



HAL
open science

Etude de la régulation de la virulence de *Pseudomonas entomophila*: recherche de gènes cibles du système à deux composants GacS/GacA impliqués dans la pathogénicité

Hyunsuk Shin

► **To cite this version:**

Hyunsuk Shin. Etude de la régulation de la virulence de *Pseudomonas entomophila*: recherche de gènes cibles du système à deux composants GacS/GacA impliqués dans la pathogénicité. Bactériologie. 2012. hal-01482455

HAL Id: hal-01482455

<https://ephe.hal.science/hal-01482455>

Submitted on 3 Mar 2017

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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

SHIN Hyunsuk

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Etude de la régulation de la virulence de *Pseudomonas entomophila* :
recherche de gènes cibles du système à deux composants GacS/GacA
impliqués dans la pathogénicité

Soutenu le 10 décembre 2012

devant le jury suivant :

M. Bruno DELESALLE – Président

M. Frédéric BOCCARD – Tuteur scientifique

Mme. Thi My Anh NEILDEZ – Tuteur pédagogique

Mme. Sylvie RIMSKY – Rapporteur

M. Philippe BOULOC – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de : Frédéric BOCCARD

Laboratoire de : Génétique moléculaire

Directeur : Frédéric BOCCARD <frederic.boccard@cgm.cnrs-gif.fr>

CNRS – CGM, Avenue de la Terrasse - Bât. 26, 91198 GIF-SUR-YVETTE

et de

Thi My Anh NEILDEZ <neildez@genethon.fr>

Laboratoire de : Biologie moléculaire

Directeur : Andréas PALDI

Généthon, 1 Rue de l'internationale 91000 ÉVRY

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Etude de la régulation de la virulence de *Pseudomonas entomophila* :
recherche de gènes cibles du système à deux composants GacS/GacA
impliqués dans la pathogénicité

Mémoire présenté par SHIN Hyunsuk

Soutenu le 10 décembre 2012

RÉSUMÉ

Pseudomonas entomophila (*Pe*) est une bactérie à Gram-négatif découverte lors de l'étude des interactions hôte-pathogène chez *Drosophila melanogaster*. Cette bactérie manifeste un caractère entomopathogène à l'égard de *D.melanogaster*. Elle persiste dans l'intestin de la drosophile, la colonise et la tue. Le système à deux composants GacS/GacA (système Gac) de *Pe* contrôle l'expression des gènes responsables de la production des enzymes extracellulaires et des métabolites secondaires. Ce système régule généralement des gènes liés à la virulence. Le mutant du système Gac de *Pe* ne persiste pas dans l'intestin et n'est pas virulent vis-à-vis de la drosophile. La dissection d'une mouche après l'infection naturelle par *Pe* montre qu'il y a une grande perturbation au niveau de l'intestin de la drosophile. Ce phénomène n'est pas observé lorsque c'est le mutant Gac qui infecte la drosophile. Donc, des facteurs de virulence responsables de la persistance dans l'intestin et de la pathogénicité de *Pe* peuvent être régulés par le système Gac. Nous avons disséqué le fonctionnement du système Gac en lançant un crible pour trouver ces facteurs. Le système Gac est activé par un signal extérieur inconnu, produit par la bactérie, durant la phase stationnaire. Cette activation entraîne la phosphorylation de la protéine senseur GacS qui phosphoryle ensuite la protéine régulatrice GacA. Cette dernière active la transcription de gènes, entraînant la production de deux petits ARNs : *rsmY* et *rsmZ*. Les petits ARNs séquestrent la protéine RsmA qui bloque la traduction des gènes en se fixant sur l'ARN messager, et déclenchent la traduction des gènes régulés par le système Gac. En construisant le système Gac inductible, nous avons fait un crible et trouvé plusieurs gènes régulés par le système Gac. Parmi eux, nous avons trouvé deux gènes impliqués dans la virulence. Ce sont des gènes codants une protéase 'La-2 ATP-dépendante liant l'ADN' et une 'nitrite réductase à cuivre'. Des mutants affectés dans ces gènes sont moins virulents que la souche sauvage. Cependant, le rôle précis de ces facteurs dans le processus de virulence reste à déterminer.

Le facteur sigma RpoS est un facteur alternatif de l'ARN polymérase actif durant la phase stationnaire. L'étude du rôle de RpoS dans la virulence de *Pe* a montré qu'il participe à la virulence indépendamment du système Gac.

MOTS-CLÉS : Système Gac, *rsmY*, *rsmZ*, RsmA, Facteurs de virulence, Facteurs de persistance, *Pseudomonas entomophila*, *Drosophila melanogaster*

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I. Interaction hôte-pathogène	7
1. Colonisation	8
2. Commensalisme	8
3. Maladie	9
II. Un modèle d'hôte : <i>Drosophila mélanogaster</i>	10
1. La drosophile, modèle d'hôte	10
2. Infection naturelle	10
3. Le Système immunitaire de la drosophile	11
3.1 Barrière physique et Barrière chimique	11
3.2 Système immunitaire inné inductible	12
3.3 La réponse par la production des AMPs	12
III. Modèle pathogène : <i>Pseudomonas entomophila</i>	14
1. Les <i>Pseudomonas</i>	14
2. <i>Pseudomonas entomophila</i>	14
IV. Le système Gac	16
1. Système à deux composants GacS/GacA chez différentes bactéries	16
2. Fonctionnement du système Gac	18
3. Les petits ARNs	19

4. Protéine répresseur RsmA/CsrA	19
5. Structure de complexe ARN messenger/ Protéine répresseur	21
V. Les différents modèles d'infections	22
1. Etude de la persistance d' <i>Erwinia carotovora carotovora</i> 15 (<i>Ecc15</i>)	22
2. Etude de la persistance de <i>Pseudomonas entomophila</i>	23
VI. Facteur sigma RpoS	26
1. RpoS, face aux stress	26
2. Rôle de RpoS dans la virulence	26
3. RpoS et système Gac	27
4. Objectives de l'expérience	28
VII. Objectif du projet	29

Liste des abréviations

AMPs	peptides antimicrobiens
DO	densité optique
HCN	cyanure d'hydrogène
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ONPG	ortho-nitrophényl- β -D-galactoside
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
<i>Pe</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i>
ROS	radicaux libres dérivés de l'oxygène

INTRODUCTION

I. Interaction hôte-pathogène

L'étude des interactions hôte-pathogène a pour objectif de comprendre le dialogue moléculaire qui existe entre un microorganisme et son hôte. Ces interactions sont en changement constant et varient en fonction de l'hôte, du microbe et des facteurs environnementaux. Les microbes établissent de nouvelles niches écologiques en envahissant des organismes vivants dans le même milieu. Ces hôtes leur permettent de se reproduire en leur fournissant des nutriments. Parmi les différents microbes, ceux qui sont pathogènes provoquent des dommages chez l'hôte. La pathogénie ou la pathogénèse est le processus du développement de la maladie depuis le pathogène. Les pathogènes possèdent dans leur génome l'ensemble des gènes leur conférant la persistance et le développement des dommages (Falkow, 2004). Ces facteurs sont impliqués dans la virulence chez l'hôte. La virulence ou la pathogénicité traduit la capacité du microbe à provoquer un dommage chez l'hôte, et c'est aussi un caractère du pathogène qui est associé à un trait qualitatif et quantitatif de la maladie. De son côté, l'hôte se défend contre l'attaque des pathogènes en développant des réponses immunitaires pour éliminer les envahisseurs.

