and thioredoxin or glutaredoxin intermediate. Sulfite is a intermediate in the cysteine biosynthesis pathway, well described in *E. coli* (Neuwald et al. 1992). *cysH* is the limiting factor in sulfur assimilation for cysteine biosynthesis (Martin et al. 2005). It is thus not surprising to find both *gshA* and *cysH* genes required for full copper resistance. Genes which belongs to the *pvdMNOE* operon are involved in cross resistance to at least two metals and will be described in another section. Our approach also missed the homolog of *zitB* in *E. coli*, named *PP\_0026 (czcD)* which was found to slightly respond to an inhibitory copper concentration during proteomic approaches, as well as another copper binding protein PacZ (PP\_0588) and two DNA binding regulator encoded by *czcR2/3* that were found in the same studies (Miller et al. 2009). These differences are not surprising since the time of exposure and the concentration of copper used were different in the two studies. Moreover, these system could be less sensitive to copper than those revealed by Tn-seq.

### **Cadmium resistance.**

Cadmium commonly form cations of oxidation states II. In contrast to zinc, cadmium binds preferentially to sulfur ligands, leading to repliement difficulties for disulfide bond proteins. Because of their similarity, zinc homeostasis and cadmium resistance mechanisms often overlap. They shared uptake and efflux transporters and also metal responsive regulatory proteins (Cánovas et al. 2003). Cadmium can be effluxed from the cytoplasm of the bacteria cells by different system including the known P-type ATPase CadA3 (PP\_5139) (Miller et al. 2009; Leedjäv et al. 2008). *cadA3*, a homolog to *zntA* in *E. coli* (Cánovas et al. 2003; Nucifora et al. 1989; Rensing et al. 1997b), was found to be involved in cadmium resistance with a strong negative log<sub>2</sub>FC of -4.99. While CadA1 is non-functional in *P. putida*, our Tn-seq confirmed previous observation that CadA3 conferred Cd<sup>2+</sup> resistance and CadA1 plays no role in Cd, Zn, Cu or Co resistance (Leedjäv et al. 2008). The orthologous gene of *cadA3* in *P. putida* CD2 was previously shown to be a major determinant of cadmium resistance (Hu



& Zhao 2007). We also emphasized the importance of the merR regulator PP\_5140 with a strong negative log2FC -6.74 for cadmium resistance. This regulator is a known regulator that respond to cadmium in *P. putida* (Lee et al. 2001). These validate our Tn-seq approach in presence of cadmium. PP\_5140 was described as the putative regulator of *cadA3* (PP\_5139) according to canovas et al., although this regulator does not regulate *cadA* in *P. putida* 06909 (Lee et al. 2001). Our study show that both PP\_5140 and *cadA3* genes are important for cadmium resistance but there is no evidence of a direct regulation. We also discovered the *dsbA* gene essential for cadmium resistance with a very strong negative log2FC of -7.59 (Fig. 2 and Table 2). The product of this gene is known to catalyse the oxidation of disulfide bonds of periplasmic proteins. As a result, the cysteine residues of DsbA become reduced and the protein must be oxidized by DsbB to be regenerated (Ito & Inaba 2008). Unsurprisingly, a *dsbA* mutant was found to be sensitive to cadmium and even to zinc in *E. coli* (Rensing et al. 1997a) and in *Burkholderia cepacia* (Hayashi et al. 2000). Surprisingly, a *dsbB* mutant appears to be non-essential for cadmium resistance in our test condition. It might be that DsbA is regenerated by another system or that the DsbA quantity in the *dsbB* mutant is sufficient to catalyze the oxidation of disulfide bonds of periplasmic proteins and avoid cadmium toxic effects. The Tn-seq approach also revealed that the gene coding the sensor RoxS (PP\_0887) belonging to the two component system RoxS-RoxR (PP\_0887-PP\_0888) is important for cadmium resistance. The two genes coding this two component system are transcribed in a single unit (Fernández-Piñar et al. 2008). Surprisingly, unless a log2FC of -3.5, the PP\_0888 mutant was not statistically significant after statistical analysis. The system belongs to the RegA/RegB family where RegA plays the role of an integral membrane sensor histidine kinase and RegB is a sigma-54 dependent regulator. Whole-genome transcriptional analysis has been performed to define the *P. putida* RoxS/RoxR regulon in LB. It includes genes involved in amino acid and sugar metabolism, sulfur starvation response, elements of the respiratory chain and genes participating in the maintenance of the redox balance (Fernández-Piñar et al. 2008). This two component system seems to be also employed in *P. putida* to responds to a cadmium stress. Despite a putative RoxR recognition element identified in promoters of genes regulated by this two-component system (Fernández-Piñar et al. 2008), the genes up or down regulated by RoxS/RoxR in response to cadmium remain unknown. Finally, PP\_1663 is a gene coding a putative lipoprotein of unknown function and was revealed in cadmium resistance with the strongest log2FC of -8.22. This gene belongs to the *purM/N/PP\_1663* operon. *purN* and *purM* play a role in the IMP and purine biosynthesis. PP\_1663 might be involved in the same mechanism and participate in renewal of purines in

cell. Its role in cadmium resistance remains unclear. For the *pvdM/N/E* gene implication in metal resistance, please refer to paragraph X. Interestingly, various genes known to be involved in cadmium resistance were not revealed by our screen. For instance, the RND complex CzcCBA (PP\_0043-PP\_0045) known for zinc and cadmium resistance (Cánovas et al. 2003) was not revealed. It seems like this system is not highly required for cadmium resistance. It could it be possible that the *czcABC* system respond to a higher quantity of metals and was so inactive in our condition. This hypothesis is supported with the identification of the *czCBA1* genes involved in 3mM cadmium resistance during the screening of a Tn5 mutant library in *P. putida* CD2 (Hu & Zhao 2007). This previous study revealed also an unknown two component system named ColRS that was not found in our study. In addition, the *zitB* gene (PP\_0026) was not revealed as well (Hu & Zhao 2007). Once again the difference in the experiments in the two study could explain this phenomenon. It means that the system already described in literature but not found in our study are less efficient for metal resistance at low concentration (Miller et al. 2009).

To finish, our study could identify a new transcriptional regulator of the LysR family, PP\_5337, probably involved in copper resistance. Analysis of its regulon was not performed yet. This gene belongs to the *purE/K* operon involved in the inosine monophosphate (IMP) pathway, an imidazole precursor. Its regulon might be involved in imidazole pathway, leading eventually to the renewal of the purine pool.

### **Cobalt resistance.**

Cobalt is a transition metals of oxidation state II. It plays an essential role for microorganisms as cofactors for diverse metalloenzymes (Cánovas et al. 2003). Cobalt toxicity relates to its potential interference with iron and possibly manganese homeostasis. The strategy for bacteria to survive in an environment with an excess of  $\text{Co}^{2+}$  are usually efflux systems. A sub-inhibitory concentration of cobalt was used to determined the genes of *P. putida* KT2440 involved in cobalt resistance. Cobalt resistance system were poorly described in *Pseudomonads* but in greater details in other organisms. Some systems giving cobalt resistance in other bacteria and existing in *P. putida* were not revealed by our screen. The *czcCBA* RND system in *Cupriavidus metallidurans* confers resistance to  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  (Nies 2003). However, although existing in KT2440, the *CzcCBA* system was only reported to give  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  resistance (Leedjäv et al. 2008). Moreover, *CzcD*, a member of the CDF family, was found to confers cobalt resistance in *Ralstonia* sp. Strain CH34, but in a lesser extent than the *CzcCBA* system (Anton et al. 1999). *czcD* homologs exist in *P. putida*

370 KT2440 (PP\_0026) but do not seem to confer cobalt resistance. Interestingly, the MrdH  
 371 efflux pump (PP\_2968), homolog to RcnA efflux pump from *E. coli* (Haritha et al. 2009) is  
 372 not revealed by our screen. Although *mrdH* activity is induced by cobalt, we confirm that the  
 373 efflux pump do not confer cobalt resistance (Haritha et al. 2009).  
 374 Even if no genes encoding efflux pump has been identified in our screening, a total of 9 genes  
 375 were identified that were not described previously to be required for cobalt resistance.  
 376 Although statistically significant, the *uvrA*, *trmE* and *miaA* genes giving a growth advantage  
 377 in presence of cobalt but with a very few quantity of reads in average per TA (reads/TA <7)  
 378 in both LB and LB+cobalt condition will not be treated in this article. Among the last 6  
 379 genes, we revealed *mgtA*, a magnesium transporter ATP dependant involved in active  
 380 transport of magnesium in cells. This gene presents a positive log2FC value, indicating that  
 381 the mutant gives a growth advantage in presence of cobalt in the culture medium. MgtA has  
 382 not been experimentally characterized in *P. putida* or *E. coli* but its ortholog in *Salmonella*  
 383 *typhimurium* was studied. MgtA was found to mediate the influx of nickel (II) (Smith &  
 384 Maguire 1998; Snively et al. 1989). Although cobalt ions were not found to be transported  
 385 via MgtA in *S. typhimurium*, it might be the case in *P. putida*. Regarding this hypothesis, a  
 386 *mgtA* mutant defective would be better protected against cobalt. *pstC* (PP\_5328) is another  
 387 gene coding a transport system that was revealed during our screen. PstC is a putative ATP-  
 388 dependent phosphate permease that is used when the phosphate concentration in cells are low  
 389 (Rao & Torriani 1990). Phosphate import might be used for protein, nucleic acid or ATP  
 390 synthesis into the bacteria cell to cope with cobalt toxicity. Surprisingly, a *pstA* mutant in  
 391 *Lactococcus lactis* which encodes an ABC domain of the transporter, is more resistant to  
 392 copper, zinc and oxidative stress generated by metals (Cesselin et al. 2009). *prlC*, another  
 393 gene revealed by our screen encode the oligopeptidase A. It might be involved in degradation  
 394 and recycling of peptide in response to cobalt stress. *glnE* whose product regulates the GlnA  
 395 protein, involved in ammoniac assimilation, was also revealed as important for cobalt  
 396 resistance. Our screening revealed once again the involvement of the *gshA* gene in a metal  
 397 resistance. In the copper section, we already explained how *gshA* product can play a major  
 398 role in metal homeostasis. It is not surprising to detect *gshA* involved in a cross resistance  
 399 since it has already been described for copper (II), zinc (II) and cadmium (II) resistance in *E.*  
 400 *coli* (Helbig et al. 2008). However, it is the first time that *gshA* is described as being involved  
 401 in cobalt resistance. Finally, the Tn-seq screening in presence of cobalt identified PP\_5002  
 402 gene with unknown function to date. The putative protein produced by PP\_5002 contains a  
 403 DUF971 domain which could be involved in Fe-S cluster assembly. The PP\_5002 product

could play a major role in iron homeostasis to counteract the deleterious effect of cobalt on this equilibrium.

#### **Zinc resistance.**

Zinc displays affinity for ligands possessing oxygen, nitrogen or sulfur and is frequently used as an enzyme cofactor in cell. As mentioned for copper, zinc toxicity occurs with its ability to replace another metal from enzymes or by forming complexes with other biomolecules. It exists in cells mainly in oxidized state  $Zn^{2+}$ . Zinc homeostasis has been well documented and is regulated by various processes:  $Zn^{2+}$  uptake regulation, sequestration by metallothioneins (MT) and efflux system (Hantke 2005; Blencowe & Morby 2003). Our screen revealed three genes that are involved in zinc resistance: *czcA1* (PP\_0043), *cadR* (PP\_5140) and *pvdM* (PP\_4213). As described in the cobalt resistance section, the CzcCBA system was fully described in bacteria. It has been reported to give  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Co^{2+}$  resistance in *C. metallidurans*, and  $Cd^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  resistance in *P. putida* KT2440 (Nies 2003; Leedj  rv et al. 2008). The identification of the major component of the CzcCBA system, CzcA1, confirms the validity of our screening in presence of zinc. The CzcCBA system might be preponderant at the zinc concentration used. At least five *czcA* gene has been described in *P. putida* KT2440 (C  novas et al. 2003). Our screen confirms a previous result showing that CzcCBA1 is the predominant CzcCBA system in *P. putida* in laboratory condition (Leedj  rv et al. 2008).

We also emphasized the importance of the merR regulator CadR (PP\_5140) with a strong negative  $\log_2FC$  of -4.31 for zinc resistance (Fig. 2, Table 2). *cadA3* (PP\_5139) and *cadR* (PP\_5140) are two divergently transcribed genes in *P. putida*. Mutational analysis indicated that *cadA3* and *cadR* are fully responsible for cadmium resistance and partially for zinc resistance in *P. putida* 06909 (Lee et al. 2001). PP\_5140 might positively regulate *cadA3* for zinc resistance. However, the *cadA* promoter was responsive to  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$ , while the *cadR* promoter was only induced by  $Cd^{2+}$  in *P. putida* 06909 (Lee et al. 2001). Thus, *cadA3* expression might be under the control of another unidentified regulator. It remains unclear how PP\_5140 plays a role in zinc resistance.

### Cross resistance illustrated by the *pvdMNOE* operon.

Pyoverdine is the major siderophore in fluorescent *pseudomonads*. The pyoverdine pathway is complex, 20 different proteins have been documented to be involved in its regulation, synthesis, maturation, transport, and uptake (Nadal-Jimenez et al. 2014; Visca et al. 2002). Pyoverdine maturation starts with the transport of a precursor (PVDIq) from the cytoplasm to the periplasm by the ABC transporter PvdE. *pvdN* and *pvdO* are involved in maturation of the pyoverdine precursor (Ringel et al. 2016; Ringel et al. 2017). The exact role of *pvdM* in the maturation process remains unknown (Nadal-Jimenez et al. 2014). The *pvdM,N,O,E* genes belongs to an operon in *P. putida* KT2440 but not in *P. aeruginosa*. The mature pyoverdine is able to chelate plenty of metals but with an affinity lower than with iron (Schalk & Guillon 2013) and could so protect cell from metal toxicity (Braud et al. 2010; Schalk & Guillon 2013). In our screening, as every mutants grow in the same culture medium, a mutant defective in the production of pyoverdine can be protected by the pyoverdine produced by the other mutants. However, at least one gene of the *pvdMNOE* operon was found to be involved in copper, cadmium or zinc resistance (Fig. 2 and Table 2). Although not statistically significant for cadmium resistance, the *pvdO* gene has a log<sub>2</sub>FC of -2.68, similar to the other genes of the operon. Likewise, the *pvdN,O,E* genes have a log<sub>2</sub>FC of -1.56, -1.26 and -2.01 respectively in presence of zinc. All the *pvdMNOE* operon seems to be important for copper, zinc and cadmium resistance (Fig. 2, Table 2). As these genes form an operon in *P. putida*, insertions in the *pvdM, N,O* genes could create a polar effect on the last gene *pvdE*. We thus hypothesized that PvdE could be really important for metal resistance by extruding metal ions in excess from the cytoplasm.

### In-frame deletion mutants and complementation assays confirmed that *PP\_1663* and *roxS* for Cd<sup>2+</sup>, *PP\_5337* for Cu<sup>2+</sup> and *PP\_5002* for Co<sup>2+</sup> are required for metal resistance.

We selected 20 of the 28 genes to be the target of in-frame deletion and further validation. Among them, we made mutants of *pcoA2/B2* for copper resistance, *czcA1* for zinc resistance and *cadA3* for cadmium resistance, because they can be used as positive controls. Since *roxS* (*PP\_0887*) are in operon with *roxR* (*PP\_0888*) (encoding the two component system RoxSR), a double mutant was created. Because several genes of the *pvdMNOE* operon were identified in our screening, we decided to make the  $\Delta pvdMNOE$  mutant. The genes that was genetically deleted in frame are underlined in Figure 2.

## Competition experiments between WT and in-frame deletion mutants in presence of Cd, Cu, Co or Zn.

First, to validate the Tn-seq results, we performed competition experiment in LB with the WT strain and the mutants in a 1/1 ratio. We calculated a ratio by counting the number of each type of bacteria after 10 divisions in presence of a metal at low concentration (concentration used during Tn-seq screen). A growth defect (GD phenotype) of the  $\Delta PP\_5002$  mutant in presence of cobalt was confirmed but not with the  $\Delta glnE$ ,  $\Delta gshA$ ,  $\Delta PP\_0096$  and  $\Delta PP\_5328$  mutants (Fig. 3). The  $\Delta cadR$ ,  $\Delta czcA1$  mutants harbored a GD phenotype in presence of zinc but not the  $\Delta cadA3$  mutant. We could confirm that the  $\Delta cadA2$ ,  $\Delta gshA$ ,  $\Delta pcoA2$ ,  $\Delta pcoB2$  and  $\Delta PP\_5337$  mutant have a GD phenotype in presence of copper, and the  $\Delta roxSR$ ,  $\Delta dsbA$ ,  $\Delta PP\_1663$ ,  $\Delta pcoB2$  and  $\Delta cadA3$  mutants in presence of cadmium. We also showed that the  $\Delta cadR$  mutant is sensitive to both cadmium and zinc and that the  $\Delta pvdMNOE$  strain is sensitive to both cadmium, zinc and copper.

## Test of individual mutants and complementation assay.

The growth of some mutants in LB culture were also tested individually by measuring the absorbance of the culture at 600 nm over the time (Fig. 4). We decided to focus this part of our work on the genes that were not characterized in previous articles. A higher concentration of metals was used in this experiment to better observe differences in growth phenotype between complemented and uncomplemented strains.

We could confirm that *dsbA*, *roxSR* and *PP\_1663* are required for cadmium resistance, whereas *PP\_5337* and *PP\_5002* are important for copper and cobalt resistance respectively. Expression of the *PP\_1663*, *dsbA*, *PP\_0887/88*, *PP\_5337* and *PP\_5002* genes in the corresponding mutant suppress at least partially the growth defect caused by the metals (Fig. 4). All together, these results confirm that the Tn-seq is a reliable technique to identify genes involved in metal resistance in *P. putida*. Particularly, these data showed that *PP\_1663* and *roxSR* for  $Cd^{2+}$ , *PP\_5337* for  $Cu^{2+}$  and *PP\_5002* for  $Co^{2+}$  are new factors required for metal resistance in *P. putida* KT2440.

## Conclusion

Tn-seq has been previously used to study extensively essential genomes of bacteria sometimes in response to drugs (Gallagher et al. 2011; Barquist et al. 2013) but there was no genome wide study of factors necessary for metal resistance in rhizospheric bacteria. Besides



genes already described in metal resistance or homeostasis, this study allowed the identification of new important factors for metal resistance. This Tn-seq experiment highlight new factors required for *P. putida* metal resistance and also confirm previous data showing that *cadA3*, *cadR*, *czcA1* and *pcoA2/B2* are very important for cadmium, zinc and copper resistance respectively in *P. putida*, which confirm the good quality of our screen. Other resistance system existing in *P. putida* KT2440 were not found in this screen. These systems, sometimes duplicated, might respond to a different metal concentration and be activated in a different condition or environnement. Other categories of genes were not found : for instance, no genes involved in oxidative stress response were identified. The oxidative stress response should be activated in presence of higher metal quantity as described by proteomics approaches (Miller et al. 2009; Manara et al. 2012; Ray et al. 2013). Our screening shows that the resistance systems found are the most important to respond to a low concentration of metal in a rich environment and complete the knowledge about *P. putida* in metal resistance or homeostasis.

## Methods

### Bacterial strains and growth conditions.

Bacterial strains, plasmids and oligonucleotides used in this study are described in Table S3 and Table S4. *P. putida* and *E. coli* cells were grown at 28 and 37°C respectively in LB medium or 2YT medium. When required, antibiotics were added at the following concentration: ampicillin, 100 µg/L, gentamicin, 30 µg/L for *P. putida* and 7 µg/L for *E. coli*, streptomycin, 100 µg/L. Media were solidified with 1.5 g/L agar. During Tn-seq experiments, metals were used at a subinhibitory concentration: cobalt 10 µM, zinc 250 µM, copper 2.5 mM, cadmium 12.5 µM.

### Construction of the transposon library

*P. putida* strain KT2440 and of *E. coli* MFDpir/pEGL55 were grown overnight in 2YT medium. 100 OD<sub>600nm</sub> unit of each strain were mixed and centrifuged 10 min at 5000 g. The bacteria were resuspended in 1.2 mL of 2YT medium supplemented with diaminopimelic acid (300 µM) and deposited onto an overdried LB agar plate containing twice the normal concentration of agar. After 3h at 30°C, bacteria were collected and resuspended in 4 mL LB

medium. A 20 µl aliquot was diluted and spread onto LB agar with gentamicin to estimate the efficiency of mutagenesis. The other part was spread on 50 plates containing LB agar with gentamicin and grown for 24 h at 28°C. pEGL55 is a R6K suicide plasmid carrying the mariner transposon. To confirm that the *P. putida* mutants lost the plasmid, we performed colony PCR with primers annealing in the *bla* gene of pEGL55. None of the 100 colonies tested produced a PCR fragment, indicating the loss of plasmid in the bacteria tested. 800,000 mutants were harvested in LB supplemented with 40% glycerol at -80°C. This library was sequenced directly and represents the mutant pool in LB agar (see Table S4).

#### **DNA preparation for high-throughput sequencing**

To identify essential genes in LB or LB with metal, ~ 10<sup>7</sup> mutants were inoculated in 25 mL LB. The culture was then incubated at 28°C with agitation at 180 rpm. At OD<sub>600</sub>= 0.2, metals were added independently at the following subinhibitory concentration: cobalt 10 µM, copper 2.5 mM, Zinc 125 µM and cadmium 12.5 µM. When OD<sub>600</sub>~1.6, the culture medium was diluted in the same medium at OD=0.03. This operation was realized during 12 générations. The final pools of mutants were harvested by centrifugation of the culture medium and stored at -80°C. DNA was extracted from aliquots of bacterial suspension with the Promega Wizard Genomic DNA purification kit. Next steps of the DNA preparation methods were realized as described previously with minor modifications (Skurnik et al. 2013). All DNA gel-extraction were performed under blue-light transillumination of DNA stained with gel-green (Biotium) to avoid DNA mutation and double-stranded breaks. 50 µg of DNA samples were digested with 50 U *MmeI* in a total volume of 1.2 mL for one hour at 37°C according to manufacturer's instructions, then heat-inactivated for 20 minutes at 80°C, purified (QIAquick, PCR purification kit Qiagen) and concentrated using a vacuum concentrator to a final volume of 25 µL. Digested DNA samples were run on a 1% agarose gel, the 1.0–1.5 kb band containing the transposon and adjacent DNA was cut out and DNA was extracted from the gel according to manufacturer's instructions (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen). This allowed recovery of all the fragments containing genomic DNA adjacent to transposons (1207 bp of transposable element with 16 bp of genomic DNA at each extremity). A pair of single-stranded complementary oligonucleotides containing an unique 5-nt barcode sequence (LIB\_AdaptT and LIB\_AdaptB) was mixed and heated to 100°C, then slowly cooled down in a water bath to obtain double-stranded adaptors with two-nucleotide overhangs. 1 µg DNA of each sample was ligated to the barcoded adaptors (0.44 mM) with 2000 U T4 DNA ligase in a final volume of 50 µL at 16°C overnight. Five identical PCR reactions from the ligation product were performed to amplify the transposon adjacent DNA. One reaction contained



100 ng of DNA, 1 unit of Q5 DNA polymerase (Biolabs), 1X Q5 Buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.4  $\mu$ M of the forward primer (LIB\_PCR\_5, which anneals to the P7 Illumina sequence of the transposon) and the reverse primer (LIB\_PCR\_3, which anneals to the P5 adaptor). Only 18 PCR cycles were performed to keep a proportional amplification of the DNA. Samples were concentrated using a vacuum concentrator to a final volume of 25  $\mu$ L. Amplified DNA was run on a 1.8% agarose gel and the 125 bp band was cut-out and gel extracted (QIAquick, PCR purification kit Qiagen). DNA was finally dialysed (0.02  $\mu$ m MF-Millipore™ Membrane Filters) for 4 hours. Quality control of the Tn-seq DNA libraries (size of the fragments and concentration) and High-throughput sequencing on HiSeq 2500 (Illumina) was performed by MGX (CNRS sequencing service, Montpellier). 6 DNA libraries were multiplexed on one flow-cell. After demultiplexing, the total number of reads were comprised between 19 and 35 millions (Table 1).

#### **Bioinformatics analysis.**

Raw reads from the fastQ files were first filtered using cutadapt v1.11 (Martin) and only reads containing the *mariner* inverted left repeat (ACAGGTTGGATGATAAGTCCCCGGTCTT) were trimmed and considered *bona fide* transposon-disrupted genes. Trimmed reads were then analyzed using a modified version of the TPP script available from the TRANSIT software v2.0.2 (26447887). The mapping step was modified to select only reads mapping uniquely and without mismatch in the *P. putida* KT2440 genome (Genbank AE015451.2). Then, the counting step was modified to accurately count the reads mapping to each TA site in the reference genome according to the Tn-seq protocol used in this study. Read counts per insertion were normalised using the LOESS method as described in Zomer et al. (2012). We next used the TRANSIT software (version 2.0) to compare the Tn-seq datasets (DeJesus et al. 2015). Gene states obtained by TRANSIT after growth of the bank of mutants of *P. putida* KT24440 in LB agar and LB are presented Table S4. Raw data of all the datasets analysed by TRANSIT are presented Table S5.

