



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Caractérisation du système à deux composants PrlS et PrlR de <i>Brucella melitensis</i>

Dissertation présentée par
Rosse Mary Yañez Villanueva
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Pr. Jean-Jacques Letesson (Promoteur, FUNDP, Namur)

Pr. Xavier De Bolle (FUNDP, Namur)

Pr. Martine Raes (FUNDP, Namur)

Pr. Michal Svoboda (ULB, Bruxelles)

Dr. David Fretin (C.E.R.V.A., Bruxelles)

© Auto-édité par [Rosse Mary Yañez Villanueva](#)
Janvier 2010
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences,
Département de Biologie
Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgique

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences,
Département de Biologie
Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgique

Caractérisation du système à deux composants PrlS et PrlR de *Brucella melitensis*

Par Rosse Mary Yañez Villanueva

RÉSUMÉ

Le système de transduction de signal à deux composants (SDC) PrlS/PrlR est très conservé en séquences et organisation génomique dans les espèces de *Brucella*, mais sa fonction est complètement inconnue. Les SDC régulent l'expression génique en réponse à des signaux environnementaux externes ou internes. Lors de ce travail, nous avons caractérisé des mutants du SDC PrlS/PrlR du pathogène bactérien *Brucella melitensis*, démontrant que ceux-ci perdent la capacité de la souche sauvage à produire des agrégats en conditions de haute osmolarité. Nous avons observé que la matrice des agrégats produits par *B. melitensis* contient de l'exopolysaccharide (EPS) et que PrlR régule positivement la production et la synthèse d'EPS. Par après, nous avons investigué le rôle que PrlR pourrait exercer sur les structures de surface comme le flagelle et les protéines de membrane externe et ce en étudiant la régulation du promoteur *pflF* chez les mutants de PrlR. Nos résultats suggèrent que *prlR* pourrait jouer un rôle dans la régulation de système flagellaire et de certains OMPs. Nous avons également montré qu'un mutant de *prlR* de *B. melitensis* est moins virulent que la souche sauvage, ce qui suggère que PrlR puisse jouer un rôle important dans la virulence. Pour terminer, l'analyse transcriptomique préliminaire comparative des profils d'ARNm de la sauvage et d'un mutant *prlR* suggère que PrlR régule approximativement 6.41% du génome de *B. melitensis*.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences,
Département de Biologie
Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgium

Characterization of the PrlS/PrlR two component system in *Brucella melitensis*

By Rosse Mary Yañez Villanueva

SUMMARY

The PrlS/PrlR two component signal transduction system (TCS) is highly conserved in sequence and genomic organization in *Brucella* species, but its function remains completely unknown. TCS regulate genetic expression in response to external or internal environmental signals. In this work PrlS/PrlR mutants were characterized with results suggesting that wt *B. melitensis* produces aggregates at high osmolarity, contrary to the mutants of the bacterial pathogen *Brucella melitensis*. Interestingly it could be observed that the matrix of this aggregates contain EPS and that PrlR regulates positively the synthesis and production of EPS. We further investigated the role of *prlR* on membrane structures such as the flagellum and outer membrane proteins, by studying the regulation of the *pflfF* promoter in the mutants. Our results suggest that *prlR* controls both the flagellar system and the regulation of OMPs. *B. melitensis* mutated for *prlR* is less virulent compared to the wt suggesting that PrlR may play an important role in virulence. Preliminary transcriptomic comparative analysis of the mRNA profiles of mutant and wild type *prlR* strains suggests that PrlR regulates approximately 6.41 % of the *B. melitensis* genome.

Le silence est la plus haute sagesse d'homme.

Pindare

La science dit : « Nous devons vivre » et chercher le moyen de prolonger, approfondir, faciliter et amplifier la vie, de la rendre tolérable et acceptable. La sagesse dit nous devons mourir et chercher comment nous faire bien mourir.

Miguel de Hunamuno

Dédié à ma fille et à ma mère

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein de l'Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (URBM la bien nommée, aux Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix) dirigée par le Professeur Jean-Jacques Letesson. Je souhaite tout spécialement lui témoigner ma gratitude, à lui, le grand chef, à qui je dois en premier lieu d'avoir eu l'opportunité de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci de m'avoir accueillie pendant ces années au sein de ton laboratoire et pour avoir accepté de me transmettre un peu de ton savoir. Merci pour ta disponibilité. Tu m'as apporté tes conseils. Je suis très heureuse d'avoir pu bénéficier de ton encadrement et merci pour tout ce que cela m'apportera pour la suite. Je te remercie également pour la liberté que tu nous laisses dans notre travail et le temps que tu passes à essayer de nous donner les moyens de réaliser nos envies. Merci aussi pour ton soutien dans mes choix personnels.

Je tiens également à remercier chaleureusement le Professeur Xavier de Bolle pour avoir eu tant de patience, pour son aide et pour m'avoir « tolérée » tout le long de cette thèse.

Un vif merci à l'ensemble des membres du Jury, le Professeur Jean-Jacques Letesson, le Professeur Xavier de Bolle, Madame le Professeur Martine Raes, le Professeur Michal Svoboda et le Docteur David Fretin qui ont si gentiment accepté de consacrer leur temps avec un regard critique à l'évaluation, la relecture et la correction de ce travail.

Je voudrais remercier très spécialement la Commission Universitaire pour le Développement (CUD-Ciuf) et l'Université Mayor de San Simon Cochabamba-Bolivie de m'avoir octroyé une bourse durant ces 4 ans, ce qui m'a permis de réaliser mon travail de thèse de doctorat et je voudrais également remercier ses représentants : le Professeur Martine Raes, le Professeur Michal Svoboda, le Professeur Carine Truyens et Madame Laurence Vieslet.

J'ai bénéficié au cours de ces années d'un très bon encadrement et ce spécialement de Sophie Bonnot et de Rose-Marie Delrue qui ont si gentiment pris la peine et le temps de me guider ce qui m'a véritablement aidée. Cela n'a certainement pas été facile au début vu que je n'avais pas d'expérience dans le cadre de la recherche en microbiologie moléculaire. Merci pour tout, pour l'aide et les nombreux conseils.

Je dois un très grand merci à Monique Cornez pour les corrections orthographiques de cette thèse et pour m'avoir consacré son temps ainsi que pour la super amitié qui s'est épanouie pendant plus de 4 ans. Je n'oublierai jamais tout ce que je te dois, avec tes conseils et ton soutien inconditionnel.

Mes remerciements les plus vifs à Richard, pour l'amitié que nous partageons, ta bonne humeur, ton soutien, ta sincérité, les apéros du vendredi soir et tes blagues qui ont beaucoup contribué à mettre une ambiance chaleureuse. Je n'oublierai pas les grands moments de confidences et de fous rires que nous avons eus.

Merci à Bernard Nkengfac, cela n'a pas été facile pour nous deux, loin de notre famille, mais durant tout ce temps nous nous sommes donné le courage pour l'avancement de notre travail.

Merci à Julien Lemaire pour sa gentillesse et pour l'aide qu'il m'a apportée dans mes manip (expériences de RT-PCR et extraction d'ARN totaux). Tu as donné à mon séjour le goût d'une

véritable amitié. Merci à Aurélie Mirabella pour avoir continué quelques manip pendant mon voyage « d'urgence » dans mon pays et nos discussions au labo. Je te souhaite une bonne continuation.

Je remercie également le Docteur Damien Hermand, le Professeur Vandenhoute, le Professeur Eric Depiereux, le Professeur Jean-Yves Matroule, pour leurs bonnes idées et l'aide qu'ils m'ont apportée.

Il y a aussi de nombreuses autres personnes qui ont beaucoup compté durant ces années....

Je voudrais aussi remercier Matthieu Terwagne et Marie-Alice Vitry mes chouettes voisins de paillasse et de bureau pendant ces années, avec vous j'ai partagé la bonne humeur. Je vous souhaite une bonne continuation.

Merci à Isabelle Housen pour les moments vécus lorsque nous partagions le même bureau et ceci pendant un long moment. Je te remercie également pour tes conseils pour la construction de plasmides.

Merci à Christian Didembourg pour l'aide technique qu'il m'a apportée. Merci à Etienne Pirotte pour avoir résolu mes problèmes « existentiels » d'ordinateur et pour sa disponibilité. Merci à Rose-Marie Génicot et Monique Dewey pour votre disponibilité pendant ces années.

Un grand merci à Johann Mignolet et Charles Van der Henst, pour l'aide dans mes constructions sur Vector NTI et pour m'avoir facilité ma vie quotidienne de chercheur. Un tout grand merci à Thierry Laurent pour l'aide inconditionnelle que tu m'as toujours apportée.

Merci aussi aux services extérieurs à URBM pour leur collaboration : Guy à l'animalerie pour l'immunisation des lapins, l'URBC pour l'accès au microscope confocal. Grand merci aussi à l'équipe en chimie : Johan Wouters, Jenny Pouyez, Catherine Michaux et d'autres membres de l'équipe.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire, à qui je dois l'ambiance sympathique dans laquelle j'ai travaillé pendant plus de quatre années. Merci à l'équipe *Brucella* pour tous les échanges fructueux: Régis Halez, Marie Godefroid, Caroline Nijskens, Alexandre Jamet, Nicolas Trincherro, Jonathan Ferroz, Delphine Dotreppe, Isabelle Danèse, Marie Dozot, Géraldine Laloux, Cécile Nicolas, Marie de Barsy, chez qui je venais souvent demander un petit quelque chose et qui m'ont permis de travailler dans une ambiance chaleureuse.

Merci à Fabrice Berger et à l'équipe Bioinfo pour sa participation dans l'analyse statistique de ce travail.

Il y a aussi tous les autres URBMmiens qui ont tous participé d'une façon ou d'une autre à mon séjour dans ce laboratoire : Sophie Le Blastier, Aurore Hamels, Alan Guigen, Maxime Devos, Fanélie Bauer, France Boonen, Benoît Dehertogh, Anne-Michèle Vandamme, Philippe Leroy, Aurélie Mayard, Françoise Tilquin et les mémorants Thomas Legrand, Philippe Materne, Thibault Barbier, Benjamin Philippe, François Beaufay et Marc Putman... et probablement beaucoup d'autres encore, merci à vous tous.

Je voudrais remercier de façon générale tout le labo de m'avoir accueillie et pour le souvenir qui restera dans mon cœur pour toute ma vie.

Je remercie du fond du cœur mes proches, Maman, bien que tu sois déjà décédée, merci de m'avoir soutenue tout au long de mes études et de ma vie. Je voudrais remercier ma petite force intérieure, ma fille qui m'apporte tant de bonheur et de sérénité et qui a compris mes choix. Merci à ma tante aussi qui m'a donné du courage pendant toute ma vie, à mes frères et mon oncle, sans vous beaucoup de choses n'auraient pas été possibles.

A mon cœur, Nelson, qui m'a donné le bonheur, son soutien et l'énergie nécessaire pour continuer mon rêve de vie pendant ces dernières années. Je remercie également mes amis et amies inconditionnels Adriana et Oscar avec lesquelles j'ai partagé des moments inoubliables en jouissant de la vie pendant les moments difficiles de ma thèse.

A Diem Bui une amie inconditionnelle, merci pour ton soutien moral et pour tes conseils. Merci à Piedad avec qui j'ai cohabité dans la grande maison des chercheurs étrangers de la Faculté et à toutes les personnes avec qui j'ai partagé une ambiance chaleureuse et cosmopolite.

Enfin, je n'oublierai pas de remercier Patricia Rodrigues, Jorge Mejia, Cossette Sanchez, Silvia Tejerina, Myrna Virreira et tous mes amis Boliviens pour leur amitié et leur aide morale inconditionnelle.

Il reste de la gratitude en mon cœur pour tous ceux et celles que je n'ai pas mentionnés et qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

TABLEAU DE MATIÈRES

I. INTRODUCTION.....	1
I.1 Brucella et la brucellose	1
I.1.1. Le genre <i>Brucella</i>	1
I.1.1.1. La brucellose	5
I.1.1.2. Découverte de la brucellose	6
I.1.1.3. Prévalence actuelle de la brucellose	6
I.1.2. La pathogénie	8
I.1.2.1. Résistance à l'immunité innée	8
I.1.2.2. Trafic intracellulaire de <i>Brucella</i>	10
I.1.2.3. Déterminants moléculaires de la virulence de <i>Brucella</i>	15
I.1.3. Réponse aux stress rencontrés lors de l'infection	17
I.1.3.1. Réponse générale	17
I.1.3.2. Réponse au stress oxydatif	18
I.1.3.3. Réponse au stress acide	19
I.1.3.4. Adaptation métabolique	19
I.2. Régulation de l'adaptation et de la virulence chez <i>Brucella</i>	20
I.2.1. Régulation transcriptionnelle	22
I.2.1.1. Facteurs de transcription classiques	22
I.2.1.2. Transduction du signal	25
I.2.1.2.1. Messenger secondaire	25
I.2.1.2.2. Phosphotransfert	28
I.2.1.2.2.1. Transduction du signal à deux composants	29
I.2.1.2.2.2. Le système de transfert de phosphate dépendant du phosphoénolpyruvate (PTS)	29
I.2.1.3. Les régulateurs globaux spécialisés	33
I.2.1.3.1. Régulation globale à l'échelon d'une cellule	33
I.2.1.3.1.1. Les facteurs sigma	33
I.2.1.3.1.2. La réponse de stringence	34
I.2.1.3.2. Effet intercellulaire	36
I.2.1.3.2.1. Le Quorum sensing	36
I.2.2. Régulation post-transcriptionnelle	37
I.3. Généralités sur les systèmes de transduction du signal à deux composants (SDC)	38
I.3.1. La chimie du phosphotransfert des voies His-Asp	42
I.3.1.1. Les réactions	42
I.3.1.2. La chimie des phosphohistidines et phosphoaspartates	42
I.3.1.2.1. Phosphohistidine	42
I.3.1.2.1. Phosphoaspartate	43
I.3.2. Relation structure fonction des protéines histidine kinases	43
I.3.2.1. Activités et architecture	43
I.3.2.2. Le domaine Kinase et de dimérisation	46
I.3.2.3. Le domaine senseur	47
I.3.2.4. Le linker	48
I.3.3. Relation structure fonction des régulateurs de réponse	48
I.3.3.1. Activités et architecture	48
I.3.3.2. Le domaine régulateur	49
I.3.3.3. Le domaine effecteur	51
I.3.4. L'architecture des systèmes à deux composants	51

I.3.4.1.	Les systèmes simples de phosphotransfert.....	51
I.3.4.2.	Les systèmes de phosphorelais et les domaines Hpt	52
I.3.4.2.1.	Les domaines HPT.....	52
I.3.4.2.2.	Exemples de phosphorelais.....	53
I.3.4.2.2.1.	Le phosphorelais impliquant une HK hybride.....	53
I.3.4.2.2.2.	Le phosphorelais sans HK hybride	54
I.3.5.	Mécanismes de régulation	54
I.3.5.1.	Régulation de l'activité histidine kinase	55
I.3.5.2.	Régulation de la déphosphorylation du régulateur de réponse.....	56
I.3.5.3.	Autres type de régulations	56
I.4.	Les systèmes à deux composants de <i>Brucella</i>	57
I.4.1.	Données génomiques.....	59
I.4.1.1.	Les Histidines kinases	59
I.4.1.2.	Les régulateurs de réponse	60
I.4.1.3.	Le phosphorelais de CtrA.....	61
I.4.3.	Comparaison avec les alpha-protéobactéries	64
I.4.4.	Les mutants décrits	64
I.4.4.1.	BvrS/R.....	64
I.4.4.2.	FeuP/Q.....	65
I.4.4.3.	NtrC	65
I.4.4.4.	NtrY.....	65
I.4.4.5.	NodV	66
I.4.4.6.	FtcR.....	66
I.4.4.7.	CemR	66
I.4.4.8.	BMEII0679	67
I.4.4.9.	PrIR	67
II.	OBJECTIFS	71
III.	RÉSULTATS	75
III.1.	Le mutant 3G4 de <i>Brucella melitensis</i>.....	77
III.1.2.	Phénotypes décrits par P. Lestrade	77
III.1.3.	Analyses du locus génomique du système <i>prlR/prlS</i>	78
III.1.3.1.	Analyse de la séquence de PrIS et PrIR.....	81
III.1.3.1.1.	PrIS	81
III.1.3.1.1.1.	Comparaison de séquences	81
III.1.3.1.1.2.	Recherche et analyse de domaines protéiques de PrIS	84
III.1.3.1.2.	PrIR	85
III.1.3.1.2.1.	Comparaison de séquences	85
III.1.3.1.2.2.	Recherche et analyse de domaines protéiques de PrIR.....	85
III.1.3.1.3.	Le système PrIS/ PrIR.....	87
III.2.	Caractérisation des mutants <i>prlR</i> et <i>prlS</i>.....	88
III.2.1.	Les mutants ne sont pas rugueux et n'agrègent pas	88
III.2.2.	Les mutants 16M:: <i>prlS</i> et 16M:: <i>prlR</i> ne sont pas atténués en modèles cellulaires.....	88
III.2.3.	Les mutants <i>prlR</i> et <i>prlS</i> sont atténués à 4 semaines en souris.....	91
III.2.4.	Les mutants <i>prlR</i> et <i>prlS</i> ne montrent pas de différence de croissance notable en culture ...	92
III.2.5.	Le NaCl à forte concentration affecte la capacité des mutants à former des agrégats	96
III.3.	Caractérisation des agrégats	98

III.3.1.	Les agrégats contiennent de l'EPS	98
III.3.2.	Test Live Dead	100
III.4.	Implication de PrIR dans les propriétés de surface	101
III.4.1.	Implication de PrIR dans la régulation des protéines de membrane externe (OMP)...	101
III.4.2.	Autres structures de surface modifiées	102
III.4.2.1.	Le flagelle	103
III.4.2.2.	Le système de sécrétion du type 4SS (VirB)	105
III.5.	Analyses de la production de PrIR et de l'expression de PrIS et PrIR chez <i>Brucella melitensis</i>	106
III.5.1.	Surexpression, purification et production d'anticorps polyclonaux	106
III.5.1.1.	Surproduction et la purification de la protéine PrIR	106
III.5.1.1.1.	Surproduction de la protéine PrIR chez <i>E. coli</i>	106
III.5.1.1.2.	Purification et renaturation de la protéine His ₆ -PrIR.	107
III.5.1.2.	Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine PrIR purifiée.....	108
III.5.2.	Expression de <i>prIR</i> au niveau transcriptomique (ARNm) et protéique	110
III.5.2.1.	Activité des promoteurs de <i>prIR</i> et <i>prIS</i> <i>in vitro</i>	111
III.5.2.2.	Expression du promoteur de <i>prIR</i> <i>in vivo</i>	113
III.5.2.2.1.	Le promoteur de <i>prIR</i> est actif au cours du cycle infectieux	113
III.6.	Analyses transcriptomiques du mutant <i>prIR</i> chez <i>Brucella melitensis</i>	115
III.6.1.	Analyses transcriptomiques.....	115
III.6.2.1.	Distribution chromosomique	116
III.6.2.2.	Localisations prédites des cibles de PrIR	116
III.6.3.	Classification fonctionnelle des cibles régulées par PrIR	120
III.6.3.1.	Les gènes réprimés par PrIR (ratio $\Delta prIR/ wt > 1,50$)	122
III.6.3.2.	Les gènes activés par PrIR (ratio $\Delta prIR/ wt < 0,663$)	126
III.6.4.	Validation des résultats transcriptomiques par qRT-PCR	126
III.6.5.	C'est possible de valider nos résultats transcriptomique	131
III.6.5.1.	Protéines de membrane externe (Omps)	131
III.6.5.2.	Exopolysaccharides.....	131
III.6.5.3.	Flagelle.....	132
III.6.5.4.	Métabolisme.....	132
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	139
IV.1.	Système à deux composants PrIS/PrIR.....	139
IV.2.	Fonctions du Système à deux composants PrIS/PrIR	140
IV.3.	Phénomène d'agrégation lié au système à deux composants PrIS/PrIR.....	143
IV.4.	Régulon du PrIR	146
V.	CONCLUSION.....	151
VI.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	159
VI.1.	Souches bactériennes et conditions de culture	159
VI.2.	Constructions plasmidiques	159
VI.3.	Infection en cellules, marquage des bactéries et observation au microscope.....	162

VI.3.1.	Préparation pour l'observation en microscopie	162
VI.4.	Infection des souris.....	163
VI.5.	Southern blotting.....	163
VI.6.	Marquage d'EPS dans les agrégats avec la Concanavaline A couplée au FITC	163
VI.7.	Viabilité des bactéries dans les agrégats	164
VI.8.	Analyse en Dot blot	164
VI.9.	Migration de protéines en gel SDS-PAGE et Western blot	165
VI.10.	Surexpression, purification et renaturation de la protéine His ₆ -PrIR	166
VI.11.	Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine His ₆ -PrIR	167
VI.11.1.	Réponse sérologique du lapin contre His ₆ -PrIR par ELISA.....	167
VI.12.	Mesure de l'activité β -galactosidase	168
VI.13.	Extraction d'ARN total de <i>Brucella</i> spp. avec le kit TRIzol.....	169
VI.14.	Design et expérimentation de Microarray (« Puces à ADN »).....	170
VI.15.	RT-PCR Quantitative.....	171
VI.16.	Tests d'assimilation de substrat Biotype100®	172
VI.17.	Test Uréase.....	173
VI.18.	Analyses statistiques statistiques	174
VI.	ANNEXES.....	177
	Annexe I.....	177
1.	Construction d'outils	177
1.2.	Création de mutants	177
1.2.1.	Construction de mutants disruptants <i>B. melitensis</i> 16M:: <i>prIR</i> et fM:: <i>prIS</i>	177
1.2.1.1.	Isolement de clones de <i>Brucella</i> candidats disruptants.....	177
1.2.1.2.	Validation des candidats intégratifs par Southern blot et Western blot	178
1.2.2.	Construction de mutants propres par délétion de <i>prIS</i> ou <i>prIR</i> chez <i>B. melitensis</i>	181
1.2.2.1.	Isolement de clones de <i>Brucella</i> candidats délétés pour <i>prIS</i> ou <i>prIR</i>	182
1.2.2.2.	Validation des mutants propres par PCR et Western blot	182
1.2.3.	Construction de plasmides de complémentation pour <i>prIR</i> et <i>prIS</i>	183
1.2.3.1.	Construction des plasmides réplcatifs chez <i>Brucella</i> porteur du gène <i>prIR</i> ou <i>prIS</i> . 183	
1.2.3.2.	Isolement de souches complémentées	184
1.2.4.	Construction d'un plasmide intégratif chez <i>Brucella</i> , porteur du gène <i>prIR</i>	184
1.2.5.	Construction de plasmides rapporteurs pour les gènes <i>prIR</i> et <i>prIS</i> , et d'un plasmide de surexpression.....	186
1.2.5.1.	Construction des plasmides réplcatifs pBBR <i>prIR-gfp</i> chez <i>Brucella melitensis</i> 16M porteur du promoteur <i>prIR</i>	186
1.2.5.2.	Construction des plasmides réplcatifs porteurs de fusions <i>pprIR-lacZ</i> et <i>pprIS-lacZ</i> 187	
1.2.5.3.	Construction des plasmides qui permettent la surproduction de la protéine PrIR . 189	
	Anexe II.....	190
	Donné transcriptomique de <i>B. melitensis</i> 16M.....	190