Les conséquences de l'interaction hôte-pathogène peuvent résulter en élimination des pathogènes par l'hôte, ou en commensalisme des microbes dans l'hôte, ou encore en développement de la maladie chez l'hôte (Pirofski and Casadevall, 2008).

L'infection est l'acquisition du microbe par l'hôte, qui est suivie par la multiplication du microbe dans l'hôte. Les dommages produits chez l'hôte dû à l'infection viennent soit des facteurs du pathogène, soit des facteurs de l'hôte, soit des facteurs des deux.

Ces dommages dépendent de la réponse immunitaire de l'hôte (Figure 1). Les dommages sont maxima quand la réponse immunitaire est faible ou excessive. Quand la réponse immunitaire est faible, l'action des facteurs des microbes provoque de grands dommages. Les facteurs de virulence des microbes peuvent impliquer différents types de molécules comme des polysaccharides, des toxines protéases, ainsi que des composants qui sont toxiques pour l'hôte. Par contre, une réponse

immunitaire excessive peut provoquer aussi des dommages importants. Les effecteurs du système immunitaire sont des cytokines, des chemokines, ou des peptides microbicides. On peut distinguer 5 conséquences dues à l'infection du microbe chez l'hôte : élimination, colonisation, commensalisme, maladie, latence (Figure 2). Le changement entre les différents états se produit par l'action de la réponse immunitaire de l'hôte.

1. Colonisation

La colonisation est un état transitoire qui peut soit évoluer vers l'élimination de la bactérie, soit se transformer en situation de commensalisme ou de maladie. En général, la colonisation induit une réponse immunitaire chez son hôte pour éliminer les microbes. Le changement de l'état de colonisation à l'état de maladie a lieu quand le système immunitaire de l'hôte n'a pas réussi à éliminer les pathogènes, et si cela arrive, les dommages dépassent le seuil de tolérance de l'hôte et provoque donc la maladie.

2. Commensalisme

Le commensalisme est un état provoqué lorsque l'interaction hôte-pathogène aboutit à l'absence de conséquences néfastes pour les deux partenaires ou bien à des effets bénéfiques pour l'hôte (Casadevall and Pirofski, 2000).

Les microbes s'installent dans notre corps depuis notre naissance. Le rôle joué par les microbes dans cette situation de commensalisme a commencé à se révéler récemment (Dethlefsen *et al.*, 2006). Par exemple, les microbes qui habitent dans le

tractus gastro-intestinal contribuent au développement et à l'immunité naturelle de l'hôte (Mutch *et al.*, 2004).

L'état de commensalisme peut changer en état de colonisation ou de maladie si l'hôte ne réussit pas à conquérir ou détruire le microbiote.

3. Maladie

La maladie est un état provoqué lorsque les dommages de l'hôte dépassent la tolérance des mécanismes qui maintiennent l'homéostasie de l'hôte.

L'état de maladie peut demeurer en état de latence (persistance) si les microbes sont toujours présents dans l'hôte en dessous de seuil de maladie malgré l'action du système immunitaire de l'hôte. La persistance endommage en continu en dessous du seuil de maladie chez l'hôte.

II. Un modèle d'hôte : *Drosophila melanogaster*

1. La drosophile, modèle d'hôte

La mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*, est l'un des êtres vivants le mieux étudié en génétique et biologie moléculaire. Elle représente aussi un modèle original pour étudier les mécanismes moléculaire de l'immunité innée. Elle vit principalement sur des fruits en décomposition, environnement très riche en microorganismes. Elle a donc développé un mécanisme efficace pour se défendre contre l'infection. Cela permet de l'utiliser pour l'étude des interactions hôte-pathogènes.

La drosophile présente pour ces études un certain nombre d'avantages:

- La reproduction est rapide. A 25°C, la durée entre la ponte de l'œuf et l'obtention d'un adulte fertile est d'environ 12 jours.
- L'élevage est facile dans l'environnement du laboratoire. Les mouches sont élevées dans les tubes nutritifs adéquats.
- Le génome de *D. melanogaster* est aujourd'hui entièrement séquencé et annoté. La taille du génome est d'environ 120 mégabases ; ce génome est distribué sur 4 paires de chromosomes. Il code environ 13600 gènes.
- Les mécanismes impliqués dans le système immunitaire inné sont en grande partie similaire à ceux des mammifères.
- Plusieurs outils génétiques et génomiques établis facilitent le décryptage des mécanismes pour disséquer les interactions hôte-pathogène.

2. Infection naturelle

Pour étudier l'interaction hôte-pathogène dans les conditions de l'environnement naturel, l'infection naturelle (orale) a été mise au point au laboratoire. Cette méthode d'infection permet de mieux analyser le mécanisme des défenses

naturelles de l'hôte (drosophile) et le mécanisme de la virulence du pathogène (bactérie) par rapport à une infection par blessure septique qui consiste à injecter directement des bactéries par piqûre dans le thorax de la drosophile (l'infection par blessure septique). Les mouches sont élevées dans un tube qui contient un milieu à Mouche. Ensuite, ces mouches sont mises en contact direct avec les cultures bactériennes pour l'expérience de l'interaction hôte- pathogène.

3. Le système immunitaire de la drosophile

3.1 Barrières physiques et barrières chimiques (Figure 3)

La première ligne de défense chez la drosophile contre le pathogène est constituée par une barrière physique. Le corps d'un insecte est entièrement recouvert par une cuticule qui protège l'organisme contre les pathogènes et l'environnement externe. Les intestins sont toujours en contact avec un grand nombre de microorganismes et ces intestins sont souvent le passage pour les pathogènes qui utilisent la voie orale pour infecter leur hôte. L'intestin antérieur et l'intestin postérieur sont recouverts par la cuticule. La cuticule est composée de la fibrille N-acetylglucosamine incorporée dans une matrice de protéines et de lipides. L'intestin moyen est recouvert par une membrane péritrophique constituée de chitine, de protéoglycanes et de protéines. Cette matrice est perméable aux nutriments et aux enzymes mais protège les cellules épithéliales d'un contact direct avec les microorganismes présents dans le bol alimentaire. Les cellules épithéliales sont des acteurs de la réponse immunitaire en exprimant des effecteurs anti-microbiens tels que des peptides anti-microbiens (AMPs) ou des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) (Vallet-Gely *et al.*, 2008).

Le pH joue également un rôle dans l'élimination des microorganismes. La partie antérieure de l'intestin moyen présente une valeur de pH voisine de 4 (acide), la partie moyenne a une valeur de pH inférieure à 2,4 (très acide), et la partie postérieure a une valeur de pH supérieure à 7 (basique). La forte acidité de l'intestin moyen donne un environnement hostile aux microorganismes.

3.2 Système immunitaire inné inductible

Si les microbes ont réussi à surmonter les barrières physiques et chimiques, la réponse immunitaire inductible est déclenchée par l'hôte.