#### **Cloning method.**

**Construction of the pKNG101 plasmids used for in frame deletion in *P. putida* (Table S2).** The 500bp of DNA upstream and downstream of a targeted gene was amplified by PCR (Primestar Max DNA polymerase, Takara). The two 500 bp fragments were then fused by overlapping PCR. The 1 kbp DNA fragment obtained was inserted between the BamHI/SpeI restriction sites of pKNG101 by SLIC (22610439). The construction was finally transformed in DH5a lambda pir and checked by colony PCR and sequencing.

**Construction of the pJN105 plasmids used for complementation (Table S2).** The targeted entire gene with native RBS was amplified by PCR (Primestar Max DNA polymerase) from gDNA of *P. putida* KT2440. The amplified fragment was inserted by SLIC between the SpeI and SacI restriction sites of pJN105, and then transformed in DH5a. The plasmids obtained were validated by restriction map and sequencing.

#### **In-frame deletion mutant construction.**

To construct the in-frame deletion mutants of genes underlined in Figure 2, the counter-selection method using the *sacB* gene was used (Kaniga et al. 1991). The suicide pKNG101 plasmid were transferred from *MFDpir* (Ferrières et al. 2010) to *P. putida* KT2440. Selection of the first event of recombination was performed on LB agar supplemented with streptomycin. Transconjugants were then spread on LB agar without NaCl supplemented with 5 % sucrose to allow the second event of recombination. In-frame deletions were then checked by PCR (Dreamtaq polymerase, Thermofisher).

#### **1 x 1 Competition assays.**

To compare the metal sensitivity of the mutants with the wild-type strain, 1 x 1 competition experiments were performed as follows.

First, to discriminate mutants from the wild strain, a GFP<sup>+</sup> WT strain was made by insertion of the constitutively expressed *gfp* gene into the attTn7 site of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome, by using the pUC18-miniTn7-gfpmut3 plasmid (Choi & Schweizer 2006). Mutant and GFP<sup>+</sup> WT strain were grown separately in LB medium from an overnight culture in LB until OD<sub>600</sub>=0.8. Subsequently bacteria were mixed in a 1:1 ratio at an initial OD<sub>600</sub>= 0.0125 in a 96 well plate containing 200 µL of LB or LB+metal in a sub-inhibitory concentration. After 24 hours of growth at 28°C in the Tecan M200 Pro with shaking, 5 µL of the cultures were used to inoculate a new 96 well plate and placed in the same condition. After a total of 48 hours of growth (around 10 divisions), bacteria were diluted and plated on LB agar plate. After 48 hours at 28°C, GFP<sup>+</sup> wild type and mutant colonies were counted under blue light to detect fluorescence of the colonies. A ratio was then calculated by dividing the number of mutant colonies by the number of wild type colonies in each condition. Growth comparison between a WT strain and a GFP<sup>+</sup> strain in LB supplemented with various metals is presented Table S6.

#### **Individual growth in presence of metals.**

Single strain growth was performed in LB medium from an overnight culture in LB until OD<sub>600</sub> = 0.8. Bacteria were then inoculated at an initial OD<sub>600</sub>= 0.006 in a 96 well plate containing 200 µL of LB or LB+metal at a sub-inhibitory concentration and placed at 28°C in

the Tecan M200 Pro. OD<sub>600</sub> measurements were taken every 10 min after shaking. Complementation assays were performed with the same protocol. Data are represented after 6.5 hours of growth.

#### **Nucleotide sequence accession numbers.**

The transposon sequence reads we obtained have been submitted to the ENA database.

## **Acknowledgment**

We thank Geraldine Effantin, Veronique Utzinger for technical assistance, the members of the MTSB team and Xavier Charpentier, Bérengère Ize, Sylvie Elsen, Sabine Favre-Bonte for discussion.

## **Funding**

This work was supported by the CNRS, INSA and funded by a grant from the University Lyon I to E.G. (BQR UCBL). K.R was supported by a PhD grant from the Ministère de l'éducation nationale et de la recherche.

## **Legend of figures**

**Table 1.** Tn-Seq analysis of *Pseudomonas putida* KT2440

**Table 2.** Metal resistance genes of *P. putida* KT2440 discovered by Tn-seq

#### **Figure 1. Quality control of the Tn-seq *P. putida* KT2440 libraries.**

(A) Frequency and distribution of transposon sequence reads across the entire *P. putida* KT2440 genome. The localization of transposon insertions shows no bias throughout the genome of *P. putida* KT2440. B) Density plot of log<sub>2</sub>FC of measured read counts versus expected reads count per gene.

**Figure 2. Genes involved in metal resistance according to the Tn-seq experiment represented in a Venn diagram.** Log<sub>2</sub> fold change (log<sub>2</sub>FC) indicating the fitness difference

between the test and the control conditions are in bracket. Genes already known to be involved in metal resistance in *P. putida* are in bold. The underlined genes were selected for in-frame deletion and further analysis.

**Figure 3. Competition between the wild type and the mutant strains of *P. putida* KT2440 in presence or not of a metal in excess.** Competition were realized with an initial ratio of 1:1 in LB supplemented or not with a sub-inhibitory concentration of metals (cobalt 10  $\mu$ M, zinc 250  $\mu$ M, copper 2.5 mM, cadmium 12.5  $\mu$ M). Final ratio was determined as described in Methods. Each value is the mean of 5 experiments. Center lines show the medians; box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles. \* indicates a statistically significant difference relative to the absence of metal condition ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test).

**Figure 4. Individual growth cultures of the mutants and complementation assay.**

Individual growth of each mutant strain was performed in rich culture medium supplemented or not with a sub-inhibitory concentration of metals (cobalt 10  $\mu$ M, zinc 250  $\mu$ M, copper 2.5 mM, cadmium 12.5  $\mu$ M).  $A_{600nm}$  was measured after 6.5 hours of growth (corresponding to the end of the exponential growth for a wild type strain in rich culture medium in our test condition). The strains were genetically complemented (+) or not (-).

### Supporting information legends

**Table S1 : Strains and plasmids**

**Table S2 : List of oligos used in this study**

**Table S3. Raw data obtained by TRANSIT after growth of the bank of the *P. putida* KT2440 mutants in LB with and without metals.**

**Figure S1. Biological reproducibility of the Tn-seq results.**

Pairs of Tn-seq assay results are compared, with the total number of reads per gene plotted. Analysis of DNA samples corresponding to two independent cultures of the mutant pool grown (A) in LB medium (correlation coefficient  $R = 0.986$ ) and (B,C,D,E) in LB supplemented with metal (Cobalt:  $R = 0.946$ ; Copper:  $R = 0.955$ ; Zinc:  $R = 0.985$ ; Cadmium:  $R = 0.944$ ). Values represent average numbers of reads per gene from the pairs of biological

replicates.

**Figure S2. Determination of metal's subinhibitory concentration of *P. putida* KT2440 in erlenmeyer.**

10 mL of LB were inoculated at DO=0.03 from an overnight culture of *P. putida* KT2440 and placed at 28°C under shaking at 180 rpm. At DO=0.2, different metal concentrations were added to the culture medium and the cultures were placed again at 28°C for incubation. Absorbance (A<sub>600</sub>) was measured at different time.

## BIBLIOGRAPHY

Anton, A. et al., 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *Journal of bacteriology*, 181(22), pp.6876–6881.

Barquist, L., Boinett, C.J. & Cain, A.K., 2013. Approaches to querying bacterial genomes with transposon-insertion sequencing. *RNA biology*, 10(7), pp.1161–1169.

Blencowe, D.K. & Morby, A.P., 2003. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), pp.291–311.

Braud, A. et al., 2010. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental microbiology reports*, 2(3), pp.419–425.

Bruins, M.R., Kapil, S. & Oehme, F.W., 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), pp.198–207.

Calero, P. et al., 2018. Genome-wide identification of tolerance mechanisms toward p-coumaric acid in *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and bioengineering*, 115(3), pp.762–774.

726 Cánovas, D., Cases, I. & de Lorenzo, V., 2003. Heavy metal tolerance and metal homeostasis  
 727 in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environmental*  
 728 *microbiology*, 5(12), pp.1242–1256.

729 Cesselin, B. et al., 2009. Inactivation of the *Lactococcus lactis* high-affinity phosphate  
 730 transporter confers oxygen and thiol resistance and alters metal homeostasis.  
 731 *Microbiology*, 155(Pt 7), pp.2274–2281.

732 Cha, J.S. & Cooksey, D.A., 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by  
 733 periplasmic and outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of*  
 734 *Sciences of the United States of America*, 88(20), pp.8915–8919.

735 Cheng, Z. et al., 2009. Proteomic analysis of the response of the plant growth-promoting  
 736 bacterium *Pseudomonas putida* UW4 to nickel stress. *Proteome science*, 7, p.18.

737 Choi, K.-H. & Schweizer, H.P., 2006. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites:  
 738 example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature protocols*, 1(1), pp.153–161.

739 Clarke, P.H., 1982. The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie van Leeuwenhoek*,  
 740 48(2), pp.105–130.

741 DeJesus, M.A. et al., 2015. TRANSIT--A Software Tool for Himar1 TnSeq Analysis. *PLoS*  
 742 *computational biology*, 11(10), p.e1004401.

743 DeJesus, M.A. & Ioerger, T.R., 2013. A Hidden Markov Model for identifying essential and  
 744 growth-defect regions in bacterial genomes from transposon insertion sequencing data.  
 745 *BMC bioinformatics*, 14, p.303.

746 Fernández-Piñar, R. et al., 2008. A two-component regulatory system integrates redox state  
 747 and population density sensing in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology*, 190(23),  
 748 pp.7666–7674.

749 Ferrières, L. et al., 2010. Silent mischief: bacteriophage Mu insertions contaminate products  
 750 of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery  
 751 plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. *Journal of*  
 752 *bacteriology*, 192(24), pp.6418–6427.

753 Fu, Y., Waldor, M.K. & Mekalanos, J.J., 2013. Tn-Seq analysis of *Vibrio cholerae* intestinal

754       colonization reveals a role for T6SS-mediated antibacterial activity in the host. *Cell host*  
755       & *microbe*, 14(6), pp.652–663.

756       Gallagher, L.A., Shendure, J. & Manoil, C., 2011. Genome-scale identification of resistance  
757       functions in *Pseudomonas aeruginosa* using Tn-seq. *mBio*, 2(1), pp.e00315–10.

758       González-Guerrero, M. et al., 2010. Distinct functional roles of homologous Cu<sup>+</sup> efflux  
759       ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 78(5), pp.1246–1258.

760       Goodman, A.L. et al., 2009. Identifying genetic determinants needed to establish a human gut  
761       symbiont in its habitat. *Cell host & microbe*, 6(3), pp.279–289.

762       Gudipaty, S.A. et al., 2012. Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the  
763       sensor kinase CusS. *FEMS microbiology letters*, 330(1), pp.30–37.

764       Hantke, K., 2005. Bacterial zinc uptake and regulators. *Current opinion in microbiology*,  
765       8(2), pp.196–202.

766       Haritha, A. et al., 2009. MrdH, a novel metal resistance determinant of *Pseudomonas putida*  
767       KT2440, is flanked by metal-inducible mobile genetic elements. *Journal of bacteriology*,  
768       191(19), pp.5976–5987.

769       Hayashi, S. et al., 2000. The dsbA-dsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia*  
770       *cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility,  
771       metal resistance, and multi-drug resistance. *Microbiology and immunology*, 44(1),  
772       pp.41–50.

773       Helbig, K. et al., 2008. Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*.  
774       *Journal of bacteriology*, 190(15), pp.5431–5438.

775       Hu, N. & Zhao, B., 2007. Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas*  
776       *putida* CD2. *FEMS microbiology letters*, 267(1), pp.17–22.

777       Ito, K. & Inaba, K., 2008. The disulfide bond formation (Dsb) system. *Current opinion in*  
778       *structural biology*, 18(4), pp.450–458.

779       Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G.R., 1991. A wide-host-range suicide vector for improving  
780       reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia*  
781       *enterocolitica*. *Gene*, 109(1), pp.137–141.



782 Leedj r v, A., Ivask, A. & Virta, M., 2008. Interplay of different transporters in the mediation  
783 of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of*  
784 *bacteriology*, 190(8), pp.2680–2689.

785 Lee, S.M. et al., 2002. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in  
786 *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(3),  
787 pp.616–620.

788 Lee, S.W., Glickmann, E. & Cooksey, D.A., 2001. Chromosomal locus for cadmium  
789 resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a  
790 MerR family response regulator. *Applied and environmental microbiology*, 67(4),  
791 pp.1437–1444.

792 Manara, A. et al., 2012. *Pseudomonas putida* response to cadmium: changes in membrane  
793 and cytosolic proteomes. *Journal of proteome research*, 11(8), pp.4169–4179.

794 Martin, M.N. et al., 2005. The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate  
795 reduction in plants. *Photosynthesis research*, 86(3), pp.309–323.

796 Miller, C.D. et al., 2009. Copper and cadmium: responses in *Pseudomonas putida* KT2440.  
797 *Letters in applied microbiology*, 49(6), pp.775–783.

798 Molina-Henares, M.A. et al., 2010. Identification of conditionally essential genes for growth  
799 of *Pseudomonas putida* KT2440 on minimal medium through the screening of a genome-  
800 wide mutant library. *Environmental microbiology*, 12(6), pp.1468–1485.

801 Nadal-Jimenez, P. et al., 2014. PvdP is a tyrosinase that drives maturation of the pyoverdine  
802 chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 196(14), pp.2681–  
803 2690.

804 Nelson, K.E. et al., 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the  
805 metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*,  
806 4(12), pp.799–808.

807 Neuwald, A.F. et al., 1992. *cysQ*, a gene needed for cysteine synthesis in *Escherichia coli* K-  
808 12 only during aerobic growth. *Journal of bacteriology*, 174(2), pp.415–425.

809 Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS*



810 *microbiology reviews*, 27(2-3), pp.313–339.

811 Nucifora, G. et al., 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258  
812 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proceedings of the National Academy*  
813 *of Sciences of the United States of America*, 86(10), pp.3544–3548.

814 van Opijnen, T., Bodi, K.L. & Camilli, A., 2009. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing  
815 for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nature methods*, 6(10),  
816 pp.767–772.

817 Outten, F.W. et al., 2001. The Independent cue and cys Systems Confer Copper Tolerance  
818 during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. *The Journal of biological*  
819 *chemistry*, 276(33), pp.30670–30677.

820 Quintana, J., Novoa-Aponte, L. & Argüello, J.M., 2017. Copper homeostasis networks in the  
821 bacterium. *The Journal of biological chemistry*, 292(38), pp.15691–15704.

822 Rao, N.N. & Torriani, A., 1990. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*.  
823 *Molecular microbiology*, 4(7), pp.1083–1090.

824 Ray, P. et al., 2013. *Pseudomonas putida* KT2440 response to nickel or cobalt induced stress  
825 by quantitative proteomics. *Metallomics: integrated biometal science*, 5(1), pp.68–79.

826 Rensing, C., Mitra, B. & Rosen, B.P., 1997a. Insertional inactivation of *dsbA* produces  
827 sensitivity to cadmium and zinc in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 179(8),  
828 pp.2769–2771.

829 Rensing, C., Mitra, B. & Rosen, B.P., 1997b. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a  
830 Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*  
831 *the United States of America*, 94(26), pp.14326–14331.

832 Ringel, M.T., Dräger, G. & Brüser, T., 2016. PvdN Enzyme Catalyzes a Periplasmic  
833 Pyoverdine Modification. *The Journal of biological chemistry*, 291(46), pp.23929–  
834 23938.

835 Ringel, M.T., Dräger, G. & Brüser, T., 2017. PvdO is required for the oxidation of  
836 dihydropyoverdine as the last step of fluorophore formation in *Pseudomonas fluorescens*.  
837 *The Journal of biological chemistry*, 293(7), pp.2330–2341.

838 Schalk, I.J. & Guillon, L., 2013. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas*  
839 *aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environmental microbiology*, 15(6),  
840 pp.1661–1673.

841 Skurnik, D. et al., 2013. A comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of  
842 *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries.  
843 *PLoS pathogens*, 9(9), p.e1003582.

844 Smith, R.L. & Maguire, M.E., 1998. Microbial magnesium transport: unusual transporters  
845 searching for identity. *Molecular microbiology*, 28(2), pp.217–226.

846 Snavelly, M.D. et al., 1989. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: 28Mg<sup>2+</sup>  
847 transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *Journal of bacteriology*, 171(9),  
848 pp.4761–4766.

849 Teitzel, G.M. et al., 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper:  
850 transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of*  
851 *bacteriology*, 188(20), pp.7242–7256.

852 Timmis, K.N., 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence.  
853 *Environmental microbiology*, 4(12), pp.779–781.

854 Trasnea, P.-I. et al., 2016. Cooperation between two periplasmic copper chaperones is  
855 required for full activity of the cbb3 -type cytochrome c oxidase and copper homeostasis  
856 in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular microbiology*, 100(2), pp.345–361.

857 Visca, P. et al., 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons  
858 from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular microbiology*, 45(5), pp.1177–1190.

859 Wu, X. et al., 2011. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in  
860 *Pseudomonas putida*. *FEMS microbiology reviews*, 35(2), pp.299–323.

861

862

**TABLE 1: Tn-Seq analysis of *Pseudomonas putida* KT2440**

Mutant pool	Total no. of reads	No. of reads normalized <sup>a</sup>	No. of mapped reads to unique TA sites	No. of mapped reads to unique TA sites after LOESS correction	Density (%) <sup>b</sup>	Mean read count <sup>c</sup>
LB agar #1	25,949,279	19,133,512	14,634,594 (76%)	11,741,358	71	91
LB agar #2	19,238,817	19,133,512	15,395,786 (80%)	12,329,792	72	96
LB #1	28,144,994	26,226,586	23,543,211 (88%)	19,897,556	70	154
LB #2	31,482,075	26,226,586	23,423,449 (89%)	19,884,101	70	154
Ni #1	37,475,818	26,226,586	23,223,539 (89%)	19,244,288	70	149
Ni #2	33,067,214	26,226,586	23,357,319 (89%)	19,819,467	71	154
Co #1	34,139,046	26,226,586	23,154,298 (88%)	19,185,102	70	149
Co #2	28,747,735	26,226,586	23,388,565 (89%)	19,354,737	70	150
Cu #1	31,276,883	26,226,586	23,448,879 (89%)	19,482,017	70	151
Cu #2	28,169,895	26,226,586	23,563,384 (90%)	19,531,947	70	151
Zn #1	33,254,843	26,226,586	23,725,013 (90%)	19,885,035	70	154
Zn #2	35,799,330	26,226,586	23,663,615 (90%)	19,868,270	70	154
Cd #1	35,115,879	26,226,586	23,457,489 (89%)	19,644,604	70	152
Cd #2	30,277,437	26,226,586	23,656,875 (90%)	19,666,339	70	152

<sup>a</sup> The number of reads containing the sequence of a Tn end were normalized for each sample according to the number of reads for the sample LB #1

<sup>b</sup> *P. putida* KT2440 genome has 129,002 TA sites. The density is the % of TAs for which mapped reads has been assigned by the TPP software.

<sup>c</sup> the mean value of mapped reads per TA.

**TABLE 2: Metal resistance genes of *P. putida* KT2440 discovered by Tn-seq**

Locus	Gene	Function	HMM	State in LB <sup>a</sup>	Resampling					Metal <sup>f</sup>
					No. Of Tas <sup>b</sup>	Mean reads <sup>c</sup>		Log2FC <sup>d</sup>	q-value <sup>e</sup>	
					LB	LB + metal				
PP_0483	uvrA	exonuclease (uvrABC system protein A)	GD		38 1.7	6.8	2.01	0.00000	Co	
PP_0005	trmE	GTPase	ES		19 0.2	1.2	2.79	0.00000	Co	
PP_4895	miaA	tRNA dimethylallyltransferase	E		18 0.3	1.7	2.58	0.00000	Co	
PP_2645	mgtA	magnesium transporter ATP-dependent	GD		24 6.1	78.9	3.70	0.00000	Co	
PP_0096	prlC	oligopeptidase A	NE		30 126.0	23.4	-2.43	0.00000	Co	
PP_0243	gshA	Glutamate--cysteine ligase	NE		28 16.5	5.6	-1.56	0.00000	Co	
PP_5002	PP_5002	conserved protein of unknown function	NE		5 38.1	0.2	-7.31	0.00000	Co	
PP_0340	glnE	Glutamate-ammonia-ligase adenyltransferase	NE		37 28.1	6.5	-2.12	0.00000	Co	
PP_5328	PP_5328	putative phosphate transport system permease pr	NE		32 33.6	8.7	-1.95	0.00000	Co	
PP_0243	gshA	Glutamate--cysteine ligase	NE		28 16.5	5.9	-1.50	0.00000	Cu	
PP_0586	cadA2	cadmium translocating P-type ATPase	NE		22 197.3	0.7	-8.19	0.00000	Cu	
PP_0691	proB	Glutamate 5-kinase	NE		7 3.8	55.8	3.89	0.00000	Cu	
PP_1735	htrB	Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	NE		10 23.6	0.1	-7.39	0.00000	Cu	
PP_2328	cysH	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	GA		11 390.5	158.9	-1.30	0.00000	Cu	
PP_2767	PP_2767	putative Branched-chain amino acid ABC transport	NE		5 22.1	1.6	-3.81	0.00000	Cu	
PP_4194	gltA	citrate synthase	NE		21 30.8	10.0	-1.62	0.00000	Cu	
PP_4213	pvdM	putative dipeptidase	NE		15 58.7	2.9	-4.35	0.00000	Cu	
PP_4214	pvdN	pyoverdine biosynthesis related protein	NE		15 62.4	2.8	-4.49	0.00000	Cu	
PP_4215	pvdO	pyoverdine biosynthesis related protein	NE		18 72.6	4.0	-4.18	0.00000	Cu	
PP_4216	pvdE	pyoverdine ABC export system fused ATPase and p	NE		18 49.0	1.1	-5.45	0.00000	Cu	
PP_5337	PP_5337	LysR family transcriptional regulator	NE		11 19.5	2.4	-3.04	0.00000	Cu	
PP_5379	copB2=pcoB2	copper resistance protein B	NE		17 113.1	33.5	-1.75	0.00000	Cu	
PP_5380	copA2=pcoA2	copper resistance protein A	NE		36 259.6	32.3	-3.01	0.00000	Cu	
PP_0043	czcA	cation efflux system protein	NE		51 211.3	90.6	-1.22	0.00000	Zn	
PP_4213	pvdM	putative dipeptidase	NE		15 58.7	18.4	-1.67	0.00000	Zn	
PP_5140	PP_5140	Transcriptional regulator MerR family	NE		9 181.6	9.1	-4.31	0.00000	Zn	
PP_0127	dsbA	Thiol:disulfide interchange protein	NE		8 32.2	0.2	-7.59	0.00000	Cd	
PP_0887	PP_0887	Sensor histidine kinase	NE		19 193.2	19.5	-3.31	0.00000	Cd	
PP_1663	PP_1663	conserved exported protein of unknown function	NE		10 364.6	1.2	-8.22	0.00000	Cd	
PP_4213	pvdM	putative dipeptidase	NE		15 58.7	7.4	-2.98	0.00000	Cd	
PP_4214	pvdN	pyoverdine biosynthesis related protein	NE		15 62.4	8.6	-2.86	0.00000	Cd	
PP_4216	pvdE	pyoverdine ABC export system fused ATPase and p	NE		18 49.0	4.1	-3.59	0.00000	Cd	
PP_5139	cadA3	cadmium translocating P-type ATPase	NE		18 110.4	3.5	-4.99	0.00000	Cd	
PP_5140	PP_5140	Transcriptional regulator MerR family	NE		9 181.6	1.7	-6.74	0.00000	Cd	

<sup>a</sup> State of each gene in LB defined by the TRANSIT software using an Hidden Markov Model: NE, Non-Essential ; GD, Growth-Defect ; E, Essential ; GA, Growth-Advantage.