Annexe III.....	252
Alignement multiple de séquences par CLUSTAL 2.0.11	252
VIII. BIBLIOGRAPHIE.....	261

TABLE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AHL	N-acyl-homosérine lactone
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine 5'triphosphate
BCV	« Brucella containig vacuole »
CFU	« Colony forming unit »
Clp	Caseino lytic protease
CRP	Catabolite repression protein
c-di-GMP	Diguanylate cyclique
DCS	Système à deux composants
DO	Densité optique
ECF	Facteurs de fonction extracytoplasmique
E. coli	<i>Escherichia Coli</i>
EPS	Exopolysaccharide
ERES	« Endoplasmic reticulum exit site »
FtcR	Flagellar two component regulator
GFP	« Green fluorescent protein »
GPI	Glycosilphosphatidylinositol
HTH	Hélice-tour-hélice
HF	« Host factor »
HK	Histidine kinase
hps	« Heat shock protein »
kDa	KiloDalton
LPS	Lipopolysaccharide
Mb	Mégabases
MVB	Corps multivésiculaires
nm	Nanomètre
OMP	« Outer membrane protein »
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	« Open reading frame »
PAMP	« Pathogen associated molecular Pattern »
CDS	Séquence codante
PEP	Phosphoénolpyruvate
ppGpp	« 3' pyrophosphate guanosine diphosphate »
PrP^c	«protéine prion cellulaire»
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	« Polymerase chain reaction »
PG	Couche de peptidoglycane
PrIS	« Proline sensor »
PrIR	« Proline regulator »
QS	Quorum sensing
RE	Réticulum endoplasmique
RR	Régulateur de réponse
sRNAs	« Small non-coding RNAs »
SR-A	Récepteur Scarvenger de classe A
STM	«Signature tagged mutagenesis»

TIRAP
TNF α
TLRs
 μ l

«Toll-like Receptor Adaptor Protein »
«Tumor necrosis factor α »
« Toll-Like receptors»
Microlitre

PARTIE I

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I.1 Brucella et la brucellose

Les bactéries du genre *Brucella* sont des organismes à Gram négatif, parasites intracellulaires responsables d'une zoonose appelée brucellose. La brucellose est une maladie ancienne puisque les premières descriptions de symptômes s'apparentant à cette maladie remontent à l'époque d'Hippocrate (Alex and Simon, 1994).

I.1.1. Le genre *Brucella*

Les *Brucellae* sont des bactéries appartenant à la classe des α -protéobactéries, tout comme de nombreuses autres espèces vivantes soit libres (*Caulobacter*, *Ochrobactrum*), soit en association avec un hôte eucaryote. Ce groupe inclut des bactéries intracellulaires obligatoires (*Rickettsia*), des bactéries intracellulaires facultatives (*Bartonella*, *Brucella*), des bactéries extracellulaires (*Agrobacterium*) ainsi que des symbiotes de plantes et d'animaux (*Sinorhizobium*, *Wolbachia*) (Moreno *et al.*, 1990) (figure 1). Souvent considérées comme bactéries intracellulaires facultatives, les *Brucellae* sont pourtant mieux adaptées au mode de vie intracellulaire. Il a de ce fait été proposé qu'elles soient qualifiées de bactéries extracellulaires facultatives (Moreno and Moriyon, 2002)

Les bactéries du genre *Brucella* sont classées en neuf espèces suivant leur hôte préférentiel, bien qu'elles puissent occasionnellement infecter d'autres hôtes. Parmi les espèces classiques: *B. melitensis* (caprins), *B. abortus* (bovins), *B. canis* (cannidés), *B. suis* (suidés), *B. ovis* (ovins), et *B. neotomae* (rat du désert). Trois nouvelles espèces ont été décrites récemment, deux isolées à partir de mammifères marins et nommées *B. pinnipedialis* (phoques) et *B. ceti* (cetacés) (Ewalt *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1996) et une isolée du campagnol des champs *B. microti* (Scholz *et al.*, 2009). Le tableau 1 reprend les caractéristiques de ces espèces et leur éventuelle pathogénicité pour l'homme. *B. melitensis* est responsable de la majorité des infections humaines (Pappas *et al.*, 2005).

Une étude phylogénétique récente, semble indiquer que *B. ovis* serait l'espèce ancestrale (Foster *et al.*, 2009).

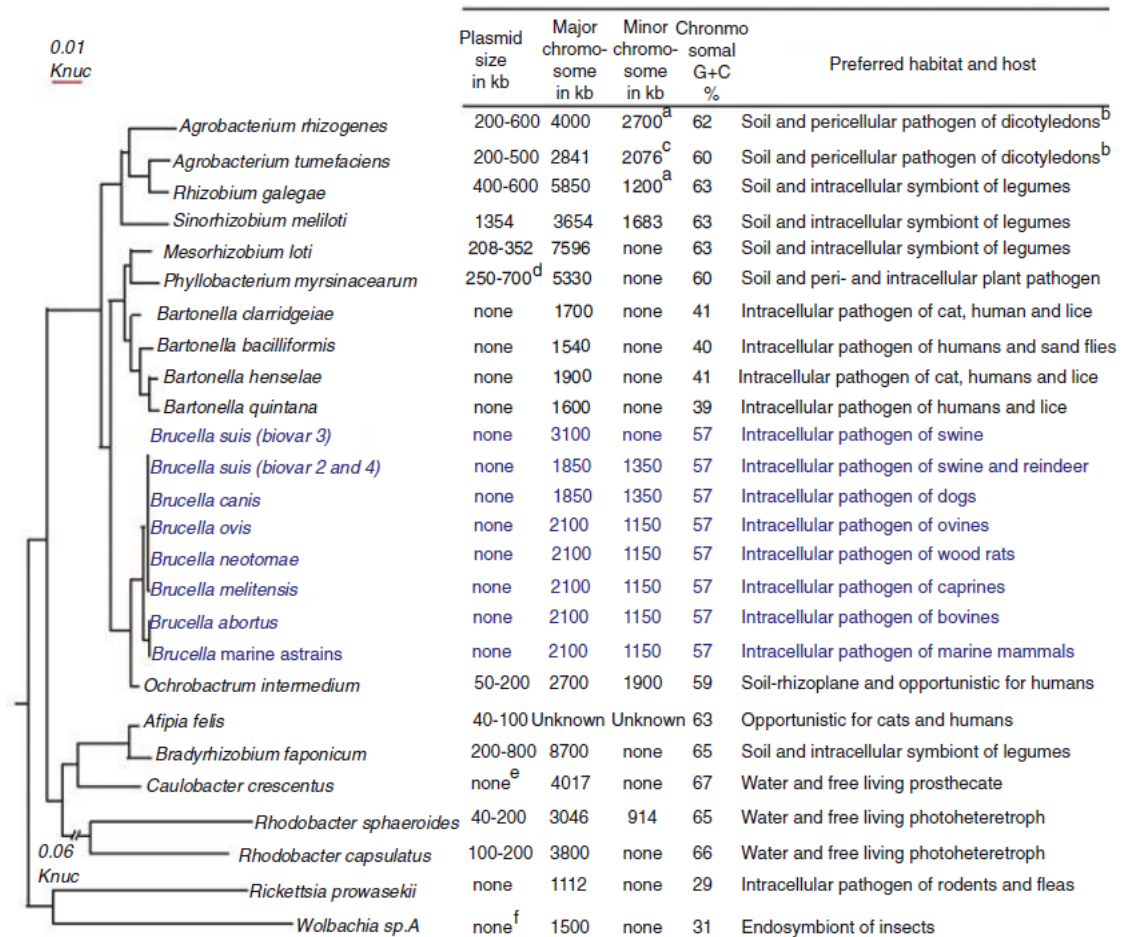


Figure 1: L'arbre phylogénétique montre le rapport qui associe les plantes, les opportunistes de vie libre et les animaux de la subdivision α -protéobactéries. La caractéristique génomique et les hôtes préférentiels pour chaque bactérie sont indiqués.(Moreno, 2006).

INTRODUCTION

Tableau 1 : Espèces, biovars du genre *Brucella*, hôte animal préférentiel, pouvoir pathogène chez l'homme et discrimination d'espèce. Selon (Pappas *et al.*, 2005)

ESPÈCE	BIOVARS	HÔTE ANIMAL HABITUEL	DECRIE PAR	VIRULENCE HUMAINE *	DISCRIMINATION DES ESPÈCES
<i>B. melitensis</i>	1-3	Chèvres, moutons, chameaux	Bruce, 1887	++++	Fuchine positive; Thionine positive; inhibition de safranine négative; production H ₂ S négative; uréase positive en 24 heures; croissance en CO ₂ négative; Lyse du phage Tiblisi négative; Lyse du phage Weybrige négative
<i>B. abortus</i>	1-6,9	Vaches, chameaux, jacks, visons	Bang, 1897	++ à +++	Fuchine positive (excepté biovars 2); Thionine négative (biovars 1,2 et 4), inhibition de safranine négative, production H ₂ S positive (excepté biovar 5); uréase positive en 24 hr, croissance en CO ₂ positive (biovars 1-4); Lyse du phage de Tiblisi positive; Lyse de phage Weybrige, positive..
<i>B. suis</i>	1-5	Porcs(biovars 1-3) lièvres sauvages(biovars 2)Caribous et Rennes (biovar 4) Rongueurs sauvages(biovars 5)	Traum, 1914	+	Fuchine négative (excepté biovars 3); Thionine positive ; inhibition de safranine positive; production H ₂ S positive biovars 1); uréase positive en 15 min; croissance en CO ₂ négative; Lyse de bactériophage de Tiblisi négative; Lyse de phage Weybrige positive..
<i>B. canis</i>	–	Chiens (canines)	Carmichael et Bruner, 1968	+	Fuchine positive ou négative; Thionine positive; inhibition de safranine négative; production H ₂ S négative; uréase positive en 15 min; croissance en CO ₂ négative; Lyse du phage de Tiblisi négative; Lyse de phage Weybrige négative.
<i>B. ovis</i>	–	Ovins	Van Drimm 1953	-	Fuchine négative pour quelques souches; inhibition de safranine négative; production H ₂ S négative; uréase négative; croissance en CO ₂ positive; Lyse du phage de Tiblisi négative Lyse de phage Weybrige négative.
<i>B. neotomae</i>	–	Rongueurs	Stoenner et Lackman, 1957	-	Fuchine négative; inhibition de safranine négative; production H ₂ S positive, uréase positive en 15 min; croissance en CO ₂ négative; Lyse de bactériophage de Tiblisi positive au négative; Lyse de phage Weybrige positive.
<i>B. pinnipediae</i> et <i>B. ceti</i>	–	Baleines, Dauphins, Marsouins,(<i>pinnipediae</i>) Phoques (<i>Ceti</i>)	Ewalt et Ross, 1994	+	Fuchine positive; Thionine positive; inhibition de safranine négative; production H ₂ S négative; uréase positive; croissance en CO ₂ négative pour <i>pinnipediae</i> et positive pour <i>B. ceti</i> ; Lyse du phage Tiblisi négative; Lyse du phage Weybrige positive pour <i>B. pinnipediae</i> et négative pour <i>B. ceti</i> .

*La virulence est évaluée sur une échelle d'aucune virulence (-) au degré le plus élevé de virulence (++++)

Tableau 1 : Espèces et biovars du genre *Brucella*, caractéristiques épidémiologiques, hôte animal préférentiel, pouvoir pathogène chez l'homme. Selon (Godfroid, 2002; Godfroid and Kasbohrer, 2002; Maurin, 2005)

ESPÈCE	BIOVARS	DISTRUBURION GEOGRAPHIQUE	HÔTE ANIMAL HABITUEL	PHATOGÉNICITÉ HOMME
<i>B. abortus</i>	1 à 6 et 9	Ubiquitaire	Bovins, ongulés sauvages	Modérée
<i>B. melitensis</i>	1 à 3	Bassin méditerranéen, Moyen Orient	Ovins, caprins, ongulés sauvages	Forte
<i>B. suis</i>	1 et 3	Amérique, Asie, Océanie	Suidés	Forte
<i>B. suis</i>	2	Europe centrale et occidentale	Suidés, lièvres	Faible *
<i>B. suis</i>	4	Amérique du nord, Russie	Rennes	Modérée
<i>B. suis</i>	5	Russie	Rongeurs sauvages	Forte
<i>B. canis</i>	-	Ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du sud)	Chiens	Faible
<i>B. ovis</i>	-	Bassin méditerranéen	Ovins	Nulle
<i>B. neotomae</i>	-	Utah (Etats-Unis)	Rats du désert	Non connue
<i>B. ceti</i>	-	Non connue	Cétacés (dauphins)	Non connue
<i>B. pinnipediae</i>	-	Non connue	Pinnipèdes (phoques-otaries)	Non connue **

* Rares cas d'infections humaines rapportés dans la littérature (Godfroid and Kasbohrer, 2002)

** Deux cas d'infections humaines, rapportés chez des patients péruviens, émigrés récemment aux Etats-Unis, ainsi qu'un cas de contamination en laboratoire en Grande-Bretagne (Sohn *et al.*, 2003)

Le génome de *Brucella* est réparti sur deux chromosomes circulaires, un grand chromosome de 2.1Mb et un petit de 1.2 Mb (excepté pour *B. suis* biovar 3 qui ne possède qu'un chromosome de 3.2 Mb). L'ensemble du génome contient environ

3200 séquences codantes. Les génomes de *B. melitensis*, *B. suis* et *B. abortus* furent les premiers à être séquencés confirmant ainsi que ces espèces sont très proches (DelVecchio *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005; Paulsen *et al.*, 2002). Par exemple, les génomes de *B. melitensis* et *B. suis* ne diffèrent que par 74 gènes (42 sont uniques à *B. suis* et 32 à *B. melitensis*), ce qui est peu comparé aux génomes d'autres pathogènes du même genre (Tsolis, 2002).

Les génomes de *B. melitensis* et *B. abortus* diffèrent quant à eux majoritairement par la présence d'un locus de 25 kb chez *B. melitensis*. Ce locus semble être impliqué dans la synthèse de polysaccharide(s) (Vizcaino *et al.*, 2001).

Actuellement une vingtaine de programme de séquençage de génomes sont en cours de finition et d'annotation. (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/brucella_group/GenomesIndex.html).

I.1.1.1. La brucellose

La brucellose, ou fièvre de Malte, est la zoonose la plus répandue dans le monde, elle est responsable de plus de 500 000 nouveaux cas humains déclarés par an (Corbel, 1997; Pappas *et al.*, 2005). Chez les animaux, la brucellose est associée à des avortements et à une infertilité responsable de pertes économiques considérables, en particulier dans les pays en voie de développement (Smith and Ficht, 1990). Chez l'homme, c'est une maladie chronique, souvent incapacitante présentant un faible taux de mortalité. La grande diversité et l'aspécificité des symptômes que cause cette maladie (fièvre, fatigue, perte de poids, anorexie...) rend le diagnostic souvent délicat.

La brucellose n'est pas considérée comme une maladie contagieuse chez l'homme car seuls de très rares cas de contagions inter-humaines ont été décrits (Godfroid *et al.*, 2005). Les voies majeures de contamination sont le contact direct avec les animaux contaminés (éleveurs, vétérinaires, bouchers...) et la consommation de produits laitiers non pasteurisés et de viande contaminée insuffisamment cuite. La contamination par inhalation est la plus courante bien qu'elle puisse également avoir lieu par contact direct avec des plaies.

Le traitement est basé sur une antibiothérapie de longue durée (doxycycline et rifampicine). Des vaccins vétérinaires atténués sont disponibles et ont contribué aux programmes d'éradication de la brucellose, mais ils restent virulents pour l'homme (Schurig *et al.*, 2002).

I.1.1.2. Découverte de la brucellose

A la fin du 19^{ème} siècle, une fièvre ondulante sévissait à l'état endémique sur l'île de Malte où des troupes britanniques étaient localisées. Le médecin David Bruce, officier britannique fut le premier à isoler en 1887 l'agent responsable de cette maladie à partir de rates de soldats décédés, il le nomma *Micrococcus melitensis*. Quelques années plus tard, le maltais Zammit démontra la nature zoonotique de la fièvre de Malte en isolant le même organisme du lait et du sang de chèvres présentes sur l'île et identifie le lait comme la source de contamination humaine.

Les Danois Bang et Stribolt isolent de façon indépendante en 1895 l'agent responsable de l'avortement des bovidés qui sera nommé ultérieurement *Bacterium abortus*. Alice Evans démontra en 1918 que *M. melitensis* et *B. abortus* ne sont pas distinguables sur base de caractères morphologiques et biochimiques. Le genre *Brucella* est créé deux ans plus tard en hommage à David Bruce et regroupe alors les espèces *B. melitensis* et *B. abortus*.

I.1.1.3. Prévalence actuelle de la brucellose

Malgré les techniques disponibles de nos jours, la brucellose reste une zoonose majeure dans le monde actuel. L'éradication de la brucellose est un but visé par de nombreux pays. Les programmes d'éradication sont basés sur la vaccination des animaux d'élevage, le dépistage régulier de la brucellose au sein des troupeaux et l'abattage des animaux infectés (Corbel, 1997). La mise en place de ces précautions dépend cependant des conditions socio-économiques du pays ainsi que de la prévalence de la brucellose dans ce dernier. Plusieurs pays d'Europe du nord ont ainsi réussi à éradiquer cette zoonose (Angleterre, Belgique, Allemagne...)(Pappas *et al.*, 2006). Ces pays maintiennent cependant une surveillance de la brucellose car le risque de réintroduction reste présent, notamment à cause des mouvements de

bétails et de certaines espèces animales sauvages pouvant constituer un réservoir infectieux.

La brucellose reste cependant endémique dans de nombreux pays en voie de développement qui continuent à subir le poids tant économique que médical de cette maladie (Pappas *et al.*, 2006). Certains pays de l'union européenne (Grèce, Espagne, Portugal, sud de l'Italie) possèdent également des foyers infectieux (voir Figure 2). Les zones touchées par la brucellose humaine colocalisent avec celles touchées par la brucellose animale et concernent tout particulièrement les personnes travaillant avec les animaux infectés ou consommant leurs produits dérivés (viande crue, produits laitiers...).

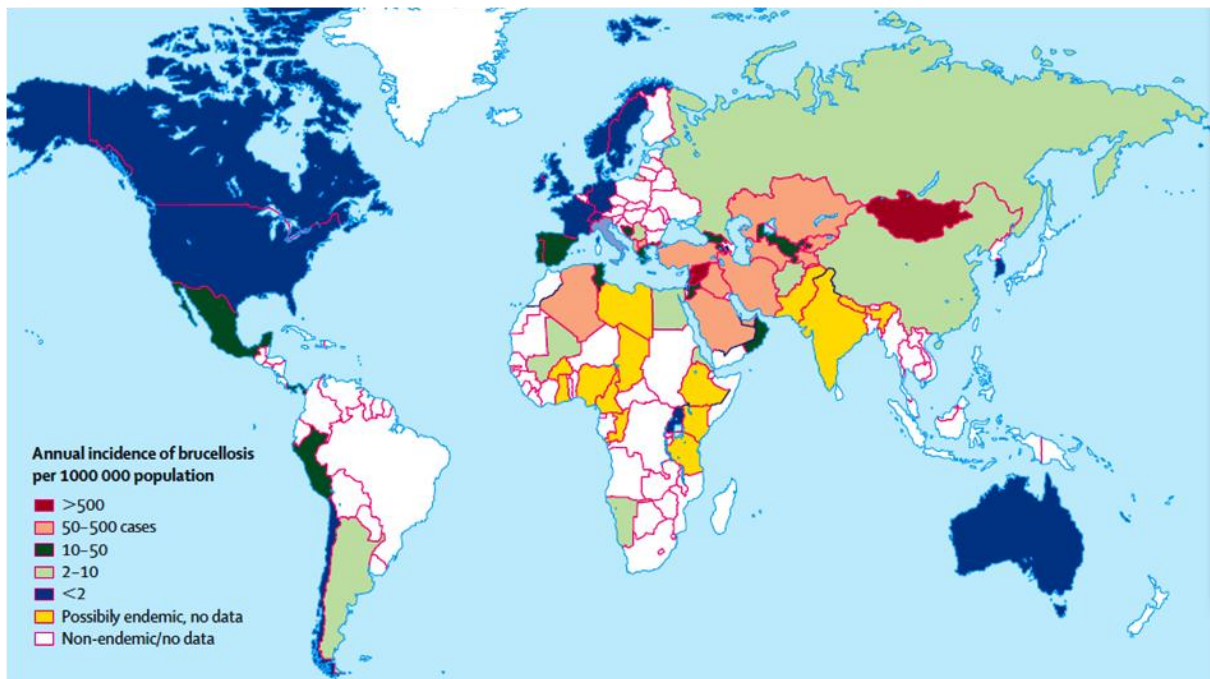


Figure 2 : Incidence mondiale de la brucellose humaine. D'après (Pappas *et al.*, 2006).