La réponse immunitaire innée est le seul système de défense inductible chez la drosophile. Le système immunitaire adaptatif est basé sur une reconnaissance d'antigène spécifique mais la mémoire immunitaire spécifique n'est présente que chez les vertébrés. Le système immunitaire inné est aussi capable de distinguer les différents types de pathogènes. Cette reconnaissance se fait par des récepteurs qui reconnaissent les différents types de pathogène et activent différentes voies de signalisation immunitaire en fonction de l'identité du pathogène reconnu. Ces récepteurs s'appellent « pattern recognition receptors (PRRs) ». Les PRRs reconnaissent des molécules différentes de la paroi des microbes. Parmi ces molécules, on a pu identifier le peptidoglycane (bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif), le lipo-polysaccharide (bactéries à Gram-négatif), l'acide lipotechoïque (bactéries à Gram-positif), les glucanes (levure) ou encore la chitine (champignon). La réponse systémique est constituée de la production de peptides antimicrobiens (AMPs) par le corps gras et de la circulation des AMPs dans tout le corps après la reconnaissance des pathogènes. La réponse cellulaire est une défense faite par les cellules immunitaires de l'hémolymph (liquide circulatoire chez les insectes dont le rôle est analogue au sang chez les vertébrés), et l'action des phagocytoses est comprise dans cette réponse. La réponse locale se produit au niveau des épithélia. Cette réponse est composée de la production des ROS, de la sécrétion du lysozyme et aussi de la production d'AMPs, causée par l'entrée en contact avec le pathogène.

3.3 La réponse par la production des AMPs

L'injection des bactéries dans le corps induit l'apparition d'une activité antimicrobienne dans l'hémolymphe de la drosophile. Cette activité persiste pendant plusieurs jours et donne une protection contre une deuxième attaque des bactéries pathogéniques (Boman *et al.*, 1972). Cette réaction se fait majoritairement par la production des AMPs dans le corps gras et aussi localement dans des cellules épithéliales. Le corps de l'insecte a une cavité ouverte appelée l'hémocèle dans laquelle on trouve des organes différents, y compris le corps gras. Le corps gras est l'équivalent du foie des mammifères. Sa grande taille et sa position confèrent une réponse immunitaire efficace qui diffuse rapidement les effecteurs dans l'hémolymphe à l'intérieur du corps de la drosophile. Donc le corps gras est un organe majeur du système immunitaire. L'expression des AMPs qui suit l'infection est régulée au niveau transcriptionnel. Les trois protéines Relish, Dorsal et Dif peuvent se fixer sur le site de NF- κ B (nuclear factor - kappa B, facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire) selon les besoins, dans la région du promoteur et activer les gènes codant les AMPs. Il y a deux voies de signalisation : la voie Toll pour les transactivateurs Dorsal et Dif, et la voie Imd pour le transactivateur Relish. La voie Toll s'active lors de la réponse à l'infection de bactéries à Gram-positif et la voie Imd est activée par les bactéries à Gram-négatif. Le peptidoglycane des bactéries à Gram-négatif est différent de celui des bactéries à Gram-positif : il y a remplacement de l'acide aminé lysine à la troisième position de la chaîne peptidique par un résidu d'acide meso-diaminopimelique (DAP). Donc la voie Toll est activée par le peptidoglycane de type « Lysine » des bactéries à Gram-positif et la voie Imd est activée par le peptidoglycane de type « DAP » des bactéries à Gram-négatif (Leulier *et al.*, 2003). La voie Toll aboutit à la production d'AMPs tels que la drosomycine, la voie Imd permettant la synthèse d'AMPs tels que la diptéricine.

III. Modèle pathogène : *Pseudomonas entomophila*

1. Les *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires à Gram-négatif, γ -protéobactérie. Les capacités métaboliques de *Pseudomonas* sont grandes : elles lui permettent de vivre dans des niches variées comme la terre, l'eau et la surface de plante. La grande versatilité des *Pseudomonas* est reflétée par la taille importante de leur génome (6 Mégabases en moyenne) et par le grand nombre de gènes qu'ils contiennent (5400 en moyenne). Leurs gènes codent de nombreuses protéines impliquées dans la résistance au stress oxydatif ainsi que dans la conversion et l'utilisation de composés présents dans leurs habitats. La capacité catabolique de certains isolats à utiliser des hydrocarbures ou des composés nitre-aromatiques a été mise à profit dans la dépollution des sols et des eaux. La capacité de ces bactéries à s'adapter et à occuper des niches écologiques différentes est également reflétée par l'abondance de système à deux composants. Ce système est répandu chez les procaryotes, et répond rapidement au changement environnemental avec robustesse. Plusieurs souches de *Pseudomonas* sont des pathogènes pour l'homme (*Pseudomonas aeruginosa*) et les plantes (*Pseudomonas aeruginosa* et groupe de *Pseudomonas syringae*). Certaines souches sont des bactéries bénéfiques (groupe de *Pseudomonas fluorescens*) qui participent au contrôle biologique et protègent les plantes des champignons pathogènes.

2. *Pseudomonas entomophila*

Pseudomonas entomophila (Pe) a été isolé à partir d'une femelle de *Drosophila melanogaster* dans des fruits en décomposition en Guadeloupe par l'équipe de Bruno Lemaitre en 2001. L'analyse de son génome suggère qu'il s'agit d'une souche bactérienne ubiquitaire capable de coloniser des habitats différents. Elle possède des gènes cataboliques proches à la bactérie *Pseudomonas putida* KT2440 qui est

une souche versatile trouvée essentiellement dans le sol. La taille du génome de *Pe* est de 5,9 megabases. 70,2% des gènes de *Pe* sont orthologues de ceux de *P. putida*, avec 96% de ces gènes orthologues se trouvant en synténie (Vodovar *et al.*, 2006). Mais *Pe* contient un certain nombre de gènes importants pour la virulence qui ne se trouvent pas chez *Pseudomonas putida*. Par ailleurs, *Pe* ne contient pas de gènes qui codent des enzymes dégradant les parois de plantes. Il a été démontré que *Pe* n'est pas pathogène pour les plantes. Par contre le génome de *Pe* possède trois gènes codant des protéines ressemblant à des toxines insecticides (PSEEN 2485, PSEEN 2697, PSEEN 2788) qui sont absents chez les autres *Pseudomonas*, mais qui sont présents dans d'autres bactéries entomopathogènes comme, *Photorhabdus luminescens*, *Serratia entomophila*, *Xenorhabdus nematophilus*, et *Yersinia* spp. (Vodovar *et al.*, 2006). *Pe* montre une pathogénicité forte à l'encontre de *D. melanogaster* : l'infection par *Pe* déclenche le système immunitaire chez *D. melanogaster* après ingestion et provoque une forte létalité. *Pe* est aussi pathogène pour d'autres insectes (comme, *Bombyx mori*, *Anopheles gambiae*). C'est donc une bactérie entomopathogène. *Pe* est la seule bactérie du genre *Pseudomonas* qui peut tuer *D. melanogaster* par ingestion aussi efficacement (Vodovar *et al.*, 2005), grâce à des systèmes pour persister et coloniser son hôte *D. melanogaster*. On pense que sa pathogénicité est liée à de nombreux facteurs de virulence comme des toxines insecticides, des protéases, du cyanure d'hydrogène (HCN) et des métabolites secondaires. Les gènes codants des systèmes de sécrétion de type III ou de type IV, impliqués dans la pathogénicité de nombreuses bactéries pathogènes à Gram-négatif ne se trouvent pas chez *Pe*. Une mutagenèse par insertion du transposon, mini-Tn5, a révélé que le système à deux composants GacS/GacA est un système régulateur majeur qui contrôle les gènes de virulence (Vodovar *et al.*, 2006).