<sup>b</sup> Mean reads per TA site for a gene in each growth condition

<sup>c</sup> Difference of reads between LB+metal and LB growth condition

<sup>d</sup> Ratio of reads between chicory and LB condition expressed in log<sub>2</sub>

<sup>e</sup> P-values adjusted for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg procedure (See Transit manual)

<sup>f</sup> metal tested

Figure 1

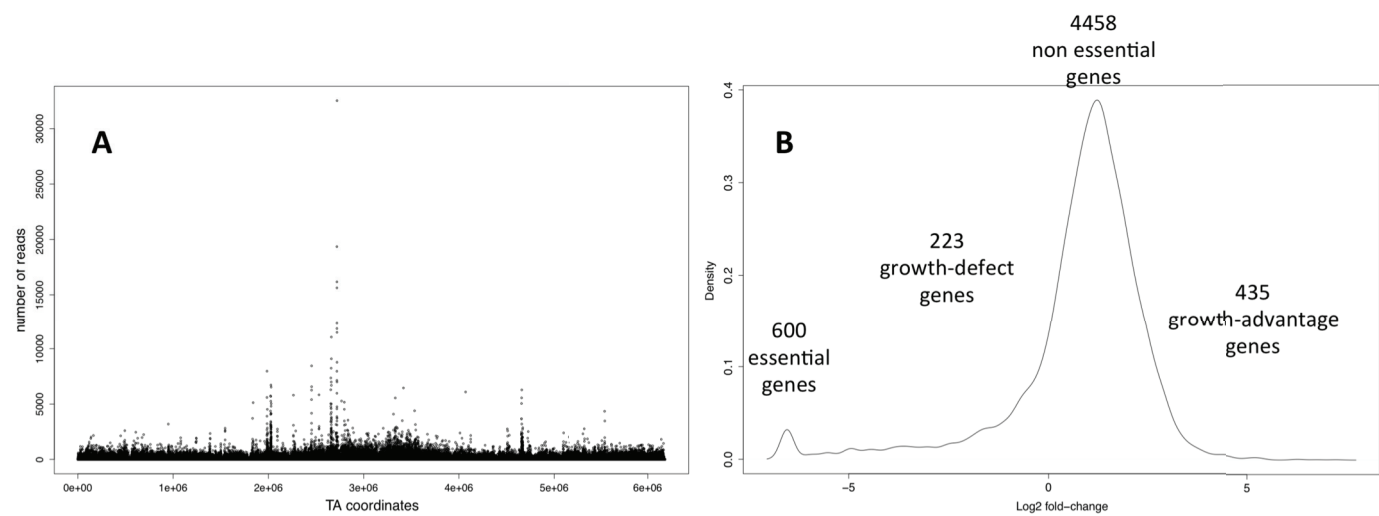


Figure 2

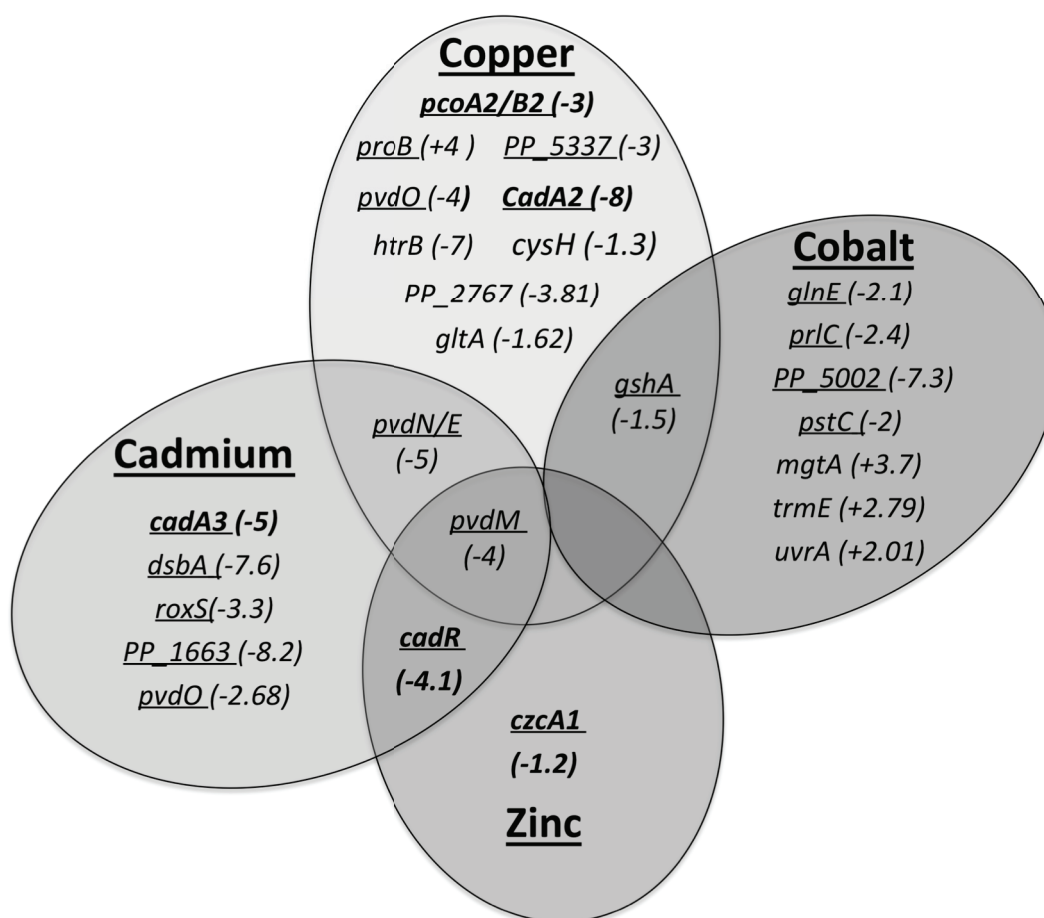


Figure 3

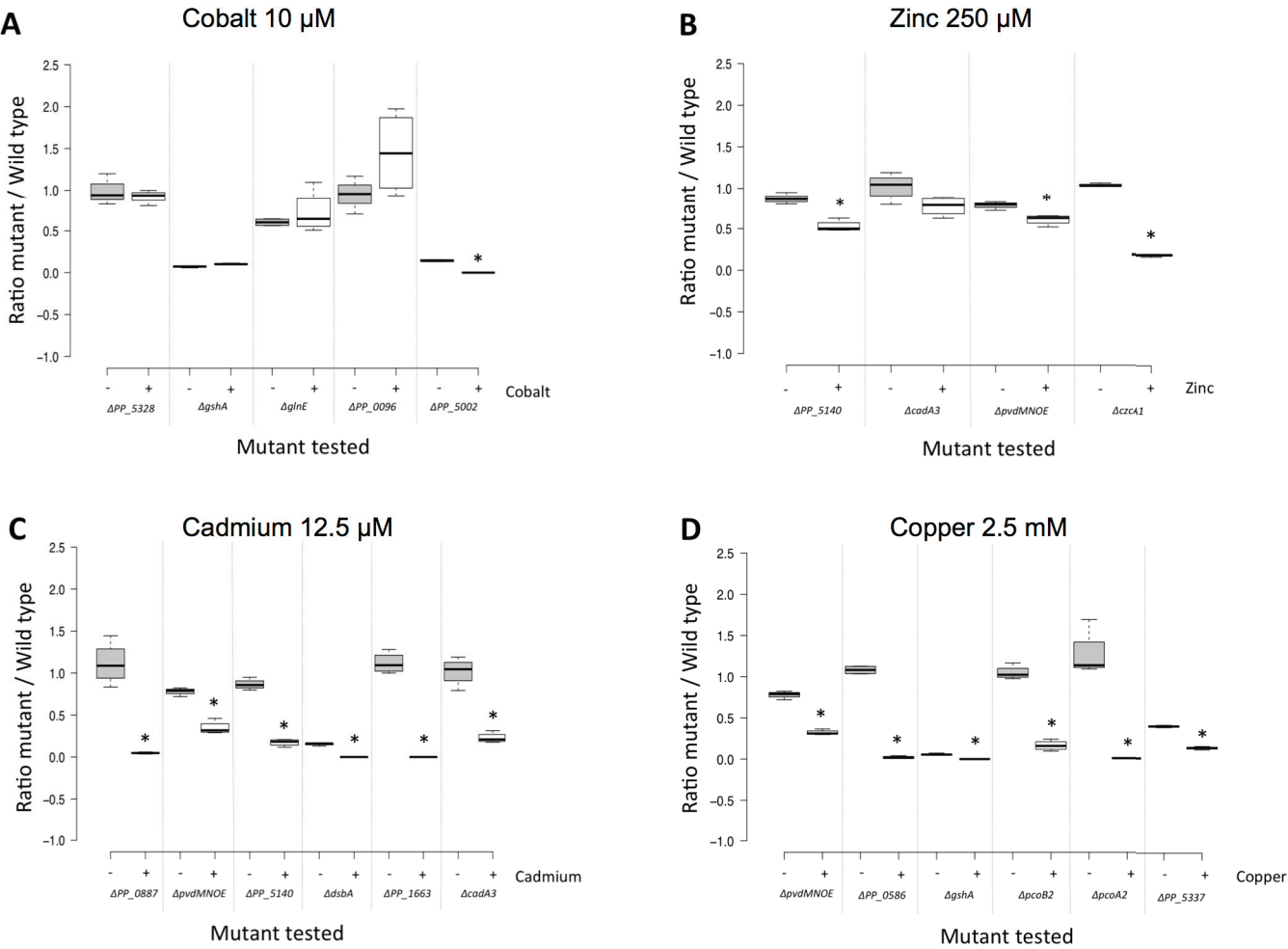
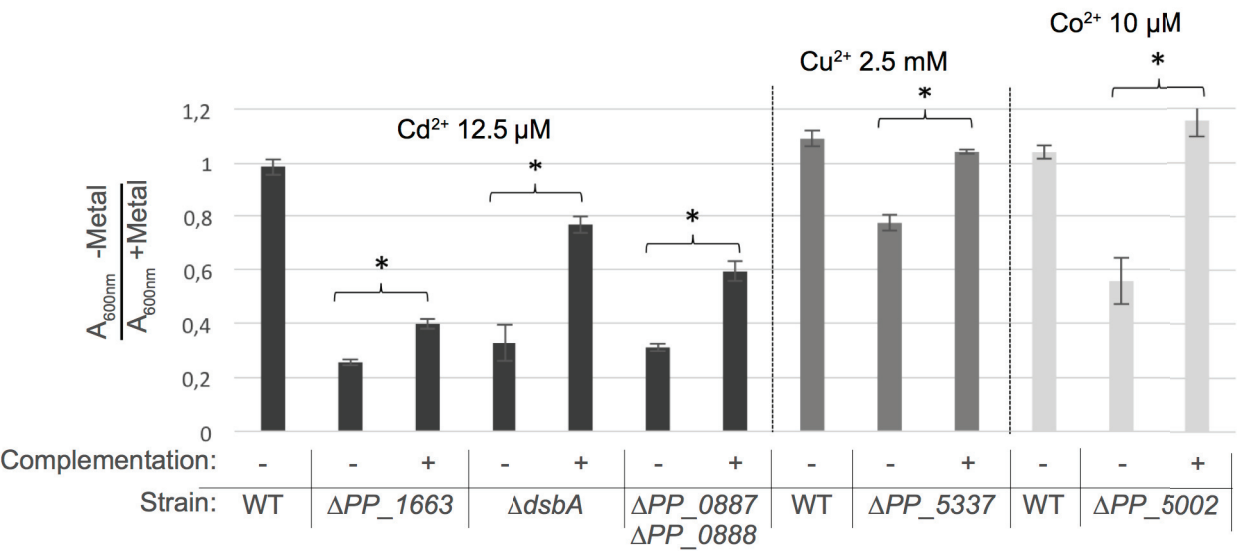


Figure 4





**Table S1: bacterial strains and plasmids used in this study**

Strain	Description	Reference
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
MFDpir	RP4-2-Tc::( $\Delta$ Mu1::aac(3))V- $\Delta$ aphA- $\Delta$ nic35- $\Delta$ Mu2::zeo) $\Delta$ adapA::erm-pir) $\Delta$ recA	[1]
DH5 $\alpha$ $\lambda$ -pir	$\lambda$ pir phage lysogen of DH5 $\alpha$	Laboratory collection
<b><i>Pseudomonas putida</i></b>		
KT2440	KT2440 Wild-type	Laboratory collection
PP27	KT2440 $\Delta$ gshA	This work
PP29	KT2440 $\Delta$ glnE	This work
PP31	KT2440 $\Delta$ copB1	This work
PP33	KT2440 $\Delta$ copA1	This work
PP36	KT2440 $\Delta$ PP_5337	This work
PP38	KT2440 $\Delta$ PP_0096	This work
PP40	KT2440 $\Delta$ PP_5328	This work
PP42	KT2440 $\Delta$ PP_5002	This work
PP44	KT2440 $\Delta$ PP_0586	This work
PP46	KT2440 $\Delta$ proB	This work
PP48	KT2440 $\Delta$ dsbA	This work
PP50	KT2440 $\Delta$ PP_0887 $\Delta$ PP_0888	This work
PP52	KT2440 $\Delta$ PP_1663	This work
PP54	KT2440 $\Delta$ czcA1	This work
PP56	KT2440 $\Delta$ PP_5139 ( $\Delta$ cadA2)	This work
PP58	KT2440 $\Delta$ pvdMNOE	This work
PP60	KT2440 $\Delta$ PP_5140	This work
PS12	KT2440 with puc18 mini-Tn7-gfpmut3 inserted in attTn7 site	This work
PS9	KT2440 WT pJN105	This work
PP63	KT2440 $\Delta$ PP_5337 pJN105	This work
PP64	KT2440 $\Delta$ PP_5337 pJN105-PP_5337	This work
PP65	KT2440 $\Delta$ PP_1663 pJN105	This work
PP66	KT2440 $\Delta$ PP_1663 pJN105-PP_1663	This work
PP67	KT2440 $\Delta$ PP_5002 pJN105	This work
PP68	KT2440 $\Delta$ PP_5002 pJN105-PP_5002	This work
PP69	KT2440 $\Delta$ dsbA pJN105	This work
PP70	KT2440 $\Delta$ dsbA pJN105-dsbA	This work
PP71	KT2440 $\Delta$ pvdMNOE pJN105	This work
PP72	KT2440 $\Delta$ pvdMNOE pJN105-pvdE	This work
PP73	KT2440 $\Delta$ PP_0887 $\Delta$ PP_0888 pJN105	This work
PP74	KT2440 $\Delta$ PP_0887 $\Delta$ PP_0888 pJN105-PP_0887/88	This work
<b>Plasmids</b>		
pSAM_DGm	Gm <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , mariner-based transposon, C9 mariner transposase gene, oriR6K, oriT	[2]
pKNG101	Sm <sup>r</sup> ; gene replacement vector, oriR6K, oriTRK2, sacB	[3]
pKNG-gshA	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream gshA gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-glnE	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream glnE gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-copB1	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream copB1 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-copA1	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream copA1 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_5337	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_5337 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_0096	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_0096 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_5328	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_5328 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_5002	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_5002 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_0586	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_0586 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-proB	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream proB gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-dsbA	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream dsbA gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_0887/0888	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_0887/PP_0888 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_1663	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_1663 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-czcA1	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream czcA1 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_5139	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_5139 gene of P. putida KT2440	This work
pKNG-pvdMNOE	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream pvdMNOE operon of P. putida KT2440	This work
pKNG-PP_5140	pKNG101 containing 500bp of upstream and downstream PP_5140 gene of P. putida KT2440	This work
pJN105	Gm <sup>r</sup> , arabinose-inducible araC-P <sub>BAD</sub> expression vector	[4]
pJN105-dsbA	dsbA gene with RBS cloned in Spe1/Sac1 digested pJN105 by SLIC	This work
pJN105-PP_5337	PP_5337 gene with RBS cloned in Spe1/Sac1 digested pJN105 by SLIC	This work
pJN105-PP_5002	PP_5002 gene with RBS cloned in Spe1/Sac1 digested pJN105 by SLIC	This work
pJN105-PP_1663	PP_1663 gene with RBS cloned in Spe1/Sac1 digested pJN105 by SLIC	This work
pJN105-pvdE	pvdE gene with RBS cloned in Spe1/Sac1 digested pJN105 by SLIC	This work
pJN105-PP_0887/0888	PP_0887/0888 operon with RBS cloned in Spe1/Sac1 digested pJN105 by SLIC	This work

[1] Ferrières L, Hémerly G, Nham T, Guérout A-M, Mazel D, Beloin C, et al.. J Bacteriol. 2010;192: 6418–6427.

[2] D. Skurnik, D. Roux, H. Aschard, V. Cattoir, D. Yoder-Himes, S. Lory, and G. B. Pier. 2013. PLoS Pathog., vol. 9, no. 9.

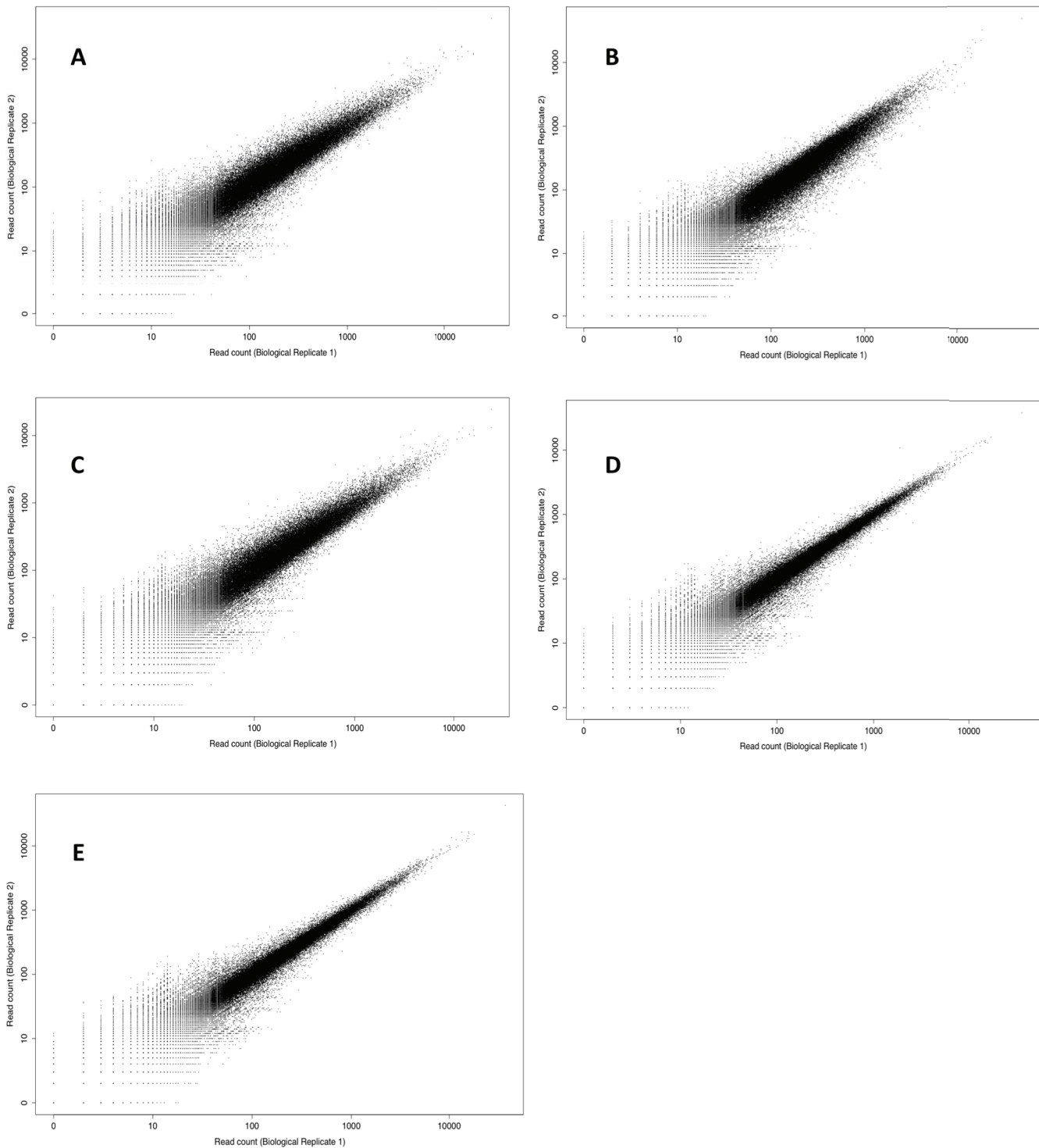
[3] Kaniga K, Delor I, Cornelis G R. Gene. 1991 Dec 20;109(1):137-41

[4] Newman JR, Fuqua C. 1999. Gene. 1999 Feb 18;227(2):197-203

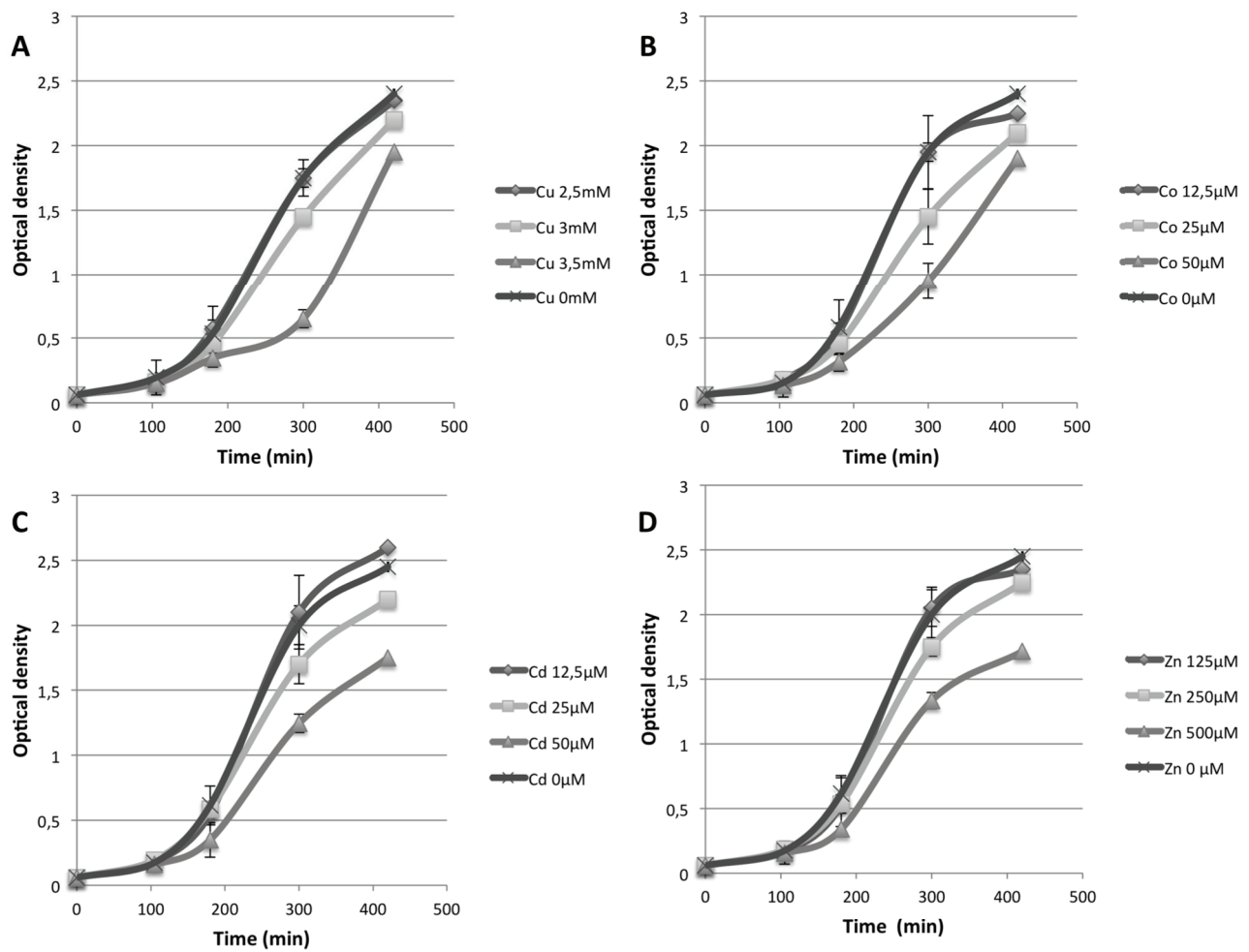
TABLE S2: list of oligonucleotides used in this study