L'apparition de nouveaux foyers infectieux ces dix dernières années, notamment en Asie centrale et en Syrie, démontre que l'éradication de la brucellose à l'échelle mondiale ne sera pas une tâche aisée, malgré les programmes d'éradication en cours. Le contrôle de la brucellose humaine passe par celui de la brucellose animale. Le coût de cette surveillance est très élevé et nécessite la mise au point de

tests fiables, simples et peu coûteux de détection des animaux infectés (Boschiroli *et al.*, 2001).

I.1.2. La pathogénie

Contrairement à ce qui a été mis en évidence chez d'autres bactéries pathogènes, le génome de *Brucella* ne code pas pour des facteurs de virulence classiques (exotoxine, capsule, fimbria, phages, formes de résistance...)(Moreno and Moriyon, 2002). Il semble donc que la virulence de cette bactérie soit basée:

- ↪ sur son faible effet stimulateur sur les cellules hôte (Barquero-Calvo *et al.*, 2007) échappant ainsi à la détection de l'immunité innée,
- ↪ sur sa capacité de pénétrer dans des cellules phagocytaires ou non (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a) et de former une niche de réplication permettant sa prolifération, sans induire de programme de mort cellulaire (Gross *et al.*, 2000).

I.1.2.1. Résistance à l'immunité innée

Les TLRs (Toll-Like receptors) interviennent dans les mécanismes de l'immunité innée afin de reconnaître des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes (PAMPs ou Pathogen Associated Molecular Pattern) et de déclencher une réponse adaptée en cas d'interaction avec ces molécules. Le LPS est un PAMP classiquement reconnu par le TLR4. L'interaction entre ces deux partenaires conduit à la production de molécules pro-inflammatoires telles le TNF- α . Le LPS des bactéries du genre *Brucella* possède une structure particulière qui lui confère une faible cytotoxicité et un faible effet stimulateur des cellules immunitaires (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). L'activation de la voie dépendante du TLR4 par le LPS de *B. abortus* nécessite des quantités importantes de cette molécule en comparaison avec le LPS classique des entérobactéries (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). De plus il n'a que peu d'influence sur la production de cytokines (Lapaque *et al.*, 2005). Il a été proposé que *Brucella* utiliserait des PAMPs non-conventionnels afin d'atteindre sa niche de réplication avant l'activation des mécanismes antimicrobiens mis en place par l'immunité adaptative (Barquero-Calvo *et al.*, 2007).

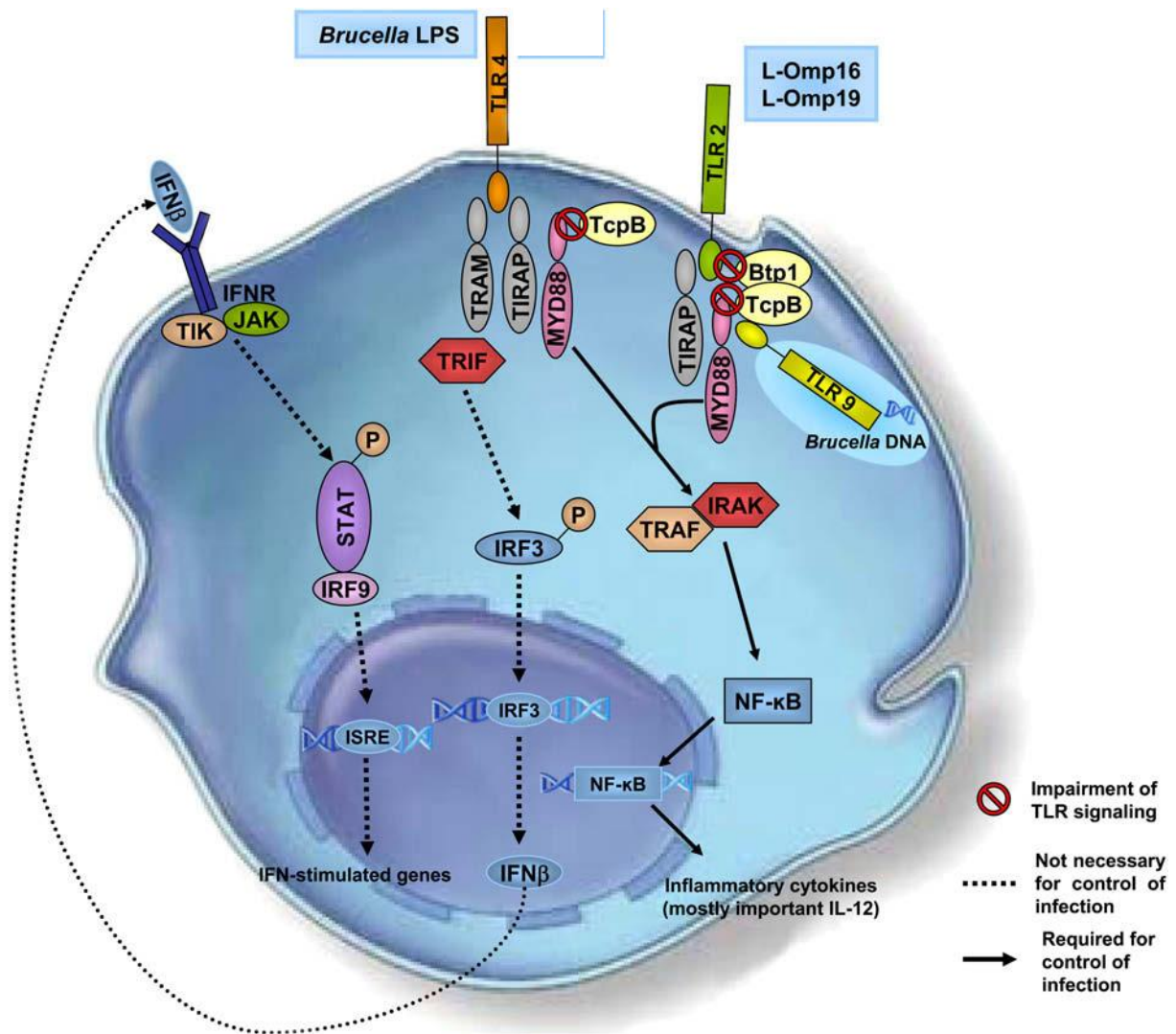


Figure 3 : Signalisation de TLR en réponse à *Brucella* en macrophage ou cellules dendritiques. Reconnaissance de motifs moléculaires conservés (PAMPs) chez *Brucella* par TLR2 (protéines de membrane externe, Omp16 et Omp19), TLR4 (LPS de *Brucella*) et TLR9 (ADN de *Brucella*). Le signal intracellulaire via MyD88 conduit à l'activation de facteur de transcription (NF-κB), MAP kinases (MAPKs) et à la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL12. Un possible rôle pour la subversion du signal de TLR par *Brucella* produisant les protéines à domaine TIR est détaillé (BtpA et Btp2). Btp1 agit sur TLR2 et TcpB agit avec MyD88 neutralisant le signal TLR2 et TLR4. Les flèches continues représentent les voies importantes de contrôle par de TLR de l'infection de *Brucella*. Les flèches discontinues représentent les TLRs et la signalisation des récepteur IFN de type I. Le cercle barré représente l'affaiblissement de la signalisation de TLR par les protéines Btp1 et TcpB. (modifié de (Oliveira *et al.*, 2008)).

En outre il semblerait que *Brucella* module activement les voies de transduction du signal liées aux TLRs par le biais d'une protéine à domaine TIR qui

freinerait la maturation des cellules dendritiques (Salcedo *et al.*, 2008). Cette protéine inhiberait les voies TLR-2/ TLR-4 en mimant les propriétés de la protéine TIRAP (Toll-like Receptor Adaptor Protein) (Radhakrishnan *et al.*, 2009). Les voies de signalisation MyD88 dépendantes et TIRF indépendantes sont impliquées dans l'activation des cellules de l'immunité innée par *Brucella*. Récemment il a été rapporté le rôle de la molécule MyD88 impliqué dans la maturation de cellules dendritiques et la production d'interleukine-12 (IL12) pendant l'infection de *B. abortus*. De récentes études reflètent la contribution de récepteurs de l'IFN pendant l'infection de *Brucella* (Radhakrishnan *et al.*, 2009).(voir figure 3).

I.1.2.2. Trafic intracellulaire de *Brucella*

La virulence des bactéries du genre *Brucella* est basée sur leur capacité à survivre et à se multiplier au sein des cellules phagocytaires professionnelles (macrophages, neutrophiles...) et non professionnelles (cellules du trophoblaste) de l'hôte (Celli, 2006; Detilleux *et al.*, 1990; Ficht, 2003; Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a). Les infections causées par *Brucella* dans leurs hôtes naturels ainsi que chez l'homme sont caractérisées par un caractère chronique. La survie dans les macrophages est essentielle à l'établissement de la chronicité de l'infection (Gorvel and Moreno, 2002) car elle met *Brucella* à l'abri des défenses extracellulaires de l'hôte (anticorps, complément...). Les macrophages étant les cellules cibles majeures de *Brucella* (Gorvel and Moreno, 2002), les paragraphes suivants décrivent brièvement le trafic des vacuoles contenant *Brucella* dans ce type cellulaire.

Les *Brucellae* entrent dans leur organisme hôte en adhérant aux muqueuses (buccale, respiratoire, gastro-intestinale, conjonctivale ou génitale) (Enright *et al.*, 1990) et traversent leur épithélium. Elles sont ensuite ingérées par les cellules phagocytaires résidentes et rejoignent les ganglions lymphatiques proches.

Les mécanismes par lesquels *Brucella* se lie et pénètre dans les cellules hôtes sont encore mal connus. Il a toutefois été démontré que les «lipid rafts» (microdomaines membranaires riches en cholestérol) sont nécessaires à l'entrée de *Brucella* dans la cellule, suggérant que les récepteurs pour cette bactérie sont présents

dans ces régions lipidiques particulière (Porte *et al.*, 2003). *Brucella* se lie aux résidus d'acide sialique présents sur les cellules eucaryotes (Castaneda-Roldan *et al.*, 2004) et est internalisée par un mécanisme actif impliquant des petites GTPases de la sous-famille Rho ainsi que des réarrangements du cytosquelette d'actine et les microtubules (Guzman-Verri *et al.*, 2001).

Trois récepteurs potentiels ont été proposés, mais leur implication reste controversée :

↪ La protéine prion cellulaire (PrP^c) (Watarai *et al.*, 2002). La protéine prion PrP^c est ubiquitaire et très conservée chez les mammifères. La protéine PrP^c possède une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), suggérant une association avec les « lipid-raft ». Une étude a suggéré que cette dernière serait le récepteur de l'Hsp60 (GroES/L) de *B. abortus* (Watarai *et al.*, 2003) et le médiateur de l'internalisation de *Brucella*. Une étude récente a cependant avancé des arguments contradictoires puisque des macrophages ou des souris knock-out pour le gène du prion sont toujours susceptibles à l'infection par *Brucella*. De même, l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine n'affecte pas l'internalisation des bactéries (Fontes *et al.*, 2005).

↪ La protéine récepteur Scavenger de classe A (SR-A) (Kim *et al.*, 2004). Les protéines scavengers ont initialement été définies sur base de leur capacité à lier et à internaliser des lipoprotéines modifiées. Les macrophages expriment au moins six types différents de récepteurs scavengers. Parmi eux, le récepteur scavenger de type A (SR-A) joue entre autre un rôle particulier dans l'immunité innée. Il a par exemple été démontré que SR-A est capable de reconnaître le lipide A des molécules de type LPS et qu'il médie l'internalisation de *Staphylococcus aureus* et de *Neisseria meningitidis* (pour revue voir (Greaves and Gordon, 2005)). Une étude a mis en évidence l'implication de SR-A dans l'internalisation de *B. abortus*. Les auteurs ont proposé que SR-A serait recruté dans les « lipid-rafts » de façon *virB*-dépendante (Kim *et al.*, 2004). Ce modèle est cependant critiqué puisque plusieurs études ont montré que le

système de sécrétion VirB n'est pas impliqué dans les étapes précoces de l'infection (Celli *et al.*, 2003; Lapaque *et al.*, 2005).

↪ La protéine SP41 qui a été décrite comme permettant l'adhérence de *Brucella* aux cellules non phagocytaires (Castaneda-Roldan *et al.*, 2006). La protéine SP41 est encodée par le gène *ugpB* qui montre une homologie avec des transporteurs de type ABC du glycérol-3-phosphate. Cette protéine ne se fixe plus sur les cellules HeLa traitées à la neuraminidase.

En comparaison avec d'autres pathogènes, tels *Salmonella*, *Shigella* ou *Legionella*, peu de *Brucella* virulentes se lient aux phagocytes professionnels et non professionnels (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a; Pizarro-Cerda *et al.*, 1998b). Cependant, pour une bactérie "smooth" une fois l'étape d'attachement accomplie la quasi-totalité des bactéries entrent dans les cellules par un mécanisme restant encore à clarifier.

Brucella contrôle son propre trafic intracellulaire afin d'inhiber la fusion phagolysosomiale qui conduirait à sa destruction (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a). Rapidement après son internalisation, *Brucella* forme une vacuole précoce nommée Early BCV (Brucella-Containing Vacuole). Après une interaction avec les endosomes précoces, la vacuole s'acidifie et se transforme en vacuole intermédiaire. Cette acidification de la vacuole est nécessaire pour la survie de *Brucella* (Porte *et al.*, 1999). La vacuole intermédiaire entre ensuite en interaction avec les endosomes tardifs et les corps multivésiculaires (Figure 4).

Afin d'atteindre le réticulum endoplasmique pour se répliquer, la vacuole se lie à une partie de la membrane du réticulum endoplasmique appelé ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Site) (Celli *et al.*, 2005). Ce mécanisme fait intervenir la petite GTPase Sar1, impliqué dans la formation du tapis de protéines COPII (Celli *et al.*, 2005; Roy, 2005).

Ensuite, la vacuole se transforme en une vacuole répllicative dans laquelle *Brucella* se réplique. Ce compartiment est spécifique de *Brucella* et ne correspond à

aucun organe cellulaire, pour cette raison il a aussi été baptisé Brucellosome (voir Figure 5 (Kohler *et al.*, 2003)).

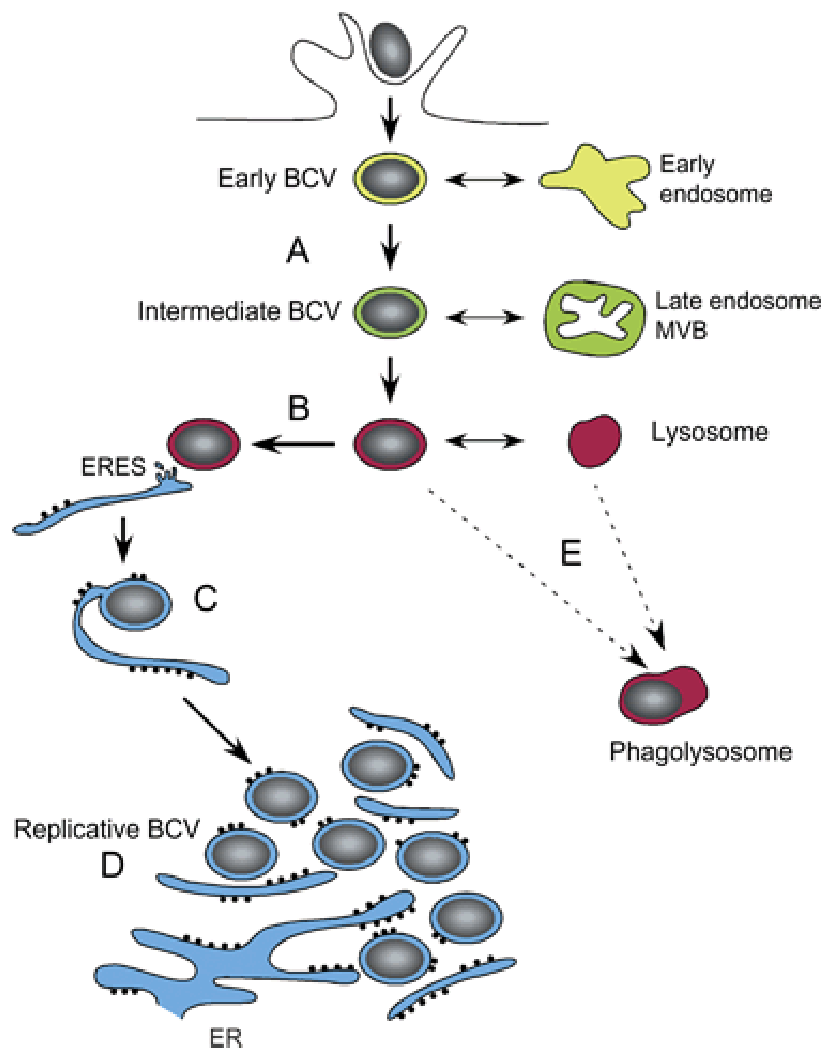


Figure 4 : Le trafic intracellulaire de *Brucella* dans les cellules hôtes: A) Quand les cellules de *Brucella* sont entrées dans les phagosomes elles sont contenues dans les BCV précoces le long de la voie de l'endocytose, les BCV qui contiennent *Brucella* interagissent avec les endosomes précoces et les endosomes tardifs et des corps multivésiculaires (MVB) avant la fusion avec les lysosomes. De telles interactions sont requises pour faire avancer le trafic, B) par lequel les BCVs intermédiaires interagissent avec les emplacements de sortie du réticulum endoplasmique (ERES) C) et fusionnent plus tard avec le RE afin de produire les vacuoles répliques. D) Ces interactions sont dépendantes du système type IV VirB, E) et /ou de la fusion dans le compartiment lysosomal qui permettent leur maturation dans une vacuole bactérienne. D'après (Starr *et al.*, 2008).

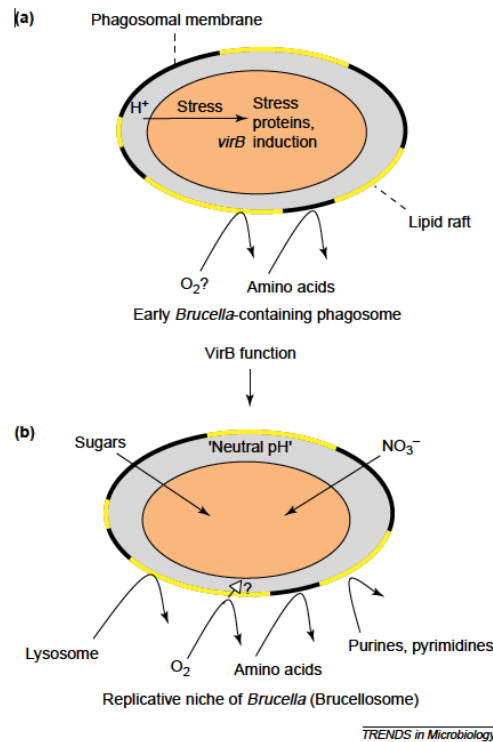


Figure 5 : a) Propriétés caractéristiques de la vacuole précoce nommée early BCV et b) la niche répliquative de *Brucella* spp. Les résultats expérimentaux d'espèces de *Brucella* suggèrent que le phagosome précoce soit très acide et pauvre en nutriments, ayant pour résultat l'induction de *virB* et des gènes qui codent des protéines de stress. *VirB* participe à la création du brucellosome, caractérisé par (1) l'absence de la fusion avec des lysosomes, (2) un pH neutre, et (3) un manque de certains composants nutritifs (Illustration tirée de (Kohler *et al.*, 2003)).

La réplication de *Brucella* semble ensuite avoir lieu par fission des BCVs en deux BCVs filles grâce à de nouveaux apports membranaires durant des interactions avec le réticulum endoplasmique (Celli, 2006).

Il est communément admis que la vacuole intermédiaire évite la fusion avec le lysosome (Celli, 2006; Gorvel, 2008). Cependant, il a récemment été proposé que la vacuole intermédiaire fusionne bel et bien avec le lysosome et que cette fusion soit nécessaire pour la maturation en vacuole répliquative (Starr *et al.*, 2008).

Plusieurs constituants de *Brucella* sont impliquées dans la déviation du trafic intracellulaire. Les constituants principaux sont décrits dans le paragraphe suivant.

I.1.2.3. Déterminants moléculaires de la virulence de *Brucella*

Plusieurs déterminants moléculaires nécessaires à la déviation du trafic intracellulaire ont été mis en évidence:

– **Le lipopolysaccharide (LPS)** des *Brucellae* possède une structure particulière: le lipide A possède une longue chaîne acyl, et possède un squelette de diaminoglucose plutôt que de glucosamine (voir figure 6). De part cette structure inhabituelle, il possède une très faible endotoxycité et protège *Brucella* des peptides cationiques antibactériens et de la fixation du complément (Lapaque *et al.*, 2005). La chaîne O du LPS joue également un rôle crucial dans l'entrée de *Brucella* dans les cellules hôtes via les « lipid rafts » et durant les premières phases de la survie intracellulaire (Naroeni and Porte, 2002; Porte *et al.*, 1999).

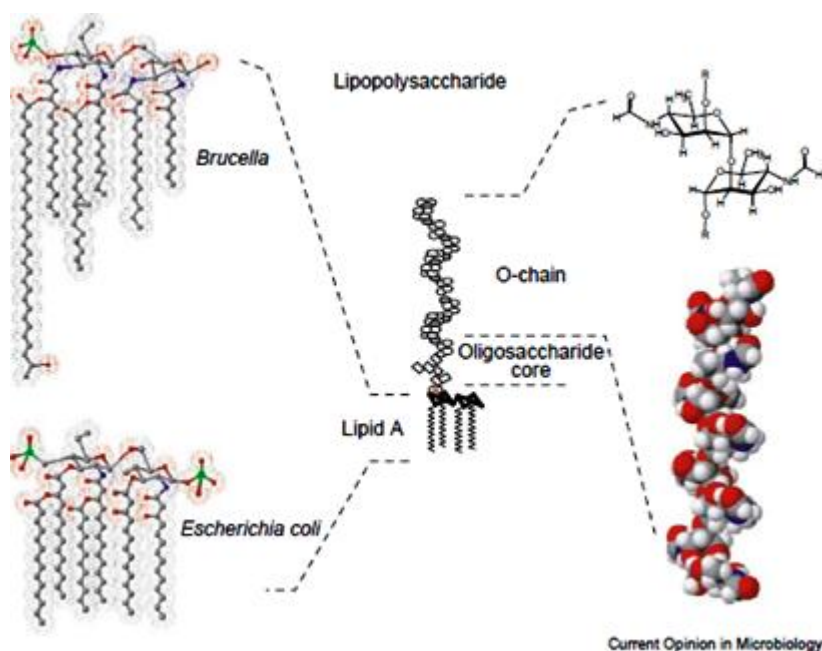


Figure 6 : Structure de LPS de *Brucella*. Le lipide A de *B. abortus* possède un squelette de diaminoglucose liée par des liens amide aux longues chaînes acyl (C18-C19, C28), qui diffère des LPS classiques d'*Escherichia coli*. L'O-chaîne est un homopolymère de N-formyl-perosamine (dessus-droite). Le noyau oligosaccharidique se compose d'acide 3 désoxy-D-manno-2 octulosonique, de mannose et de glucosamine (en bas à droite). D'après (Lapaque *et al.*, 2005).