IV. Le système Gac

1. Système à deux composants GacS/GacA chez différentes bactéries

Le système à deux composants GacS/GacA est répandu chez les bactéries. Ce système aide les bactéries à s'adapter aux conditions différentes et à coloniser les niches écologiques à la réponse de signal environnemental. Il est composé du détecteur de type kinase GacS et du régulateur de réponse GacA. Ce système GacS/GacA joue un rôle important chez les bactéries à Gram-négatif, d'une part pour manifester leur virulence aux plantes et aux animaux et d'autre part pour contrôler l'expression des facteurs de tolérance contre des stressés et du contrôle biologique. Le contrôle biologique manifesté par les bactéries protège les plantes contre des champignons pathogéniques. Le détecteur de type kinase GacS, qui était précédemment appelé Lem A, a d'abord été décrit chez *Pseudomonas syringae* strain B728 en tant que facteur essentiel pour l'activité pathogène « lesion manifestation by this pathogenic strain on bean leaves » (Hrabak and Willis, 1992). L'inactivation de ce gène provoque la perte de la virulence et du biocontrôle écologique. Le régulateur de réponse GacA a été décrit pour la première fois dans la souche *Pseudomonas fluorescens* CHA0 en tant qu'activateur global de la production d'antibiotiques et de HCN. Dans cette souche, le rôle de GacA est requis pour l'activité contre le champignon et pour la robustesse du biocontrôle écologique (Laville *et al.*, 1992, Natsch *et al.*, 1994). Cette activité est due à des métabolites secondaires qui sont essentiels pour le contrôle biologique (Haas *et al.*, 2000).

La preuve que GacS et GacA sont les partenaires d'un même système à deux composants a été apportée génétiquement pour la première fois chez *P. syringae* pv. *Syrngaie* en utilisant plusieurs mutants liés aux gènes GacS et GacA (Rich *et al.*, 1994). Cette relation a ensuite été confirmée chez plusieurs bactéries. La confirmation biochimique que GacA est le régulateur de réponse du détecteur GacS provient de la démonstration réalisée in vitro du transfert d'un résidu phosphoryl de BarA, l'homologue de GacS, à UvrY, l'homologue de GacA chez *Escherichia coli* K-12 (Pernestig *et al.*, 2001).

Le système GacS/GacA a pu être découvert dans différentes bactéries car des mutants de ce système montrent des phénotypes remarquables ; perte de la capacité du contrôle biologique chez certaines bactéries *Pseudomonas* et perte de virulence chez les bactéries pathogènes de plantes ou d'animaux.

Le phénotype commun de ce système chez les différentes bactéries concerne le contrôle de la synthèse des produits extracellulaires comme des enzymes extracellulaires et des métabolites secondaires.

Le système GacS/GacA régule positivement l'expression des gènes codant des enzymes sécrétés tels que des protéases, des phospholipases et des chitinases. La production de la toxine syringomycine, des polysaccharides extracellulaires de type alginate, ainsi que des exoprotéases, composés nécessaires pour la formation de lésions, est contrôlée par le système Gac chez *P.syringae* pv. *syringae* strain *B728a*. (Willis *et al.*, 2001). Ces composés sont probablement liés à la pathogénicité.

Erwinia caratovora. *Caratovora* fait mincir le tissu infecté chez différentes plantes. Cet amincissement est dû à l'action des enzymes régulés par le système Gac, comme les cellulases, les pectate lyases et les protéases. Ces enzymes dégradent les parois de la plante.

Parmi les métabolites secondaires, on trouve le 2,4-diacetylphloroglucinol, la pyoluteorine, la pyrrolnitrine, le cyanure d'hydrogène (HCN), le 2-hexyl-5-propyl-résorcinol, et les composés de type phénazine.

Pseudomonas aeruginosa, la bactérie ubiquitaire et pathogène opportuniste, provoque des dommages importants quand on infiltre une grande densité de cellules bactériennes sur des feuilles d'*Arabidopsis*. Les mutants *gacA* forment beaucoup moins de dommages (Rahme *et al.*, 1997). Avec des modèles animaux comme la souris, le nematode *Caenorhabditis elegans* et les larves de papillon de nuit, les mutants *gacA* ou *gacS* de *P. aeruginosa* sont beaucoup moins virulents que la souche sauvage (Jander *et al.*, 2000, Tan *et al.*, 1999). Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* sont donc régulés positivement par le système Gac (Pessi and Haas, 2001). Chez *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, la protéine SirA (l'homologue de GacA) en association avec la protéine BarA (l'homologue de GacS) régule positivement la sécrétion de Type III et l'invasion (Goodier and Ahmer, 2001, Johnston *et al.*, 1996, Lucas *et al.*, 2000).

Les mutants *gac* présentent une morphologie de colonie différente et sont différents en motilité par rapport au sauvage. Les colonies des mutants sont plus grandes et plus plates sur des milieux gélosés, ce qui montre leur motilité déficiente. Le phénotype du système Gac est perceptible en phase transitoire c'est à dire lors du passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire de la culture liquide bactérienne ; le phénotype est apparent lors de la phase stationnaire, indépendamment du rapport avec l'hôte.

2. Fonctionnement du système Gac (Figure 4)

L'activation du système Gac commence par un signal inconnu venu de l'extérieur, mais qui est produit par la bactérie (Kay *et al*, 2005, Dubuis and Haas, 2007). Ce signal entraîne la phosphorylation du détecteur GacS. Le phosphate impliqué dans cette phosphorylation est dans un deuxième temps transféré au régulateur GacA. Ensuite, la protéine GacA phosphorylée se fixe en amont du gène dans la région promotrice de gènes codant des petits ARNs ; la liaison se produit au niveau de régions particulières appelées « boîtes GacA ». Les petits ARNs synthétisés permettent l'expression des gènes qui étaient réprimés par la protéine qui s'appelle RsmA chez *Pseudomonas*, CsrA chez *E. coli*. Les protéines RsmA ou CsrA interagissent avec l'ARN messager de différents gènes cibles, à proximité de la séquence Shine-Dalgarno impliquée dans l'initiation de la traduction. Les petits ARNs séquestrent les protéines RsmA ou CsrA permettant ainsi la traduction des gènes régulés par système Gac. On imagine que les petits ARNs exercent un rétro-contrôle sur leur propre synthèse afin d'arrêter le système Gac (Heeb *et al*, 2002).

La bactérie qui a une mutation complète de ces petits ARNs a le même phénotype que celui du mutant *gacA* ; on peut donc dire que le système Gac induit principalement l'expression des petits ARNs.

3. Les petits ARNs

La taille de ces petits ARNs varie de 100 à 479 nucléotides. Ils possèdent plusieurs motifs GGA en commun qui ne sont pas appariés dans une structure double-brin. Ces motifs sont situés sur les boucles ou entre les tiges des structures tige-boucle (Babitzke and Romeo, 2007).

Ils font partie d'un motif plus grand, ANGGA ou AGGA où N est un des 4 nucléotides.

Ces petits ARNs ont été dénommés *rsmX*, *rsmY*, *rsmZ* chez *Pseudomonas*, *csrB*, *csrC* chez les entérobactéries, *rsmB* chez *Erwinia carotovora*. Mais on ne sait pas encore clairement s'ils ont des ancêtres communs ou non, même s'ils exercent une activité similaire.