Oligonucleotides	Description	Sequence	Reference
LIB_AdaptIT	in bold: barcode	TTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <b>XXXXNN</b>	[1]
LIB_AdaptB	in bold: barcode	<b>XXXXXX</b> AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAA	[1]
LIB_PCR_5	in bold: anneals to the P7 Illumina sequence of the transposon	<b>CAAGCAGAAGACGGCATACGAA</b> GACCGGGGACTTATCATCCAACCTGT	[1]
LIB_PCR_3	in bold: anneals to the P5 adaptor	<b>AATGATACGGCGACCA</b> CCGAACACTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCT	[1]
PP_0096 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp PP_0096 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCCCAAGCCCAATGATTAATCTCGT	This work
PP_0096 amont Rev	Amplification of upstream 500bp PP_0096 gene	CGCTGCAGGCTTGTTCGACGTCaaCGTTT	This work
PP_0096 aval Fw	Amplification of downstream 500bp PP_0096 gene	TGCGAACAGCGCTGCACCAAtggGTGAGGTA	This work
PP_0096 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp PP_0096 gene	GGACTATAGACTATACTAGTCAGACAGACAGCGCTTAGGG	This work
pvdMNOE amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp pvdMNOE operon	CCCTGCAGGTCGACGGATCCTTGTCCGAGCGCAAGTCG	This work
pvdMNOE amont Rev	Amplification of upstream 500bp pvdMNOE operon	GACCTTGCAGTAGGTTTCAACCGCAGAG	This work
pvdMNOE aval Fw	Amplification of downstream 500bp pvdMNOE operon	GAACCTACTGGCAAGGTCCAACAGGAGAA	This work
pvdMNOE aval Spe1 rev	Amplification of downstream 500bp pvdMNOE operon	GGACTATAGACTATACTAGTCCTTACCATCGATGTTGGTTGC	This work
proB amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp proB gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCGGTGCTGAACAAGGCCGATA	This work
proB amont Rev	Amplification of upstream 500bp proB gene	CAGGTGTCTCTGCTTGCaaCTTCTTCC	This work
proB aval Fw	Amplification of downstream 500bp proB gene	CGAAGAAGGACAACCTGGTGTGCTGAlgaG	This work
proB aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp proB gene	GGACTATAGACTATACTAGTGTATCGAGGAGCGGGCTATC	This work
PP_5337 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp PP_5337 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCGCCCTGGATCATGTCTACCA	This work
PP_5337 amont Rev	Amplification of upstream 500bp PP_5337 gene	CTTCACCTTGTTCaAGGTTCaaGAAGCACA	This work
PP_5337 aval Fw	Amplification of upstream 500bp PP_5337 gene	GAACCTTGAACAAGGTGAAGCGTCACTTtg	This work
PP_5337 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp PP_5337 gene	GGACTATAGACTATACTAGTTCGACAGCAGGAATCGACG	This work
copA1 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp copA1 gene	CCCTGCAGGATCGACGGATCGGAGCTCGACGCTTCTGTG	This work
copA1 amont Rev	Amplification of upstream 500bp copA1 gene	TTCTGCTCACTTTGCTTTCaaCGCGTAG	This work
copA1 aval Fw	Amplification of downstream 500bp copA1 gene	CAAAAGCAAAGTGGACGAAlgaACTGGAGA	This work
copA1 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp copA1 gene	GGACTATAGACTATACTAGTCGACGAGCGGAATCCATT	This work
copB1 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp copB1 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCGGAGCGATCTGAGGATGAGG	This work
copB1 amont Rev	Amplification of upstream 500bp copB1 gene	CGAATGCCTCCCTGCTTATGCTTTATCG	This work
copB1 aval Fw	Amplification of downstream 500bp copB1 gene	AGGCAAGGAGGACCTCGGATGTGGTTTGA	This work
copB1 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp copB1 gene	GGACTATAGACTATACTAGTACTGCTCTGCGTTCACTGCG	This work
cadA2 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp cadA2 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCCGCTTGTCTCCAGTTGCT	This work
cadA2 amont Rev	Amplification of upstream 500bp cadA2 gene	TTTGGCGAAGCTGACAGGCTGGTTCTATG	This work
cadA2 aval Fw	Amplification of downstream 500bp cadA2 gene	CTGTGACGTTGGCGAAAlgaAGGACGTA	This work
cadA2 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp cadA2 gene	GGACTATAGACTATACTAGTGGTTCAGTGCCCATGATCC	This work
dsbA amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp dsbA gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCCGATATCGCGCCCTACTTCTC	This work
dsbA amont Rev	Amplification of upstream 500bp dsbA gene	TGACGCTGGTCAGCGATGCTTTACTCCTGAG	This work
dsbA aval Fw	Amplification of downstream 500bp dsbA gene	CGaAgTGTGATGCACTGATCGAATG	This work
dsbA aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp dsbA gene	GGACTATAGACTATACTAGTGCACAAGCGCACCAAGAATCG	This work
PP_5140 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp PP_5140 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCCGACAATGCCAGTGGCCAC	This work
PP_5140 amont Rev	Amplification of upstream 500bp PP_5140 gene	GTGACTCCGCGATTTCTCCGATCTTaaICACG	This work
PP_5140 aval Fw	Amplification of downstream 500bp PP_5140 gene	GGAGAAGCTGCGGAGTCACGGGCAAlga	This work
PP_5140 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp PP_5140 gene	GGACTATAGACTATACTAGTGCAACTGGACGAATGGCACT	This work
gshA amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp gshA gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCCCTGGACAGCGGTGTTGC	This work
gshA amont Rev	Amplification of upstream 500bp gshA gene	TTCACTCACTGAGGAGTTTCGCTTaaGATG	This work
gshA aval Fw	Amplification of downstream 500bp gshA gene	GAACCTCCTCACTTgaTGAACCGCACCACT	This work
gshA aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp gshA gene	GGACTATAGACTATACTAGTCAGGCGAAACACATCCACATC	This work
glnE amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp glnE gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCCCAATACGGGTCTATCAGGTAAT	This work
glnE amont Rev	Amplification of upstream 500bp glnE gene	GTATGACGTTAGGCGaaTGGTCTATCCTT	This work
glnE aval Fw	Amplification of downstream 500bp glnE gene	CaIgCGCCTTAAGCTgaTACCGTGTGGGCTTA	This work
glnE aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp glnE gene	GGACTATAGACTATACTAGTTCGAGTTGGGCGACGAGATG	This work
PP_5002 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp PP_5002 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCGACTTCGAGCGCATCCTGCTG	This work
PP_5002 amont Rev	Amplification of upstream 500bp PP_5002 gene	CTGACGATGTTGATGGCGTAGGGACG	This work
PP_5002 aval Fw	Amplification of downstream 500bp PP_5002 gene	GGCATCAACATGCTTCagCGCAAGG	This work
PP_5002 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp PP_5002 gene	GGACTATAGACTATACTAGTCTGAGTTGGCCAGCAACACG	This work
PP_5328 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp PP_5328 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCCCAAGTCTGTCGACAAAGACCC	This work
PP_5328 amont Rev	Amplification of upstream 500bp PP_5328 gene	CTTGCGCAGTTCAAGCGCATaaCTCAGT	This work
PP_5328 aval Fw	Amplification of downstream 500bp PP_5328 gene	CGCTTGAATGCGCAAGAAATACCTGCTC	This work
PP_5328 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp PP_5328 gene	GGACTATAGACTATACTAGTCTGTTTGTCTTGGCGCTGACC	This work
PP_0887/PP_0888 amont BamH1	Amplification of upstream 500bp PP_0887/PP_0888 operon	CCCTGCAGGTCGACGGATCGGAAGTTGGCGCTTTCAAGG	This work
PP_0887/PP_0888 amont Rev	Amplification of upstream 500bp PP_0887/PP_0888 operon	GCCGAAGCCCAACACTTTTTCaaAGGTT	This work
PP_0887/PP_0888 aval Fw	Amplification of downstream 500bp PP_0887/PP_0888 operon	AAAGTGTGGGCTTCGGCGCTgaTTCCTTAT	This work
PP_0887/PP_0888 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp PP_0887/PP_0888 operon	GGACTATAGACTATACTAGTGGCGGTATTCGTAGTCTCCT	This work
PP_1663 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp PP_1663 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCCTCGACCAACACCCAGTTTCG	This work
PP_1663 amont Rev	Amplification of upstream 500bp PP_1663 gene	CCCTTTCAGCGACGaaTAAATTTCTCCTA	This work
PP_1663 aval Fw	Amplification of downstream 500bp PP_1663 gene	TATgCGTGGGCTGAAGGGCAACaGtaTCCGC	This work
PP_1663 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp PP_1663 gene	GGACTATAGACTATACTAGTTCGCTGTGAGGCCCTGCTATG	This work
czcA1 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp czcA1 gene	CCCTGCAGGTCGACGGATCGGATCTTCGCGACAGATC	This work
czcA1 amont Rev	Amplification of upstream 500bp czcA1 gene	CTGTATGCTGGCGAATCTGATGATAGCTTCA	This work
czcA1 aval Fw	Amplification of downstream 500bp czcA1 gene	AGATTGCCACGaaCaaCGCCTCCGCTAA	This work
czcA1 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp czcA1 gene	GGACTATAGACTATACTAGTATGCATTGCGAATACATCGAGT	This work
PP_0586 amont BamH1 Fw	Amplification of upstream 500bp PP_0586 gene	GTAGCTTTTACAGCATCCGCTGCGCTTTTACGATCAG	This work
PP_0586 amont Rev	Amplification of upstream 500bp PP_0586 gene	GTGCTGCTGGTATGTGGTGATCGGGGATG	This work
PP_0586 aval Fw	Amplification of downstream 500bp PP_0586 gene	ACCACTACACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	This work
PP_0586 aval Spe1 Rev	Amplification of downstream 500bp PP_0586 gene	CGTCTACTGTACGATACACTTGGTGGTGACTATTTCGCTCGTG	This work
PP_0096 Fw	Verification of ΔPP_0096 mutant	GGCGCTAGGAGAAAAATCG	This work
PP_0096 Rev	Verification of ΔPP_0096 mutant	ACCGGGATCTTACCAGCAC	This work
pvdMNOE Fw	Verification of ΔpvdMNOE mutant	CACGAGATGGGCACTCGTAG	This work
pvdMNOE Rev	Verification of ΔpvdMNOE mutant	GTCACTGGCAGTTTGGTCT	This work
proB Fw	Verification of ΔproB mutant	TGCACCTGTTGGACATTTG	This work
proB Rev	Verification of ΔproB mutant	ACGATCAGGCGGAGGAAT	This work
PP_5337 Fw	Verification of ΔPP_5337 mutant	TCGTTGTTAGGTTGCAGGT	This work
PP_5337 Rev	Verification of ΔPP_5337 mutant	GTGGTACTGCGGGTACTTG	This work
copA1 Fw	Verification of ΔcopA1 mutant	TCATCCATAGCCCAAGGATTC	This work
copA1 Rev	Verification of ΔcopA1 mutant	CATGTGCGCAGGTTTGG	This work
copB1 Fw	Verification of ΔcopB1 mutant	CTCAATATGGCGAGCGCT	This work
copB1 Rev	Verification of ΔcopB1 mutant	CATGATGGTCTGGCTCATTG	This work
cadA2 Fw	Verification of ΔcadA2 mutant	CCGATGGCGGTCTGATAG	This work
cadA2 Rev	Verification of ΔcadA2 mutant	GTGTGGTTCGAGCCCTTCTC	This work
dsbA Fw	Verification of ΔdsbA mutant	CCAGCGCTATCTCGAAAAAC	This work
dsbA Rev	Verification of ΔdsbA mutant	GTGACGGTAACCGCCTATCA	This work
PP_5140 Fw	Verification of ΔPP_5140 mutant	GCCACCACCCCACTCAGG	This work
PP_5140 Rev	Verification of ΔPP_5140 mutant	ATCGACAGGTACGCCAGT	This work
gshA Fw	Verification of ΔgshA mutant	GCCAACGCCAAGCAACTG	This work
gshA Rev	Verification of ΔgshA mutant	GCTTTCGACACACCCCTTG	This work
glnE Fw	Verification of ΔglnE mutant	GTGACAGGATGGTGTTCG	This work
glnE Rev	Verification of ΔglnE mutant	CTCGATCATCAGCGGGTAG	This work
PP_5002 Fw	Verification of ΔPP_5002 mutant	GGGTGCAATTCACCTGAGC	This work
PP_5002 Rev	Verification of ΔPP_5002 mutant	CTGCTGCTCACCAGTCC	This work
PP_5328 Fw	Verification of ΔPP_5328 mutant	GCCGAACAAGCCTCTGG	This work
PP_5328 Rev	Verification of ΔPP_5328 mutant	GCACCGATGTCTTCTTCTC	This work
PP_0887/PP_0888 Fw	Verification of ΔPP_0887/PP_0888 mutant	ATCGACCGCATCTTTGAG	This work
PP_0887/PP_0888 Rev	Verification of ΔPP_0887/PP_0888 mutant	GGTATACAGCATGGCCACC	This work
PP_1663 Fw	Verification of ΔPP_1663 mutant	GATCGACAGCTGCCAAGG	This work
PP_1663 Rev	Verification of ΔPP_1663 mutant	CTGTGTCATTAAGCAGCTT	This work
czcA1 Fw	Verification of ΔczcA1 mutant	CCGTGGTAGTGGAGAAACAC	This work
czcA1 Rev	Verification of ΔczcA2 mutant	AGGGGTATACATTTTCGAAGC	This work
PP_0586 Fw	Verification of ΔPP_0586 mutant	GCCATCAGGACAAGGTGA	This work
PP_0586 Rev	Verification of ΔPP_0586 mutant	ACACGAGGCGAGGTAGCAA	This work
PP_5337 Spe1 Fw	Cloning PP_5337 gene in pJN105	cagcccgggggtatccactagTGGAGATGTGCTTCgtgAAC	This work
PP_5337 Sac1 Rev	Cloning PP_5337 gene in pJN105	TATAGGCGCAATTGGAGCTCCAATTCAAAGTGACGCTTCACC	This work
dsbA Spe1 Fw	Cloning dsbA gene in pJN105	cagcccgggggtatccactagTCTCAGGAGTAAAGCATgCG	This work
dsbA Sac1 Rev	Cloning dsbA gene in pJN105	TATAGGCGCAATTGGAGCTCCTACTTGGCAGCGCGCTC	This work
PP_1663 Spe1 Fw	Cloning PP_1663 gene in pJN105	cagcccgggggtatccactagTCTTAGGAGAAATTgTCTGCTGCG	This work
PP_1663 Sac1 Rev	Cloning PP_1663 gene in pJN105	TATAGGCGCAATTGGAGCTCGATCAGTTGCCCTTCACCG	This work
PP_5002 Spe1 Fw	Cloning PP_5002 gene in pJN105	cagcccgggggtatccactagTCAGAGATTTCTGCCCatgG	This work
PP_5002 Sac1 rev	Cloning PP_5002 gene in pJN105	TATAGGCGCAATTGGAGCTCCTTAGAGCATGAGCTTGACCAC	This work

Figure S1



**Figure S2**







### 4.2.1 Introduction d'article

*Pseudomonas putida* est une espèce bactérienne présente dans de très nombreux environnements et fait ainsi face à de nombreux stress environnementaux : variation de température, carence en nutriments, stress osmotique et stress engendrés par la présence de nombreux composés habituellement toxiques pour de nombreux micro-organismes. Parmi ces composés, on retrouve des hydrocarbures et des composés à cycle aromatique que *P. putida* est capable d'utiliser en tant que principale source carbonée et ne considère donc pas comme un stress [309], [310]. Souvent isolée d'environnements contaminés par les métaux, cette espèce porte également de très nombreux gènes de résistance à ces derniers. Certains métaux sont essentiels à la vie cellulaire mais tous deviennent toxiques en excès dans la cellule. Leur toxicité est due principalement à leur capacité à altérer les protéines, l'ADN ou à la création d'espèce réactives d'oxygène. Certains des stress engendrés par les métaux sont ainsi retrouvés chez les phytopathogènes comme nous l'avons vu pour *Dickeya dadantii*. Lors d'un excès d'ions métalliques, la cellule met en place de nombreux mécanismes de défense qui ont notamment été mis en évidence par plusieurs approches globales. En effet, des expériences de protéomique réalisées chez différentes souches de *P. putida* et en présence d'une variété de métaux ont été entreprises afin d'établir le protéome induit en réponse au stress métallique[311]–[314]. Cependant, une fois encore, les gènes importants pour la résistance mais dont l'expression reste inchangée sont négligés par ce type d'approche. De plus, très peu de banques de mutants ont été criblées afin de découvrir les mécanismes de résistances aux métaux. Enfin, comme expliqué précédemment, ce type d'approche est assez fastidieux car il nécessite le criblage de chaque mutant de façon indépendante. Nous avons ainsi décidé d'utiliser le Tn-seq pour étudier la réponse au stress métallique chez *P. putida*. Un crible réalisé en milieu riche en présence de cuivre, cobalt, zinc ou cadmium a ainsi été entrepris et a permis de mettre en évidence 24 gènes dont l'absence conduit à un défaut de croissance en présence du métal considéré et 4 gènes dont l'absence facilite la croissance de *P. putida* dans les mêmes conditions. La plupart d'entre eux n'ont pas de rôle connu dans la résistance aux métaux.

Parmi les gènes de résistance aux métaux déjà connus chez *P. putida*, nous avons mis en évidence l'importance de deux ATPases de type P, à savoir CadA2 (PP\_0586

anciennement PacS) et CadA3 (PP\_5139), ainsi qu'un autre système d'efflux (CzcA1) pour la résistance au cuivre, cadmium et zinc respectivement. Ces résultats montrent l'importance des systèmes d'efflux dans la résistance aux métaux. D'autres systèmes de protection connus, comme la chélation d'ions cuivre par CopA2 (renommée PcoA2) ont aussi été mis en évidence.

Trois gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels ou pour des protéines participant à des systèmes à deux composants ont aussi été révélés (PP\_0887, PP\_5337, PP\_5140). Ces derniers pourraient correspondre à des régulateurs majeurs des voies de résistance aux métaux chez *P. putida*.

Un gène faisant partie d'un opéron impliqué dans la voie de biosynthèse de l'inosine monophosphate (IMP) (PP\_1663) s'est révélé important. Comme chez le phytopathogène *D. dadantii*, cette voie de biosynthèse apparaît importante en condition de stress.

De nombreux autres gènes jamais décrits auparavant comme étant impliqués dans la résistance aux métaux ont ainsi été révélés. Plus particulièrement, des gènes impliqués dans la maturation et le transport du précurseur de la pyoverdine seraient importants pour la résistance à différents métaux.

Enfin, quatre gènes ont été mis en évidence dans une résistance croisée à plusieurs métaux, indiquant que la cellule bactérienne pourrait privilégier l'utilisation d'un seul système pour faire face à différents stress.

La première partie de l'étude porte sur la façon dont le Tn-seq a été utilisé sur une banque de mutants de *P. putida*: caractérisation de la banque, crible réalisé et traitement informatique pour l'identification des gènes. La seconde partie analyse les gènes requis pour la résistance aux métaux. La dernière partie porte sur la validation des résultats de Tn-seq par l'utilisation de mutants de délétion et des complémentations associées.

#### **4.2.2 Discussion**

Nos résultats de Tn-seq ont mis en évidence de nombreux mécanismes de résistance aux métaux comme des séquestrateurs d'ions métalliques et des transporteurs chez *P. putida*. Notre crible a aussi souligné le rôle important des régulateurs de réponse afin d'optimiser la réponse cellulaire au stress rencontré.

De façon surprenante, aucun système de réponse au stress oxydatif n'a été mis en évidence. *P. putida* est pourtant dotée de systèmes de défense évolués avec des régulateurs de transcription majeurs tels que SoxR et OxyR contrôlant de nombreuses enzymes détoxifiantes telles que SodB (superoxyde dismutase), Tpx (thiol peroxidase) ou encore AhpC (hydroperoxyde reductase) [315]. Aucun des gènes codant ces enzymes n'apparaît important dans la résistance aux métaux dans notre crible. Pourtant, de nombreuses analyses protéomiques ont démontré que cette catégorie de gènes était régulée positivement en présence de métaux, indiquant que la bactérie fait bel et bien face à un stress oxydatif nécessitant une réponse appropriée [312]–[314]. Cependant, les quantités de métaux utilisées dans ces études sont bien plus importantes et conduisent à un défaut de croissance de la souche étudiée en comparaison avec notre crible. Ces excès d'ions métalliques sont peut être la cause d'une forte production de stress oxydant, stress qui serait minimisé dans nos conditions où une souche sauvage de *P. putida* voit sa croissance très peu affectée par la présence des métaux. Une autre hypothèse serait que les très nombreux systèmes de défenses au stress oxydatif chez *P. putida* pourraient se compenser entre eux, de fait que même si un mutant fait face à un stress oxydatif généré par les métaux, d'autres systèmes peuvent suffire à rétablir un équilibre cellulaire suffisant pour la croissance.

Les porines et transporteurs spécifiques d'un composé peuvent devenir des voies d'entrée pour les métaux au sein de la cellule. Les bactéries qui font face à un excès d'ions métalliques peuvent ainsi réguler négativement les gènes codant des porines de la membrane externe afin de faciliter la survie en présence de métaux [92], [313]. Nos résultats n'identifient pourtant qu'un seul gène codant un transporteur de magnésium, MgtA, dont le mutant présente un avantage de croissance en présence de cobalt. Ce transporteur à magnésium est aussi responsable de l'import de nickel chez *S. typhimurium* et pourrait ainsi être une voie d'entrée pour les ions cobalt [316]. Lorsqu'un transporteur est utilisé spécifiquement afin d'importer une molécule essentielle et qu'il est aussi responsable de l'entrée en excès d'ions métalliques, sa disparition peut aussi conduire à la mort cellulaire par absence de la molécule censée être importée. Ceci pourrait expliquer qu'un seul transporteur a été identifié comme conférant un avantage de croissance lorsqu'il est muté. Il est assez surprenant que l'absence d'importeur du zinc, ZnuABC, ou de son régulateur négatif Zur, ne confère pas



d'avantage de croissance. Il est probable que les systèmes d'import du zinc soient dupliqués chez *P. putida* comme le suppose *D. Canovas et al. 2003* [138].

Les pompes à efflux sont les principaux mécanismes de défense en cas d'excès d'ions métalliques. La plupart sont capables d'effluer plusieurs métaux et sont sous le contrôle d'un régulateur dépendant du métal à effluer. Notre crible a mis en évidence trois pompes à efflux majeures : *czcA1*, *cadA3* et *CadA2* (PP\_0586) pour l'efflux respectif de zinc, cadmium et cuivre. Ces systèmes, connus, sont importants même en faible concentration de métaux environnants indiquant qu'ils sont l'un des premiers mécanismes de défense déployés face au stress métallique. Près de cinq systèmes CzcABC sont présents chez *P. putida* [138] mais seul un de ces systèmes est retrouvé dans notre analyse. CzcABC1 apparaît alors comme le mécanisme d'efflux majeur dans la résistance au zinc dans nos conditions de laboratoire. Il est probable que les autres systèmes présents permettent à la bactérie de s'adapter à d'autres milieux de vie et/ou répondent à des stress différents. Le système CzcABC est aussi connu dans la résistance à de fortes concentrations de cadmium chez *P. putida* CD2 [275]. Cependant, la présence de *CadA3* (système d'efflux d'ions cadmium) chez un mutant  $\Delta czcA1$  ne permet probablement pas de le révéler. La création d'un double mutant  $\Delta czcA1\Delta cadA3$  pourrait indiquer si le système CzcA1 est impliqué dans la résistance au cadmium chez *P. putida* KT2440. Comme décrit par Leedjarv et ses collaborateurs, *CadA1* (PP\_0041), homologue de *CadA3* (PP\_5139) ne semble pas intervenir dans la résistance aux métaux testés. Un autre homologue de *CadA3* (PP\_5139), *CadA2* (PP\_0586) lui même homologue de CopA1<sub>PA01</sub>, une Cu<sup>+</sup>-ATPase, apparaît essentiel pour la résistance au cuivre seulement. Ce résultat n'est pas surprenant car CopA1<sub>PA01</sub> est impliqué dans la résistance au cuivre chez *P. aeruginosa* [317]. A l'exception du cobalt, les systèmes d'efflux jouent un rôle majeur dans la résistance aux métaux testés. Parmi les systèmes de résistance déjà connus, notre crible a aussi révélé CopA2/B2 (PP\_5379/80) renommé PcoA2/B2 car homologue au système de résistance au cuivre PcoA/B (PA2064/65) chez *P. aeruginosa*. La réponse au cuivre implique donc l'activité de deux systèmes non compensatoires entre eux : PcoA2/B2 et *CadA2*.

Ces systèmes de résistance aux métaux sont finement contrôlés par des régulateurs de transcription. Chez *P. aeruginosa*, CopA<sub>PA01</sub> (homologue de *CadA2*<sub>KT2440</sub>) est régulé par

CueR. Un homologue de CueR chez *P. putida*, PP\_0585, fait partie de la même unité de transcription que CadA2. PP\_0585 est probablement le régulateur de *cadA2* mais n'apparaît pourtant pas essentiel malgré un log<sub>2</sub>FC négatif de -1,74. Il est probable qu'un autre régulateur active la production de CadA2 ou que l'activité résiduelle de son promoteur soit suffisante à la résistance au cuivre.

La séquence reconnue par CopR2 (PP\_5383) n'est pas connue. Cependant, copR2 et pcoA2/B2 (PP\_5379/80) sont proches d'un point de vue génomique suggérant que CopR2 pourrait être son régulateur. Cette hypothèse ne peut être confirmée à la vue du score de log<sub>2</sub>FC de *copR2* (-0,74). Encore une fois, la régulation de *pcoA2/B2* pourrait dépendre d'autres facteurs.

Les régulateurs CusR/S, contrôlant la transcription de *cusABC* (PP\_5385/86/87) n'apparaissent pas non plus comme essentiels. Un mutant de *cusABC* possède d'autres systèmes de résistance (PcoA2B2) actifs. Si les autres systèmes sont suffisants pour la résistance au cuivre, CusABC n'apparaîtra pas comme essentiel. A l'inverse, dans un mutant  $\Delta pcoA2B2$ , CusABC ne semble pas pouvoir suffire à la résistance. Ce système n'est alors probablement pas actif dans nos conditions.