– **Les β -glucans cycliques** sont des composés périplasmiques souvent osmorégulés, produits par les α -protéobactéries chez lesquelles ils jouent un rôle

important dans les propriétés de l'enveloppe bactérienne (Bohin, 2000). Chez *Brucella*, des mutants du gène *cgs* codant pour la synthèse de ce composé sont fortement atténués de par leur incapacité à inhiber la fusion phagolysosomiale. Les β -1,2-glucans cycliques sont nécessaires à la déviation du trafic intracellulaire (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005; Briones *et al.*, 2001)). Ces composés sont sécrétés par *Brucella* et disruptent les « lipid rafts » de la membrane des phagosomes. Ces domaines membranaires de composition particulière étant impliqués dans la maturation des phagosomes, les β -1,2-glucans cycliques pourraient donc interférer avec le trafic des phagosomes (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

– **Le système de sécrétions de type IV** (permettant la sécrétion de molécules effectrices dans la cellule hôte) encodé par l'opéron *virB* est exprimé durant l'infection cellulaire (Boschiroli *et al.*, 2002). Bien que les molécules effectrices sécrétées par ce système de sécrétion soient inconnues, VirB est nécessaire pour maintenir les interactions entre les BCVs et le réticulum endoplasmique conduisant à la formation des vacuoles répliques (Celli *et al.*, 2003; Commerci *et al.*, 2001). Les différentes espèces de *Brucella* mutées dans l'opéron *virB* sont incapables de dévier les dernières étapes du trafic intracellulaire et sont dirigées dans les phagolysosomes où elles sont détruites (voir Figure 4). Ces mutants sont de ce fait fortement atténués dans tous les modèles cellulaires testés ainsi qu'en modèle murin (Delrue *et al.*, 2001; Foulongne *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2000; O'Callaghan *et al.*, 1999; Sieira *et al.*, 2000). D'autre part, l'expression de ce système de sécrétion de type IV (type four secretion system ou TFSS) est dépendante de l'acidification des BCVs (Porte *et al.*, 1999). L'expression de ce système est aussi dépendante du Quorum sensing (Delrue *et al.*, 2005; Taminiau, 2003; Uzureau *et al.*, 2007) (voir point 1.2.1.3.2.1). Le TFSS est supposé moduler le comportement de la BCV et de la cellule hôte par le biais d'effecteurs protéiques qui restent encore à identifier. Récemment le groupe de Tsolis (de Jong *et al.*, 2008) a identifié 2 substrats protéiques du TFSS de *Brucella* qui sont aussi injectés dans la cellule hôte via le TFSS de *Legionella pneumophila* (système dot/icm). Ces substrats voient leur production co-régulée avec le TFSS par le

régulateur de QS, VjbR. Néanmoins à ce jour aucun effet sur la cellule hôte ne leur est associé, aussi peut-on difficilement parler d'effecteurs.

↪ **Le système à deux composants BvrR/BvrS** est impliqué dans l'internalisation de *Brucella* dans les phagocytes professionnels et non-professionnels (Sola-Landa *et al.*, 1998). Ce système de régulation est décrit comme impliqué dans la maintenance de l'homéostasie de la membrane externe de *Brucella* (Lamontagne *et al.*, 2007; Manterola *et al.*, 2005). La synthèse de plusieurs protéines de membrane externe est affectée dans un mutant de ce système de transduction du signal, tout comme la structure du LPS. Un tel mutant est incapable de pénétrer dans les cellules hôtes (Guzman-Verri *et al.*, 2002).

I.1.3. Réponse aux stress rencontrés lors de l'infection

Durant le trafic intracellulaire, *Brucella* est confrontée à de nombreux stress (Roop *et al.*, 2004):

- ↪ **Stress oxydatif** dû aux intermédiaires réactifs de l'oxygène libérés par les macrophages suite à l'internalisation de *Brucella* (Jiang *et al.*, 1993; Phillips and Roop, 2001).
- ↪ **Stress acide** dans les vacuoles (pH 4 - 4,5), (Kohler *et al.*, 2003; Porte *et al.*, 1999).
- ↪ **Stress nutritif** dans les BCVs (Kohler *et al.*, 2003; Lamontagne *et al.*, 2009).

Les stratégies mises en place par *Brucella* afin de s'adapter à ses différents stress sont décrites dans les paragraphes suivants en nous focalisant d'abord sur les acteurs moléculaires identifiés comme intervenant dans ces résistances et puis en nous tournant vers les systèmes de régulation.

I.1.3.1. Réponse générale

Outre l'intervention de régulateurs de l'adaptation qui seront décrits plus loin (voir point I.2), diverses protéines ont été impliquées dans l'adaptation aux conditions

stressantes. D'une manière générale, plusieurs chaperones ou protéases sont impliquées dans ces phénomènes

↪ La protéase ATP-dépendante Lon joue un rôle principal dans la dégradation des protéines endommagées par différents stress environnementaux. De par l'atténuation d'un mutant *lon* dans les périodes initiales de l'infection en souris, il a été proposé que cette protéase est essentielle à *Brucella* durant les stades précoces de l'infection (Robertson *et al.*, 2000).

↪ En condition de stress, les bactéries activent l'expression de gènes codant pour des protéines de réponse au stress (hsp : « heat shock protein »). Les protéines hsp ont pour rôle de préserver les fonctions cellulaires. Il a été démontré que lors de la croissance intracellulaire, *Brucella* augmente l'expression de plusieurs de ces protéines (DnaK, GroESL...) (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996).

I.1.3.2. Réponse au stress oxydatif

Le génome de *Brucella* code pour plusieurs protéines capables de détoxifier les dérivés réactifs de l'oxygène produits par les macrophages lors de l'infection. Le génome de *B. abortus* code entre autres pour deux superoxyde dismutases (SOD), l'une cytoplasmique (Mn-SOD) et l'autre périplasmique (Cu/Zn-SOD), et pour une catalase périplasmique (Moreno, 2001). La localisation périplasmique de deux de ces enzymes suggère qu'elles sont impliquées dans la protection de *Brucella* vis-à-vis des sources externes de stress oxydatif (Kim *et al.*, 2000; Stabel *et al.*, 1994; Tatum *et al.*, 1992).

L'opéron *cydAB* chez *B. abortus* (Roop *et al.*, 2003) code pour la cytochrome oxydase *bd* qui possède une haute affinité pour l'O₂ et participerait à l'adaptation de *Brucella* aux conditions de microaérobiose rencontrées dans l'hôte (Endley *et al.*, 2001). La surproduction de la catalase ou de la Cu/Zn-superoxyde dismutase de *B. abortus* dans un mutant transpositionnel *cydB::Tn5* réduit l'atténuation en modèle murin, Elle intensifie aussi la sensibilité aux inhibiteurs respiratoires et à radicaux oxygénés telles que le peroxyde d'hydrogène (Endley *et al.*, 2001). Ces résultats

suggèrent que l'opéron *cydAB* joue rôle dans la résistance au stress oxydatif chez *B. abortus*.

Brucella est également capable de se débarrasser des protéines altérées par le stress oxydatif. La protéine HtrA, une sérine protéase périplasmique de choc thermique, est impliquée dans la dégradation des protéines oxydées endommagées. La mutation du gène *htrA* entraîne une sensibilité accrue de *Brucella* aux substances oxydantes ainsi qu'une atténuation de la survie (Elzer *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1995).

Les protéines de la famille Clp ATPases (Caseino lytic protease) sont très conservées au sein des génomes bactériens. Les chaperonnes ClpA, ClpB et ClpX peuvent former des complexes avec la protéase ClpP afin de dégrader les protéines endommagées. Il a été démontré que ClpA est impliquée dans la dégradation de protéines anormales/dénaturées chez *B. suis* (Ekaza *et al.*, 2000). Le mutant *clpB* montre quant à lui une sensibilité au pH acide et au stress oxydatif (Ekaza *et al.*, 2001).

I.1.3.3. Réponse au stress acide

L'expression des protéines HtrA, GroEL et DnaK est induite en milieu acide (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996; Teixeira-Gomes *et al.*, 2000). DnaK est impliquée dans la réponse aux stress acide et oxydatif (Kohler *et al.*, 2002c) et est essentielle à la survie de *Brucella* au sein des macrophages (Kohler *et al.*, 2002a). Sa fonction précise n'est cependant pas connue à ce jour. La protéine ClpB semble impliquée dans la résistance au stress acide (Ekaza *et al.*, 2001).

I.1.3.4. Adaptation métabolique

Les *Brucellae* doivent être capables d'adapter leur métabolisme aux conditions rencontrées au cours de leur cycle infectieux. Plusieurs cribles génétiques ont mis en évidence que de nombreux mutants affectés dans des voies métaboliques sont atténués en modèles cellulaires et/ou en modèle murin (Delrue *et al.*, 2001; Foulongne *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Lestrade *et al.*, 2000; Lestrade

et al., 2003). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que *Brucella* rencontrerait lors de l'infection cellulaire des compartiments de compositions nutritives différentes, nécessitant l'adaptation métabolique de la bactérie (Kohler *et al.*, 2003).

De nombreux gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés valine, leucine, isoleucine, serine, thréonine, histidine et cystéine, sont nécessaires à la virulence de *Brucella* dans plusieurs modèles d'infection. De même certains transporteurs permettant l'importation de ces métabolites sont nécessaires à la survie dans l'hôte (Delrue *et al.*, 2004).

En ce qui concerne le métabolisme des sucres, il a été démontré que les voies de dégradation du maltose, de l'arabinose, du ribose, du galactose, du glucose, de l'inositol et du glycérol et de l'érythritol sont essentiels à la survie intracellulaire de *Brucella* (Essenberg *et al.*, 2002). De nombreux gènes impliqués dans le transport et le catabolisme de ces sucres sont indispensables à la virulence de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2004). Cinq de ces gènes sont notamment impliqués dans la voie des pentoses phosphate, une voie métabolique capitale pour *Brucella* qui ne possède pas de phosphofructokinase, enzyme essentielle de la glycolyse (Essenberg *et al.*, 2002).

Une analyse protéomique récente (Lamontagne *et al.* 2009) illustre également un profond remaniement métabolique au cours du trafic intracellulaire; dans un premier temps *Brucella* réprime l'expression des protéines associées au métabolisme central (cycle TCA, pentoses phosphate) et à l'internalisation de substrats carbonés. Par contre les enzymes destinés au catabolisme des protéines et acides aminés sont augmentés. Ce n'est que quand la bactérie atteint sa niche de réplication que les enzymes du métabolisme central reprennent leur niveau d'expression tout en semblant toujours dépendre des acides aminés.

1.2. Régulation de l'adaptation et de la virulence chez Brucella

L'adaptabilité générale d'un organisme ne dépend pas seulement de la nature de l'information génétique disponible, mais aussi et peut-être surtout de la mise en place de mécanismes qui en assurent l'expression régulée.

Le leitmotif de l'adaptabilité pour une bactérie dans un environnement donné est d'exprimer les gènes qui procurent un avantage dans la survie et/ou la croissance dans cet environnement et de réprimer les gènes qui ne sont pas nécessaires.

Notons que l'expression des gènes de virulence est généralement gouvernée par des voies de signalisation et des mécanismes de régulations qui sont similaires à ceux contrôlant des gènes non impliqués dans la pathogénie.

Comme nous l'avons vu ci-dessus *Brucella* a chez son hôte un cycle infectieux partiellement compris. L'aspect cardinal de ce cycle reposant sur la capacité qu'a *Brucella* de moduler la réponse immunitaire de l'hôte et de survivre et de se répliquer au sein des cellules phagocytaires ou non phagocytaires. Cette dernière caractéristique dépendant de la subversion du trafic vacuolaire et de la physiologie de la cellule infectée (Gorvel and Moreno, 2002).

Lors de son « Odyssée » au sein de l'hôte et de ses cellules, *Brucella* a la capacité de s'adapter à une grande diversité d'environnements. Du point de vue de la bactérie, l'infection pourrait être perçue comme un processus développemental ou de différenciation caractérisé par une succession d'événements spatialement et chronologiquement bien définis. Etape après étape durant ce processus d'infection et en fonction des conditions rencontrées à chacune des phases spécifiques de l'infection, il est nécessaire d'avoir une expression finement régulée des gènes encodant les « déterminants » de virulence.

Le décodage de ces phénomènes de régulation, chez *Brucella*, sera d'une importance cruciale pour aboutir à une meilleure compréhension de la pathogénie de cette bactérie.

L'objectif de ce chapitre est de faire très brièvement le point sur les facteurs qui pourraient être partie prenante du réseau de régulation de la virulence de *Brucella*. Les données seront basées soit sur les mutants atténués qui ont été décrits au cours des dernières années dans divers modèles d'infection (Delrue *et al.*, 2001; Ficht, 2002; Foulongne *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2002a; Lestrade *et al.*, 2000;

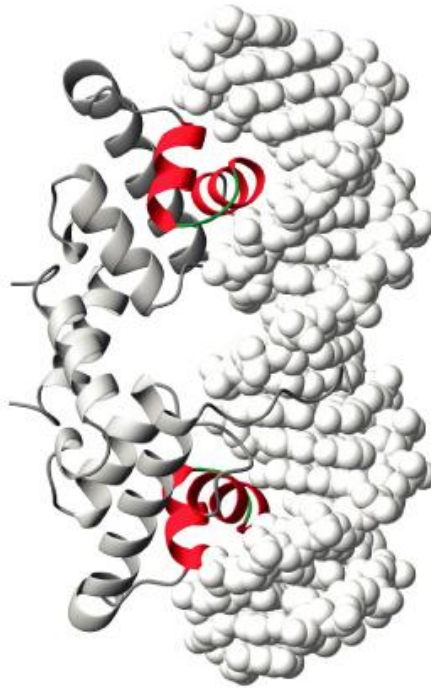
Wu *et al.*, 2006) et également sur certaines prédictions qui ont été faites à partir des données génomiques et sur ce qui est connu chez d'autres espèces de bactéries (DeIVecchio *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005; Paulsen *et al.*, 2002).

Nous insisterons particulièrement sur les systèmes de transduction du signal à deux composants mais nous décrirons aussi en bref les régulateurs transcriptionnels classiques, les autres systèmes de transduction du signal, qu'ils impliquent un phosphotransfert ou un second messenger, ainsi que les régulateurs globaux spécialisés qu'ils agissent à l'échelle de la cellule (facteurs sigma, réponse de stringence, sRNA) ou de la population (quorum sensing).

I.2.1. Régulation transcriptionnelle

I.2.1.1. Facteurs de transcription classiques

Le motif Helix-Turn-Helix (HTH) (Figure 7) est la signature majoritaire des domaines de liaison à l'ADN des facteurs de transcription procaryotes. (Luscombe *et al.*, 2000) . Des particularités de ce motif permettent de le répartir en différentes familles (Karmirantzou and Hamodrakas, 2001). Il y a environ 20 familles de domaines HTH définis chez les procaryotes, les plus fréquents dans les génomes séquencés étant les familles LysR, AraC/XylS, ColD, EBP, GalR/LacI et GntR. Des différences additionnelles peuvent être trouvées dans des domaines autres que le domaine HTH et qui sont également partagées entre membres d'une même famille. Citons par exemple : le domaine N-terminal nucléotide-binding des régulateurs de la famille Crp/Fnr, le domaine C-terminal sugar-binding des familles RpiR et GntR.



© 1999–2004 New Science Press

Figure 7 : Le domaine DNA binding de la protéine lamda, avec deux motifs Helix-Turn-Helix (HTH) montrés en couleurs. Les deux hélices (en rouge) plus proches de l'ADN sont les hélices de lecture ou reconnaissance, qui reconnaissent et qui lient dans le sillon de la séquence spécifique du gène régulé, dans l'ADN, (par (Petsko, 2007)).

Si quelques mutants ont été isolés lors de cribles génétiques, la majorité des données provient d'une étude de mutagenèse systématique de 88 de ces régulateurs et de l'étude de leur atténuation en modèle murin (Haine *et al.*, 2005) (voir Tableau 3).

Il y a 146 régulateurs transcriptionnels (RT) encodés dans le génome de *B. melitensis*. 129 d'entre eux sont répartis en 14 familles avec au moins trois membres (tableau 2) Dans l'ordre décroissant d'abondance ces familles sont : 20 GntR, 20 LysR, 13 AraC, 12 MarR, 10 AsnC, 8 TetR, 7 IclR, 7 LacI, 6 FnR, 6 ArsR, 6 Xre, 6 MerR, 5 DeoR, 3 RpiR (tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des familles principales des régulateurs transcriptionnels, identifiés dans le génome de *Brucella*

Familles	Position du domaine HTH ²	Rôle Régulateur ²	Nombre sur CI ³	Nombre sur CII ³	Total	%
GntR	N	répresseur	6	14	20	13,7
LysR	N	dual	9	11	20	13,7
AraC	C	activateur	5	8	13	8,9
MarR	V	?	5	7	12	8,2
AsnC	N	dual	5	5	10	6,8
TetR	N	répresseur	6	2	8	5,5
IcIR	N	répresseur	2	5	7	4,8
LacI	N	répresseur	3	4	7	4,8
FnR	C	dual	2	4	6	4,1
ArsR	M	?	3	3	6	4,1
Xre	N	répresseur	5	1	6	4,1
MerR	N	répresseur	4	2	6	4,1
DeoR	N	répresseur	2	3	5	3,4
RpiR	N	répresseur	0	3	3	2,1
autres		variable	11	6	17	11,6
TOTAL			68	78	146	100

¹N :N-terminal ; C :C-terminal ; V : variable, M : moyen, CI : chromosome I, CII : chromosome II. Selon (Perez-Rueda and Collado-Vides, 2000)

Peu de signaux reconnus par ces régulateurs ont été identifiés sans ambiguïté. Néanmoins quelques pistes existent. Citons par exemple, le régulateur RpiR impliqué dans le métabolisme de la rhizopine, qui a été identifié comme étant induit par le 3-O-méthyl-scylo-inositol (P. Lestrade, thèse), le régulateur NikR qui pourrait répondre au nickel (Jubier-Maurin *et al.*, 2001) ou encore le régulateur EryD qui est prédit répondre à l'érythritol (Sangari *et al.*, 2000) ou finalement DhbR (un régulateur de la famille AraC) qui nécessite le 2,3-DHBA ou la brucebactine (un sidérophore) comme co-inducteur pour devenir un activateur transcriptionnel de l'opéron dhbCEBA opéron de *B. abortus* 2308 (Anderson *et al.*, 2008).

Tableau 3 : Liste et caractéristiques des mutants de RT de *B. melitensis* identifiés comme étant atténués.

Famille ¹	Nom	N° pCDS	Référence	Modèles employés
gntR	gntR1 ²	bmeII0475	(Haine ⁴ , 2005)	Mice
	gntR4 ²	bmeI0169	(Haine ⁴ , 2005)	Mice
	gntR5 ^{2,3}	bmeI0881	(Haine ⁴ , 2005)	Mice
	gntR10 ^{2,3}	bmeII0116	(Haine ⁴ , 2005)	Mice
	gntR 18	bmeII1066	(Lestrade P., 2003)	Mice, Macrophages, HeLa
lysR	lysR12 ^{2,3}	bmeII0390	(Haine ⁴ , 2005)	Mice
	lysR13 ^{2,3}	bmeI1913	(Haine ⁴ , 2005)	Mice
	lysR18 ²	bmeI1573	(Haine ⁴ , 2005)	Mice
	lysR21	bmeI0513	(Foulongne <i>et al.</i> , 2000) (Wu <i>et al</i> 2006)	Mice, Macrophages, HeLa
merR	merR1	bmeI0808	(Wu <i>et al</i> 2006)	Mice, Macrophages
	merR4	bmeI1178	(Wu <i>et al</i> 2006)	Mice, Macrophages
asnC	asnC11	bmeI0357	(Lestrade P., 2003)	Mice, Macrophages, HeLa
rpiR	rpiR ²	bmeII0573	(Lestrade P. ⁴ , 2003) (Haine ⁴ , 2005)	Mice, <u>Macrophages⁵, HeLa⁵</u>
deoR	deoR ³	bmeII1093	(Kohler <i>et al.</i> , 2002)	Macrophages
crP	NnrA	bmeII0986	(Haine ⁴ , 2006)	Mice, macrophages
Autres	nikR	bmeII0486	(Lestrade P., 2003)	Mice, Macrophages, HeLa
	mucR	bmeI1364	(Wu <i>et al</i> 2006)	Mice, Macrophages

¹Voir tableau 2: ²mutants identifiés avec la stratégie de disruption systématique; ³aucune prédiction de fonction spéciale ne peut être faite pour ces RT parce que nous n'avons pas identifié clairement une organisation conservée du locus dans d'autres Rhizobiaceae. ⁴Communication personnelle V. Haine. ⁵Aucune atténuation n'a été enregistrée dans ces modèles (Letesson, 2004) (Haine *et al.*, 2005; Lestrade *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006).

1.2.1.2. Transduction du signal

Les systèmes de transduction du signal sont basés soit sur un second messenger (Hengge, 2009; Pesavento and Hengge, 2009) ou sur une phosphorylation réversible de protéines (Reizer and Saier, 1997).