L'annotation du génome laissait supposer qu'il existait deux petits ARNs : *rsmY* (Figure 5) et *rsmZ* (Figure 6) chez *Pe* qui participent au fonctionnement du système Gac. Dans ce travail, nous avons prouvé que c'était effectivement le cas, car un mutant dépourvu de ces deux petits ARNs présente le même phénotype qu'un mutant *gacA*.

La séquence consensus de boîte GacA chez *Pseudomonas* est :

'TGTAAGN6CTTACA'

La séquence de la boîte GacA du gène *rsmY* chez *Pe* est :

TGTAAGCATTCTCCTACA

Elle se trouve à 58pb-75pbs en amont du gène *rsmY*.

La séquence de la boîte GacA du gène *rsmZ* chez *Pe* est :

TGTAAGCATTCACTTACA

Elle se trouve à 174pb-191pbs en amont du gène *rsmZ*.

4. Protéine répresseur RsmA / CsrA

La protéine RsmA / CsrA est bien conservée tandis que les petits ARNs peuvent être classés en plusieurs familles. La taille de RsmA / CsrA monomérique est de 7kDa, et la protéine se présente sous forme de dimère en solution (Dubey *et al.*, 2003). Chaque monomère comprend cinq feuillets- β et une hélice- α dans la région C-terminale (Heeb *et al.*, 2006). L'analyse par une substitution d'alanine dans la protéine CsrA chez *E. coli* montre que les feuillets- β -1 et α -5 sont importants pour la fixation de la protéine CsrA sur l'ARN messager (Mercante *et al.*, 2006).

Chez les *Pseudomonas*, HCN est une toxine bactérienne. L'expression des gènes *hcnABC*, impliqués dans sa synthèse, est régulée par système Gac (Blumer *et al.*, 1999). La région 5' non traduite de l'ARN messager de *hcnA* adopte deux formes différentes (Figure 7). L'initiation de la traduction est favorisée lorsque la séquence Shine-Dalgarno (caractères en gras sur la figure) est libre pour s'apparier avec l'extrémité 3' de l'ARN ribosomique 16S dans la sous-unité ribosomique 30S. La fixation de RsmA/RsmE (RsmE est homologue de RsmA chez *P. fluorescens*) sur le motif GGA (caractères en gras) situé dans la région de liaison du ribosome et sur la séquence située en amont (non visible sur la figure) de ce motif entraîne un changement de configuration qui empêche l'accès au ribosome et donc la traduction. (Le codon initiateur AUG est en caractères en gras).

L'analyse de mutations affectant *rsmY* (Valverde *et al.*, 2004) ou la région 5' non traduite (5' UTR pour UnTranslated Region) de l'ARN messager spécifiant de l'ARN messager de *hcnA* (Lapouge *et al.*, 2007) a montré que ces deux ARNs ont des contacts critiques avec la protéine RsmE. Le petit ARN *rsmY* a six motifs GGA non appariés et constitue quatre complexes différents avec RsmE. La région 5' UTR de l'ARN messager de *hcnA* a cinq motifs GGA. Tous les motifs contribuent à la régulation par les petits ARNs, RsmA/RsmE in vivo. RsmE forme au moins trois complexes distincts avec la région 5'UTR de l'ARN messager in vitro (Lapouge *et al.*, 2007). La mutation ponctuelle des nucléotides conservés dans la région 5'UTR de l'ARN messager diminue fortement le contrôle de l'expression de *hcnA*, par les protéines RsmA et RsmE. L'interaction entre RsmA/RsmE et la séquence Shine-Dalgarno sur l'ARN messager empêche l'initiation de la traduction. Les petits ARNs

libèrent les protéines RsmA/ RsmE fixées sur l'ARN messenger grâce à ses nombreux motifs GGA reconnus par ces protéines.

5. Structure du complexe ARN messenger/ Protéine répresseur (Figure 8)

La structure du complexe formé par RsmE lié à un fragment de 12 nucléotides de la région 5'UTR de l'ARN messenger du gène *hcnA* chez *P. fluorescens* a été déterminée par la méthode de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Schubert *et al.*, 2007). Le dimère RsmE se fixe sur deux molécules de l'ARN. RsmE crée deux contacts avec l'ARN messenger au bord de deux feuillets β : un du côté du feuillet β -1 d'un monomère, et l'autre du côté du feuillet β -5 de l'autre monomère. L'arrêt de l'initiation de la traduction provoque la dégradation de l'ARN messenger chez *E.coli* (Kaberdin *et al.*, 2006). L'ARN messenger est plus susceptible aux dégradations quand la protéine RsmA/CsrA s'est fixée sur lui, et est plus stable en l'absence de RsmA/CsrA.

V. Les différents modèles d'infections

1. Etude de la persistance d'*Erwinia carotovora carotovora*15 (*Ecc15*)

Les bactéries *Erwinia carotovora carotovora* sont des entérobactériacées phytopathogènes. Elles sont capables de synthétiser toute une batterie d'enzymes pectinolytiques qui sont responsables de la pourriture molle des fruits et légumes ainsi que de la maladie de la jambe noire chez les pommes de terre (Agrios,1997). La bactérie *Ecc15* avait été identifiée par Bruno Lemaitre pour sa capacité à induire une réponse immunitaire chez la drosophile. Après ingestion, la bactérie persiste dans la larve de drosophile. Cette dernière produit les AMPs diptéricine et drosomycine par activation de la réponse immunitaire systémique et locale. (Basset *et al.*, 2000). Grâce à un crible, on a isolé les gènes bactériens indispensables à l'interaction avec la drosophile (Basset *et al.*, 2003). Parmi les gènes impliqués, le gène *evf* (pour *Erwinia* virulence factor) joue un rôle particulier. Le mutant du gène *evf* n'induit pas l'expression d'AMPs et ne persiste pas dans la larve de drosophile. Le transfert de ce gène dans les différentes bactéries à Gram négatif induit l'expression d'AMPs chez la larve de drosophile. La présence du gène *evf* suffit donc pour qu'il y ait interaction spécifique entre la larve de drosophile et les bactéries à Gram négatif. La surexpression de ce gène dans *Ecc15* augmente la colonisation et provoque la mort de la larve de drosophile (Basset *et al.*, 2003).

Lorsqu'on injecte directement *Ecc15* dans l'hémocèle de la larve ou de l'adulte, il n'y a pas de mortalité apparente. Donc la mortalité causée par la surexpression du gène *evf* après ingestion est liée à la persistance des bactéries dans l'intestin de la drosophile. Le mucus de l'intestin qui protège les épithélia digestifs disparaît entre 2h30 et 6h après l'infection, ce qui démontre une perturbation profonde de l'intestin. La manière dont *Evf* promeut la persistance de la bactérie n'implique pas une action contre les AMPs, puisque un mutant *evf* d'*Ecc15* ne persiste pas chez un mutant *Imd* qui n'exprime pas les AMPs. La protéine *Evf* n'a pas d'action contre les espèces moléculaires dérivés de l'oxygène, ni contre un stress acide, ni contre un stress alcalin, ni contre un stress éthanol, ni contre un choc osmotique et ni contre un traitement par la trypsine ou le lysozyme (Acosta *et al.*, 2007). L'action exacte d'*Evf* n'a pas encore été découverte.