PP\_5140, un régulateur de la famille MerR, est essentiel à la résistance au cadmium et au zinc d'après notre crible. Son implication dans la résistance au cadmium est connue chez *P. putida* [318]. Il est décrit comme étant le régulateur de CadA3 (PP\_5139) [138]. Les mutants des gènes *cadA3* et PP\_5140 ont été testés pour leur résistance au cadmium et au zinc. Le mutant de *cadA3* ne présentant un défaut de croissance qu'en présence de cadmium. PP\_5140 pourrait donc activer d'autres systèmes de résistance au zinc, comme *czcA1*. Cette hypothèse reste à confirmer.

PP\_5337, un régulateur de la famille LysR, est situé entre deux clusters de gènes, un impliqué dans la biosynthèse de l'IMP (*purE* et *purK*) et un autre dans la production d'ammonium (*aspA*). Son régulon n'est pas connu. Il pourrait réguler les gènes faisant partie de la voie de biosynthèse de l'IMP ou ceux impliqués dans la production d'ammonium. De part sa proximité avec *pcoA2/B2* (PP\_5379/80), une dernière hypothèse serait qu'il régulerait l'expression de ce système de résistance. Pour répondre à ces interrogations, des systèmes rapporteurs ainsi que des qRT-PCR en contexte sauvage et  $\Delta PP_5337$  pourront être réalisés.

Pour rappel, le cadmium a une forte affinité avec les groupements cystéines-soufre. En présence de cadmium, le système à deux composants PP\_0887/88 (RoxS/RoxR)

apparaît essentiel. Le régulon de RoxS/RoxR a été étudié en absence de stress. Ce système à deux composants régule des gènes de réponse à la carence en soufre dont *selA* et *selB* impliqués dans le remplacement des cystéines contenant du soufre par l'acide aminé alternatif sélénocystéine. RoxS/RoxR régule aussi l'opéron *PP\_1110-PP\_1113* ainsi que des gènes *cysD* et *cysNC* impliqués dans la voie de biosynthèse des cystéines [319]. Il a été démontré que l'ensemble de ces gènes est induit par la diminution de la quantité de soufre chez *Mycobacterium tuberculosis* [320]. Le renouvellement de cystéines pourrait ainsi être induit par ce système à deux composants en réponse aux dégâts sur les groupements cystéines-soufre causés par le cadmium.

D'autres gènes apparaissent très importants pour la résistance aux métaux testés à la vue des scores très bas de log<sub>2</sub>FC. DsbA qui catalyse la formation de ponts disulfures sur des protéines non repliées dans le périplasme [58] apparaît comme un système de défense majeur en plus de CadA3. Nous avons émis l'hypothèse que son rôle dans la résistance pourrait être dû à la liaison directe des ions cadmium par ses groupements thiol, un peu à l'image d'une éponge à cadmium. La surexpression de DsbA en présence d'une forte quantité de cadmium n'a pas démontré une résistance accrue par rapport à une souche sauvage, réfutant ainsi notre hypothèse (données non présentées). Ceci indique que DsbA est probablement essentielle dans la résistance au cadmium en permettant le repliement correct de certaines protéines périplasmiques qui sont la cible des ions Cd<sup>2+</sup>. Ces dernières protéines ne sont pas forcément impliquées dans la résistance mais ont une fonction essentielle pour la vie cellulaire.

PP\_1663 présente le log<sub>2</sub>FC le plus bas en présence de cadmium. Ce gène à fonction inconnue fait partie d'un opéron impliqué dans la voie de biosynthèse de l'IMP. Si sa fonction concerne la production d'IMP et donc la synthèse *in fine* de purines, il apparaît encore une fois que la biosynthèse de bases azotées est un mécanisme majeur pour la survie en condition de stress.

PP\_5002 est un autre gène à fonction inconnue avec un score de log<sub>2</sub>FC très bas. Il apparaît comme le mécanisme indispensable pour la survie en présence de cobalt. Il contient un domaine DUF971 qui est retrouvé entre autre dans des facteurs d'assemblage de clusters Fe-S. Le cobalt est connu pour interférer avec l'homéostasie du fer et pourrait donc générer des dommages aux clusters Fe-S [104]. Le produit de

*PP\_5002* pourrait ainsi avoir une fonction dans l'assemblage des clusters perturbés par les ions  $\text{Co}^{2+}$ .

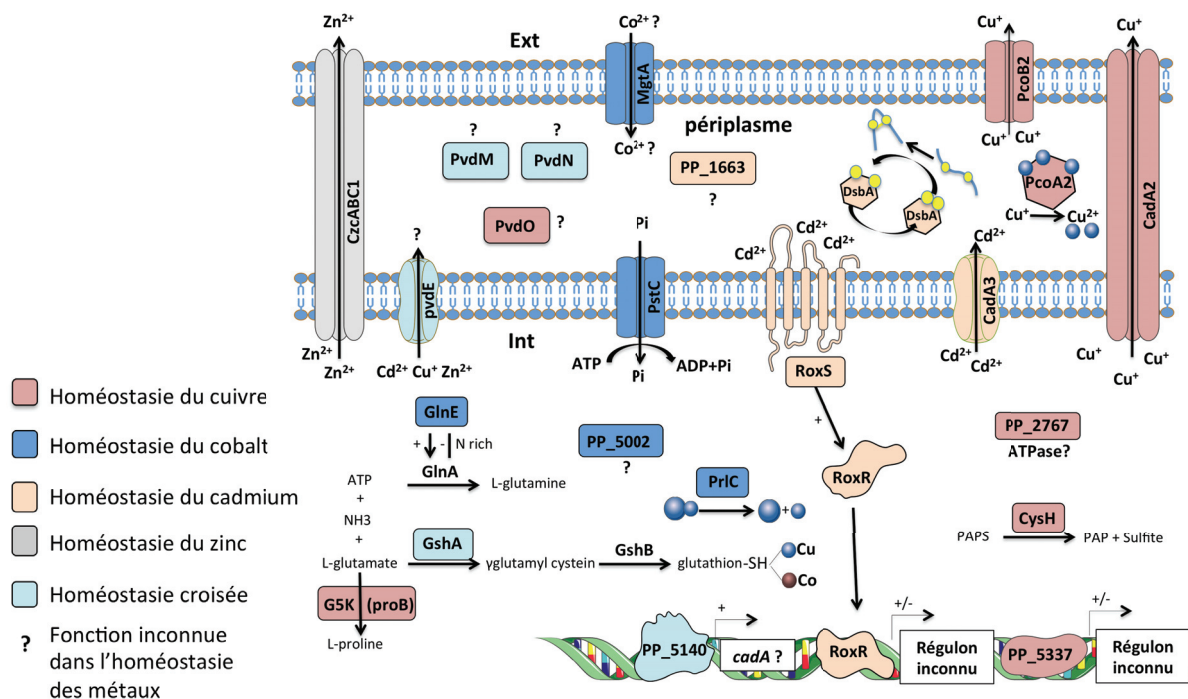
Certains gènes ont un intérêt particulier car impliqués dans des résistances croisées à plusieurs métaux. C'est le cas de *gshA* qui pour rappel est impliqué dans la voie de synthèse du glutathion tout comme *gshB* qui a un score de  $\log_2\text{FC}$  non significatif ( $\log_2\text{FC}$  de -1,04 et -0,45 pour le cuivre et cobalt respectivement). Chez *E. coli*, la perte de production de glutathion induit une légère sensibilité aux métaux (cd, zn, cu) lorsque d'autres systèmes de résistance sont actifs [321]. Son absence provoque cependant un fort défaut de croissance en absence de systèmes de résistance tel que *PcoA2*. Le glutathion agit dans un cytosol où peu d'ions cuivre sont présents car ils sont essentiellement séquestrés dans le périplasme. Le glutathion semble agir comme une seconde ligne de défense. Cette seconde protection semble néanmoins importante d'après notre crible où les ions cuivre et cobalt sont certainement en excès dans le cytosol. Cette idée de défense secondaire est appuyée par les scores de  $\log_2\text{FC}$  plus proche de 0 pour les gènes *gshA/B* (-1,5 pour *gshA*) que pour les autres systèmes de résistance tels que *pcoA2/B2* (-3). Nos résultats phénotypiques montrent aussi qu'un mutant *gshA* présente un léger défaut de croissance en milieu riche indiquant que le glutathion joue déjà un rôle de tampon du potentiel redox en absence de stress métallique. Cette molécule agit également comme molécule signal chez la plante [322].

Au moins un gène de l'opéron *pvdMNOE* est retrouvé à chaque fois comme étant impliqué dans la résistance au cadmium, cuivre ou zinc. Pour rappel, les produits des gènes *pvdMNO* sont suspectés d'être impliqués dans la maturation du précurseur de la pyoverdine alors que *pvdE* produit le système de transport du précurseur de la pyoverdine du cytosol vers le périplasme. Nous avons émis l'hypothèse que seul *pvdE* serait impliqué dans la résistance aux métaux en permettant la détoxification du cytosol par transport direct ou indirect des métaux vers le périplasme. Selon cette hypothèse, la présence d'insertion dans les gènes *pvdMNO* conduirait à un effet polaire sur *pvdE*. Afin de tester cette hypothèse, un mutant de délétion de l'opéron *pvdMNOE* a été complémenté par le gène *pvdE* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose (pBAD) et exprimé à partir d'un plasmide à nombre moyen de copies. Aucune complémentation phénotypique en présence des différents métaux n'a été possible et ce,

quelque soit la dose d'arabinose utilisée (inducteur du système). De plus, le système s'est révélé toxique en milieu riche et ce, même en absence d'induction à l'arabinose (données non présentées). L'expression basale de pBAD conduit probablement à une production trop importante de PvdE, protéine membranaire, devenant toxique pour la cellule. L'hypothèse n'est pas réfutée mais le système de complémentation doit être adapté en réalisant une complémentation de préférence chromosomique où *pvdE* serait sous le contrôle de son propre promoteur.

Un crible Tn-seq chez *P. putida* a déjà été réalisé par Calero et ses collaborateurs [257]. Cette équipe a utilisé une banque d'environ 10,000 mutants de KT2440, obtenus par mutagénèse avec un Tn5, afin de mettre en évidence des gènes de résistance à un composé organique et aromatique, l'acide p-coumarique. Leur étude révèle l'implication de transporteurs (ex : Ttg2A), de lipoprotéines (ex : VacJ), de régulateurs (ex : FleN), de protéines de membrane externe (ex : OprH) ainsi que plusieurs protéines de fonction inconnue. Aucun de ces gènes n'a été retrouvé comme étant impliqué dans la réponse à un stress métallique, indiquant que les stratégies de défense de *P. putida* sont différentes selon le stress rencontré.

Un schéma bilan des systèmes de résistance mis en évidence dans cette étude est présenté Figure 33.



**Figure 33 : Bilan des systèmes de résistance aux métaux chez *P. putida* découvert par Tn-seq.**

Flèche avec signe « + »: activation; Flèche avec signe « - »: inhibition. PAPS: 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate. PAP: 3'-phosphoadénosine 5'-phosphate. PcoA2 et PcoB2 correspondent à PP\_5379 et PP\_5380.

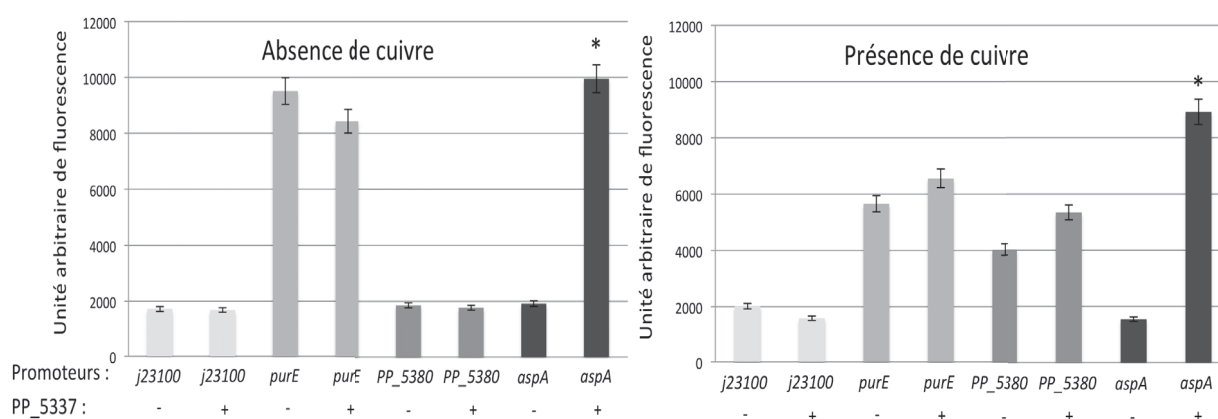
### 4.2.3 Résultats additionnels

Au paragraphe 4.2.2, nous avons émis la possibilité d'une régulation de *purE/K* ou *aspA* ou *PP\_5380* par le régulateur *PP\_5337*. Afin de tester ces hypothèses, des fusions transcriptionnelles ont été réalisées en plaçant le promoteur de chacun des gènes cités en amont du gène *sfgfp* [323]. Les constructions ont été utilisées dans des souches  $\Delta PP_5337$  complémentées par le plasmide pJN105 vide ou avec *PP\_5337* exprimé sous le contrôle de son propre promoteur. Lors d'une culture en microplaque en milieu riche en présence ou absence de cuivre, la fluorescence a été mesurée au cours du temps. Ces fusions permettent de déterminer d'une part si l'un des trois gènes testés est régulé par *PP\_5337* et d'autre part si cette régulation est dépendante du cuivre.

Les résultats présentés Figure 34 sont normalisés sur la DO et la valeur de fluorescence de la construction pSEVA421-*gfp* sans promoteur a été soustraite. De plus, un contrôle d'activité a été réalisé en utilisant le promoteur synthétique J23100, connu pour avoir une activité transcriptionnelle forte en LB et ne fixant pas de régulateurs transcriptionnels. Ce promoteur est un contrôle d'activité pour prouver que les variations de fluorescence sont spécifiques du régulateur étudié. L'activité transcriptionnelle de ce promoteur ne varie pas en absence ou présence de cuivre et du régulateur. Les résultats montrent que d'une manière indépendante au cuivre, *PP\_5337* régule positivement le gène *aspA*. L'activité de *purE* et de *PP\_5380* est indépendante du régulateur *PP\_5337*. On remarque cependant que l'activité de *PP\_5380* est plus importante en présence de cuivre.

Ces résultats indiquent que la résistance apportée par *PP\_5380* semble indépendante de *PP\_5337*. Ce système de résistance est régulé positivement en présence de cuivre afin d'assurer la survie de la cellule bactérienne. *PP\_5337* régule positivement la transcription du gène *aspA* de manière totalement indépendante du cuivre. Le produit du gène *aspA* est impliqué dans la production de fumarate à partir de l'acide aminé L-aspartate et fait partie plus globalement de la voie du cycle TCA (tricarboxylic acid cycle). Malgré sa régulation positive par *PP\_5337*, *aspA* n'apparaît pas essentiel pour la résistance au cuivre dans notre crible ( $\log_2FC = +0,18$ ). *PP\_5337* régule probablement d'autres gènes impliqués dans la résistance à un excès d'ions  $Cu^{2+}$ . La détermination de ses cibles pourrait s'effectuer au moyen d'un Chip-seq (chromatine immuno-précipitation associée à un séquençage).





**Figure 34 : PP\_5337 régule l'activité du gène *aspA* en présence et absence de cuivre.**

Des mesures de l'activité de fusions transcriptionnelles ont été réalisées dans la souche mutante  $\Delta PP_{5337}$  par culture en microplaque en milieu LB supplémenté en gentamycine 10 $\mu$ M (maintien du plasmide pJN105 vide ou exprimant le gène *PP\_5337*) et streptomycine 50 $\mu$ M (maintien du plasmide pSEVA-GFP exprimant les fusions transcriptionnelles) en présence ou absence de CuCl<sub>2</sub> 2,5mM. Les résultats présentent la moyenne d'un triplicata technique des valeurs maximales de fluorescence mesurées après croissance à 30°C pendant 24h par le lecteur de microplaque TecanM200 Pro. Les valeurs sont normalisées par la DO et par l'activité de fluorescence du pSEVA-GFP sans promoteur. J23100: promoteur synthétique à activité forte. \*: p-value <0,05 (test U de Mann Whitney).





# Conclusion générale & perspectives

Le travail présenté au cours de cette thèse a permis d'élargir le champ de connaissances sur les systèmes de résistance aux stress chez les bactéries environnementales. Deux types de stress ont été étudiés durant ma thèse : le stress généré par les métaux et celui rencontré en cours d'infection chez une plante.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence les facteurs essentiels à la croissance et/ou à la virulence du phytopathogène *D. dadantii* chez l'endive. Ces facteurs diffèrent de ceux connus jusqu'à présent (systèmes de sécrétions, substrats sécrétés) car notre crible ne permet pas de révéler les facteurs sécrétés dans le milieu extérieur. Les voies de biosynthèse de certains acides aminés ainsi que des acides nucléiques (voie de production d'IMP et d'UMP) apparaissent essentielles pour établir une infection chez l'endive. Une compétition est probablement installée entre le pathogène et la plante qui limite la disponibilité de ces composés dans l'espace intercellulaire. Ces voies de biosynthèse pourraient être une cible pour le développement d'antimicrobiens. Afin d'établir une infection réussie, les différents facteurs de virulence doivent être finement régulés. Il n'est pas surprenant de retrouver bon nombre de régulateurs dans notre crible. Deux nouveaux régulateurs, jusqu'alors inconnus, LfcR et Dda3937\_00840, sont importants pour la virulence. Zur, un troisième régulateur avec un score de log<sub>2</sub>FC non significatif dans le crible, semble pourtant très important. L'étude de leur régulon pourrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs de virulence chez le pathogène. En plus d'avoir identifié des gènes déjà connus comme étant indispensables pour la survie du pathogène chez la plante (ex: *opgG/H*), notre crible a aussi mis en évidence l'importance de la glycosylation des flagelles. Cette glycosylation pourrait permettre à la bactérie de se cacher du système de défense de l'hôte.

Les systèmes de défense ainsi que les voies métaboliques de chaque plante peuvent varier. Les gènes requis pour l'infection des différents hôtes de *Dickeya* (pommes de terre, céleri, plantes ornementales...) peuvent alors varier considérablement. Il serait intéressant de tester les mutants (voies de biosynthèses, glycosylation etc...) sur de nombreux hôtes, notamment des plantes entières, ou encore de réaliser un Tn-seq après

infection de plusieurs plantes par *D. dadantii* afin de déterminer les voies globales et indispensables au pouvoir pathogène de cette bactérie.

Ces travaux de thèse ont aussi permis de caractériser les principaux mécanismes de résistance à différents métaux chez *Pseudomonas putida*. Les pompes à efflux apparaissent comme l'un des systèmes de résistance préférés des bactéries comme l'a prouvé la mise en évidence des pompes CadA3, CadA2 (PP\_0586) et CzcA1. Les régulateurs de transcription jouent une fois encore un rôle majeur dans la résistance au stress. Notre étude a permis d'identifier deux nouvelles voies de régulation impliquées dans la résistance au cuivre et au cadmium : PP\_5337 et PP\_0887/88. Connaître les gènes contrôlés par ces régulateurs en absence et en présence de métaux pourrait conduire à identifier de nouvelles voies de résistance aux métaux. Plusieurs gènes à fonction inconnue ont aussi été identifiés tels que PP\_1663 pour la résistance au cadmium et PP\_5002 pour la résistance au cobalt. Leur rôle reste à être élucidé mais ces résultats montrent que l'ensemble de mécanismes de résistance aux métaux n'est pas complètement compris. De façon surprenante, les gènes de l'opéron *pvdMNOE* ont semblé jouer un rôle important dans une résistance croisée à plusieurs métaux. Il serait intéressant de déterminer le rôle de chacun de ces gènes dans la résistance par l'utilisation de mutants indépendants afin de lever le doute d'un possible effet polaire sur le gène *pvdE*.

Le Tn-seq a été un outil suffisamment puissant et simple à mettre en œuvre pour nous permettre de réaliser deux cribles différents en parallèle dans le cadre d'une thèse. De plus, cette nouvelle approche est complémentaire d'autres techniques qui permettent d'identifier rapidement des gènes impliqués dans une fonction particulière comme le RNA-seq. L'utilisation du RNA-seq pourrait en effet être utilisée afin de déterminer si *zur*, gène important pour la survie de *D. dadantii* dans l'endive d'après notre expérience de Tn-seq, contrôle d'autres gènes que *znuABC* qui sont responsables de l'import du zinc dans la cellule.

## D- Bibliographie

- [1] S. Reverchon et W. Nasser, « Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme », *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 5, n° 5, p. 622-636, oct. 2013.
- [2] N. J. Russell, R. I. Evans, P. F. ter Steeg, J. Hellemons, A. Verheul, et T. Abee, « Membranes as a target for stress adaptation », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 28, n° 2, p. 255-261, déc. 1995.
- [3] C. Hill, B. O'Driscoll, et I. Booth, « Acid adaptation and food poisoning microorganisms », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 28, n° 2, p. 245-254, déc. 1995.
- [4] « Proteolytic regulation of stress response pathways in Escherichia coli. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479439>. [Consulté le: 03-avr-2018].
- [5] Chung H.J., Bang W., et Drake M.A., « Stress Response of Escherichia coli », *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 5, n° 3, p. 52-64, août 2006.
- [6] L. M. Maurer, E. Yohannes, S. S. Bondurant, M. Radmacher, et J. L. Slonczewski, « pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in Escherichia coli K-12 », *J. Bacteriol.*, vol. 187, n° 1, p. 304-319, janv. 2005.
- [7] M. Follmann *et al.*, « Functional genomics of pH homeostasis in Corynebacterium glutamicum revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis », *BMC Genomics*, vol. 10, p. 621, déc. 2009.
- [8] R. P. Straka et J. L. Stokes, « Metabolic injury to bacteria at low temperatures », *J. Bacteriol.*, vol. 78, p. 181-185, août 1959.
- [9] F. C. Fang, E. R. Frawley, T. Tapscott, et A. Vázquez-Torres, « Bacterial Stress Responses during Host Infection », *Cell Host Microbe*, vol. 20, n° 2, p. 133-143, août 2016.
- [10] J. L. Slonczewski, M. Fujisawa, M. Dopson, et T. A. Krulwich, « Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea », *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 55, p. 1-79, 317, 2009.
- [11] J. C. Cox, D. G. Nicholls, et W. J. Ingledew, « Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile Thiobacillus ferro-oxidans », *Biochem. J.*, vol. 178, n° 1, p. 195-200, janv. 1979.
- [12] T. A. Krulwich, G. Sachs, et E. Padan, « Molecular aspects of bacterial pH sensing

and homeostasis », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, n° 5, p. 330-343, mai 2011.

[13] W. Hong, Y. E. Wu, X. Fu, et Z. Chang, « Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria », *Trends Microbiol.*, vol. 20, n° 7, p. 328-335, juill. 2012.

[14] V. Seputiene, K. Suziedelis, S. Normark, O. Melefors, et E. Suziedeliene, « Transcriptional analysis of the acid-inducible *asr* gene in enterobacteria », *Res. Microbiol.*, vol. 155, n° 7, p. 535-542, sept. 2004.

[15] V. Seputiene *et al.*, « Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response », *J. Bacteriol.*, vol. 185, n° 8, p. 2475-2484, avr. 2003.

[16] H. Ogasawara, A. Hasegawa, E. Kanda, T. Miki, K. Yamamoto, et A. Ishihama, « Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade », *J. Bacteriol.*, vol. 189, n° 13, p. 4791-4799, juill. 2007.

[17] S. I. Miller, A. M. Kukral, et J. J. Mekalanos, « A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, n° 13, p. 5054-5058, juill. 1989.

[18] P. Lund, A. Tramonti, et D. De Biase, « Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, n° 6, p. 1091-1125, nov. 2014.

[19] J. P. Audia, C. C. Webb, et J. W. Foster, « Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria », *Int. J. Med. Microbiol. IJMM*, vol. 291, n° 2, p. 97-106, mai 2001.

[20] A. Cameron, E. Frirdich, S. Huynh, C. T. Parker, et E. C. Gaynor, « Hyperosmotic stress response of *Campylobacter jejuni* », *J. Bacteriol.*, vol. 194, n° 22, p. 6116-6130, nov. 2012.

[21] H. J. Quinn, A. D. S. Cameron, et C. J. Dorman, « Bacterial regulon evolution: distinct responses and roles for the identical OmpR proteins of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* in the acid stress response », *PLoS Genet.*, vol. 10, n° 3, p. e1004215, mars 2014.

[22] I. S. Bang, J. P. Audia, Y. K. Park, et J. W. Foster, « Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response », *Mol. Microbiol.*, vol. 44, n° 5, p. 1235-1250, juin 2002.

[23] A. Stincone *et al.*, « A systems biology approach sheds new light on *Escherichia coli* acid resistance », *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, n° 17, p. 7512-7528, sept. 2011.