1.2.1.2.1. Messenger secondaire

Un module second messenger consiste généralement en 4 composants : les 2 enzymes qui en réponse à un signal produisent et dégradent le second messenger, la molécule

effectrice qui lie et est régulée allostériquement par le second messager et finalement la cible qui en réponse à un contact direct avec la molécule effectrice produit la réponse.

Un exemple classique est la signalisation par l'AMPc chez *E. coli*. L'AMPc est produit par une adénylate cyclase en réponse à des stimuli complexes (dont par exemple l'absence de glucose passant par la perméase du système de transfert de phosphate dépendant du phosphoénolpyruvate (PTS) et est dégradé par une phosphodiesterase spécifique. L'AMPc interagit allostériquement avec une molécule effectrice qui est le régulateur transcriptionnel CRP (catabolite repression protein) qui, dès lors, est apte à interagir avec de multiples gènes cibles qui possèdent tous le motif de liaison au AMPc-CRP dans leur zone opératrice. Ce système est responsable de l'utilisation préférentielle de glucose lorsque de nombreuses autres sources de carbone sont disponibles (répression catabolique) et du phénomène de diauxie lors de croissance sur 2 sources de carbone.

Il n'y a pas d'adénylate cyclase ni de protéines de type CRP chez *Brucella* donc le mécanisme de répression catabolique doit être différent.

Plus récemment le c-di-GMP (diguanylate cyclique) est apparu comme un second messager crucial dans le monde bactérien et régule de nombreuses fonctions dont la mobilité, la production de biofilm, la virulence et le cycle cellulaire (Hengge, 2009) (voir figure 8). Dans ce cas les enzymes à la base du système sont une diguanylate cyclase définie par la possession d'un domaine GGDEF (GGDEF représente les motifs conservés d'acide aminés) qui à partir de 2 GTP synthétise le c-di-GMP et la phosphodiesterase spécifique (qui possède un domaine EAL ou un domaine HD-GYP) qui hydrolyse le c-di-GMP en pGpG. Ce dernier est ensuite clivé en deux GMP. La particularité de ce système est que chez de très nombreuses bactéries il existe plusieurs protéines à domaine GGDEF et plusieurs protéines à domaine EAL/HD-GYP ainsi que de nombreuses molécules effectrices ce qui assure un potentiel régulateur beaucoup plus complexe et diversifié loin d'être encore complètement compris.

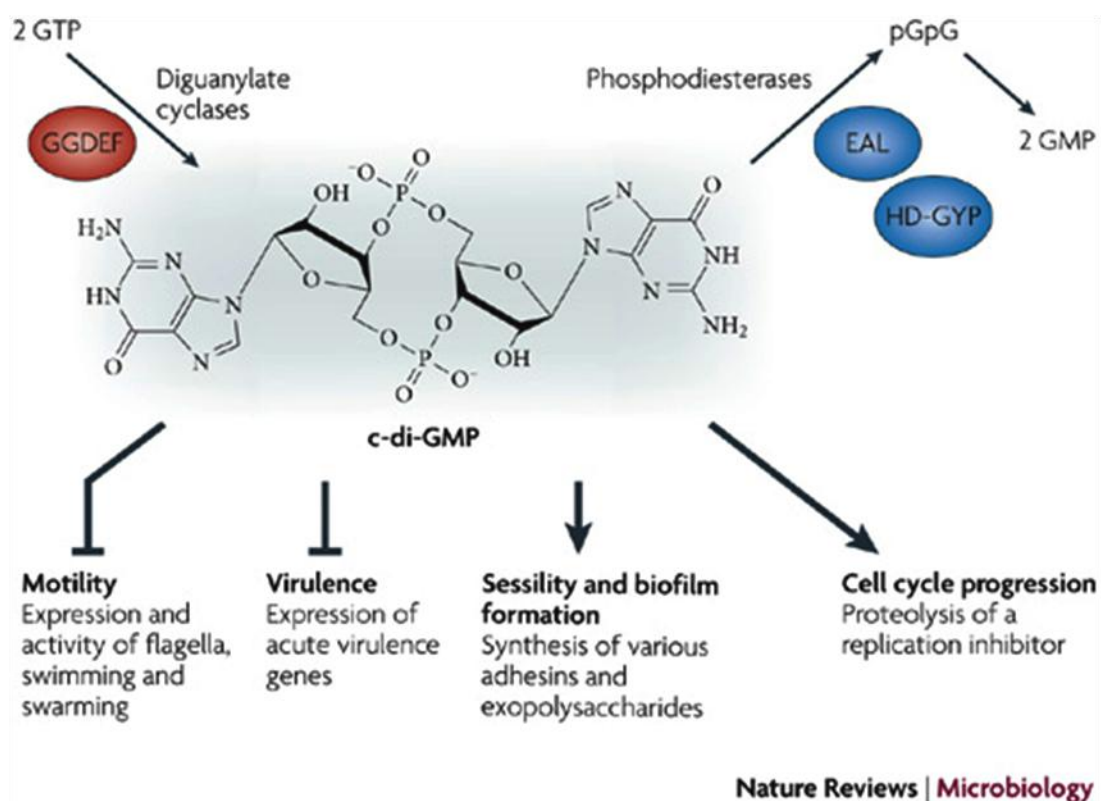


Figure 8: Au niveau cellulaire le diguanilate cyclique (c-di-GMP), est contrôlé par la diguanylate cyclase qui porte les domaines GGDEF (en rouge) et les phosphodiesterases spécifiques qui portent les domaines EAL ou HD-GYP (bleu). Le c-di-GMP, un second messager crucial dans le monde bactérien régule de nombreuses fonctions, dont la mobilité (régulation de l'expression des protéines du flagelle)(Wolfe and Visick, 2008), la production de biofilm (biosynthèses de fimbries, d'adhésines et la matrice d'exopolysaccharides) (Jenal, 2004; Jonas *et al.*, 2009), la virulence et le cycle cellulaire (Duerig *et al.*, 2009). D'après (Hengge, 2009).

Il y a 11 protéines prédites comme pouvant intervenir dans la voie des messagers secondaires de type c-di-GMP chez *B. melitensis* (c'est-à-dire possédant un domaine GGDEF ou EAL). Six n'ont que le domaine GGDEF sans domaine EAL, trois ont à la fois un domaine GGDEF et un domaine EAL et deux n'ont qu'un domaine EAL (voir Tableau 4).

A ce jour aucun mutant n'a été décrit pour l'une de ces protéines chez *Brucella* spp. La CDS BMEII0660 correspond à *pleD* de *C. crescentus* avec qui elle partage une identité de 45 % en acides aminés (voir la Partie 1.3 sur les SDC). Aucun phénotype discernable n'a été associé à ce mutant chez *B. abortus* (X. De Bolle communication personnelle).

Tableau 4: Protéines prédites comme liées au système de messagers secondaires de type c-di-GMP chez *B. melitensis*

N°ORF	N°TM*	Taille aa	7TMR1/2	GAF	RR	PAS	GGDEF	EAL
BMEII0654	1	212						
BMEI0929	2	255						
BMEII0292	7	348						
BMEI1520	6	355						
BMEII1009		378						
BMEII0660		461			2			
BMEI1448		526						
BMEII0904		530						
BMEI1731		709						
BMEII0317	5	765						
BMEI1453	8	964				2		

- TM : segments transmembranaires prédits
- 7TMR1/2: 7 recepteur transmembranaire
- GAF: domaine GAF (motifs omniprésents)
- RR : domaine du response régulateur
- PAS: domaine PAS (Per-ARNT-Sim)
- EAL: représente les motifs conservés d'acide aminés
- GGDEF: représente les motifs conservés d'acide aminés

1.2.1.2.2. Phosphotransfert

Le phosphotransfert peut être classé en trois catégories :

- les systèmes à deux composants (SDC) chez qui une histidine kinase senseur fonctionne dans un transfert de phosphate sur un résidu aspartate d'un régulateur de réponse (voir point I.3.4.1)
- le système de transfert de phosphate dépendant du phosphoénolpyruvate (système PTS) qui transfère un groupe phosphate majoritairement sur un résidu histidine d'une protéine cible.

- les kinases ATP dépendantes qui phosphorylent des résidus sérine, thréonine ou tyrosine sur les protéines cibles.

Ce dernier système est plus utilisé chez les eucaryotes, tandis que les systèmes SDC et PTS sont majoritaires chez les procaryotes (Bakal and Davies, 2000).

I.2.1.2.2.1. Transduction du signal à deux composants

Initialement, le terme « deux composants » a été utilisé pour désigner une nouvelle catégorie de système de régulation bactérien (Nixon *et al.*, 1986). Depuis lors des centaines de systèmes à deux composants (SDC) ont été découverts chez les eubactéries, les archaeae et chez quelques eucaryotes.

Les SDC fonctionnent comme mécanisme sophistiqué dont le couplage « stimulus – réponse » utilise une histidine kinase (HK) senseur dans un transfert de phosphate sur un résidu aspartate d'un régulateur de réponse (RR). A côté du coeur conservé qui lui a valu son nom de deux composants (HK, RR) la construction des SDC est hautement modulaire et les bactéries ont plusieurs dizaines de SDC qui ont été adaptés et intégrés à une large variété de circuits de signalisation cellulaire.

Ces systèmes à deux composants seront décrits plus en détail au point I.3.

I.2.1.2.2.2. Le système de transfert de phosphate dépendant du phosphoénolpyruvate (PTS)

Le système PTS est un système de phosphotransfert dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP) et est présent exclusivement chez les procaryotes. Il a été décrit comme un système qui non seulement assure le transport et la phosphorylation de carbohydrates mais régule aussi de nombreux aspects de la physiologie bactérienne (Barabote and Saier, 2005; Deutscher *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1993).

Le PTS est composé de plusieurs protéines qui forment un phosphorelais à travers lequel le groupe phosphate est transféré à partir du PEP sur le sucre qui pénètre dans la cellule (Figure 9) (Postma *et al.*, 1993). On y trouve dans l'ordre: (i) les protéines générales du PTS: l'enzyme EI (EI) et HPr qui sont deux composants cytoplasmiques communs à tous les systèmes PTS et (ii) les complexes enzymatiques

EII chacun spécifique d'un ou plusieurs sucres. Le composant EII est formé d'au moins trois domaines (ou protéines) distincts appelés EIIA et EIIB qui sont cytoplasmiques ainsi que EIIC (et parfois EIID) qui sont transmembranaires et constituent la perméase du système (Deutscher *et al.*, 2006). En présence de PEP, son groupe phosphate est transféré séquentiellement à EI, HPr, EIIA, EIIB et finalement au sucre qui pénètre. La plupart des protéines PTS sont phosphorylées sur un résidu histidine conservé à l'exception des protéines EIIB qui sont phosphorylées sur un résidu cystéine conservé. A côté de son rôle dans la pénétration et la phosphorylation de sucres, sources de carbone PTS dépendante, le système PTS est un régulateur majeur de nombreux aspects de la physiologie bactérienne (par exemple la répression catabolique) (voir (Bruckner and Titgemeyer, 2002; Deutscher *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1993) mais on l'implique aussi de plus en plus dans virulence de bactéries pathogènes.

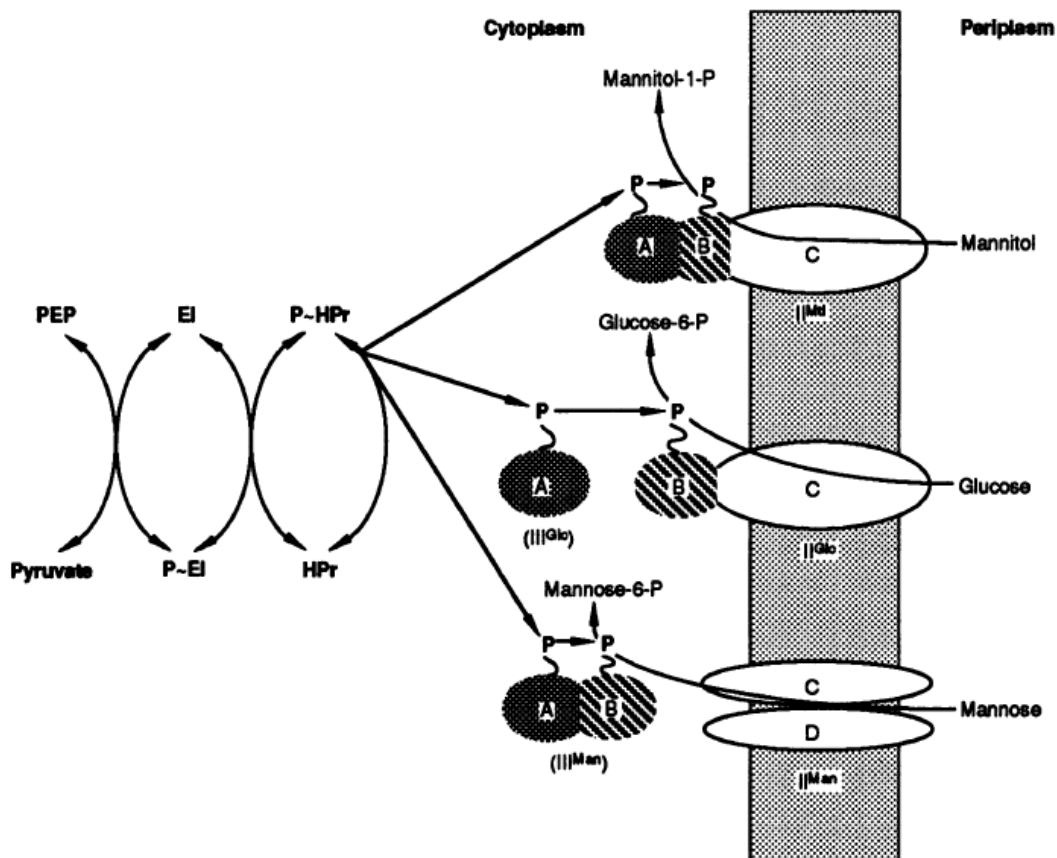


Figure 9 : Représentation schématique de PTS d'hydrates de carbone. EI et HPr enzymes du système PTS. Trois complexes EII spécifiques sont représentés pour le manitol (Mtl), le glucose (Glc) et le

mannose (Man). Chacun contient deux domaines cytoplasmiques: EIIA contient le premier site de phosphorylation (histidine). Et EIIB contient le deuxième site de phosphorylation (cystéine ou histidine). Le domaine associé à la membrane EIIC (EIID) est une perméase sucre spécifique. D'après (Postma *et al.*, 1993).

Le système tel que décrit ci-dessus suivant le modèle de bactéries à Gram négatif comme les entérobactéries a subi quelques variantes chez les bactéries à Gram positif comme les firmicutes (par exemple *Bacillus* spp). Chez ces dernières une kinase additionnelle HPrK/P est susceptible de phosphoryler HPr sur un résidu sérine conservé. Sous cette forme, le transfert de phosphate via les résidus histidine depuis le PEP sur le complexe EII est inhibé.

Chez *E. coli* un système paralogue du système PTS a été proposé comme responsable du lien entre le métabolisme carboné et azoté et dénommé le PTS azote (PTS_{Ntr}) (Figure 10) (Lee *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 1995). Le transfert de phosphate dans ce PTS_{Ntr} fait intervenir trois protéines EI_{Ntr}, NPr et l'enzyme EIIA_{Ntr} qui sont les paralogues de EI, HPr et EIIA du PTS classiques mais ne sont pas associées à des perméases PTS (Barabote and Saier, 2005; Postma *et al.*, 1993; Reizer *et al.*, 1996).

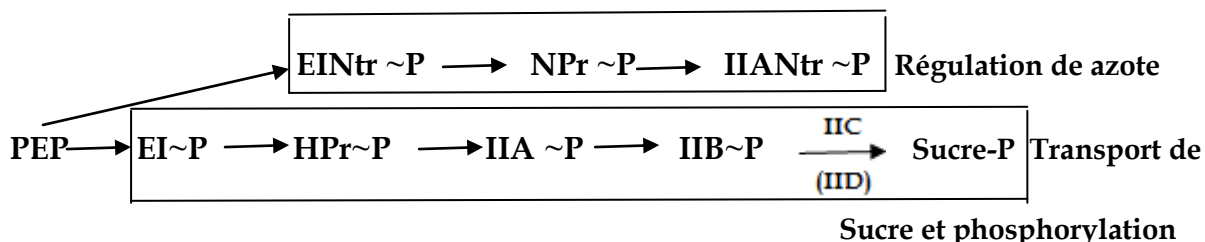


Figure 10 : Représentation schématique de chaînes de transfert de phosphate en bactéries du système PTS, le schéma de régulation d'azote montre la séquence parallèle d'évènements de phosphorylation.

Le PTS_{Ntr} coexiste avec le PTS carbohydrate chez de nombreuses γ -protéobactéries dont les entérobactéries (e.g. *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*), les pseudomonadales (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*) et les Vibrionales (*Vibrio cholerae*).

Néanmoins de nombreuses autres bactéries à Gram négatif, dont les α -protéobactéries (*Agrobacterium* spp, les rhizobiales et *Brucella* spp.) n'ont qu'un seul système PTS qui est en outre incomplet puisque sans perméase.

Ces bactéries possèdent au moins un enzyme I (EI_{Ntr}) et HPr (or NPr) et souvent deux enzymes IIA dont EIIA_{Ntr} et EIIA_{Fru} ou EIIA_{Man}.

L'absence de perméase permet de penser que ce système incomplet fonctionne uniquement dans le cadre de la régulation métabolique. Chez ces bactéries dont le PTS est purement régulateur on retrouve généralement un composant additionnel la HPr (ou NPr) sérine-kinase (HprK/P) décrite initialement chez les bactéries à Gram positif et susceptible de moduler l'activité histidine phosphotransferase de HPr (NPr) (Barabote and Saier, 2005; Boel *et al.*, 2003; Hu and Saier, 2002).

Chez *Brucella* et d'autres alphaprotéobactéries dont *S. meliloti* et *A. tumefaciens* les gènes encodant NPr, EIIA_{Man} et HprK/P) sont localisés dans un locus génomique à proximité d'un système à deux composants (voir ci-dessous) impliqué dans la symbiose ou la virulence (BvrS-BvrR chez *Brucella* spp., ChvG-ChvI chez *A. tumefaciens* et ExoS-ChvI chez *S. meliloti*) (Charles and Nester, 1993; Cheng and Walker, 1998; Sola-Landa *et al.*, 1998), ce qui laisse à penser qu'il y aurait un lien fonctionnel entre ce système à deux composants et les gènes PTS avoisinants. Cette hypothèse est renforcée par l'existence d'une liaison transcriptionnelle entre BvrS et le gène PTS en aval (Dozot, 2007).

Trois des gènes du PTS_{Ntr} (EI_{Ntr}, EIIA_{Ntr} et NpR) de *Brucella* ont été identifiés lors de cribles comme étant atténués pour leur virulence (Delrue *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2002b; Wu *et al.*, 2006).

M. Dozot a également montré lors de sa thèse que les mutants EI_{Ntr} et NPr n'expriment plus le système de sécrétion de type IV alors que les mutants HprK et EIIA_{Ntr} ne sont pas affectés. Ces observations lient clairement la régulation du métabolisme de *Brucella* spp. et sa virulence. En outre, plusieurs mutants du PTS montrent en culture sur milieu solide un phénotype « small colony variant » qui a été proposé comme étant associé à une résistance accrue des bactéries et ainsi pourrait être lié à la chronicité de la brucellose (Jacob *et al.*, 2006).

I.2.1.3. Les régulateurs globaux spécialisés

Bien entendu certains des régulateurs décrits plus haut pourraient avoir un rôle global (PTS, SDC...) ; pour s'en convaincre il suffit de considérer le phosphorelais de CtrA qui coordonne le cycle cellulaire et la différenciation.

Il existe néanmoins des régulateurs globaux spécialisés : les facteurs sigma qui reprogramme la RNA polymérase à reconnaître les promoteurs des opérons d'un régulon, le réseau de la réponse de stringence et enfin le système de quorum sensing. Ces divers systèmes seront décrits brièvement dans les paragraphes qui suivent en faisant la distinction entre la régulation à l'échelon d'une cellule (facteur sigma, réponse de stringence) et à l'échelle de la population (Quorum sensing).

I.2.1.3.1. Régulation globale à l'échelon d'une cellule.

I.2.1.3.1.1. Les facteurs sigma

Le processus d'initiation de la transcription par la RNA polymérase nécessite la liaison réversible d'une sous-unité spéciale de cet enzyme: le facteur sigma qui conduit à la reconnaissance de divers types de promoteurs.

Le facteur sigma majoritaire (appelé aussi RpoD ou sigma70 chez *E. coli*) est responsable de la transcription de la plupart des gènes dits « de ménage » qui sont essentiels à la survie bactérienne et exprimés pendant la croissance exponentielle. En plus de ce facteur σ^{70} principal, d'autres facteurs sigma permettent à la bactérie d'adapter son expression génique aux changements environnementaux comme par exemple: les bas pH, la haute température, le stress oxydatif, la restriction carbonée. Sur base de similarités de séquence, ces facteurs sigma alternatifs sont regroupés en deux familles: famille σ^{70} et famille σ^{54} .

Certains de ces facteurs sigma ont été décrits comme intervenant dans la régulation de gènes de virulence; ainsi les facteurs de stress (σ^B et σ^S) (Loewen and Hengge-Aronis, 1994), le facteur flagellaire (σ^{28}), les facteurs à fonction extracytoplasmique (RpoE, AlgU), et enfin le facteur sigma de la régulation azotée RpoN ou σ^{54} (Fang *et al.*, 1992) (Nadon *et al.*, 2002).

Six facteurs sigma ont été identifiés dans le génome de *B. melitensis* :

- un facteur sigma de ménage (σ^{70} , encodé par *rpoD*),
- deux homologues de σ^{32} (*rpoH1* et *rpoH2*). L'existence de 2 *rpoH* semble classique chez les Rhizobiales (Delory *et al.*, 2006).
- deux facteurs de fonction extracytoplasmique (ECF) (*rpoE1* et *rpoE2*) ce qui est comparativement peu par rapport à *A. tumefaciens* ou *S. meliloti* et pourrait être corrélé au cycle de vie extracellulaire limité de *Brucella* spp.
- et un homologue de σ^{54} (*rpoN*) dont l'organisation génomique à proximité du facteur EI_{Ntr} est conservé chez les α -protéobactéries. On note chez *B. melitensis* 3 régulateurs transcriptionnels prédits comme dépendants de *rpoN* (*NtrC*, *NtrY* et *BMEII0011*).