2. Etude de la persistance de *Pseudomonas entomophila*

La bactérie *Pe* a la capacité d'induire chez la drosophile l'expression des gènes AMPs après infection de larves ou d'adultes. L'expression des AMPs, diptéricines apparaît 3h après ingestion et le niveau maximal est obtenu 12 heures après l'infection. On observe que les AMPs sont produits par les deux réponses systémique et locale. Grâce à l'expérience qui avait pour but l'étude de la virulence de *Pe*, on a constaté que plus de 80% des drosophiles avaient succombé à l'infection après 16 heures. L'infection par *Pe* induit la mélanisation de l'intestin. L'étude histologique de l'intestin montre que le mucus intestinal a disparu. Cette analyse histologique montre aussi l'extrusion du matériel cellulaire vers la lumière intestinale et que les microvillosités sont anormales. L'infection par *Pe* modifie profondément la physiologie de l'intestin, en particulier, 12 heures après l'infection. Par contre, la matrice péritrophique, qui agit comme une barrière et qui prévient l'entrée des grosses molécules comme des microorganismes est toujours présente. On observe donc de grandes perturbations au niveau des cellules intestinales de la drosophile après infection par *Pe*.

Des mutants du système Gac ont été obtenus ; ils n'induisent plus la réponse immunitaire et ne sont plus pathogènes pour la drosophile. Ceci montre que la virulence de *Pe* est sous le contrôle du système à deux composants GacS/GacA. L'infection de la drosophile par *Pe* module l'expression de 205 gènes de la drosophile. Plus de 90% de ces gènes sont induits après 12 heures d'infection et ces gènes pourraient être associés à l'altération de la physiologie de l'intestin. Parmi ces gènes spécifiques affectés par l'infection de *Pe*, plus de la moitié sont divisés en six groupes fonctionnels; des inhibiteurs de sérine-protéase, des enzymes impliqués dans la détoxification et dans les réponses aux stress des enzymes du métabolisme général, des enzymes de transcription et de maturation des protéines, des protéines du cytosquelette, des protéines impliquées dans la transduction du signal. Mais les plupart de drosophile sont déjà mortes 16 heures après l'infection, il semble que les produits de ces gènes ne font pas grand rôle dans la pathogénécité de *Pe*.

Il semble que la persistance de *Pe* dans l'intestin soit l'étape cruciale pour déclencher l'activation de la réponse immunitaire systémique.

L'ensemble de ces résultats ont été présentés dans l'article de Vodovar et collaborateurs: *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species (2005).

L'interaction entre la bactérie *Pe* et la drosophile est spécifique. La drosophile infectée par *Pe* meurt rapidement malgré la réponse immunitaire locale et systémique. Ceci montre que *Pe* a développé une stratégie qui lui permet d'échapper de la réponse immunitaire de la drosophile. Normalement, les bactéries sécrètent des toxines et des facteurs de virulence qui peuvent causer des dommages à leurs hôtes. Pour identifier la stratégie utilisée par *Pe* et caractériser les facteurs de virulence impliqués, les collaborateurs de B. Lemaitre ont analysé le surnageant des cultures liquides de *Pe*, qui est très concentré. L'infection avec le surnageant montre une mortalité même si celle-ci est modérée par rapport à l'infection par *Pe*, 40% des larves de drosophile meurent 24 heures après l'infection naturelle du surnageant, plus de 90% des drosophiles adultes meurent après l'infection septique du surnageant. Le liquide surnageant est toxique pour la drosophile. L'infection avec le surnageant de mutants *gac* ne provoque pas de létalité chez la drosophile ; ceci démontre que la virulence est liée au système Gac. Grâce à l'analyse des protéines du surnageant, une protéine de 51kDa abondante dans la souche sauvage mais absente chez le mutant *gac* a pu être identifiée comme un facteur potentiel responsable de la toxicité de *Pe*. Des tests d'activité de protéase ont montré que le mutant *gac* n'a pas d'activité protéase. La protéine de 51 kDa est une métallo-protéase. Cette protéine a été nommée AprA. L'injection d'AprA pure dans l'hémocèle tue rapidement les drosophiles adultes. Donc cette protéine se comporte comme une toxine bactérienne. La mutation du gène *aprA* a pour effet d'atténuer la virulence de *Pe* puisque la mortalité de la drosophile est réduite. Le mutant *aprA* complétement avec le plasmide qui sur-exprime le gène *aprA* récupère une virulence semblable à celle du sauvage. La numération de bactéries après infection montre que le mutant *aprA* persiste moins que le sauvage mais le nombre du mutant *aprA* reste assez élevé (48h après infection : sauvage; 10^6 , mutant *aprA* 10^4 , mutant *gac* 10^1). De plus, le mutant *aprA* provoque une cessation d'ingestion de nourriture par la drosophile et déclenche la réponse immunitaire comme la souche sauvage alors que le mutant *gac* ne provoque aucun de ces processus. Le mutant *aprA* ne perd donc pas sa persistance dans l'intestin de la drosophile. Même si AprA est un facteur de

virulence important qui permet la persistance dans l'hôte et qui le tue, ces résultats démontrent qu'il doit donc exister d'autres facteurs de virulence qui n'ont pas encore été identifiés. Le mutant *aprA* survit chez un mutant de drosophile affecté dans la voie Imd qui ne produit plus d'AMPs. La surexpression de la voie Imd de drosophile 12 heures avant infection par *Pe* protège fortement la drosophile. Le nombre du mutant *aprA* diminue plus rapidement, comparé à celui du sauvage. Ceci démontre le rôle d'AprA qui neutralise l'action des AMPs. La drosophile infectée préalablement par *Ecc15* par la voie orale est protégée significativement contre l'infection de *Pe*. L'infection orale induit la réponse locale et systémique. Mais dans le cas de l'infection septique préalable par *Ecc15* qui induit la réponse systémique, la drosophile n'est pas protégée contre l'infection par *Pe*. Ceci montre que la réponse systémique ne contribue pas à la défense contre l'infection par *Pe*, mais la réponse locale, elle, y contribue.

Ces résultats ont été décrits par Peter Liehl et ses collaborateurs : Prevalence of Local Immune Response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* Infection Model (2006).

VI. Facteur sigma RpoS

1. RpoS, face aux stress

Le facteur sigma est la partie de la polymérase d'ARN qui reconnaît la région promoteur des gènes et recrute la polymérase d'ARN pour initier leur transcription. Les facteurs sigma dits « domestiques », comme sigma70, contrôlent la transcription des gènes essentiels, alors que les facteurs sigma dits « alternatifs » contrôlent l'expression de gènes spécifiques. Il y a plusieurs facteurs de sigma alternatifs chez les bactéries, qui permettent de répondre aux changements environnementaux ou aux changements physiologiques. En effet, dans l'environnement naturel, les bactéries sont continuellement exposées à différents stress : changements dans les nutriments, chocs osmotiques, oxydatifs, acides, changements de température, etc. Différents facteurs sigma alternatifs permettent l'expression de gènes spécifiquement nécessaire à la survie lorsque les bactéries sont soumises à ces stress.