[24] Y. Sun, T. Fukamachi, H. Saito, et H. Kobayashi, « ATP requirement for acidic

resistance in *Escherichia coli* », *J. Bacteriol.*, vol. 193, n° 12, p. 3072–3077, juin 2011.

[25] R. Iyer, T. M. Iverson, A. Accardi, et C. Miller, « A biological role for prokaryotic ClC chloride channels », *Nature*, vol. 419, n° 6908, p. 715–718, oct. 2002.

[26] J. W. Foster, « *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, n° 11, p. 898–907, nov. 2004.

[27] M. P. Castanie-Cornet, T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, et J. W. Foster, « Control of acid resistance in *Escherichia coli* », *J. Bacteriol.*, vol. 181, n° 11, p. 3525–3535, juin 1999.

[28] H. Richard et J. W. Foster, « *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential », *J. Bacteriol.*, vol. 186, n° 18, p. 6032–6041, sept. 2004.

[29] F. Diez-Gonzalez et Y. Karaibrahimoglu, « Comparison of the glutamate-, arginine- and lysine-dependent acid resistance systems in *Escherichia coli* O157:H7 », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 96, n° 6, p. 1237–1244, 2004.

[30] E. Krin, A. Danchin, et O. Soutourina, « Decrypting the H-NS-dependent regulatory cascade of acid stress resistance in *Escherichia coli* », *BMC Microbiol.*, vol. 10, p. 273, oct. 2010.

[31] R. D. Sleator et C. Hill, « Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 26, n° 1, p. 49–71, mars 2002.

[32] G. Gouesbet, M. Jebbar, S. Bonnassie, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, S. Himdi-Kabbab, et C. Blanco, « *Erwinia chrysanthemi* at high osmolarity: influence of osmoprotectants on growth and pectate lyase production », *Microbiology*, vol. 141, n° 6, p. 1407–1412, 1995.

[33] M. Roesser et V. Müller, « Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences », *Environ. Microbiol.*, vol. 3, n° 12, p. 743–754, déc. 2001.

[34] M. L. Rod, K. Y. Alam, P. R. Cunningham, et D. P. Clark, « Accumulation of trehalose by *Escherichia coli* K-12 at high osmotic pressure depends on the presence of amber suppressors », *J. Bacteriol.*, vol. 170, n° 8, p. 3601–3610, août 1988.

[35] N. Messaoudi *et al.*, « Global stress response in a prokaryotic model of DJ-1-associated Parkinsonism », *J. Bacteriol.*, vol. 195, n° 6, p. 1167–1178, mars 2013.

[36] « K<sup>+</sup> Transport and its Role for Osmoregulation in a Halophilic... » [En ligne].

Disponible

sur:

[https://www.researchgate.net/publication/227052460\\_K\\_Transport\\_and\\_its\\_Role\\_for\\_](https://www.researchgate.net/publication/227052460_K_Transport_and_its_Role_for_)

Osmoregulation\_in\_a\_Halophilic\_Member\_of\_the\_Bacteria\_Domain\_Characterization\_of\_the\_K\_Uptake\_Systems\_from\_Halomonas\_Elongata. [Consulté le: 19-avr-2018].

[37] L. Shabala, J. Bowman, J. Brown, T. Ross, T. McMeekin, et S. Shabala, « Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotica », *Environ. Microbiol.*, vol. 11, n° 1, p. 137-148, janv. 2009.

[38] J. Meury et M. Kohiyama, « Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli* », *J. Bacteriol.*, vol. 173, n° 14, p. 4404-4410, juill. 1991.

[39] M. Kilstrup, S. Jacobsen, K. Hammer, et F. K. Vogensen, « Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, n° 5, p. 1826-1837, mai 1997.

[40] U. Völker, H. Mach, R. Schmid, et M. Hecker, « Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis* », *J. Gen. Microbiol.*, vol. 138, n° 10, p. 2125-2135, oct. 1992.

[41] H. Nikaido et E. Y. Rosenberg, « Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins », *J. Bacteriol.*, vol. 153, n° 1, p. 241-252, janv. 1983.

[42] M. Ferrario, B. R. Ernsting, D. W. Borst, D. E. Wiese, R. M. Blumenthal, et R. G. Matthews, « The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF* », *J. Bacteriol.*, vol. 177, n° 1, p. 103-113, janv. 1995.

[43] L. C. Wang, L. K. Morgan, P. Godakumbura, L. J. Kenney, et G. S. Anand, « The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm », *EMBO J.*, vol. 34, n° 19, p. 2481, oct. 2015.

[44] X. Feng, R. Oropeza, et L. J. Kenney, « Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2 », *Mol. Microbiol.*, vol. 48, n° 4, p. 1131-1143, mai 2003.

[45] G. Condemine et A. Ghazi, « Differential regulation of two oligogalacturonate outer membrane channels, KdgN and KdgM, of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*) », *J. Bacteriol.*, vol. 189, n° 16, p. 5955-5962, août 2007.

[46] R. Kohen et A. Nyska, « Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification », *Toxicol. Pathol.*, vol. 30, n° 6, p. 620-650, déc. 2002.

[47] « Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. - PubMed - NCBI ». [En

ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372322>. [Consulté le: 09-avr-2018].

[48] H. Fones et G. M. Preston, « Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas* », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 327, n° 1, p. 1-8, févr. 2012.

[49] H. H. Lee et J. J. Collins, « Microbial environments confound antibiotic efficacy », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, n° 1, p. 6-9, janv. 2012.

[50] F. Vatansever *et al.*, « Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy and beyond », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 37, n° 6, p. 955-989, nov. 2013.

[51] J. A. Imlay, « Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, p. 755-776, 2008.

[52] S. M. Chiang et H. E. Schellhorn, « Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 525, n° 2, p. 161-169, sept. 2012.

[53] S. Mishra et J. Imlay, « Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 525, n° 2, p. 145-160, sept. 2012.

[54] R. Santos, T. Franza, M. L. Laporte, C. Sauvage, D. Touati, et D. Expert, « Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 14, n° 6, p. 758-767, juin 2001.

[55] Y. Meyer, B. B. Buchanan, F. Vignols, et J.-P. Reichheld, « Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology », *Annu. Rev. Genet.*, vol. 43, p. 335-367, 2009.

[56] J. A. Imlay, « The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, n° 7, p. 443-454, juill. 2013.

[57] L. Masip, K. Veeravalli, et G. Georgiou, « The many faces of glutathione in bacteria », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, n° 5-6, p. 753-762, juin 2006.

[58] B. Ezraty, A. Gennaris, F. Barras, et J.-F. Collet, « Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 15, n° 7, p. 385-396, 2017.

[59] J. P. Lisher et D. P. Giedroc, « Manganese acquisition and homeostasis at the host-pathogen interface », *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 3, p. 91, 2013.

[60] K. M. Gebendorfer *et al.*, « Identification of a hypochlorite-specific transcription factor from *Escherichia coli* », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 9, p. 6892-6903, févr. 2012.



- [61] « Hydrogen peroxide inactivates the Escherichia coli Isc iron-sulfur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3051806/>. [Consulté le: 19-avr-2018].
- [62] L. Nachin, M. El Hassouni, L. Loiseau, D. Expert, et F. Barras, « SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of Erwinia chrysanthemi: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase », *Mol. Microbiol.*, vol. 39, n° 4, p. 960-972, févr. 2001.
- [63] M. Pruteanu et T. A. Baker, « Proteolysis in the SOS response and metal homeostasis in Escherichia coli », *Res. Microbiol.*, vol. 160, n° 9, p. 677-683, nov. 2009.
- [64] T. Ferenci, « Hungry bacteria--definition and properties of a nutritional state », *Environ. Microbiol.*, vol. 3, n° 10, p. 605-611, oct. 2001.
- [65] T. P. Primm, S. J. Andersen, V. Mizrahi, D. Avarbock, H. Rubin, et C. E. Barry, « The stringent response of Mycobacterium tuberculosis is required for long-term survival », *J. Bacteriol.*, vol. 182, n° 17, p. 4889-4898, sept. 2000.
- [66] J. L. Dahl *et al.*, « The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of Mycobacterium tuberculosis in mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 17, p. 10026-10031, août 2003.
- [67] T. Hardiman, K. Lemuth, M. A. Keller, M. Reuss, et M. Siemann-Herzberg, « Topology of the global regulatory network of carbon limitation in Escherichia coli », *J. Biotechnol.*, vol. 132, n° 4, p. 359-374, déc. 2007.
- [68] K. Braeken, M. Moris, R. Daniels, J. Vanderleyden, et J. Michiels, « New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology », *Trends Microbiol.*, vol. 14, n° 1, p. 45-54, janv. 2006.
- [69] V. Jain, M. Kumar, et D. Chatterji, « ppGpp: stringent response and survival », *J. Microbiol. Seoul Korea*, vol. 44, n° 1, p. 1-10, févr. 2006.
- [70] U. Kanjee, K. Ogata, et W. A. Houry, « Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp », *Mol. Microbiol.*, vol. 85, n° 6, p. 1029-1043, sept. 2012.
- [71] I. Artsimovitch *et al.*, « Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp », *Cell*, vol. 117, n° 3, p. 299-310, avr. 2004.
- [72] R. Hengge-Aronis, « Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase », *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*, vol. 66, n° 3, p. 373-395, table of contents, sept. 2002.
- [73] C. L. Patten, M. G. Kirchhof, M. R. Schertzberg, R. A. Morton, et H. E. Schellhorn, « Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in Escherichia coli K-12 », *Mol.*

*Genet. Genomics MGG*, vol. 272, n° 5, p. 580-591, déc. 2004.

[74] M. Jishage, K. Kvint, V. Shingler, et T. Nyström, « Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp », *Genes Dev.*, vol. 16, n° 10, p. 1260-1270, mai 2002.

[75] U. K. Sharma et D. Chatterji, « Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 34, n° 5, p. 646-657, sept. 2010.

[76] A. Perederina *et al.*, « Regulation through the secondary channel-structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription », *Cell*, vol. 118, n° 3, p. 297-309, août 2004.

[77] B. J. Paul *et al.*, « DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP », *Cell*, vol. 118, n° 3, p. 311-322, août 2004.

[78] B. J. Paul, M. B. Berkmen, et R. L. Gourse, « DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 22, p. 7823-7828, mai 2005.

[79] W. Ross, P. Sanchez-Vazquez, A. Y. Chen, J.-H. Lee, H. L. Burgos, et R. L. Gourse, « ppGpp binding to a site at the RNAP-DksA interface accounts for its dramatic effects on transcription initiation during the stringent response », *Mol. Cell*, vol. 62, n° 6, p. 811-823, juin 2016.

[80] B. K. Hammer et M. S. Swanson, « Co-ordination of *legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp », *Mol. Microbiol.*, vol. 33, n° 4, p. 721-731, août 1999.

[81] S. Haralalka, S. Nandi, et R. K. Bhadra, « Mutation in the *relA* gene of *Vibrio cholerae* affects in vitro and in vivo expression of virulence factors », *J. Bacteriol.*, vol. 185, n° 16, p. 4672-4682, août 2003.

[82] J. Pizarro-Cerdá et K. Tedin, « The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression », *Mol. Microbiol.*, vol. 52, n° 6, p. 1827-1844, juin 2004.

[83] E. C. Gaynor, D. H. Wells, J. K. MacKichan, et S. Falkow, « The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes », *Mol. Microbiol.*, vol. 56, n° 1, p. 8-27, avr. 2005.

[84] C. M. Taylor *et al.*, « *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence », *J. Bacteriol.*, vol. 184, n° 3, p. 621-628, févr.

2002.

[85] M. Song *et al.*, « ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on Salmonella pathogenicity island 1 », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 33, p. 34183-34190, août 2004.

[86] D. L. Erickson, J. L. Lines, E. C. Pesci, V. Venturi, et D. G. Storey, « *Pseudomonas aeruginosa* relA contributes to virulence in *Drosophila melanogaster* », *Infect. Immun.*, vol. 72, n° 10, p. 5638-5645, oct. 2004.

[87] K. O. Konhauser *et al.*, « Oceanic nickel depletion and a methanogen famine before the Great Oxidation Event », *Nature*, vol. 458, n° 7239, p. 750-753, avr. 2009.

[88] J. F. Kasting et J. L. Siefert, « Life and the evolution of Earth's atmosphere », *Science*, vol. 296, n° 5570, p. 1066-1068, mai 2002.

[89] R. R. Crichton et J. L. Pierre, « Old iron, young copper: from Mars to Venus », *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.*, vol. 14, n° 2, p. 99-112, juin 2001.

[90] D. F. Wilson, M. Erecińska, et P. L. Dutton, « Thermodynamic relationships in mitochondrial oxidative phosphorylation », *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 3, n° 0, p. 203-230, 1974.

[91] « Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764885>. [Consulté le: 10-avr-2018].

[92] K. J. Waldron et N. J. Robinson, « How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, n° 1, p. 25-35, janv. 2009.

[93] C. E. Outten et T. V. O'Halloran, « Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis », *Science*, vol. 292, n° 5526, p. 2488-2492, juin 2001.

[94] « Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788177>. [Consulté le: 10-avr-2018].

[95] A. Singh *et al.*, « Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans* », *mBio*, vol. 4, n° 3, p. e00220-00213, mai 2013.

[96] L. Alagna, S. S. Hasnain, B. Piggott, et D. J. Williams, « The nickel ion environment in jack bean urease », *Biochem. J.*, vol. 220, n° 2, p. 591-595, juin 1984.

- [97] T. Phipps *et al.*, « Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its regulation in terrestrial organisms », *Environ. Rev.*, vol. 10, n° 4, p. 209-261, déc. 2002.
- [98] F. Vella, « Principles of bioinorganic chemistry: By S J Lippard and J M Berg. pp 411. University Science Books, Mill Valley, California. 1994. \$30 ISBN 0-935702-73-3 (paper) », *Biochem. Educ.*, vol. 23, n° 2, p. 115-115.
- [99] « Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress | SpringerLink ». [En ligne]. Disponible sur: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/7171\\_2006\\_074](https://link.springer.com/chapter/10.1007/7171_2006_074). [Consulté le: 19-avr-2018].
- [100] H. Grönewald, « CRC Handbook of Chemistry and Physics. Herausgeg. von R. C. Weast, S. M. Selby und C. D. Hodgman. The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio 1965. 46. Aufl., ca. 1700 S., zahlr. Abb., \$16.00 », *Angew. Chem.*, vol. 78, n° 18-19, p. 912-912.
- [101] A. O. Summers, « Damage control: regulating defenses against toxic metals and metalloids », *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 12, n° 2, p. 138-144, avr. 2009.
- [102] E. Cabiscol, J. Tamarit, et J. Ros, « Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species », *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.*, vol. 3, n° 1, p. 3-8, mars 2000.
- [103] E. R. Stadtman, « Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 62, p. 797-821, 1993.
- [104] C. Ranquet, S. Ollagnier-de-Choudens, L. Loiseau, F. Barras, et M. Fontecave, « Cobalt stress in Escherichia coli. The effect on the iron-sulfur proteins », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 42, p. 30442-30451, oct. 2007.
- [105] M. Valko, H. Morris, et M. T. D. Cronin, « Metals, toxicity and oxidative stress », *Curr. Med. Chem.*, vol. 12, n° 10, p. 1161-1208, 2005.
- [106] V. Hodgkinson et M. J. Petris, « Copper homeostasis at the host-pathogen interface », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 17, p. 13549-13555, avr. 2012.
- [107] « Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325943>. [Consulté le: 10-avr-2018].
- [108] G. Manon, « L'homéostasie des métaux chez la bactérie Escherichia coli : de l'analyse générale d'un stress sur l'expression des gènes, à la compréhension des mécanismes moléculaires », p. 218.

- [109] H. de Reuse, D. Vinella, et C. Cavazza, « Common themes and unique proteins for the uptake and trafficking of nickel, a metal essential for the virulence of *Helicobacter pylori* », *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 3, p. 94, 2013.
- [110] N. C. Ha, S. T. Oh, J. Y. Sung, K. A. Cha, M. H. Lee, et B. H. Oh, « Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease », *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, n° 6, p. 505-509, juin 2001.
- [111] J. W. Olson et R. J. Maier, « Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori* », *Science*, vol. 298, n° 5599, p. 1788-1790, nov. 2002.
- [112] I. Sekirov, S. L. Russell, L. C. M. Antunes, et B. B. Finlay, « Gut microbiota in health and disease », *Physiol. Rev.*, vol. 90, n° 3, p. 859-904, juill. 2010.
- [113] « Iron supplementation promotes gut microbiota metabolic activity but not colitis markers in human gut microbiota-associated rats. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555487>. [Consulté le: 10-avr-2018].
- [114] D. R. Donohoe *et al.*, « The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon », *Cell Metab.*, vol. 13, n° 5, p. 517-526, mai 2011.
- [115] C. J. al et, « Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528: Fur controls expression of genes involved in quor... - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023417>. [Consulté le: 10-avr-2018].
- [116] D. Touati, « Iron and oxidative stress in bacteria », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 373, n° 1, p. 1-6, janv. 2000.
- [117] A. Dellagi *et al.*, « Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection », *Plant J. Cell Mol. Biol.*, vol. 43, n° 2, p. 262-272, juill. 2005.
- [118] P. Wojtaszek, « Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection », *Biochem. J.*, vol. 322 ( Pt 3), p. 681-692, mars 1997.
- [119] G. W. Sundin, « Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from Cherry Orchards and its Associated Transfer in Vitro and in Planta with a Plasmid », *Phytopathology*, vol. 79, janv. 1989.
- [120] D. A. Cooksey, « Characterization of a Copper Resistance Plasmid Conserved in Copper-Resistant Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 53, n° 2, p. 454-456, janv. 1987.

- [121] G. I. Burd, D. G. Dixon, et B. R. Glick, « Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants », *Can. J. Microbiol.*, vol. 46, n° 3, p. 237-245, mars 2000.
- [122] I. J. Schalk, M. Hannauer, et A. Braud, « New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance », *Environ. Microbiol.*, vol. 13, n° 11, p. 2844-2854.
- [123] H. Fones et G. M. Preston, « The impact of transition metals on bacterial plant disease », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 37, n° 4, p. 495-519, juill. 2013.
- [124] « Order of Stability of Metal Complexes | Nature ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/162746a0>. [Consulté le: 12-avr-2018].
- [125] E. Bellion, « The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life (da Silva, J. J. R. Frausto; Williams, R. J. P.) », *J. Chem. Educ.*, vol. 69, n° 12, p. A326, déc. 1992.
- [126] V. Braun et F. Endriss, « Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins », *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.*, vol. 20, n° 3-4, p. 219-231, juin 2007.
- [127] A. Changela *et al.*, « Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR », *Science*, vol. 301, n° 5638, p. 1383-1387, sept. 2003.
- [128] D. P. Giedroc et A. I. Arunkumar, « Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches », *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003*, n° 29, p. 3107-3120, août 2007.
- [129] J.-W. Lee et J. D. Helmann, « Functional specialization within the Fur family of metalloregulators », *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.*, vol. 20, n° 3-4, p. 485-499, juin 2007.
- [130] D. H. Nies, « Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 27, n° 2-3, p. 313-339, juin 2003.
- [131] J. S. Iwig, J. L. Rowe, et P. T. Chivers, « Nickel homeostasis in Escherichia coli - the rcnR-rcnA efflux pathway and its linkage to NikR function », *Mol. Microbiol.*, vol. 62, n° 1, p. 252-262, oct. 2006.
- [132] T. Liu *et al.*, « CsoR is a novel Mycobacterium tuberculosis copper-sensing transcriptional regulator », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 3, n° 1, p. 60-68, janv. 2007.
- [133] T. Ogawa, D. H. Bao, H. Katoh, M. Shibata, H. B. Pakrasi, et M. Bhattacharyya-Pakrasi, « A two-component signal transduction pathway regulates manganese homeostasis in Synechocystis 6803, a photosynthetic organism », *J. Biol. Chem.*, vol. 277,



n° 32, p. 28981-28986, août 2002.

[134] C. A. Blindauer *et al.*, « Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers », *Mol. Microbiol.*, vol. 45, n° 5, p. 1421-1432, sept. 2002.

[135] J. W. Huckle, A. P. Morby, J. S. Turner, et N. J. Robinson, « Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions », *Mol. Microbiol.*, vol. 7, n° 2, p. 177-187, janv. 1993.

[136] A. P. Morby, J. S. Turner, J. W. Huckle, et N. J. Robinson, « SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex », *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, n° 4, p. 921-925, févr. 1993.

[137] S. Tottey *et al.*, « Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding », *Nature*, vol. 455, n° 7216, p. 1138-1142, oct. 2008.

[138] D. Cánovas, I. Cases, et V. de Lorenzo, « Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis », *Environ. Microbiol.*, vol. 5, n° 12, p. 1242-1256, déc. 2003.

[139] J. A. Lemire, J. J. Harrison, et R. J. Turner, « Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, n° 6, p. 371-384, juin 2013.

[140] M. R. Bruins, S. Kapil, et F. W. Oehme, « Microbial resistance to metals in the environment », *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 45, n° 3, p. 198-207, mars 2000.

[141] J. S. Cha et D. A. Cooksey, « Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, n° 20, p. 8915-8919, oct. 1991.

[142] R. W. Olafson, W. D. McCubbin, et C. M. Kay, « Primary- and secondary-structural analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. cyanobacterium », *Biochem. J.*, vol. 251, n° 3, p. 691-699, mai 1988.

[143] J. A. Scott, G. K. Sage, S. J. Palmer, et D. S. Powell, « Cadmium adsorption by bacterial capsular polysaccharide coatings », *Biotechnol. Lett.*, vol. 8, n° 10, p. 711-714, oct. 1986.

[144] I. J. Schalk et L. Guillon, « Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis », *Environ. Microbiol.*, vol. 15, n° 6, p. 1661-1673, juin 2013.

[145] K. P. Grim *et al.*, « The Metallophore Staphylopin Enables *Staphylococcus aureus*

To Compete with the Host for Zinc and Overcome Nutritional Immunity », *mBio*, vol. 8, n° 5, p. e01281-17, août 2017.

[146] K. E. Nelson *et al.*, « Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440 », *Environ. Microbiol.*, vol. 4, n° 12, p. 799-808, déc. 2002.

[147] C. K. Stover *et al.*, « Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen », *Nature*, vol. 406, n° 6799, p. 959-964, août 2000.

[148] F. W. Outten, D. L. Huffman, J. A. Hale, et T. V. O'Halloran, « The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli* », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 33, p. 30670-30677, août 2001.

[149] A. Davin-Regli et J. M. Pagès, « Cross-resistance between biocides and antimicrobials: an emerging question », *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.*, vol. 31, n° 1, p. 89-104, avr. 2012.

[150] C. Baker-Austin, M. S. Wright, R. Stepanauskas, et J. V. McArthur, « Co-selection of antibiotic and metal resistance », *Trends Microbiol.*, vol. 14, n° 4, p. 176-182, avr. 2006.

[151] M. T. Mata, F. Baquero, et J. C. Pérez-Díaz, « A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes* », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 187, n° 2, p. 185-188.

[152] B. Afessa, A. F. Shorr, A. R. Anzueto, D. E. Craven, R. Schinner, et M. H. Kollef, « Association between a silver-coated endotracheal tube and reduced mortality in patients with ventilator-associated pneumonia », *Chest*, vol. 137, n° 5, p. 1015-1021, mai 2010.

[153] M. H. Kollef *et al.*, « Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial », *JAMA*, vol. 300, n° 7, p. 805-813, août 2008.

[154] S. Saint, J. G. Elmore, S. D. Sullivan, S. S. Emerson, et T. D. Koepsell, « The efficacy of silver alloy-coated urinary catheters in preventing urinary tract infection: a meta-analysis », *Am. J. Med.*, vol. 105, n° 3, p. 236-241, sept. 1998.

[155] Czajkowski R., Pérombelon M. C. M., van Veen J. A., et van der Wolf J. M., « Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review », *Plant Pathol.*, vol. 60, n° 6, p. 999-1013, mai 2011.

[156] A. Lebeau *et al.*, « The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection », *Environ. Microbiol.*, vol. 10, n° 3, p. 545-559, mars 2008.