Contrairement aux bactéries entériques, *B. melitensis*, tout comme les autres alpha-protéobactéries (Roop *et al.*, 2003), ne possède pas de gène *rpoS*-like qui encode le facteur sigma général de stress *RpoS* (σ^S) nécessaire par exemple pour la phase stationnaire de croissance.

A l'exception de *rpoD*, tous les gènes des facteurs sigma ont été mutés et le mutants évalués quant à leur résistance aux stress et leur virulence résiduelle. Le $\Delta rpoH2$ voit sa croissance réduite à 21 et à 42° C il est aussi plus sensible au peroxyde d'hydrogène et est atténué dans tous les modèles d'infection. Trois autres mutants nuls, $\Delta rpoH1$, $\Delta rpoE1$ et $\Delta rpoE2$, ont aussi un défaut de survie après 4 semaines d'infection en souris. En outre, le mutant $\Delta rpoH2$ voit l'expression de deux facteurs de virulence (le TFSS et le flagelle) fortement réduite (Delory *et al.*, 2006).

I.2.1.3.1.2. La réponse de stringence

La réponse de stringence est un système de régulation pléiotropique permettant aux bactéries de s'adapter aux conditions de famine. Elle est médiée par les ppGpp, de petites molécules produites par les bactéries en réponse à une carence en acides aminés et autres composés métaboliques (Magnusson *et al.*, 2005). Par exemple chez

E. coli RelA produit du (p)ppGpp lors d'une carence en acide aminé en détectant un ribosome « à l'arrêt » (Kim *et al.*, 2009). L'enzyme SpoT quant à lui répond à d'autres type de stimuli dont la carence en carbone ou dans le métabolisme lipidique (Battesti and Bouveret, 2009) en produisant aussi une accumulation de (p)ppGpp.

Les (p)ppGpp synthétisés par les protéines RelA/SpoT modifient la compétition entre facteurs sigma pour la liaison à l'ARN-polymérase et entraîne un arrêt de croissance et l'expression de gènes de résistance à divers stress (Figure 11).

De nombreuses bactéries (*Bacillus* spp, *Streptococcus* spp et des α -protéobactéries dont *Brucella* spp.) possèdent seulement un homologue de RelA/SpoT appelé Rsh (RelA/SpoT homologue) (Battesti and Bouveret, 2009) qui est capable de synthétiser et dégrader le (p)ppGpp et qui ne semble pas avoir de lien avec le métabolisme lipidique.

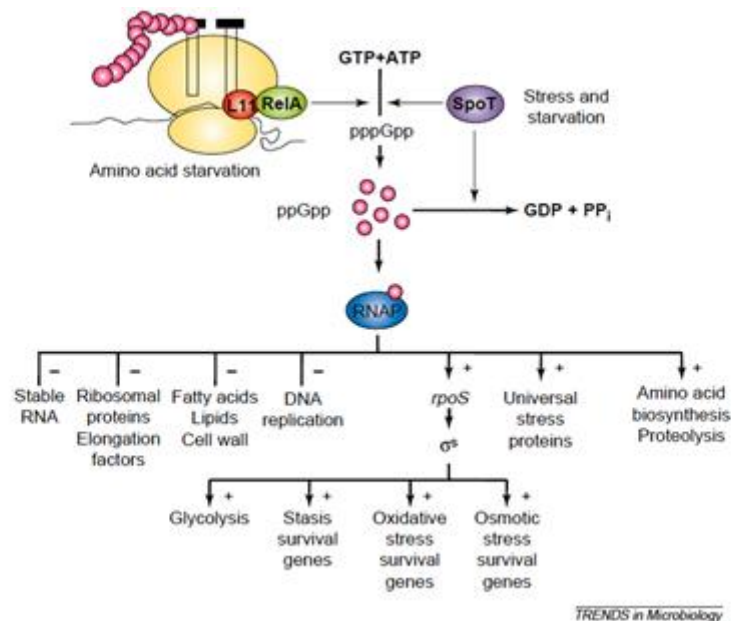


Figure11 : Le schéma présente la réponse de stringence. Le pppGpp est produit à partir de GTP et ATP pour deux voies parallèles en réponse au stress et à la famine, et plus tard il se transforme en ppGpp. Les ppGpp synthétisés par RelA se lient à l'ARN-Polymérase et réorientent la transcription des gènes impliqués dans la croissance, dans la résistance aux stress et à la survie de famine. SpoT est également responsable de l'hydrolyse de ppGpp. (Illustration tirée de (Magnusson *et al.*, 2005)).

Chez *Brucella*, il a récemment été démontré que Rsh est impliquée dans la survie en conditions de stress et en macrophages ainsi que dans l'activation de l'opéron *virB* (Dozot *et al.*, 2006).

I.2.1.3.2. Effet intercellulaire

I.2.1.3.2.1. Le Quorum sensing

Le Quorum sensing (QS) correspond à un moyen par lequel les bactéries communiquent entre elles et par là coordonnent, à l'échelle de la population, une réponse adaptative lorsque la densité cellulaire atteint un certain seuil (le Quorum).

Chez les bactéries à Gram négatif, la communication est médiée par les N-acyl-homosérine lactones (AHL) (Fuqua *et al.*, 2001) une petite molécule diffusible aussi appelée phéromone. Cette phéromone est produite par une synthétase (souvent de la famille LuxI) qui diffuse et s'accumule dans le milieu ; lorsque l'AHL atteint une certaine concentration (c'est-à-dire lorsque la population est grande ou l'espace confiné) elle rentre dans chaque cellule en se liant à un régulateur transcriptionnel et modifie l'expression génique. Parmi les gènes régulés se trouve la synthétase, ce qui entraîne une augmentation de production de la phéromone et une autoamplification du phénomène de QS ; pour cette raison l'AHL est aussi appelée auto-inducteur.

Il apparait évident que pour de très nombreuses bactéries symbiotiques ou pathogènes leurs capacités d'adaptation à l'hôte est sous la dépendance du Quorum sensing (Gonzalez and Keshavan, 2006).

Bien qu'aucune synthétase d'AHL n'aie été identifiée à ce jour chez *B. melitensis*, cette bactérie produit deux AHL : de la C12-AHL qui a été caractérisée par spectrométrie de masse et probablement une 3-oxo-C12-AHL non caractérisée (Taminiau *et al.*, 2002). Deux régulateurs transcriptionnels de type LuxR et répondant au moins à la C12-AHL ont été identifiés : VjbR « Vacuolar Hijacking *Brucella* Regulator » (BMEI1116) (Delrue *et al.*, 2001) et BabR (BMEI1758) (Taminiau *et al.*, 2002)

Si à ce jour aucun phénotype d'atténuation n'a pu être associé à BabR (Taminiau, 2003), VjbR régule l'expression de l'opéron *virB* (TFSS) et du flagelle (il est d'ailleurs localisé dans un opéron flagellaire) (Delrue *et al.*, 2005). Ce régulateur contrôle en outre de nombreuses structures de surface comme les OMPs et la production d'un exopolysaccharide (Uzureau *et al.*, 2007).

Une étude combinée en transcriptomique et en protéomique a également démontré que les deux régulateurs de QS de *Brucella* sont impliqués dans une régulation réciproque et qu'ils partagent un bon nombre de cibles. Bien plus qu'une régulation limitée à des constituants de l'enveloppe, il apparaît en fait que des aspects très divers de la physiologie de *Brucella* sont sous le contrôle du QS (métabolisme central, chaîne de transport des électrons, transport de sucre et de peptides,...etc). Ces constatations donnent à penser que le QS jouerait un rôle important dans l'adaptation de *Brucella* à son environnement intracellulaire lorsqu'elle se dirige vers la niche de réplication (thèse de Sophie Uzureau 2007). Il faut également remarquer que pour d'autres bactéries il apparaît que les voies signalétiques du QS convergent avec celles de détection de la famine et régulent ainsi de concert l'entrée en phase stationnaire (Lazazzera, 2000).

I.2.2. Régulation post-transcriptionnelle.

Les régulations post-transcriptionnelles, interviennent dans l'adaptation dynamique du turnover de transcrits et des protéines ainsi que dans la modulation de l'efficacité de traduction d'ARNm en protéines (Picard *et al.*, 2009). Les stabilités des transcrits et des protéines sont dépendantes de déterminants de séquences et de processus de dégradation. L'efficacité de traduction est quant à elle principalement modulée par la synthèse et l'activité des ribosomes (Picard *et al.*, 2009). Ces mécanismes post-transcriptionnels mettent en concurrence de multiples facteurs de transcription (FT) pendant l'épissage, l'exportation, la localisation, la stabilité d'ARNm et pendant la traduction. (Harbison *et al.*, 2004).

Chez les procaryotes, les small non-coding RNAs (sRNAs), aussi appelés « noncoding » ou « regulatory' RNAs (sRNAs) », fonctionnent comme régulateurs de

l'expression génique (Storz *et al.*, 2005). Leurs tailles varient de 50 à 550 nucléotides. Beaucoup d'entre eux agissent au niveau post-transcriptionnel soit en tant qu'ARN anti-sens, soit en se liant à des séquences complémentaires de transcrits particuliers soit encore en se liant à des protéines (Pichon and Felden, 2007). Parmi ces protéines, Hfq (Host Factor-1 ou HF-1) joue un rôle majoritaire dans la stabilité de ces sARNs et leur appariement avec leurs cibles (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Les sARNs jouent ainsi un rôle soit dans la répression de la traduction ou dans l'activation de la traduction ou encore dans la stabilisation ou la dégradation des mRNA.

Bien que de nombreux ARN non codants soit prédits chez *Brucella*, à ce jour aucun d'entre eux n'a été démontré comme impliqué dans le contrôle de la virulence ni dans aucun autre processus physiologique.

Cependant des homologues du gène *hfq*, codant pour une petite protéine capable de lier l'ARN (Hfq) ont été trouvés dans tous les génomes séquencés de *Brucella*. Des mutants de ce gène sont incapables de s'adapter aux conditions de phase stationnaire et présentent une forte sensibilité au pH acide et au stress oxydatif ainsi qu'une forte atténuation de la virulence en modèle cellulaire et murin (Robertson and Roop, 1999).

Les cibles d'HF-1 ne sont pas encore définies, mais il a été démontré que cette « RNA-binding protein » est nécessaire à l'activation de l'opéron *cydAB* chez *B. abortus* (Roop *et al.*, 2003).

La régulation de la traduction dépende du contrôle d'éléments intrinsèques de l'ARNm (séquence et futures structures) et comprend la liaison de différents types d'effecteurs, (ARN-binding protéines et ribosomes).

Les contributions de séquences dans l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction ont été étudiées dans plusieurs bactéries. Chez *E. coli* l'interaction forte de séquences de liaison au ribosome (RBS) avec le ribosome ont été employée pour estimer l'initiation de la traduction (Osada *et al.*, 1999). La liaison de la petite sous-unité ribosomal 30S est interceptée par la protéine ribosomal S1 (Rocha *et al.*,

1999). Ainsi le RBS, le codon ATG et le codon stop jouent un rôle dans la traduction efficace.

Chez les bactéries, les riboswitchs sont des domaines structurés secondaires non codants de la molécule d'ARNm, qui régulent l'expression de gènes aux niveaux transcriptionnels et traductionnels (Batey, 2006). Généralement les riboswitches jouent un rôle dans le contrôle de la répression de la transcription, l'activation de la traduction ou dans la stabilisation des ARNm (Winkler and Breaker, 2005). Ils répondent aux changements dans les concentrations de petites molécules (métabolites), par exemple bases nucléiques, acides aminés, ou sucres. Plus souvent les riboswitches sont situés dans le 5'UTR du gène qui code la protéine de leurs ligands (Vitreschak *et al.*, 2004). Winkler a montré chez *E. coli* que la traduction de l'ARNm qui code pour enzymes impliqués dans la synthèse de thiamine est régulée par un riboswitch avec des aptamers fortement sélectifs pour sa cible thiamine. (Winkler and Breaker, 2005)

Une famille des protéines de liaison à l'ARN comme par exemple CsrA d' *E. coli* et RsmA des espèces de *Pseudomonas*, joue un rôle par liaison de ces protéines à la région 5' des ARNm qui entraîne le blocage de l'initiation de la traduction et la stimulation de la dégradation de l'ARNm (Dubey *et al.*, 2003).

Dans *E. coli* en conditions de stress les protéines chaperonnes comme les protéines du choc thermique généralement désignées par HSP (heat shock proteins) interviennent dans la régulation de la protéine naissante conformationnelle. Ces chaperones comme DnaK ou GroEL aident à la traduction, au repliement, ou à leur assemblage après la libération du ribosome (Picard *et al.*, 2009).

La dégradation des protéines chez les bactéries est un processus qui requiert des protéases. Les protéases principales font partie de la famille des Clp (protéase caséinolytique). Chez *E. coli* des complexes protéolytiques de deux protéases Clp sont formés comme ClpAP, ClpXp et ClpYQ. Une Clp protéase est aussi une ATPase (ClpA, ClpX et ClpY). Tandis que le deuxième est impliqué dans la protéolyse (ClpP ou ClpQ) (Gottesman, 2003). Le complexe protéolytique ClpX est surtout

impliqué dans la dégradation des protéines SsrR-tagget. La protéine SspB augmente l'affinité de ClpXP pour des protéines SsrA-tagget C terminal (Lies and Maurizi, 2008). Le complexe ClpXP est une protéine du ciblage protéolytique de CtrA (Bellefontaine *et al.*, 2002).

1.3. Généralités sur les systèmes de transduction du signal à deux composants (SDC)

Le prototype d'un SDC consiste en une protéine histidine kinase (HK) avec un domaine kinase conservé et en un régulateur de réponse (RR) possédant également un domaine régulateur conservé. Un stimulus (souvent extracellulaire) est perçu par la kinase et module son activité. L'HK s'autophosphoryle et transfère ensuite le groupement phosphate sur l'aspartate conservé du RR dans une réaction catalysée par le RR. La phosphorylation du RR conduit à l'activation de son domaine effecteur qui mène à la réponse adaptée au stimulus (Figure 12).

A l'encontre des cascades classiques de kinases où une protéine kinase peut phosphoryler plusieurs cibles, dans les SDC le transfert est « mono cible ».

Les SDC se retrouvent dans tous les domaines du vivant Eubacteria, Archaeae, et Eucarya, néanmoins leur abondance relative y est assez différente. Si les systèmes de phosphotransfert His-Asp sont les voies signalétiques majoritaires des eubactéries ils sont bien plus rares chez les eucaryotes chez qui les cascades de kinases impliquant des phosphorylations Ser/Thr et Tyr prédominent.

Suivant la complexité du cycle vital des bactéries concernées, le nombre des protéines impliquées dans un SDC est très variable (Mizuno, 1998; Mizuno *et al.*, 1996) de 0 chez *Mycoplasma genitalium* à 80 chez *Synechocystis* sp. en passant par 11 pour *Helicobacter pylori* (Mizuno, 1998), 60 chez *E.coli* (Mizuno, 1997) et 70 chez *B. subtilis* (Fabret *et al.*, 1999).

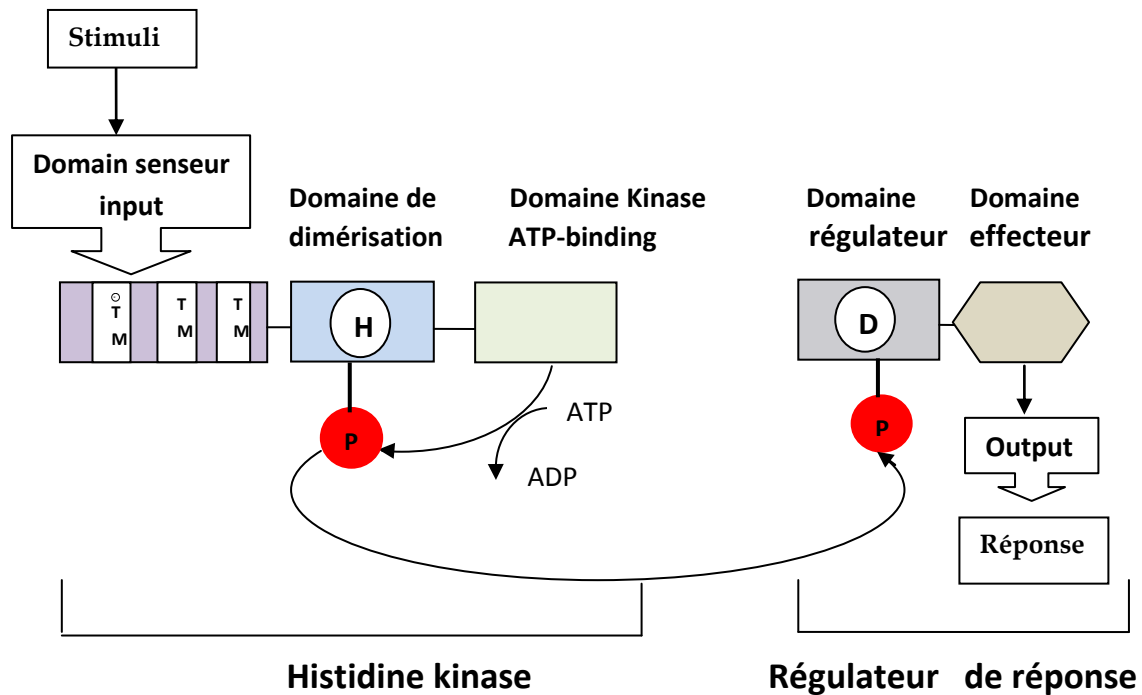


Figure 12 : Le schéma représente l'organisation d'un système à deux composants typiques. Ce système est composé d'une protéine histidine kinase (HK) et une protéine régulateur de réponse. L'histidine kinase contient trois domaines: un domaine de détection, un domaine de dimérisation conservé et un domaine kinase lié à l'adénosine triphosphate. Le régulateur de réponse contient deux domaines: un domaine récepteur (REC) qui contient l'acide aspartique conservé et un domaine effecteur. (modifié de (Puttick *et al.*, 2008)). (TM= trans membranaire).

Bien que plus rares chez les eucaryotes, on retrouve des protéines de SDC chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Dictyostelium discoideum* mais aussi des plantes comme *Arabidopsis thaliana* (Chang *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995) et la tomate (Wilkinson *et al.*, 1995).

Outre leur relative rareté, les différences majeures entre les acteurs des SDC eucaryotiques et procaryotiques sont les faits suivants : les HK eucaryotiques sont majoritairement des HK hybrides (c'est-à-dire contenant aussi un domaine RR ; voir plus loin) et les RR eucaryotiques ne sont que très rarement des facteurs de transcription (avec un domaine effecteur de liaison à l'ADN).

Malgré ces différences notables, la structure et les activités des domaines impliqués dans la phosphorylation His-Asp sont très conservés et décrites ci-dessous.

I.3.1. La chimie du phosphotransfert des voies His-Asp

I.3.1.1. Les réactions

Les phosphotransferts pour les SDC classiques impliquent trois réactions et deux intermédiaires phospho-protéiques :

1. Autophosphorylation: $\text{HK-His} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. Phosphotransfert: $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \rightleftharpoons \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$
3. Déphosphorylation: $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RR-Asp} + \text{Pi}$

Ces trois réactions nécessitent des ions métalliques bivalents (souvent le Mg^{2+}).

I.3.1.2. La chimie des phosphohistidines et phosphoaspartates

I.3.1.2.1. Phosphohistidine

La chimie des HK diffère de celle des protéines Ser/Thr/Tyr kinases par le fait que ces dernières créent des phosphoesters alors que les HK produisent des phosphoramidates.

L'hydrolyse des phosphoramidates a une énergie libre négative significativement plus importante que celle des phosphoesters; en conséquence, l'utilisation de ces modifications dans les processus biologiques est aussi différente (Stock *et al.*, 1990).

L'équilibre de la réaction d'autophosphorylation ($\text{HK-His} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$) est en faveur de la forme non-phosphorylée. Considérant le ratio intracellulaire ATP/ADP, seule une faible fraction de la population des HKs est dans un état phosphorylé. C'est donc le flux des groupements phosphoryls qui est important pour la fonction des HKs plutôt que la stoechiométrie de la phosphorylation.

Le fait que le lien phospho-His à haute énergie soit idéal pour le phosphotransfert est illustré par le fait qu'il se retrouve sur des intermédiaires phosphorylés d'enzymes comme: la succinyl-CoA synthétase (Wolodko *et al.*, 1994),

la pyruvate phosphate dikinase (Spronk *et al.*, 1976), et la nucléoside diphosphate kinase (Morera *et al.*, 1995; Parks *et al.*, 1973). Le lien phospho-His est également utilisé par les enzymes EI et EII du système PTS (voir point 1.2.1.2.2.2).

1.3.1.2.1. Phosphoaspartate

La phosphorylation de l'aspartate produit un groupement acyl phosphate de haute énergie. Il existe des intermédiaires phospho-Asp d'enzymes comme l'acétate kinase (Anthony and Spector, 1972) et les P-type ion-translocating ATPases (Aravind *et al.*, 1998; Jencks, 1980). L'énergie libre d'hydrolyse du lien phospho-Asp de ces protéines est significativement différente de celle mesurée pour des petites molécules d'acyl phosphates (Pickart and Jencks, 1984).

Ce constat supporte l'hypothèse que l'énergie contenue dans le lien acyl phosphate dans ces protéines puisse être utilisé pour générer des modifications conformationnelles de ces protéines (Jencks, 1980; Tanford, 1984) qui sont ainsi exploitées dans le fonctionnement des RRs. Sur ce point, les protéines phospho-Asp diffèrent des protéines à phospho-Ser/Thr qui modulent l'activité protéique par des effets électrostatiques locaux (Hurley *et al.*, 1990; Johnson and O'Reilly, 1996).

La demi-vie du phospho-Asp au sein des RRs varie énormément de quelques secondes à plusieurs heures (Hess *et al.*, 1988; Weiss and Magasanik, 1988). En outre, plusieurs RRs ont une activité phosphatase qui diminue le temps de vie de leur forme phosphorylée (Hess *et al.*, 1988).