Un exemple de ces facteurs sigma alternatifs, RpoS, permet l'adaptation à la phase stationnaire (Dong et Schellhorn, 2010). Le terme « phase stationnaire » définit l'état physiologique de cessation de la multiplication bactérienne, liée le plus souvent en laboratoire à l'épuisement des nutriments dans le milieu de croissance, mais qui peut aussi être due à d'autres facteurs stressants environnementaux. Le résultat est un grand changement dans l'expression des gènes, grâce à RpoS.

La régulation de RpoS en elle-même a lieu à plusieurs niveaux et est complexe : elle se passe au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, ainsi qu'au niveau de la stabilité de la protéine RpoS.

2. Rôle de RpoS dans la virulence

De façon remarquable, RpoS a aussi été identifié comme jouant un rôle dans la virulence chez certaines bactéries. Ce rôle est cependant variable, même entre des

espèces proches. Par exemple, RpoS est impliqué dans la virulence chez *Salmonella enterice*, *Vibrio cholerae*, *Burkholderia plantarii*, et *Serratia entomophila*, mais le rôle de RpoS dans la virulence est moins important chez d'autres bactéries pathogènes (Dong et Schellhorn, 2010). Plus particulièrement, chez *Pseudomonas aeruginosa*, RpoS joue un rôle crucial pour survivre à un choc osmotique, à un choc de température et au stress oxydatif. Mais l'effet sur les facteurs de virulence est variable dans cet organisme. En effet, RpoS régule positivement la production de certains facteurs de virulence comme l'exotoxine A, l'alginate et les protéases LasA et LasB. Mais au contraire, la production de pyocyanine, un autre facteur de virulence, est augmentée dans le mutant *rpoS*. Il semble aussi que RpoS est nécessaire à la motilité liée aux pili de type IV, qui joue un rôle dans la pathogénicité de cet organisme (Suh *et al.*, 1999).

D'autre part, RpoS semble jouer un rôle dans la virulence de certaines bactéries vis-à-vis des insectes : par exemple, chez *Serratia entomophila*, une bactérie entomopathogène, RpoS régule l'expression du gène *anfA1* qui code un facteur de virulence important pendant le développement de l'infection chez la larve (Giddens *et al.*, 2000). Chez *Xenorhabdus nematophilus*, un autre entomopathogène, RpoS est nécessaire pour la colonisation du nématode *Steinernema carpocapsae*. C'est ce nématode qui permet l'introduction de *Xenorhabdus* dans l'insecte. RpoS n'est cependant pas nécessaire à la pathogénicité proprement dite (Vivas, *et al.*, 2001).

3. RpoS et système Gac

RpoS et le système Gac sont tous les deux actifs pendant la phase stationnaire, et il a été observé que ces deux systèmes peuvent parfois s'influencer l'un et l'autre.

Par exemple, chez *E. coli*, BarA est le senseur kinase et UvrY est le récepteur du système à deux composants équivalent au système Gac chez *Pe*. On observe qu'il y a une réduction de la quantité d'ARN messagers de *rpoS* et de protéine RpoS dans le mutant *barA* (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). Par contre, dans le mutant *uvrY*,

l'expression des gènes régulés par RpoS augmente, et ceci est dû à l'augmentation de la synthèse de RpoS (Oshima *et al.*, 2002). Donc, BarA et le UvrY contrôlent de façon contraire l'expression de *rpoS*.: BarA positivement, UvrY négativement.

Chez *Pseudomonas fluorescens Pf-5*, le système Gac influence la transcription et l'accumulation de RpoS (Whistler *et al.*, 1998). Il y a trois fois plus de transcription de *rpoS* à l'entrée de la phase stationnaire que pendant la phase exponentielle dans la souche sauvage, mais dans le mutant *gac*, l'induction de la transcription de *rpoS* se fait plus progressivement et moins fortement. L'accumulation de RpoS chez le mutant *gac* n'est que de 20% de celui du sauvage. Donc le système Gac contrôle positivement la synthèse de RpoS de cet organisme (Heeb *et al.*, 2005). Chez *P. aeruginosa*, le système Gac contrôle positivement la production de N-butyryl-homoserine lactone (C4-HSL). Ce dernier est l'un des deux homoserine lactone qui sont des auto-inducteurs de quorum sensing (un mécanisme par lequel les bactéries évaluent leur densité de population, qui leur permet d'adopter de nouveaux comportements) (Reimann *et al.*, 1997). C4-HSL, quorum sensing molécule, est impliqué dans l'activation de la transcription de *rpoS* et ce dernier est réciproquement impliqué dans l'activation de C4-HSL (Whiteley *et al.*, 2000).

4. Objectives de l'expérience

Le fait que le système Gac et RpoS sont des systèmes régulateurs actifs durant la phase stationnaire et se contrôlent mutuellement, est observé dans certaines bactéries. Nous voulons connaître le lien de régulation entre le système Gac et le RpoS chez *Pe*, la bactérie nouvellement identifiée, et savoir si RpoS est impliqué dans la virulence.

VII. Objectif du projet

Pseudomonas entomophila a été découverte dans l'étude du système immunitaire de la drosophile. En démontrant sa virulence envers plusieurs insectes, son caractère particulier entomopathogène a été révélé. Cette souche est très pathogène chez la drosophile car il tue rapidement la larve et l'adulte après ingestion. Il semble que *Pe* ait sélectionné des systèmes particuliers pour manifester sa virulence chez les insectes. Grâce à l'expérience de l'infection de la drosophile par le surnageant de culture de *Pe*, on a découvert que la métallo-protéine AprA est un facteur de virulence important. Cependant le mutant *aprA* peut persister dans l'intestin de la drosophile et provoque toujours une réponse immunitaire et une cessation d'ingestion de nourriture chez la drosophile. La bactérie *Pe* doit donc posséder d'autres facteurs de virulence qui lui permettent de persister et de provoquer des dommages à la drosophile. La synthèse de ces facteurs est supposée d'être contrôlée par le système Gac puisque la virulence de *Pe* est complètement abolie par des mutations du système Gac. Le but de ce projet était de disséquer le fonctionnement du système Gac de *Pe*, afin d'identifier des gènes régulés par ce système et qui sont en même temps impliqués dans la virulence surtout dans la persistance de *Pe*.

BIBLIOGRAPHIE

Acosta Muniz C., Jaillard D., Lemaitre B., Boccard F., (2007). *Erwinia carotovora* Evf antagonizes the elimination of bacteria in the gut of *Drosophila* larvae. *Cell Microbio*, 9,106-119.

Agrios G.A., (1997). Plant pathology, New York.

Babitzke P. and Romeo T., (2007). CsrB sRNA family : sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol*, 10, 156–163.

Basset A., Khush RS., Braun A., Gardan L., Boccard F., Hoffmann JA., Lemaitre B., (2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mar 28, 97(7), 3376-81.

Basset A., Tzou P., Lemaitre B., Boccard F., (2003). A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its insect vector, *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep*, 4, 205–209.

Blumer C., Heeb S., Pessi G., Haas D., (1999). Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 14073-14078.

Boman H.G., Nilsson I., Rasmuson B., (1972). Inducible antibacterial defense system in *Drosophila*. *Nature*, 237, 232–35.

Butler S.M., Festa R.A., Pearce M.J., Darwin K.H., (2006). Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol. Microbiol*, 60, 553–562.

Casadevall A. and Pirofski L., (2000). The basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection and disease. *Infect Immun*, 68, 6511-8.