- [157] Toth I. K. *et al.*, « Dickeya species: an emerging problem for potato production in Europe », *Plant Pathol.*, vol. 60, n° 3, p. 385–399, mai 2011.
- [158] S. K. Aoki *et al.*, « A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria », *Nature*, vol. 468, n° 7322, p. 439–442, nov. 2010.
- [159] A.-M. Grenier, G. Duport, S. Pagès, G. Condemine, et Y. Rahbé, « The Phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) Is a Pathogen of the Pea Aphid », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, n° 3, p. 1956–1965, janv. 2006.
- [160] « pH and Ionic Conditions in the Apoplast | Annual Review of Plant Biology ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.42.060191.000535>. [Consulté le: 16-avr-2018].
- [161] L. Nachin et F. Barras, « External pH: An Environmental Signal That Helps to Rationalize *pel* Gene Duplication in *Erwinia chrysanthemi* », *Mol. Plant. Microbe Interact.*, vol. 13, n° 8, p. 882–886, août 2000.
- [162] X. Jiang *et al.*, « Global transcriptional response of *Dickeya dadantii* to environmental stimuli relevant to the plant infection », *Environ. Microbiol.*, vol. 18, n° 11, p. 3651–3672, nov. 2016.
- [163] D. Duca, J. Lörv, C. L. Patten, D. Rose, et B. R. Glick, « Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions », *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 106, n° 1, p. 85–125, juill. 2014.
- [164] M. Piisilä *et al.*, « The F-box protein MAX2 contributes to resistance to bacterial phytopathogens in *Arabidopsis thaliana* », *BMC Plant Biol.*, vol. 15, p. 53, févr. 2015.
- [165] K. Kazan et J. M. Manners, « Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions », *Trends Plant Sci.*, vol. 14, n° 7, p. 373–382, juill. 2009.
- [166] C. (Université L. de B. Beaulieu, M. Boccara, et F. van Gijsegem, « Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI USA*, 1993.
- [167] A. Llama-Palacios, E. López-Solanilla, C. Poza-Carrión, F. García-Olmedo, et P. Rodríguez-Palenzuela, « The *Erwinia chrysanthemi* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue », *Mol. Microbiol.*, vol. 49, n° 2, p. 347–357, juill. 2003.
- [168] A. Llama-Palacios, E. López-Solanilla, et P. Rodríguez-Palenzuela, « Role of the *PhoP-PhoQ* System in the Virulence of *Erwinia chrysanthemi* Strain 3937: Involvement in Sensitivity to Plant Antimicrobial Peptides, Survival at Acid pH, and Regulation of

Pectolytic Enzymes », *J. Bacteriol.*, vol. 187, n° 6, p. 2157-2162, mars 2005.

[169] « The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ Sensor Kinase Regulates Several Virulence Determinants ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1447017/>. [Consulté le: 16-avr-2018].

[170] H. Hyytiäinen, S. Sjöblom, T. Palomäki, A. Tuikkala, et E. Tapio Palva, « The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* », *Mol. Microbiol.*, vol. 50, n° 3, p. 795-807, nov. 2003.

[171] E. López-Solanilla, F. García-Olmedo, et P. Rodríguez-Palenzuela, « Inactivation of the *sapA* to *sapF* locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis », *Plant Cell*, vol. 10, n° 6, p. 917-924, juin 1998.

[172] C. Pandin, M. Caroff, et G. Condemine, « Antimicrobial Peptide Resistance Genes in the Plant Pathogen *Dickeya dadantii* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, n° 21, p. 6423-6430, oct. 2016.

[173] C. Pandin, M. Caroff, et G. Condemine, « Identification and characterization of antimicrobial peptide resistance genes in the plant pathogen *Dickeya dadantii* », *Appl. Environ. Microbiol.*, p. AEM.01757-16, août 2016.

[174] S. Bontemps-Gallo, E. Madec, et J.-M. Lacroix, « The two-component system CpxAR is essential for virulence in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii* EC3937 », *Environ. Microbiol.*, vol. 17, n° 11, p. 4415-4428, nov. 2015.

[175] « Virulence Program of a Bacterial Plant Pathogen: The *Dickeya* Model. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27571692>. [Consulté le: 18-juill-2018].

[176] « Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1447147>. [Consulté le: 19-avr-2018].

[177] « Evolution of the metabolic and regulatory networks associated with oxygen availability in two phytopathogenic enterobacteria. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439737>. [Consulté le: 16-avr-2018].

[178] M. Fagard *et al.*, « *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi* », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 20, n° 7, p. 794-805, juill. 2007.

- [179] M. E. Hassouni, J. P. Chambost, D. Expert, F. Van Gijsegem, et F. Barras, « The minimal gene set member msrA, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi* », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n° 3, p. 887-892, févr. 1999.
- [180] « SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC140745/>. [Consulté le: 16-avr-2018].
- [181] S. Reverchon, C. Rouanet, D. Expert, et W. Nasser, « Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity », *J. Bacteriol.*, vol. 184, n° 3, p. 654-665, févr. 2002.
- [182] G. Gouesbet, A. Trautwetter, S. Bonnassie, L. F. Wu, et C. Blanco, « Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA* », *J. Bacteriol.*, vol. 178, n° 2, p. 447-455, janv. 1996.
- [183] G. Choquet, N. Jehan, C. Pissavin, C. Blanco, et M. Jebbar, « OusB, a broad-specificity ABC-type transporter from *Erwinia chrysanthemi*, mediates uptake of glycine betaine and choline with a high affinity », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, n° 7, p. 3389-3398, juill. 2005.
- [184] K. Gloux, T. Touze, Y. Pagot, B. Jouan, et C. Blanco, « Mutations of *ousA* alter the virulence of *Erwinia chrysanthemi* », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 18, n° 2, p. 150-157, févr. 2005.
- [185] « Glutamine, Glutamate, and  $\alpha$ -Glucosylglycerate Are the Major Osmotic Solutes Accumulated by *Erwinia chrysanthemi* Strain 3937 ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525223/>. [Consulté le: 16-avr-2018].
- [186] S. Bontemps-Gallo *et al.*, « Concentration of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) modulates the activation level of the RcsCD RcsB phosphorelay in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii* », *Environ. Microbiol.*, vol. 15, n° 3, p. 881-894, mars 2013.
- [187] E. Madec, S. Bontemps-Gallo, et J.-M. Lacroix, « Increased phosphorylation of the RcsB regulator of the RcsCDB phosphorelay in strains of *Dickeya dadantii* devoid of osmoregulated periplasmic glucans revealed by Phos-tag gel analysis », *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 160, n° Pt 12, p. 2763-2770, déc. 2014.
- [188] N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, G. Condemine, et V. E. Shevchik, « Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity », *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 6, n° 5, p.

427-440, oct. 2014.

[189] N. T. Keen, C. Boyd, et B. Henrissat, « Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi* », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 9, n° 7, p. 651-657, sept. 1996.

[190] A. Delangle, A.-F. Prouvost, V. Cogez, J.-P. Bohin, J.-M. Lacroix, et N. H. Cotte-Pattat, « Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* Gan locus, involved in galactan catabolism », *J. Bacteriol.*, vol. 189, n° 19, p. 7053-7061, oct. 2007.

[191] B. Py, I. Bortoli-German, J. Haiech, M. Chippaux, et F. Barras, « Cellulase EGZ of *Erwinia chrysanthemi*: structural organization and importance of His98 and Glu133 residues for catalysis », *Protein Eng.*, vol. 4, n° 3, p. 325-333, févr. 1991.

[192] C. Wandersman, P. Delepelaire, S. Letoffe, et M. Schwartz, « Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Escherichia coli* », *J. Bacteriol.*, vol. 169, n° 11, p. 5046-5053, nov. 1987.

[193] C. Pineau, N. Guschinskaya, X. Robert, P. Gouet, L. Ballut, et V. E. Shevchik, « Substrate recognition by the bacterial type II secretion system: more than a simple interaction », *Mol. Microbiol.*, vol. 94, n° 1, p. 126-140, oct. 2014.

[194] P. Delepelaire, « *Erwinia* metalloprotease permease: aspects of secretion pathway and secretion functions », *Methods Enzymol.*, vol. 292, p. 67-81, 1998.

[195] T. Andro *et al.*, « Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase », *J. Bacteriol.*, vol. 160, n° 3, p. 1199-1203, déc. 1984.

[196] F. Hommais *et al.*, « PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937 », *J. Bacteriol.*, vol. 190, n° 22, p. 7508-7522, nov. 2008.

[197] M. Laatu et G. Condemine, « Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the out system in *Erwinia chrysanthemi* », *J. Bacteriol.*, vol. 185, n° 5, p. 1642-1649, mars 2003.

[198] S. Hassan et N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, « Identification of two feruloyl esterases in *Dickeya dadantii* 3937 and induction of the major feruloyl esterase and of pectate lyases by ferulic acid », *J. Bacteriol.*, vol. 193, n° 4, p. 963-970, févr. 2011.

[199] S. Ferrari, D. V. Savatin, F. Sicilia, G. Gramegna, F. Cervone, et G. D. Lorenzo, « Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development », *Front. Plant Sci.*, vol. 4, p. 49, 2013.

[200] A. Brutus, F. Sicilia, A. Macone, F. Cervone, et G. De Lorenzo, « A domain swap

approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, n° 20, p. 9452-9457, mai 2010.

[201] P. R. Davidsson, T. Kariola, O. Niemi, et E. T. Palva, « Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria », *Front. Plant Sci.*, vol. 4, p. 191, 2013.

[202] M. Boccara, A. Diolez, M. Rouve, et A. Kotoujansky, « The role of individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saintpaulia plants », *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 33, n° 1, p. 95-104, juill. 1988.

[203] H. C. Kester *et al.*, « Performance of selected microbial pectinases on synthetic monomethyl-esterified di- and trigalacturonates », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 52, p. 37053-37059, déc. 1999.

[204] W. Nasser, V. E. Shevchik, et N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, « Analysis of three clustered polygalacturonase genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937 revealed an anti-repressor function for the PecS regulator », *Mol. Microbiol.*, vol. 34, n° 4, p. 641-650, nov. 1999.

[205] R. D'Ovidio, B. Mattei, S. Roberti, et D. Bellincampi, « Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1696, n° 2, p. 237-244, févr. 2004.

[206] W. Nasser *et al.*, « Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii* », *Environ. Microbiol.*, vol. 15, n° 3, p. 865-880, mars 2013.

[207] W. Nasser, M. Faellen, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, et S. Reverchon, « Role of the nucleoid-associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 14, n° 1, p. 10-20, janv. 2001.

[208] T. Lautier et W. Nasser, « The DNA nucleoid-associated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* », *Mol. Microbiol.*, vol. 66, n° 6, p. 1474-1490, déc. 2007.

[209] D. A. Rodionov, M. S. Gelfand, et N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, « Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gamma-proteobacteria », *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 150, n° Pt 11, p. 3571-3590, nov. 2004.

[210] S. Reverchon, F. Van Gijsegem, G. Effantin, O. Zghidi-Abouzid, et W. Nasser, « Systematic targeted mutagenesis of the MarR/SlyA family members of *Dickeya dadantii* 3937 reveals a role for MfbR in the modulation of virulence gene expression in

- response to acidic pH », *Mol. Microbiol.*, vol. 78, n° 4, p. 1018-1037, nov. 2010.
- [211] G. Effantin, C. Rivasseau, M. Gromova, R. Bligny, et N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, « Massive production of butanediol during plant infection by phytopathogenic bacteria of the genera *Dickeya* and *Pectobacterium* », *Mol. Microbiol.*, vol. 82, n° 4, p. 988-997, nov. 2011.
- [212] S. Yang *et al.*, « Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937 », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, n° 4, p. 1079-1088, févr. 2007.
- [213] N. Kazemi-Pour, G. Condemine, et N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, « The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* », *Proteomics*, vol. 4, n° 10, p. 3177-3186, oct. 2004.
- [214] P. N. Dodds et J. P. Rathjen, « Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions », *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, n° 8, p. 539-548, août 2010.
- [215] U. Dubiella *et al.*, « Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, n° 21, p. 8744-8749, mai 2013.
- [216] C. Zipfel, « Plant pattern-recognition receptors », *Trends Immunol.*, vol. 35, n° 7, p. 345-351, juill. 2014.
- [217] B. Roux *et al.*, « Genomics and transcriptomics of *Xanthomonas campestris* species challenge the concept of core type III effectome », *BMC Genomics*, vol. 16, p. 975, nov. 2015.
- [218] J. D. Glasner *et al.*, « Genome sequence of the plant-pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* 3937 », *J. Bacteriol.*, vol. 193, n° 8, p. 2076-2077, avr. 2011.
- [219] M.-S. Choi, W. Kim, C. Lee, et C.-S. Oh, « Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 26, n° 10, p. 1115-1122, oct. 2013.
- [220] M. Münzinger, H. Budzikiewicz, D. Expert, C. Enard, et J. M. Meyer, « Achromobactin, a new citrate siderophore of *Erwinia chrysanthemi* », *Z. Naturforschung C J. Biosci.*, vol. 55, n° 5-6, p. 328-332, juin 2000.
- [221] M. Persmark, D. Expert, et J. B. Neilands, « Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi* », *J. Biol. Chem.*, vol. 264, n° 6, p. 3187-3193, févr. 1989.
- [222] T. Franza, B. Mahé, et D. Expert, « *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron



transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection », *Mol. Microbiol.*, vol. 55, n° 1, p. 261-275, janv. 2005.

[223] « Microbial siderophores exert a subtle role in Arabidopsis during infection by manipulating the immune response and the iron status. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Microbial+siderophores+exert+a+subtle+role+in+Arabidopsis+during+infection+by+manipulating+the+immune+response+and+the+iron+status>. [Consulté le: 16-avr-2018].

[224] A. Aznar *et al.*, « Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores », *Plant Physiol.*, vol. 164, n° 4, p. 2167-2183, avr. 2014.

[225] A. Aznar, O. Patrit, A. Berger, et A. Dellagi, « Alterations of iron distribution in Arabidopsis tissues infected by *Dickeya dadantii* », *Mol. Plant Pathol.*, vol. 16, n° 5, p. 521-528, juin 2015.

[226] A. Boughammoura *et al.*, « Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937 », *J. Bacteriol.*, vol. 190, n° 5, p. 1518-1530, mars 2008.

[227] C. (inra Masclaux, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, et D. Expert, « Iron is a triggering factor for differential expression of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 pectate lyases in pathogenesis of African violets », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI USA*, 1996.

[228] Masclaux Céline et Expert Dominique, « Signalling potential of iron in plant—microbe interactions: the pathogenic switch of iron transport in *Erwinia chrysanthemi* », *Plant J.*, vol. 7, n° 1, p. 121-128, mars 2002.

[229] N. Kleckner, J. Roth, et D. Botstein, « Genetic engineering in vivo using translocatable drug-resistance elements. New methods in bacterial genetics », *J. Mol. Biol.*, vol. 116, n° 1, p. 125-159, oct. 1977.

[230] M. G. Kidwell et D. R. Lisch, « Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution », *Evol. Int. J. Org. Evol.*, vol. 55, n° 1, p. 1-24, janv. 2001.

[231] N. L. Craig, « Target site selection in transposition », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, p. 437-474, 1997.

[232] M. N. Alekshun et S. B. Levy, « Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance », *Cell*, vol. 128, n° 6, p. 1037-1050, mars 2007.

[233] R. J. Nichols *et al.*, « Phenotypic landscape of a bacterial cell », *Cell*, vol. 144, n° 1, p. 143-156, janv. 2011.

- [234] S. M. Joshi, A. K. Pandey, N. Capite, S. M. Fortune, E. J. Rubin, et C. M. Sassetti, « Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, n° 31, p. 11760–11765, août 2006.
- [235] H. S. Girgis, Y. Liu, W. S. Ryu, et S. Tavazoie, « A comprehensive genetic characterization of bacterial motility », *PLoS Genet.*, vol. 3, n° 9, p. 1644–1660, sept. 2007.
- [236] B.-M. Koo *et al.*, « Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis* », *Cell Syst.*, vol. 4, n° 3, p. 291–305.e7, mars 2017.
- [237] L. A. Gallagher, J. Shendure, et C. Manoil, « Genome-scale identification of resistance functions in *Pseudomonas aeruginosa* using Tn-seq », *mBio*, vol. 2, n° 1, p. e00315–00310, janv. 2011.
- [238] A. L. Goodman *et al.*, « Identifying genetic determinants needed to establish a human gut symbiont in its habitat », *Cell Host Microbe*, vol. 6, n° 3, p. 279–289, sept. 2009.
- [239] B. Christen *et al.*, « The essential genome of a bacterium », *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, p. 528, août 2011.
- [240] T. van Opijnen, K. L. Bodi, et A. Camilli, « Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms », *Nat. Methods*, vol. 6, n° 10, p. 767–772, oct. 2009.
- [241] S. A. Lee *et al.*, « General and condition-specific essential functions of *Pseudomonas aeruginosa* », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, n° 16, p. 5189–5194, avr. 2015.
- [242] K. H. Turner, A. K. Wessel, G. C. Palmer, J. L. Murray, et M. Whiteley, « Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, n° 13, p. 4110–4115, mars 2015.
- [243] I. Y. Goryshin, J. A. Miller, Y. V. Kil, V. A. Lanzov, et W. S. Reznikoff, « Tn5/IS50 target recognition », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, n° 18, p. 10716–10721, sept. 1998.
- [244] K. Lipkow, N. Buisine, et R. Chalmers, « Promiscuous target interactions in the mariner transposon Himar1 », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 47, p. 48569–48575, nov. 2004.
- [245] L. Barquist, C. J. Boinett, et A. K. Cain, « Approaches to querying bacterial genomes with transposon-insertion sequencing », *RNA Biol.*, vol. 10, n° 7, p. 1161–1169, juill. 2013.
- [246] « The MmeI family: type II restriction-modification enzymes that employ single-



strand modification for host protection. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+MmeI+family%3A+type+II+restriction%E2%80%93modification+enzymes+that+employ+single-strand+modification+for+host+protection>. [Consulté le: 17-avr-2018].

[247] J. D. Gawronski, S. M. S. Wong, G. Giannoukos, D. V. Ward, et B. J. Akerley, « Tracking insertion mutants within libraries by deep sequencing and a genome-wide screen for *Haemophilus* genes required in the lung », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n° 38, p. 16422-16427, sept. 2009.

[248] G. C. Langridge *et al.*, « Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants », *Genome Res.*, vol. 19, n° 12, p. 2308-2316, déc. 2009.

[249] B. Green, C. Bouchier, C. Fairhead, N. L. Craig, et B. P. Cormack, « Insertion site preference of Mu, Tn5, and Tn7 transposons », *Mob. DNA*, vol. 3, n° 1, p. 3, févr. 2012.

[250] J. K. Lodge, K. Weston-Hafer, et D. E. Berg, « Transposon Tn5 target specificity: preference for insertion at G/C pairs », *Genetics*, vol. 120, n° 3, p. 645-650, nov. 1988.

[251] K. M. Wetmore *et al.*, « Rapid quantification of mutant fitness in diverse bacteria by sequencing randomly bar-coded transposons », *mBio*, vol. 6, n° 3, p. e00306-00315, mai 2015.

[252] J. E. Griffin, J. D. Gawronski, M. A. Dejesus, T. R. Ioerger, B. J. Akerley, et C. M. Sassetti, « High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism », *PLoS Pathog.*, vol. 7, n° 9, p. e1002251, sept. 2011.

[253] « Anomalies of the anaerobic tricarboxylic acid cycle in *Shewanella oneidensis* revealed by Tn-seq. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Anomalies+of+the+anaerobic+tricarboxylic+acid+cycle+in+Shewanella+oneidensis+revealed+by+Tn-seq>. [Consulté le: 17-avr-2018].

[254] « Identification of essential genes of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114059>. [Consulté le: 17-avr-2018].

[255] T. van Opijnen, D. W. Lazinski, et A. Camilli, « Genome-Wide Fitness and Genetic Interactions Determined by Tn-seq, a High-Throughput Massively Parallel Sequencing Method for Microorganisms », *Curr. Protoc. Microbiol.*, vol. 36, p. 1E.3.1-24, févr. 2015.

[256] M. R. Grosser *et al.*, « Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* nitric oxide

- resistance and virulence », *PLoS Pathog.*, vol. 14, n° 3, p. e1006907, mars 2018.
- [257] P. Calero, S. I. Jensen, K. Bojanovič, R. M. Lennen, A. Koza, et A. T. Nielsen, « Genome-wide identification of tolerance mechanisms toward p-coumaric acid in *Pseudomonas putida* », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 115, n° 3, p. 762-774, mars 2018.
- [258] G. T. Crimmins, S. Mohammadi, E. R. Green, M. A. Bergman, R. R. Isberg, et J. Mecsas, « Identification of MrtAB, an ABC transporter specifically required for *Yersinia pseudotuberculosis* to colonize the mesenteric lymph nodes », *PLoS Pathog.*, vol. 8, n° 8, p. e1002828, 2012.
- [259] D. Skurnik *et al.*, « A comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries », *PLoS Pathog.*, vol. 9, n° 9, p. e1003582, 2013.
- [260] D. A. Duong, R. V. Jensen, et A. M. Stevens, « Discovery of *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* genes important for survival in corn xylem through a Tn-Seq analysis », *Mol. Plant Pathol.*, févr. 2018.
- [261] Y. J. Zhang *et al.*, « Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis* », *PLoS Pathog.*, vol. 8, n° 9, p. e1002946, sept. 2012.
- [262] « Control of virulence by small RNAs in *Streptococcus pneumoniae*. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22807675>. [Consulté le: 17-avr-2018].
- [263] M. C. Chao *et al.*, « High-resolution definition of the *Vibrio cholerae* essential gene set with hidden Markov model-based analyses of transposon-insertion sequencing data », *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, n° 19, p. 9033-9048, oct. 2013.
- [264] « A comparison of dense transposon insertion libraries in the *Salmonella* serovars Typhi and Typhimurium. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+comparison+of+dense+transposon+insertion+libraries+in+the+Salmonella+serovars+Typhi+and+Typhimurium>. [Consulté le: 17-avr-2018].
- [265] E. B. Troy *et al.*, « Understanding barriers to *Borrelia burgdorferi* dissemination during infection using massively parallel sequencing », *Infect. Immun.*, vol. 81, n° 7, p. 2347-2357, juill. 2013.
- [266] Y. Fu, M. K. Waldor, et J. J. Mekalanos, « Tn-Seq analysis of *Vibrio cholerae* intestinal colonization reveals a role for T6SS-mediated antibacterial activity in the host », *Cell Host Microbe*, vol. 14, n° 6, p. 652-663, déc. 2013.

- [267] J. R. Pritchard *et al.*, « ARTIST: high-resolution genome-wide assessment of fitness using transposon-insertion sequencing », *PLoS Genet.*, vol. 10, n° 11, p. e1004782, nov. 2014.
- [268] T. van Opijnen et A. Camilli, « A fine scale phenotype-genotype virulence map of a bacterial pathogen », *Genome Res.*, vol. 22, n° 12, p. 2541-2551, déc. 2012.
- [269] R. Carter *et al.*, « Genomic analyses of pneumococci from children with sickle cell disease expose host-specific bacterial adaptations and deficits in current interventions », *Cell Host Microbe*, vol. 15, n° 5, p. 587-599, mai 2014.
- [270] S. Abel, P. Abel zur Wiesch, H.-H. Chang, B. M. Davis, M. Lipsitch, et M. K. Waldor, « Sequence tag-based analysis of microbial population dynamics », *Nat. Methods*, vol. 12, n° 3, p. 223-226, 3 p following 226, mars 2015.
- [271] « Cholera. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7704895>. [Consulté le: 17-avr-2018].
- [272] J. M. Ritchie, H. Rui, R. T. Bronson, et M. K. Waldor, « Back to the future: studying cholera pathogenesis using infant rabbits », *mBio*, vol. 1, n° 1, mai 2010.
- [273] « Gene fitness landscapes of *Vibrio cholerae* at important stages of its life cycle. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gene+fitness+landscapes+of+Vibrio+cholerae+at+important+stages+of+its+life+cycle>. [Consulté le: 17-avr-2018].
- [274] M. C. Chao, S. Abel, B. M. Davis, et M. K. Waldor, « The design and analysis of transposon insertion sequencing experiments », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, n° 2, p. 119-128, 2016.
- [275] N. Hu et B. Zhao, « Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2 », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 267, n° 1, p. 17-22, févr. 2007.
- [276] K. Li, R. R. Pidatala, et W. Ramakrishna, « Mutational, proteomic and metabolomic analysis of a plant growth promoting copper-resistant *Pseudomonas* spp », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 335, n° 2, p. 140-148, oct. 2012.
- [277] J. C. Hinton, J. M. Sidebotham, L. J. Hyman, M. C. Pérombelon, et G. P. Salmond, « Isolation and characterisation of transposon-induced mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* exhibiting reduced virulence », *Mol. Gen. Genet. MGG*, vol. 217, n° 1, p. 141-148, mai 1989.
- [278] M. Pirhonen, « Identification of Pathogenicity Determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by Transposon Mutagenesis », *Mol. Plant. Microbe Interact.*, vol. 4, n° 3,

p. 276, 1991.

[279] D. H. Lee *et al.*, « Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage », *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 159, n° Pt 7, p. 1487-1496, juill. 2013.

[280] M. Adeolu, S. Alnajar, S. Naushad, et R. S Gupta, « Genome-based phylogeny and taxonomy of the “Enterobacteriales”: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov », *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 66, n° 12, p. 5575-5599, déc. 2016.

[281] V. L. Miller et J. J. Mekalanos, « A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR* », *J. Bacteriol.*, vol. 170, n° 6, p. 2575-2583, juin 1988.

[282] « A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=1756974>. [Consulté le: 18-juill-2018].

[283] J. R. Newman et C. Fuqua, « Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator », *Gene*, vol. 227, n° 2, p. 197-203, févr. 1999.

[284] J.-Y. Jeong *et al.*, « One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, n° 15, p. 5440-5443, août 2012.