1.3.2. Relation structure fonction des protéines histidine kinases

1.3.2.1. Activités et architecture

La nature modulaire des HK résulte d'une combinaison simple et fonctionnellement élégante de domaines senseurs, catalytiques et auxiliaires qui permettent une architecture particulière et adaptée à chacune des HKs en fonction des besoins signalétiques précis auxquels elle répond.

Les HKs contiennent au minimum les 3 éléments de base : un domaine senseur variable et un domaine kinase structuralement conservé ; les deux domaines sont unis par un linker. Ces trois éléments seront décrits plus bas.

La taille des HKs peut varier de moins de 40 kDa à plus de 200 kDa, dans les HKs de plus grande taille divers domaines auxiliaires s'ajoutant aux domaines senseur et kinase.

L'activité globale de la kinase est modulée par le stimulus perçu par le domaine senseur. Les HKs subissent alors une autophosphorylation dépendante de l'ATP sur une histidine conservée du domaine kinase. Cette autophosphorylation est une réaction bimoléculaire entre homodimères dans laquelle un monomère HK catalyse la phosphorylation de l'histidine conservée du second monomère (Pan *et al.*, 1993; Surette *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 1993).

En plus de présider à la réaction de phosphorylation, de nombreuses HKs possèdent une activité phosphatase leur permettant de déphosphoryler leur RR respectif (Keener and Kustu, 1988; Lois *et al.*, 1993b). Ces HKs bifonctionnelles sont généralement présentes dans les voies signalétiques qui doivent être éteintes rapidement.

Malgré leur grande diversité, les HKs peuvent être classées en deux catégories : les HKs orthodoxes et les HKs hybrides. Ces dernières seront considérées au point traitant des phosphorelais.I.3.4.2.2. (Alex and Simon, 1994; Parkinson and Kofoed, 1992) (Figure 13).

La plupart des HKs orthodoxes, dont l'archétype est représenté par EnvZ chez *E. coli*, fonctionne avec un domaine senseur périplasmique séparé par deux brins transmembranaires du domaine kinase cytoplasmique. D'autres HKs contiennent de multiples segments transmembranaires comme FixL de *Rhizobium meliloti* qui intervient dans la fixation d'azote (Lois *et al.*, 1993a) ou UhpB d'*E. coli* qui fait partie d'un système de transport de sucre (Island *et al.*, 1992) avec respectivement 4 et 8 segments transmembranaires.

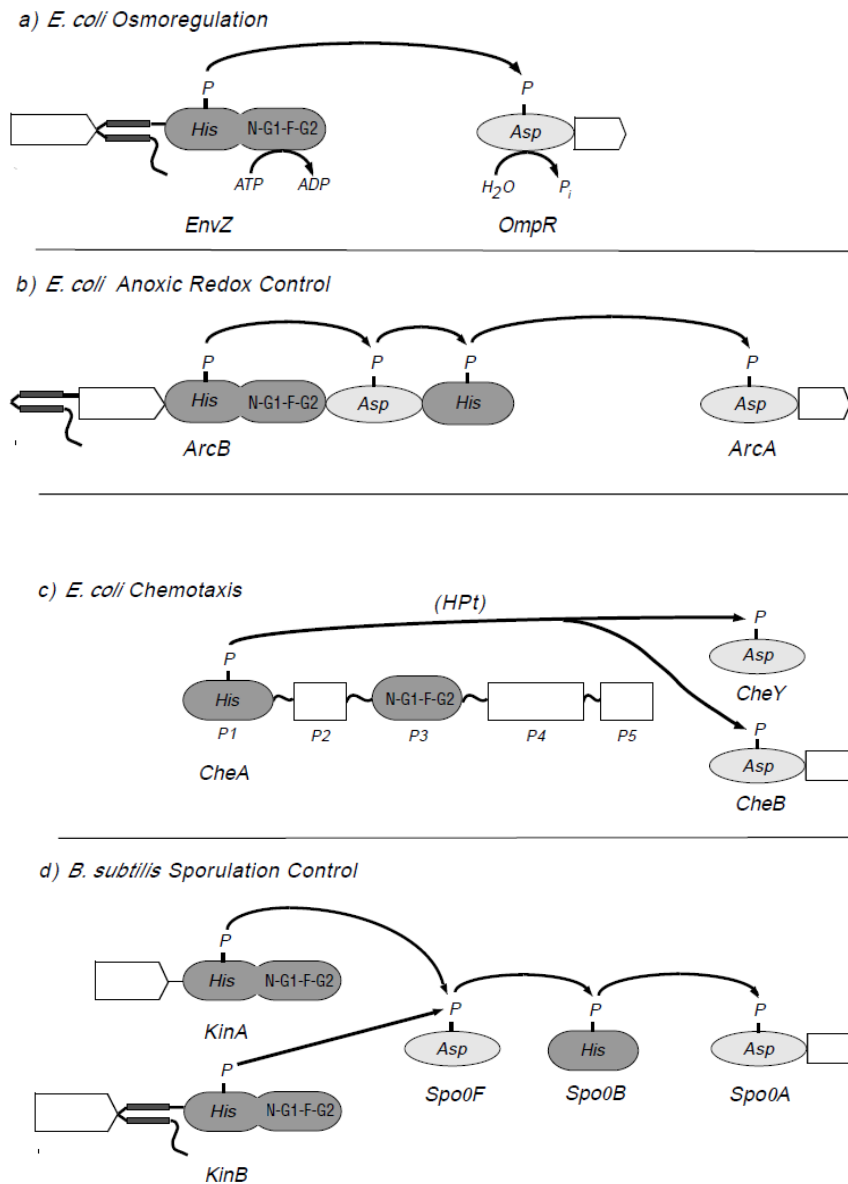


Figure 13 : Le schéma représente l'organisation modulaire de systèmes à deux composants représentatifs. Des domaines contenant l'Asp sont colorés en gris-clair, les domaines contenant l'histidine sont colorés en gris-foncé. Les domaines variables sont colorés en blancs. a) Le prototype des deux composants est représenté par le système qui régule l'osmolarité de *E. coli* et emploie un événement simple de transfert de groupe phosphoryl entre la protéine histidine kinase orthodoxe (HK) EnvZ et son régulateur de réponse (RR) OmpR. b) Le système Arc d'*E. coli* illustre un histidine kinase phosphorelais hybride ArcB. ArcA, en conditions aérobies, est capable de recevoir un groupe phosphorylé du noyau catalytique ou du domaine histidine du phosphotransfert (HPT) d'ArcB. c) La voie de chimiotactisme d'*E. coli* CheA implique une HK soluble atypique capable de phosphoryler l'un ou l'autre de deux RRs, le domaine simple RR CheY et la méthylestérase CheB. d) Le système qui contrôle la sporulation de *B. subtilis*, est un système phosphorelais à plusieurs éléments dans lequel tous les domaines de signalisation sont des protéines indépendantes. SpoOF reçoit le groupe

phosphoryl de KinA ou de KinB et le transfère plus tard au HPt SpoOB, qui phosphoryle le RR SpoOA, (Illustration tirée de (Stock *et al.*, 2000).

Toutes les kinases ne sont pas membranaires, certaines sont cytoplasmiques ; citons par exemple la kinase du chémotactisme CheA (Stock *et al.*, 1988) ou la kinase NtrB qui régule l'assimilation d'azote (MacFarlane and Merrick, 1985). Ces HK solubles peuvent être régulées par des stimuli intracellulaires ou des interactions avec d'autres protéines cytoplasmiques.

I.3.2.2. Le domaine Kinase et de dimérisation

La structure qui est le mieux conservée chez les HKs est le « kinase core » composé d'un domaine de dimérisation et d'un domaine de phosphotransfert liant l'ATP/ADP aussi appelé domaine catalytique (Stock, 1999).

Le « kinase core » comporte environ 350 acides aminés avec 5 motifs (boîtes) conservés que l'on retrouve chez toutes les HKs. L'histidine conservée fait partie de la boîte H souvent portée par le domaine de dimérisation, alors que les boîtes N, G1, F et G2 définissent le sillon de liaison au nucléotide (Figure 14).

La topologie générale du « kinase core » a été déterminée à partir de la structure cristallographique de la partie C-terminale de la kinase CheA de *Thermotoga maritima* (Bilwes *et al.*, 1999). Le domaine catalytique est replié suivant un « fold » en sandwich α/β comportant 5 brins β antiparallèles et 3 hélices α (Figure 14a). Un repliement similaire est retrouvé dans le domaine ATPase de la DNA gyrase B, MutL et Hsp90 (Bilwes *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1998).

Le site de fixation de l'ATP des HKs contient les boîtes N, G1, F et G2. Il semble particulièrement flexible et subit de grandes modifications de conformation lors de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP qui seraient dès lors capable de moduler des interactions avec d'autres protéines (Stock, 1999).

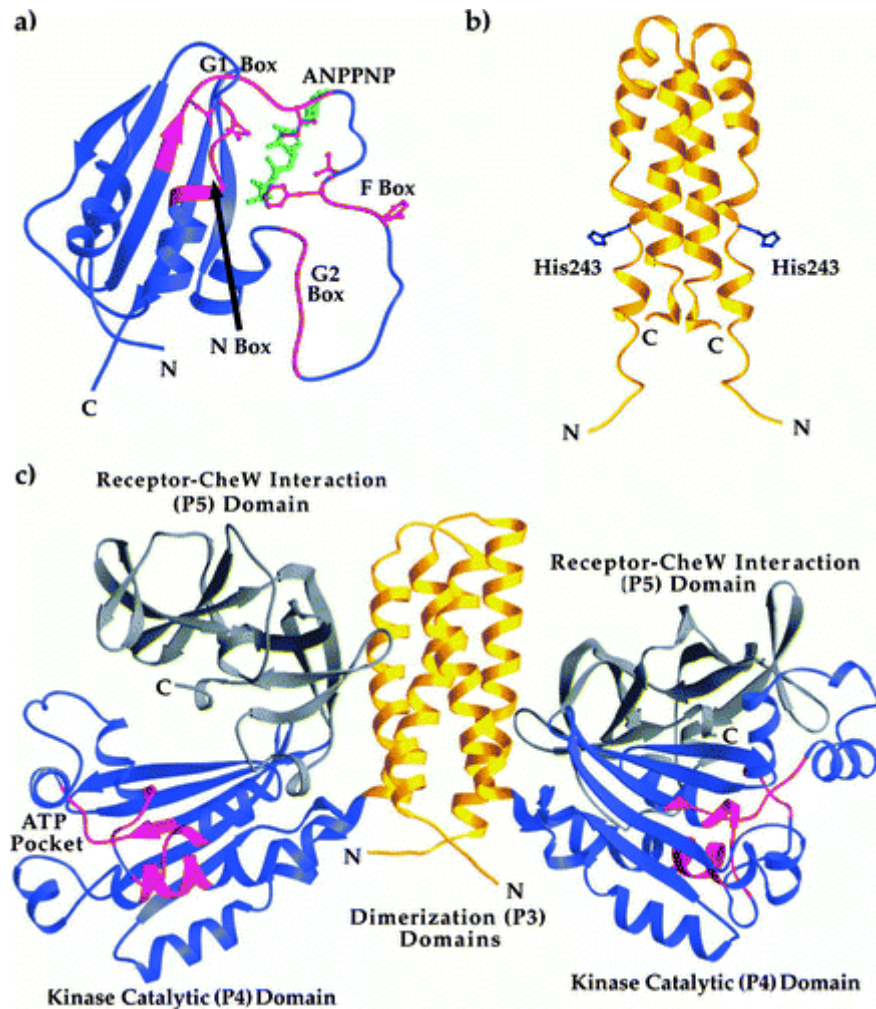


Figure 14 : Le « core » de la protéine histidine kinase. Structure en résonance magnétique nucléaire du : a) domaine catalytique, b) domaine de dimérisation d'EnvZ chez *E. coli* et c) la structure cristalline de la moitié C-terminale de CheA de *T. maritima* qui illustre la conservation structurale du « core » de la kinase. Le domaine catalytique en bleu contient quatre motifs fortement conservés (magenta), qui forment le site de fixation à l'ATP (analogue non hydrolysable montré en vert). Le domaine de dimérisation d'EnvZ (or) de la plupart des protéines histidine kinase contient l'histidine conservée (bleu) qui est l'emplacement de la phosphorylation. Le « fold » du domaine de dimérisation de CheA est conservé, mais l'histidine phosphorylée est située dans un domaine phosphotransfert auxiliaire voir Figure 13, (Illustration tirée de (Stock *et al.*, 2000)).

I.3.2.3. Le domaine senseur

Ces domaines ne partagent que très peu de similarité de séquence, illustrant par là leur adéquation à la perception de stimulus ou ligands spécifiques qui sont détectés directement ou non par eux.

Ces stimuli sont et restent pour la plupart non définis. Certains d'entre eux ont néanmoins été précisés ; c'est le cas du domaine senseur de PhoQ sensible aux cations divalents et aux peptides antibactériens (Prost *et al.*, 2008), du domaine senseur de lumière bleue d'une kinase retrouvée tant chez les bactéries (dont *Brucella* spp) et des eucaryotes (Swartz *et al.*, 2007) et de l'HK Comp de *B. subtilis* qui initie la réponse de compétence en percevant le peptide ComX (ADPITRQ(W)GD)(Lazazzera, 2000).

Les HKs cytosoliques possèdent aussi des domaines senseurs dont le plus connu est le domaine PAS, très versatile, qui sert de senseur au potentiel redox, à la lumière etc... en fonction des co-facteurs associés (Taylor *et al.*, 1999).

I.3.2.4. Le linker

Chez les HKs transmembranaires le domaine senseur est lié au « kinase core » cytoplasmique par une hélice transmembranaire et un linker cytoplasmique (entre 40 et 200 acides aminés). De loin les moins compris, ces éléments semblent néanmoins cruciaux pour le fonctionnement normal de la signalisation (Jourlin *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1999). Des analyses bioinformatiques ont identifié dans ces linkers une signature de 50 résidus en « coiled coil » qui généralement précède la boîte H (Singh *et al.*, 1998). Ce motif pourrait servir à aligner correctement entre eux les homodimères de HK ou servir de relais au changement conformationnel de la partie périplasmique vers le « kinase core » (Park and Inouye, 1997)

I.3.3. Relation structure fonction des régulateurs de réponse

I.3.3.1. Activités et architecture

Dans la plupart des SDC bactériens, les RRs sont les éléments terminaux de la voie de signalisation.

Un RR catalyse le transfert d'un groupe phosphoryl depuis la phospho-His de son HK vers un résidu aspartate de son propre domaine de régulation. Des petites molécules comme l'acétyl phosphate, le carbamoyl phosphate peuvent servir de

phospho-donneur pour les RRs (Lukat *et al.*, 1992), démontrant ainsi qu'ils sont capables de catalyser le phosphotransfert indépendamment d'une HK.

Nous avons déjà signalé que la plupart des RRS catalyse également leur auto-déphosphorylation diminuant d'autant la durée de vie de leur état activé. Des données récentes supportent la vue que la phosphorylation d'un RR conduit à une modification de conformation d'une très large surface de ce RR. Sur base d'un schéma général de modifications de surface il est aisé de concevoir une large variété de mécanismes régulateurs suivant les interactions inter- ou intra moléculaires qui produiront la réponse optimisée.

La plupart des RRs comporte deux domaines : un domaine régulateur de réponse conservé en N-terminal et un domaine effecteur variable en C-terminal.

1.3.3.2. Le domaine régulateur

C'est la protéine « monodomaniale » CheY qui représente l'archétype des domaines régulateurs des RRs (Stock *et al.*, 1990; Volz, 1993) (Figure 15a). Cette protéine de 128 acides aminés est constituée d'un feuillet β à 5 brins parallèles au centre entouré par 5 hélices α ou RR regulatory domains (Stock *et al.*, 1989a; Volz and Matsumura, 1991). Le site de phosphorylation est situé sur l'aspartate 57 (Sanders *et al.*, 1989) sur une boucle exposée au solvant; d'autres résidus acides sont situés à proximité (Asp12 et Asp13). Deux autres résidus très conservés, la Thr 87 et Lys109 entourent le site actif du domaine régulateur.

Dans tous les cas il semble que le RR soit préférentiellement phosphorylé par la HK (ou la HPt voir plus loin) qui lui est spécifiquement dédiée.

Le domaine régulateur existe en équilibre entre deux conformations. Sa phosphorylation déplace l'équilibre vers la conformation active. Cette activation implique parfois une levée d'inhibition du domaine effecteur comme cela est observé chez les RRs qui peuvent être activés par la délétion du domaine régulateur N-terminal (Grimsley *et al.*, 1994; Kahn and Ditta, 1991; Simms *et al.*, 1985).

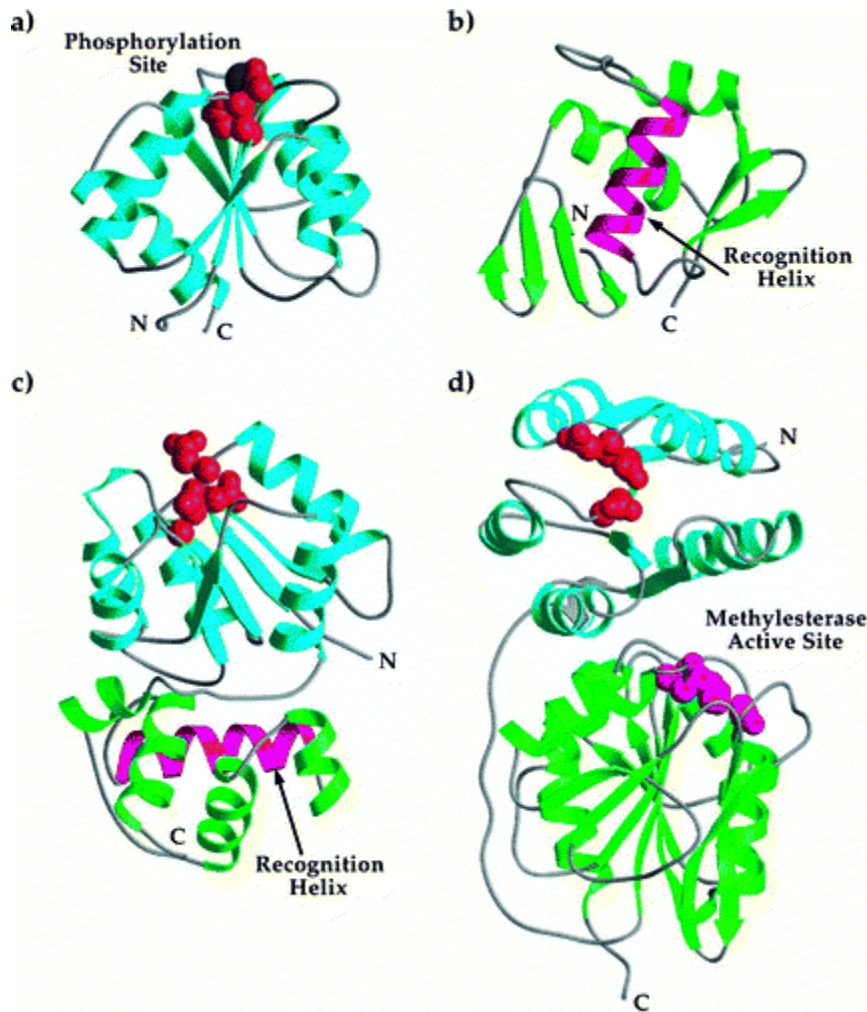


Figure 15 : Le schéma représente les membres de la famille de RR. Les protéines RR contiennent généralement deux domaines, un domaine régulateur conservé (cyan) et un domaine effecteur variable (vert). Le domaine régulateur conservé de *S. typhimurium* CheY, représenté par (a), contient des résidus Asp conservés (chaîne latérale et atomes Ca montrés comme des sphères rouges) et le site de liaison du Mg^{2+} (bleu-froncé) forme l'emplacement actif pour le transfert phosphorylé. Les architectures variables des domaines effecteurs sont illustrés par (b) le domaine C-terminal de OmpR d'*E. coli*, (c) NarL d'*E. coli*, et (d) méthyltransférase CheB de *S. typhimurium*. Les facteurs de transcription NarL et OmpR contiennent chacun une hélice de reconnaissance (magenta), tandis que CheB contient une triade catalytique (spheres magenta). Dans les régulateurs de réponse NarL et CheB intacts, la juxtaposition des domaines régulateurs et des régions fonctionnelles des domaines effecteurs suggère une base structurale pour l'inhibition, (Illustration tirée de (Stock *et al.*, 2000)).

Dans d'autres cas, le domaine régulateur a un rôle actif en favorisant la dimérisation (Fiedler and Weiss, 1995), l'oligomérisation (Webber and Kadner, 1997)

ou les interactions avec d'autres protéines (Blat and Eisenbach, 1994; Welch *et al.*, 1994). Certains RRs utilisent une combinaison de ces mécanismes (Anand *et al.*, 1998).

I.3.3.3. Le domaine effecteur

La grande diversité de ces domaines rend illusoire leur description. La grande majorité possède une activité de liaison à l'ADN et fonctionne en activant/réprimant l'expression de gènes cibles. Les RRs sont majoritairement des facteurs de transcription avec un domaine de liaison à l'ADN comme domaine effecteur (25 des 32 RRs d'*E. coli*) (Mizuno, 1997).

Ces domaines de liaison peuvent être répartis en trois familles représentées par OmpR, NarL, et NtrC (avec 14, 7, et 4 membres, respectivement chez *E. coli*) (Albright *et al.*, 1989; Mizuno, 1997; Stock *et al.*, 1989b).

D'autres RRs ont un domaine effecteur de nature enzymatique comme la méthylestérase du système chemotactique CheB (Simms *et al.*, 1985) ou cyclic-di-GMP synthase comme Pled de *Caulobacter crescentus* (Chan *et al.*, 2004) et d'autres encore sont de type « monodomanial » ne comportant que le domaine régulateur de réponse et pas de domaine effecteur (DivK chez *Caulobacter crescentus* ou CheY).