Dethlefsen L., Eckburg P.B., Bik E.M., Relman D.A., (2006). Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol*, 21(9), 517-23.

Dong T., Schellhorn HE., (2010). Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect*

Immun, 78(3), 887-97.

Dubey A.K., Baker C.S., Suzuki K., Jones A.D., Pandit P., Romeo T., Babitzke P., (2003). CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J Bacteriol*, 185, 4450–4460.

Dubuis, C. and Haas D., (2007). Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*, 73, 650–654.

Falkow S., (2004). Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity-- a personal recollection 15 years later. *Nat Rev Microbiol*, 2, 67-72.

Giddens, S.R., Tormo A., Mahanty H.K., (2000). Expression of the antifeeding gene *anfA1* in *Serratia entomophila* requires *rpoS*. *Appl. Environ. Microbiol*, 66, 1711–1714.

Gooderham W.J., Hancock R.E., (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*, 33, 279–294.

Goodier R.I. and Ahmer B.M., (2001). SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol*, 183, 2249-2258.

Haas, D., Blumer, C., Keel, C., (2000). Biocontrol ability do *fluorescent pseudomonads* genetically dissected; Importance of positive feedback regulation. *Curr. Opin Biotechnol*, 11, 290-297.

Heeb S., Blumer C., Haas D., (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 184, 1046–1056.

Heeb S., Valverde C., Gigot-Bonnefoy C., D. Haas. (2005). Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett*, 243, 251-258.

Heeb S., Kuehne S.A., Bycroft M., Crivii S., Allen M.D., Haas D., Cámara M, Williams P., (2006). Functional analysis of the posttranscriptional regulator RsmA reveals a novel RNA binding site. *J Mol Biol*, 355, 1026–1036.

Hengge-Aronis R., (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3), 373-95.

Hrabak E. M. and Willis D.K., (1992). The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J Bacteriol*, 174, 3011-3020.

Jander G., Rahme L.G., Ausubel F.M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*, 182, 3843-3845.

Johnston C., Pegues D.A., Hueck C.J., Lee A., Miller S.I., (1996). Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol*, 22, 715-727.

Kaberlin V.R., Bläsi U., (2006). Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol Rev*, 30: 967–979.

Kay E., Dubuis C., Haas D., (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 17136–17141.

Lapouge K., Sineva E., Lindell M., Starke K., Baker C.S., Babitzke P., Haas D., (2007). Mechanism of *hcnA* mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Microbiol*, 66,341–356.

Lapouge K., Schubert M., Allain F.H., Haas D., (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol*, 67, 241–253.

Laville J., Voisard C., Keel C., Maurhofer M., Défago G., Haas D., (1992). Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1562-1566.

Leulier F., Parquet C., Pili-Floury S., Ryu J.H., Caroff M., Lee W.J., Mengin-Lecreulx D., Lemaitre B., (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol*, 4, 478–84.

Lucas R.L., Lostroh C.P., DiRusso C.C., Spector M.P., Wanner B.L., Lee C. A., (2000). Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol*, 182, 1872-1882.

Mercante J., Suzuki K., Cheng X., Babitzke P., Romeo T., (2006). Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *J Biol Chem*, 281, 31832–31842.

Miller, J., (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, p. 352-355, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Mukhopadhyay S., Audia J.P., Roy R.N., Schellhorn H.E., (2000). Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol Microbiol*, 37(2), 371-381.

Mutch D.M., Simmering R., Donnicola D., Fotopoulos G., Holzwarth J.A., Williamson G., Corthésy-Theulaz I., (2004). Impact of commensal microbiota on murine gastrointestinal tract gene ontologies. *Physiol Genomics*, 19(1), 22-31.

Natsch A., Keel C., Pfirter H.A., Haas D., Défago G., (1994). Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain *CHA0* introduced into soil microcosms. *Appl. Environ Microbiol*, 60, 2553-2560.

Oshima T., Aiba H., Masuda Y., Kanaya S., Sugiura M., Wanner B.L., Mori H., Mizuno T., (2002). Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 46, 281–291.

Pernestig A.K., Melefors O., Georgellis D., (2001). Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 276, 225-23.

Pessi G., Haas D., (2001). Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS (Fed Eur Microbiol Soc) Microbio. Lett*, 200, 73-78.

Peter Liehl, Mark Blight, Nicolas Vodovar, Frédéric Boccard, Bruno Lemaitre, (2006). Prevalence of Local Immune Response against Oral Infection in a *Drosophila/Pseudomonas* Infection. *Model PLoS Pathogens* 2(6), e56.

Pirofski LA., Casadevall A., (2008). *Adv Exp Med Biol*, 635, 135-46.

Rahme L.G., Tan M.W., Le L., Wong S. M., Tompkins R.G., Calderwood S.B., Ausubel F.M., (1997). Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 13245-13250.

Reimann C., Beyeler M., Latifi A., Winteler H., Foglino M., Lazdunski A., Haas D., (1997). The global activator *gacA* of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol*, 24, 309-319.

Rich J.J., Kinscherf T.G., Kitten T., Willis D.K., (1994). Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol*, 176, 7468-7475.

Schubert M., Lapouge K., Duss O., Oberstrass F.C., Jelesarov I., Haas D., Allain F.H.-T., (2007). Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 807–813.

Suh S.J., Silo-Suh L., Woods D.E., Hassett D.J., West S.E., Ohman D.E., (1999). Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 181, 3890-3897.

Suh, S.J., Silo-Suh L., Ohman D.E., (2004). Development of tools for the genetic manipulation of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods*, 58, 203-212.

Tan M.W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G., Ausubel F. M., (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 2408-2413.

Vallet-Gely, Lemaitre B., Boccard F., (2008). Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev Microbiol* , doi,10.1038 /nrmicro1870.

Valverde C., Lindell M., Wagner E.G.H., Haas D., (2004). A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator *RsmY* of *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*, 279, 25066–25074.

Vivas E. I., Goodrich-Blair H., (2001). *Xenorhabdus nematophilus* as a model for host-bacterium interactions: *rpoS* is necessary for mutualism with nematodes. *J. Bacteriol*, 183, 4687–4693.

Vodovar N., Vinals M., Liehl P., Basset A., Degrouard J., Spellman P., Boccard F., Lemaitre B., (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 11414–11419.

Vodovar N., Vallenet D., Cruveiller S., Rouy Z., Barbe V., Acosta C., Cattolico L., Jubin C., Lajus A., Segurens B., Vacherie B., Wincker P., Weissenbach J., Lemaitre B., Medigue C., Boccard F. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol*, 24, 673-679.

Whistler C.A., Corbell N.A., Sarniguet A., Ream W., Loper J.E., (1998). The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor σ_S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens Pf-5*. *J Bacteriol* , 180, 6635-6641.

Whiteley M., Parsek M.R., Greenberg E.P., (2000). Regulation of quorum sensing

by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 82(15), 4356-60.

Willis D.K., Holmstadt J.J., Kinscherf T.G., (2001). Genetic evidence that loss of virulence associated with *gacS* or *gacA* mutations in *Pseudomonas syringae* B728a does not result from effects on alginate production. *Appl. Environ. Microbiol*, 67, 1400-1403.

Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K.C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas J.R., Randell S., Boucher R.C., Doring G. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest* 109, 317–325.