[285] « Combining quantitative genetic footprinting and trait enrichment analysis to identify fitness determinants of a bacterial pathogen. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23990803>. [Consulté le: 18-juill-2018].

[286] « Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=9511756>. [Consulté le: 18-juill-2018].

[287] S. Zobel, I. Benedetti, L. Eisenbach, V. de Lorenzo, N. Wierckx, et L. M. Blank, « Tn7-Based Device for Calibrated Heterologous Gene Expression in *Pseudomonas putida* », *ACS Synth. Biol.*, vol. 4, n° 12, p. 1341-1351, déc. 2015.

- [288] K.-H. Choi *et al.*, « Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, n° 4, p. 1064–1075, févr. 2008.
- [289] A. J. Link, D. Phillips, et G. M. Church, « Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization », *J. Bacteriol.*, vol. 179, n° 20, p. 6228–6237, oct. 1997.
- [290] M. A. DeJesus, C. Ambadipudi, R. Baker, C. Sassetti, et T. R. Ioerger, « TRANSIT--A Software Tool for Himar1 TnSeq Analysis », *PLoS Comput. Biol.*, vol. 11, n° 10, p. e1004401, oct. 2015.
- [291] « ESSENTIALS: Software for Rapid Analysis of High Throughput Transposon Insertion Sequencing Data ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416827/>. [Consulté le: 18-juill-2018].
- [292] R. S. Ravirala *et al.*, « Efflux pump gene expression in *Erwinia chrysanthemi* is induced by exposure to phenolic acids », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 20, n° 3, p. 313–320, mars 2007.
- [293] F. Taguchi *et al.*, « Defects in flagellin glycosylation affect the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 », *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 156, n° Pt 1, p. 72–80, janv. 2010.
- [294] « *Burkholderia cenocepacia* Lipopolysaccharide Modification and Flagellin Glycosylation Affect Virulence but Not Innate Immune Recognition in Plants. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=cenocepacia+Lipopolysaccharide+Modification+and+Flagellin+Glycosylation+Affect+Virulence>. [Consulté le: 10-mai-2018].
- [295] « RsmC of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls motility, extracellular protein production, and virulence by binding FlhD and modu... - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19447906>. [Consulté le: 10-mai-2018].
- [296] M. Ko et C. Park, « H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein », *J. Bacteriol.*, vol. 182, n° 16, p. 4670–4672, août 2000.
- [297] X. Yi, A. Yamazaki, E. Biddle, Q. Zeng, et C.-H. Yang, « Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in *Dickeya dadantii* », *Mol. Microbiol.*, vol. 77, n° 3, p. 787–800, août 2010.

- [298] X. Yuan *et al.*, « The diguanylate cyclase GcpA inhibits the production of pectate lyases via the H-NS protein and RsmB regulatory RNA in *Dickeya dadantii* », *Mol. Plant Pathol.*, févr. 2018.
- [299] « The acetate switch. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755952>. [Consulté le: 10-mai-2018].
- [300] F. Van Gijsegem, A. Wlodarczyk, A. Cornu, S. Reverchon, et N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, « Analysis of the LacI family regulators of *Erwinia chrysanthemi* 3937, involvement in the bacterial phytopathogenicity », *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*, vol. 21, n° 11, p. 1471-1481, nov. 2008.
- [301] S. Reverchon, W. Nasser, et J. Robert-Baudouy, « pecS: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi* », *Mol. Microbiol.*, vol. 11, n° 6, p. 1127-1139, mars 1994.
- [302] N. Surgey, J. Robert-Baudouy, et G. Condemine, « The *Erwinia chrysanthemi* pecT gene regulates pectinase gene expression », *J. Bacteriol.*, vol. 178, n° 6, p. 1593-1599, mars 1996.
- [303] « Inhibitory zinc sites in enzymes. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23456096>. [Consulté le: 10-mai-2018].
- [304] C. Y. Ong, M. J. Walker, et A. G. McEwan, « Zinc disrupts central carbon metabolism and capsule biosynthesis in *Streptococcus pyogenes* », *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 10799, juin 2015.
- [305] C. A. McDevitt *et al.*, « A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc », *PLoS Pathog.*, vol. 7, n° 11, p. e1002357, nov. 2011.
- [306] « Extracellular zinc competitively inhibits manganese uptake and compromises oxidative stress management in *Streptococcus pneumoniae*. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Extracellular+Zinc+Competitively+Inhibits+Manganese+Uptake+and+Compromises+Oxidative+Stress+Management+in+Streptococcus+pneumoniae>. [Consulté le: 10-mai-2018].
- [307] S. L. Stafford *et al.*, « Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper », *Biosci. Rep.*, vol. 33, n° 4, juill. 2013.
- [308] B. J. Cole *et al.*, « Genome-wide identification of bacterial plant colonization genes », *PLoS Biol.*, vol. 15, n° 9, sept. 2017.
- [309] K. N. Timmis, « *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par



excellence », *Environ. Microbiol.*, vol. 4, n° 12, p. 779-781, déc. 2002.

[310] « Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: [https://www.ncbi.nlm.nih-](https://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[gov.insb.bib.cnrs.fr/pubmed/?term=comparative+genomics+and+functional+analysis+of+niche-specific+adaptation+in+pseudomonas+putida](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=comparative+genomics+and+functional+analysis+of+niche-specific+adaptation+in+pseudomonas+putida). [Consulté le: 20-févr-2018].

[311] Z. Cheng, Y.-Y. C. Wei, W. W. L. Sung, B. R. Glick, et B. J. McConkey, « Proteomic analysis of the response of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida* UW4 to nickel stress », *Proteome Sci.*, vol. 7, p. 18, mai 2009.

[312] « *Pseudomonas putida* KT2440 response to nickel or cobalt induced stress by quantitative proteomics. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: [https://www-ncbi.nlm.nih-](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23235558)

[gov.insb.bib.cnrs.fr/pubmed/23235558](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23235558). [Consulté le: 20-févr-2018].

[313] A. Manara, G. DalCorso, C. Baliardini, S. Farinati, D. Cecconi, et A. Furini, « *Pseudomonas putida* response to cadmium: changes in membrane and cytosolic proteomes », *J. Proteome Res.*, vol. 11, n° 8, p. 4169-4179, août 2012.

[314] C. D. Miller, B. Pettee, C. Zhang, M. Pabst, J. E. McLean, et A. J. Anderson, « Copper and cadmium: responses in *Pseudomonas putida* KT2440 », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 49, n° 6, p. 775-783, déc. 2009.

[315] « Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24957251>. [Consulté le: 18-mai-2018].

[316] « Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. Regulation of *mgtA* and *mgtB* expression. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1898738>. [Consulté le: 18-mai-2018].

[317] M. González-Guerrero, D. Raimunda, X. Cheng, et J. M. Argüello, « Distinct functional roles of homologous Cu<sup>+</sup> efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa* », *Mol. Microbiol.*, vol. 78, n° 5, p. 1246-1258, déc. 2010.

[318] S. W. Lee, E. Glickmann, et D. A. Cooksey, « Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, n° 4, p. 1437-1444, avr. 2001.

[319] R. Fernández-Piñar, J. L. Ramos, J. J. Rodríguez-Herva, et M. Espinosa-Urgel, « A two-component regulatory system integrates redox state and population density

- sensing in *Pseudomonas putida* », *J. Bacteriol.*, vol. 190, n° 23, p. 7666-7674, déc. 2008.
- [320] R. Pinto, Q. X. Tang, W. J. Britton, T. S. Leyh, et J. A. Triccas, « The *Mycobacterium tuberculosis* *cysD* and *cysNC* genes form a stress-induced operon that encodes a tri-functional sulfate-activating complex », *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 150, n° Pt 6, p. 1681-1686, juin 2004.
- [321] K. Helbig, C. Bleuel, G. J. Krauss, et D. H. Nies, « Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli* », *J. Bacteriol.*, vol. 190, n° 15, p. 5431-5438, août 2008.
- [322] M. Jozefczak, T. Remans, J. Vangronsveld, et A. Cuypers, « Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, n° 3, p. 3145-3175, 2012.
- [323] « Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein | Nature Biotechnology ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nbt1172>. [Consulté le: 23-juill-2018].





## E- Annexes

### Posters :

**\* Tn-seq : a powerful tool to study genes function in bacteria**

Poster présenté lors du congrès GRRMI à Grenoble (France) en avril 2016

**\* The essential genome of the ubiquitous soil bacterium *Pseudomonas putida* in metal rich growth medium revealed by Tn-seq**

Poster présenté lors du congrès international EMBO/EMBL « New Approaches and Concepts in Microbiology » en Juin 2017

# Tn-seq: a powerful tool to study genes function in bacteria

K. Royet, G. Condemine, A. Rodrigue, E. Gueguen

kevin.royet@univ-lyon1.fr, erwan.gueguen@univ-lyon1.fr

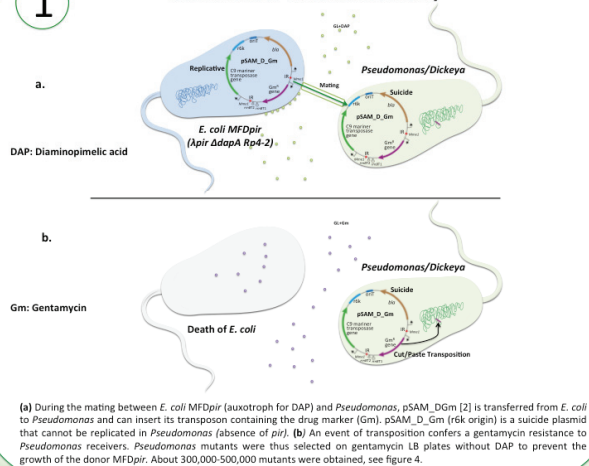
MAP UMR 5240 CNRS INSA UCBL, Villeurbanne, France.

**INTRODUCTION:** Classical approaches to understand microbial processes, such as pathogenesis can be undertaken using functional genomics or random mutant library screening. If this latter approach gives access to any gene involved in a process, the screening of mutant library is a laborious work. Recently a new technique called **Tn-seq** [1], for transposon insertion coupled to high throughput sequencing, has been developed. This method is based on the random insertion of a mariner type transposon and the subsequent identification of transposon insertion sites on the chromosome by high throughput sequencing. If a gene is essential in a given condition, its inactivation by the Tn insertion will lead to death or severe growth defect, leading to the absence of its DNA in the sequenced DNA library. Genes involved in fitness will also be detected thanks to the comparison between a permissive (no selective pressure) and a non-permissive condition (selective pressure). Finally, new essential genes or sRNAs involved in bacterial fitness in a specific condition can be discovered, even if not overexpressed.

**OBJECTIVES:** The aim was to find genes involved in virulence in *Dickeya dadantii*, one of the phytopathogenic *Enterobacteriaceae* that can cause soft rot diseases, and in *Pseudomonas syringae*, an opportunistic pathogen for plants. Results obtained for *D. dadantii* by comparing the results of Tn-seq after growth of *D. dadantii* pool of mutants in rich medium and after infection of chicory leaf is presented in this poster.

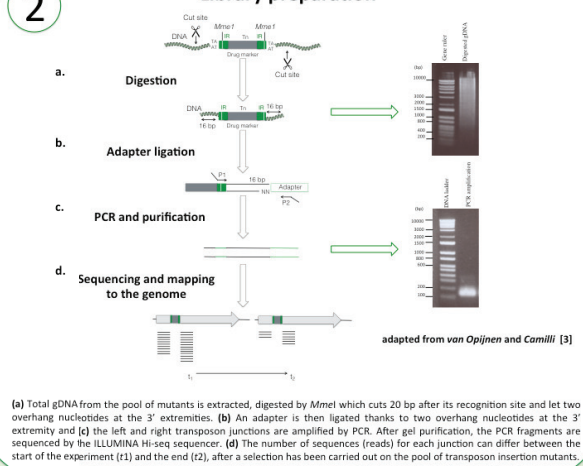
1

## Construction of mutant library



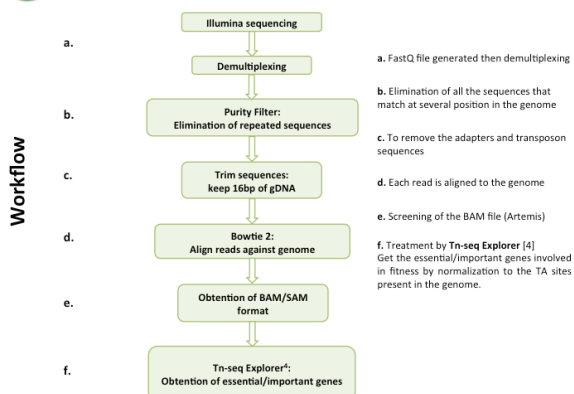
2

## Library preparation



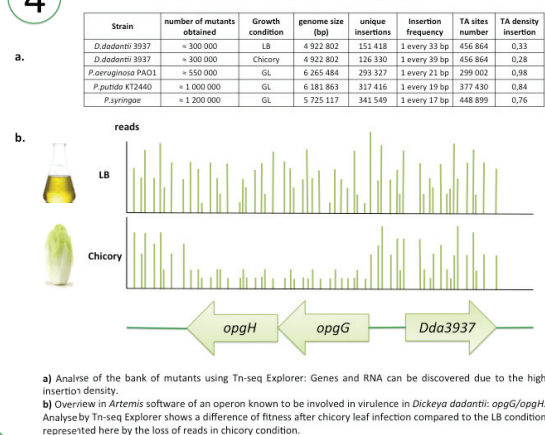
3

## Sequencing results analysis



4

## Validation of the Tn-seq tool



**Conclusion:** The identification of genes known to be involved in virulence of *D. dadantii* in chicory after Tn-seq analysis confirms the accuracy of this approach. The banks of mutants display a high percentage of insertions for every bacterium, showing that the genome is almost totally mutated. In addition with a fitness approach, new genes or ncRNA involved in a virulence process can also be discovered. The application of the Tn-seq tool on different phytopathogenic bacteria and in different conditions will contribute to understand the virulence processes.

**REFERENCES:** [1] Michael C. Chao, Soren Abel, Brigid M. Davis & Matthew K. Waldor "The design and analysis of transposon insertion sequencing experiments". *Nature Reviews Microbiology* 14, 119–118, Jan 2016.  
[2] D. Skarba, D. Raux, H. Aouf, V. Cottier, D. Yoder-Himes, S. Lory, and G. B. Pier, "A comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries." *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 9, p. e1003582, 2013.  
[3] T. van Opijnen, K. L. Bodi, and A. Camilli, "Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms." *Nat. Methods*, vol. 6, no. 10, pp. 767–772, Oct. 2009.  
[4] Tn-seq explorer: a tool for analysis of high-throughput sequencing data of transposon mutant libraries." *PLoS One*, vol. 10, no. 5, p. e0126070, 2015.



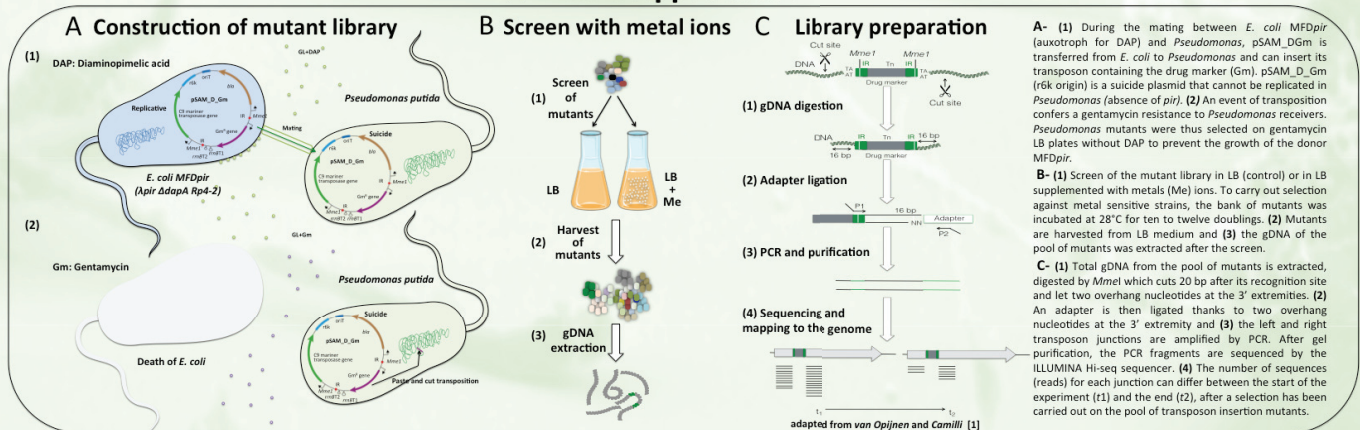
# The essential genome of the ubiquitous soil bacteria *Pseudomonas putida* in metal-rich growth medium revealed by Tn-seq

K. Royet<sup>1</sup>, N. Parisot<sup>2</sup>, C. Oriol<sup>1</sup>, L. Kergoat<sup>1</sup>, A. Rodrigue<sup>1</sup>, E. Gueguen<sup>1</sup>  
kevin.royet@univ-lyon1.fr, erwan.gueguen@univ-lyon1.fr

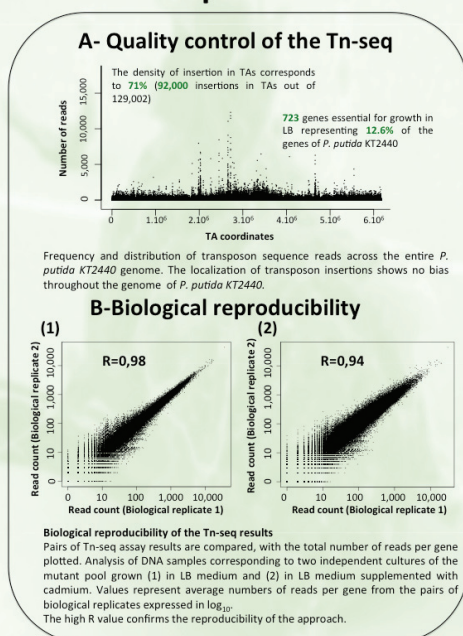
<sup>1</sup>MAP UMR 5240 CNRS INSA UCBL, Villeurbanne, France. <sup>2</sup>BF2I UMR 0203 UCBL INSA INRA, Villeurbanne, France

**INTRODUCTION:** Metal ions are present all over the environment from natural origin or industrial activity. Most of them are indispensable for cell metabolism because they are essential cofactors of many enzymes. However, environmental bacteria can be exposed to variable concentration of metal ions that can be toxic. Maintaining metal homeostasis is of great importance for the survival of these bacteria. Among them, *Pseudomonas putida* KT2440 is an ubiquitous soil bacteria that harbours a large variety of genes predicted to be involved in metal homeostasis. However, little has been done to characterize the genes really implicated in metal tolerance or resistance in this bacterium. Moreover, more than 1000 genes of *P. putida* are still of unknown function and we hypothesized that some genes involved in metal tolerance remain to be discovered. In order to systematically identify genes required for growth of *P. putida* KT2440 in the presence of metal ions, we made a Tn-seq mariner transposon mutant library of this bacterium and then screened the library for increased susceptibility of mutants to cobalt, zinc, copper or cadmium ions. Results obtained by the Tn-seq approach in *P. putida* are presented in this poster.

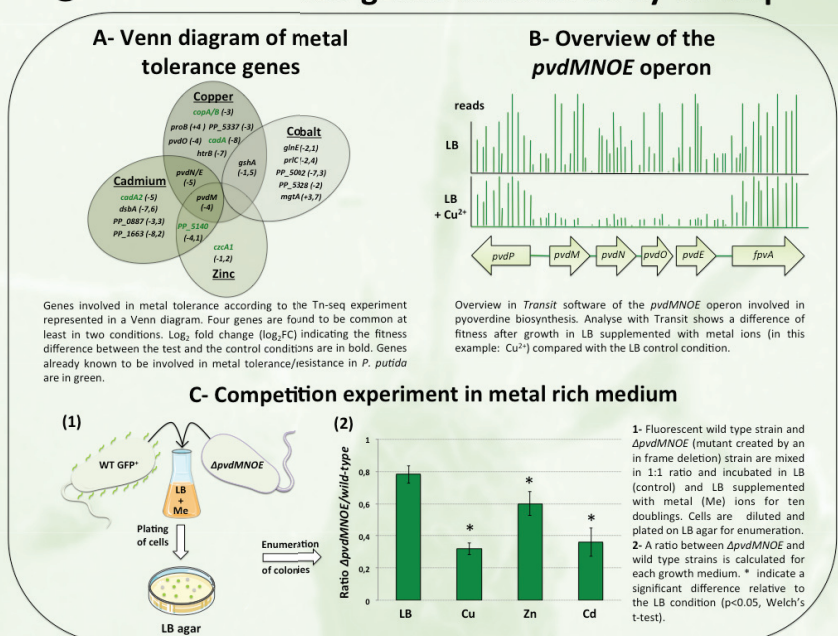
## 1 - Tn-seq protocol



## 2 - Tn-seq validation



## 3 - Metal tolerance genes discovered by Tn-seq



**Conclusion:** The identification of genes known to be involved in metal resistance in *P. putida* KT2440 confirms the accuracy of the Tn-seq approach (Fig 3A). Some genes whose involvement in metal tolerance was previously unknown, such as genes coding for a transcriptional regulator (PP\_0887, PP\_5337), are found to be important for metal tolerance (Fig 3A). Moreover, some of these genes are involved in a cross resistance for different metals, such as *pvdE* or *gshA* genes. To validate the global approach, the genes newly discovered were thus deleted by an in frame deletion and the mutant strains obtained were tested for metal tolerance in competition to a wild-type strain. Preliminary results confirm the involvement of genes found by the Tn-seq approach in metal tolerance. Complementation experiments and flow cytometry analysis of the competition tests will be performed to validate the implication of every mutants in metal tolerance. These results give a new regard on the genes involved in metal tolerance in *P. putida*.







## FOLIO ADMINISTRATIF

### THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON 1

NOM : ROYET

DATE de SOUTENANCE : 24/10/2018

Prénoms : Kévin

**TITRE : La réponse au stress chez les bactéries : réponse au stress métallique chez *Pseudomonas putida* et au stress rencontré en cours d'infection de plante chez le phytopathogène *Dickeya dadantii*.**

NATURE : Doctorat

Ecole doctorale : Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)

Spécialité : Microbiologie Moléculaire

#### RESUME :

Les bactéries environnementales font face à de très nombreux stress dans leur milieu de vie. Ces dernières doivent s'acclimater rapidement pour faire face à des variations de température, des changements d'osmolarité, des changements de pH ou encore des carences nutritives afin de survivre et de prospérer dans leur environnement naturel. Ce travail de thèse s'inscrit dans l'étude de la réponse aux stress chez les bactéries environnementales en prenant l'exemple du stress engendré par les métaux chez la bactérie modèle *Pseudomonas putida* et du stress rencontré en cours d'infection de plante chez le phytopathogène *Dickeya dadantii*. La présence d'un excès d'ions métalliques ainsi que les défenses d'une plante sur un phytopathogène entraînent tout deux un stress oxydatif et peut provoquer une altération membranaire ainsi que protéique. Ces stress, à première vue éloignés, pourraient ainsi induire des mécanismes de réponses similaires chez les bactéries. La plupart des études de résistance aux stress chez les bactéries portent sur l'étude de gènes sur ou sous exprimés et peuvent alors manquer des gènes importants pour la réponse à un stress donné dont l'expression reste inchangée. Afin d'identifier de nouveaux facteurs de résistance aux stress métalliques chez *P. putida* ainsi que de nouveaux facteurs de résistance/virulence chez le phytopathogène *D. dadantii*, un crible Tn-seq (Transposon-Sequencing) a été réalisé à l'aide de banques de mutants très denses. Les deux cribles ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de régulateurs de transcription ainsi que l'importance des mécanismes d'efflux dans la réponse à un stress. Les deux cribles ont aussi mis en évidence l'importance des voies de biosynthèses en acides aminées et acides nucléiques. Enfin, de nombreux gènes à fonction inconnue participent à la survie des deux bactéries en condition de stress. Les résultats obtenus pourraient permettre de développer de nouveaux antimicrobiens chez *D. dadantii*. Les mécanismes de résistance aux métaux et aux antibiotiques peuvent être similaires. Nos travaux améliorent la compréhension des mécanismes de résistance aux métaux et pourraient ainsi permettre de trouver de nouvelles molécules à activité antimicrobienne.

**MOTS-CLÉS:** cobalt, cadmium, zinc, cuivre, stress, efflux, résistance, Tn-seq, *Pseudomonas putida*, *Dickeya Dadantii*, maladie de la pourriture molle, mobilité, métabolisme, glycosylation

Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire Microbiologie, Adaptation et Pathogénie  
UMR5240 UCBL-INSa-CNRS-BayerCropSciences  
Campus de la Doua- Bâtiment Lwoff, 10 rue Raphael Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex

Directeur de thèse: Erwan GUEGUEN  
Co-directrice de thèse : Agnès RODRIGUE

Composition du jury : Florence WISNIEWSKI  
Jean-François COLLET  
Isabelle SCHALK  
Laurent NOEL