I.3.4. L'architecture des systèmes à deux composants

Les SDC les plus courants sont composés d'une HK et d'un RR. Ce sont des systèmes simples de phosphotransfert. Il existe néanmoins des systèmes plus complexes où une combinaison de HK, de RR et d'un domaine de type nouveau (HPt) forme un phosphorelais; la complexité additionnelle de ces phosphorelais procure des points de contrôle additionnels au circuit de régulation ainsi que des points de « communication » entre voies signalétiques.

I.3.4.1. Les systèmes simples de phosphotransfert

Nous avons décrit ci-dessus le fonctionnement de base des systèmes simples de phosphotransfert où une HK, par le biais d'un seul phosphotransfert, active un RR cytoplasmique qui donnera une réponse adaptée au stimulus initial. L'archétype de

ce système est le SDC EnvZ-OmpR d'*E. coli* qui est responsable de la modulation de l'expression des porines OmpF et OmpC (Pratt and Silhavy, 1995).

Pour être complet, signalons qu'il existe des variations sur ce thème simple, par exemple dans le système chémotactique où une seule HK CheA phosphoryle de manière compétitive deux RRs : CheB et CheY (Li *et al.*, 1995).

Ou encore le système qui régule l'expression des gènes de réponse au nitrate/nitrite dans lequel deux HKs (NarX et NarQ) régulent deux RRs (NarL et NarP) (Rabin and Stewart, 1993).

1.3.4.2. Les systèmes de phosphorelais et les domaines Hpt

L'architecture de la cascade phosphorelais étend le transfert de base His-Asp en impliquant cinq transferts de groupe phosphoryl et quatre phosphoprotéines intermédiaires suivant la séquence suivante :

1. Autophosphorylation: $\text{HK-HisI} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{HK-HisI}\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. Phosphotransfert I: $\text{HK-HisI}\sim\text{P} + \text{RR-AspI} \rightleftharpoons \text{HK-HisI} + \text{RR-AspI}\sim\text{P}$
3. Phosphotransfert II: $\text{RR-AspI}\sim\text{P} + \text{HPt-HisII} \rightleftharpoons \text{RR-AspI} + \text{HPt-HisII}\sim\text{P}$
4. Phosphotransfert III: $\text{HPt-HisII}\sim\text{P} + \text{RR-AspII} \rightleftharpoons \text{HPt-HisII} + \text{RR-AspII}\sim\text{P}$
5. Déphosphorylation: $\text{RR-AspII}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RR-AspII} + \text{P}_i$

Les domaines contenant soit His soit Asp sont toujours utilisés comme éléments du phosphotransfert. On voit apparaître en outre un nouveau domaine, le domaine de phosphotransfert contenant une Histidine (HPt).

1.3.4.2.1. Les domaines HPt

Ces domaines peuvent exister comme domaines isolés ou faire partie intégrante d'une protéine kinase hybride.

Les domaines HPt sont d'environ 120 acides aminés de long et contiennent un résidu Histidine capable de participer aux réactions de phosphotransfert.

Ce domaine ne possède ni activité kinase ni phosphatase (Tsuzuki *et al.*, 1995) et sert essentiellement de module de « communication » entre différentes protéines.

Récemment, la structure de plusieurs domaines HPt a été déterminée : le domaine P1 de CheA d' *E. coli* (Zhou *et al.*, 1996), le domaine HPt de ArcB d' *E. coli* (Kato *et al.*, 1997) et la protéine Spo0B de *B. subtilis* (Varughese *et al.*, 1998). Toutes ces structures, malgré leur faible similarité de séquence, ont en commun un motif « four-helix bundle » relativement homologue architecturalement parlant au domaine de dimérisation qui contient l'Histidine de EnvZ.

1.3.4.2.2. Exemples de phosphorelais

Outre le domaine HPt les phosphorelais peuvent ou non impliquer une HK hybride.

1.3.4.2.2.1. Le phosphorelais impliquant une HK hybride

L'architecture la plus représentative des HKs hybrides est la protéine ArcB d' *E. coli* (Figure 16) qui fonctionne dans le contrôle redox anoxique (système Arc). ArcB contient deux segments transmembranaires suivi d'un « kinase core », d'un domaine similaire au domaine régulateur des RRs et finalement d'un domaine HPt. Suivant les conditions d'oxygénation le RR ArcA recevra son groupe phosphoryl soit du « kinase core » soit du domaine HPt (via le passage sur le domaine RR de ArcB).

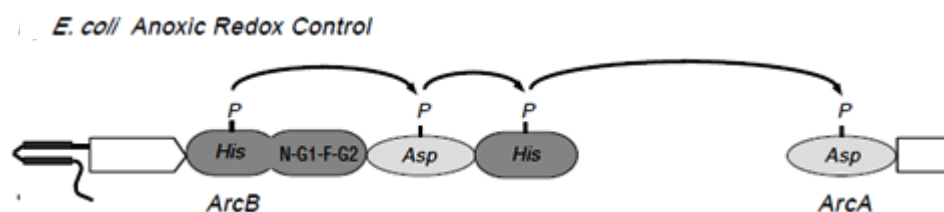


Figure 16 : Le schéma représente le système Arc d' *E. coli*. Il illustre un phosphorelais impliquant la HK hybride ArcB. En conditions aérobies, l'ArcA est capable de recevoir un groupe phosphorylé du noyau catalytique ou du domaine histidine du phosphotransfert (HPt) d' ArcB (Stock *et al.*, 2000).

I.3.4.2.2. Le phosphorelais sans HK hybride

Le système de contrôle de la sporulation de *B. subtilis* est un exemple de phosphoryl His-Asp-His-Asp qui n'implique pas de HK hybride (Burbulys *et al.*, 1991). Dans cette voie de signalisation, plusieurs kinases (KinA et KinB) peuvent donner un groupe phosphoryl au RR monodomaine Spo0F. Le groupe phosphoryl est ensuite transféré sur la protéine SpoB une protéine qui ne possède que le domaine HpT et qui finalement phosphoryle le facteur de transcription SpoA sur son domaine régulateur Figure 17.

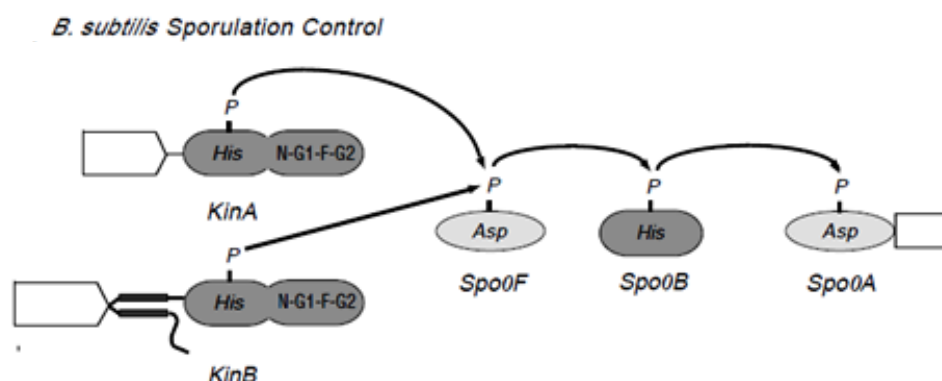


Figure 17 : Le schéma illustre le système phosphorelais, qui contrôle la sporulation de *B. subtilis*, ce système phosphorelais His-Asp-His-Asp a plusieurs éléments dans lesquels tous les domaines de signalisation sont des protéines indépendantes. Spo0F reçoit le groupe phosphoryl soit de KinA soit de KinB et le transfère plus tard au HPt Spo0B, qui phosphoryle le RR Spo0A, (Stock *et al.*, 2000).

D'autres phosphorelais sont bien caractérisés ; citons par exemple le système de contrôle de la virulence BvgS/BvgA de *Bordetella pertussis* (Uhl and Miller, 1995) ou le phosphorelais lié à CtrA de *C. crescentus* (Quon *et al.*, 1996).

I.3.5. Mécanismes de régulation

Sur les modules centraux de phosphotransfert ou de phosphorelais se superposent une grande diversité de mécanismes de régulation et les divers modules composant ces systèmes procurent des points au niveau desquels le flux d'information (le transfert de phosphate) peut être régulé permettant ainsi d'optimiser la transmission du signal en fonction des besoins spécifiques auxquels correspond chacun des systèmes particuliers.

Les systèmes à deux composants fonctionnent suivant le mode « réponse tout ou rien » comme le système Spo de *B. subtilis* (Hoch JA, 1995) qui contrôle la sporulation ou suivant le mode « réponse graduelle » comme le système EnvZ-OmpR d'*E. coli* (Pratt and Silhavy, 1995). Ces régulations sont nombreuses et impliquent souvent d'autres protéines partenaires. Les cibles principales de régulation sont l'activité de l'HK et la déphosphorylation du RR et sont brièvement décrites ci-dessous.

I.3.5.1. Régulation de l'activité histidine kinase

Le niveau de phosphorylation des RRs dépend de deux activités des HKs l'autophosphorylation et l'activité phosphatase pour les HKs qui possèdent cette dernière activité (souvent ce sont celles des phosphorelais).

Les deux types d'activité des HKs (autophosphorylation (Borkovich *et al.*, 1989) et phosphatase (Aiba *et al.*, 1989; Dahl *et al.*, 1992; Ninfa and Magasanik, 1986) peuvent être régulées en réponse directe ou indirecte à divers stimuli.

Ces régulations peuvent résulter de divers phénomènes :

- pour les HKs transmembranaires typiques, le domaine senseur lie directement un ligand ou détecte un autre stimulus physique.
- certaines HKs détectent le signal grâce à une interaction avec d'autres protéines. Ainsi, dans le système de chimotactisme, la kinase CheA forme un complexe avec les chémorécepteurs et la protéine adaptatrice CheW et est soit inhibée soit activée par les signaux transmis par les chémorécepteurs (Gegner *et al.*, 1992; Ninfa *et al.*, 1991). Citons encore l'activité phosphatase de l'HK cytoplasmique NtrB qui est régulée allostériquement par une protéine accessoire PII. La liaison de cette dernière à NtrB dépend de son état d'uridylylation, une modification qui est catalysée par une urydyl-transférase dont l'activité dépend du ratio intracellulaire entre le 2-kétoglutarate et la glutamine (Kamberov *et al.*, 1994b).
- d'autres HK possèdent un domaine intrinsèquement responsable de la régulation. Le senseur de pression de turgescence KdpD possède un domaine additionnel de

liaison à l'ATP et c'est cette liaison (et non l'hydrolyse de l'ATP) qui est nécessaire pour l'activité phosphatase (Jung and Altendorf, 1998).

1.3.5.2. Régulation de la déphosphorylation du régulateur de réponse

Nous avons déjà mentionné que de nombreux RR ont une activité autophosphatase et que leur déphosphorylation peut aussi être influencée par l'activité phosphatase de l'HK, elle-même régulée par divers mécanismes. La plupart du temps ce dernier mécanisme est indépendant de la H box His de la HK et ne consiste donc pas en une inversion du mécanisme de phosphotransfert (Kamberov *et al.*, 1994a; Skarphol *et al.*, 1997; Stewart, 1995). La déphosphorylation du RR peut aussi être affectée par des protéines accessoires comme c'est le cas chez *B. subtilis* où le mécanisme de sporulation dépend d'une série très précise de phosphatases (RapA, RapB, and RapE) qui déphosphorylent Spo0F (Perego *et al.*, 1994) et d'une phosphatase (Spo0E) qui déphosphoryle Spo0A (Ohlsen *et al.*, 1994).

1.3.5.3. Autres type de régulations

Quelques mécanismes de régulation additionnels ont été décrits.

- Modification du niveau de phosphorylation du RR ou du phosphotransfert

Le domaine RR de l'HK hybride VirA d'*Agrobacterium tumefaciens* module le phosphotransfert en interagissant physiquement avec le site d'autophosphorylation de la kinase (Chang *et al.*, 1996).

Il existe également des systèmes où l'HK peut phosphoryler plus d'une RR. Dans ces systèmes, la compétition pour la phosphorylation peut influencer l'activation des diverses branches de la voie de signalisation (Stewart and Rabin, 1995; (Li *et al.*, 1995).

- Modification du niveau d'expression même du RR.

De nombreux SDC qui régulent la transcription sont autorégulés. Dans ce cas le RR phosphorylé fonctionne comme activateur ou répresseur de l'opéron encodant les protéines du SDC (Soncini *et al.*, 1995; Ueno-Nishio *et al.*, 1984).

1.4. Les systèmes à deux composants de Brucella

Les données qui suivent sont majoritairement tirées d'une analyse réalisée au laboratoire (Letesson, 2004) en vue d'identifier les systèmes à deux composants chez *B. melitensis*. Les régulateurs de réponse (RR) ont été identifiés par analyse du génome en utilisant le domaine (pfam00072) comme signature du domaine receveur du régulateur de réponse et les histidines kinases (HK) en utilisant d'abord le domaine HATPase-c (pf02518) et puis le domaine phosphoaccepteur N-terminal histidine kinase A (pf00512). Ces séquences ont été ensuite validées par alignement multiple (programme Clustal) pour certifier la conservation de résidus clés puis analysées par bioinformatique pour identifier d'éventuels autres domaines, des segments transmembranaires ainsi que le voisinage génomique.

Les données sont résumées dans le tableau 5. Les RR et les HK sont représentées dans l'ordre des séquences codantes suivant un code couleur en fonction de leur famille (voir légende). En outre chaque séquence codante (pCDS) est représentée graphiquement de manière à visualiser les domaines Pfam orientés (sauf mention explicite) depuis la gauche (N-terminal) vers la droite (C-terminal). La nomenclature utilisée correspond à celle publiée ou suit un code à quatre lettres (Hallez *et al.*, 2007).

Outre le tableau 5 les données génomiques sont brièvement décrites ci-dessous.

Tableau 5 : Les RR et les HK sont codés selon leur famille respective et présentés selon leur nombre de pCDS et le chromosome dans lesquels ils sont localisés. Le contenu de leurs domaines est représenté de gauche (N- terminal) vers la droite (C-terminal) sauf mention explicite (Letesson, 2004).

REGULATEUR DE REPONSE									HISTIDINE KINASE									
PCDS N°	Nom	Domaines							Domaines							Nom	PCDS N°	
		ResReg	TraPr	GerE	S54	HTH8	Ggdef	ECF	Tmdom	Hamp	Pas	Pac	HiskA	Hatpas	ReszReg			
I066	CemR																	
I0372	TcaR	C term														TcaS	I0370	
																PdhS	I0417	
I0423	CtrA																	
I0493	TcbR															TcbS	I0492	
I0866	NtcC															NtrB	I0865	
I0868	NtrX															NtrY	I0867	
																CckA	I0947	
																PleC	I1325	
I1329	TccR															TccS	I1328	
I1337	FeuP															FeuQ	I1336	
																DivJ	I1357	
I1582	TcdR															TcdS	I1583	
I1607	PrIR															PrIS	I1606	
																PhoR	I1624	
																CemK	I1648	
I1811	PrrA															PrrB	I1816	
I1984	PhoB																	
																DivL	I2027	
I2036	BvrR															BvrS	I2035	
II0011	StcA																	
II0050	MdrR																	
II0051	NodW															NodV	II0052	
II0058	FtcR																	
II0659	DivK																	
II0660	PleD																	
II0791	TceR															TceS	II0792	
II1014	TefR															TcfS	II1015	
	Paire deux-composants Bona fide							Membres phosphorelais							Paires putatives de Deux-composants			
	RR Famille R							RR Famille ROII (OmpR)							RR Famille ROIII (NalR)			
	RR Famille ROIV (NtcR)							RR Famille ROI							HK Famille IT			
	HK Famille ICT							HK Famille ITR							Orphelines RR ou HK			

ResReg : domaine régulateur de réponse

TmdoM : domaine trans membranaire

TraPr: (tetratricopeptide repeat motif)

PAS : domaine PAS (Per-ARNT-Sim)

GgdeF: représente les motifs conservés d'acide aminés

Pac: Motif PAC

HTH : domaine de liaison à l'ADN (helix-turn-helix)

Hatpas : domaine Histone acetyltransferase

ECF : (extracytoplasmic function domain)

GerE: (spore germination protein domain)

S54 : serine peptidase

HiskA: domaine histidine kinase A

Hamp : (histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-acceptin chemotaxis proteins, and phosphatases)

I.4.1. Données génomiques

I.4.1.1. Les Histidines kinases

Le génome de *B. melitensis* contient 19 pCDS correspondant à des HK *bona fide*, avec le domaine de phosphorylation et de dimérisation (pf00512) suivi du côté C-terminal par le domaine catalytique HATPase (pf02512).

Trois d'entre elles sont situées sur le chromosome II et 16 sur le grand chromosome.

Deux pCDS pour laquelle Pfam n'identifie pas de domaine de dimérisation (BMEI0370) ou pas de domaine catalytique (BMEI0679) ont été sélectionnées comme HK. La première est séparée d'un RR (BMEI0372) par une pCDS encodant un facteur sigma extracytoplasmique. Cette organisation est conservée chez *S. meliloti*. La seconde a été récemment publiée comme étant sensible à la lumière bleue (Briggs, 2007).

Les 3 HKs du petit chromosome sont prédites comme ancrées en membrane (famille IT) et appartiennent à des SDC classiques.

Sur le grand chromosome, 5 des HK prédites appartiennent à un phosphorelais (I0417, CckA, PleC, DivJ and DivL). Mis à part PleC et DivJ, qui sont des protéines intégrales de membrane, toutes les autres sont des protéines solubles cytoplasmiques et devraient ainsi réagir à un stimulus interne ou interagir avec une autre protéine membranaire (famille IcT). La pCDS I1606 aussi nommée *PrlS* (voir ci-après) et CckA sont les deux seules HK hybrides détectées chez *Brucella* spp. (famille ITR). La plupart des HK avec un domaine PAS font partie d'un phosphorelais.

Huit HK correspondent à des senseurs traditionnels qui pour certains ont déjà été décrits (ex. NtrB, NtrY, FeuQ and BvrS). Mis à part NtrB, dont l'homologue de *E. coli* est connu pour être cytoplasmique (Weiss *et al.*, 2002) toutes ces HK sont prédites comme étant des protéines transmembranaires.

Les trois HK restantes sont orphelines dans ce sens qu'elles ne sont pas à proximité d'un RR et une d'entre elles (BMEI1624) est prédite comme cytoplasmique réagissant à un signal interne inconnu.

A l'exception de la pCDS BMEI0370 (dont nous avons déjà décrit plus haut le manque du domaine de phosphorylation) et de DivL (BMEI2027) dont l'homologue chez *C. crescentus* est connu pour avoir l'histidine phosphorylable remplacée par une tyrosine (Wu *et al.*, 1999), toutes les HK possèdent l'histidine consensus dans l'environnement adéquat.

I.4.1.2. Les régulateurs de réponse

Brucella melitensis possède 23 pCDS portant un domaine RR, 15 sur le chromosome I et 8 sur le petit chromosome. Deux d'entre elles correspondent en fait à des HK hybrides (CckA and PrlS) et ont été discutées ci-dessus.

Quatre de ces pCDS (CtrA et CckA sur le grand chromosome et DivK, PleD sur le petit chromosome) appartiennent à un phosphorelais (voir ci-après).

Sur chacun des chromosomes il y a 3 pCDS portant un domaine RR qui sont orphelines, c'est-à-dire qui ne sont pas localisées près d'une HK ou qui ne font pas partie d'un phosphorelais. Parmi elles, la BMEI0158 (appelée FtcR: Flagellar Two Components Regulator) est localisée dans un locus flagellaire et sera discutée dans la section suivante.

Le petit chromosome porte 3 RR localisés près de leur HK putative. Aucun de ces trois SDC n'a été analysé à ce jour. Sept RR et leur HK dédiée sont localisés sur le chromosome I. Parmi elles seuls BvrR, NtrC et FeuP ont été analysés (voir section suivante).

La pCDS BMEI1811 (*PrrA*) sur le chromosome I est séparée de son HK putative (BMEI1816: *PrrB*) par quatre Orfs qui pourraient être un reste d'un élément transposable. En outre le domaine de liaison de *PrrA* est assez dégénéré et pourrait ne pas être fonctionnel.

Quatre des pCDS identifiées comme RR n'ont pas de domaine de liaison à l'ADN. Parmi elles 2 font partie d'un phosphorelais PleD (avec deux domaines receveurs et un domaine C-terminal de type GGDEF) et DivK qui est strictement monodomanial (ne possédant que le domaine RR).

Les deux pCDS restantes qui n'ont pas de domaine de liaison à l'ADN sont d'une part *MdrR* (Mono Domain Response Regulator (BMEII0050) qui est aussi monodomanial (comme DivK) et d'autre part *TcaR* (BMEI0372) qui a son domaine RR en C-terminal et qui possède en N-terminal un domaine apparenté à un domaine sigma 24 (COG1595, RpoE). Cette organisation domaniale particulière est conservée chez d'autres alphaprotéobactéries (*A. tumefaciens*, *C. crescentus*, *S. meliloti* and *R. sphaeroides*).

Dix sept des RR prédits portent en outre un domaine de liaison à l'ADN. Ils peuvent être répartis en différentes familles sur base de l'architecture de ce domaine de liaison. La famille OmpR est la plus grande (RO_{II}) avec 10 membres (dont CtrA, FeuP, BvrR et FtcR). La famille NarL (RO_{III}) comporte trois membres : VsrR, NodW, BMEI1582 et la famille NtrC (RO_{IV}) est représentée par 4 membres NtrC, NtrX, BMEI1811, BMEII0011.

I.4.1.3. Le phosphorelais de CtrA

Chez *C. crescentus*, le rôle de CtrA peut se décrire comme étant le contrôle coordonné du cycle cellulaire et de la morphogénèse. En effet CtrA contrôle l'initiation de la réplication (Quon *et al.*, 1996; Quon *et al.*, 1998). Il contrôle également le gène *ftsZ* (Kelly *et al.*, 1998), impliqué dans l'initiation de la septation. CtrA régule également la biogénèse du pilus et du flagelle, liant ainsi le cycle cellulaire à la différenciation morphologique (Skerker and Shapiro, 2000). En fait, à partir d'une cellule pédonculée, *C. crescentus* initialise la réplication de l'ADN et produit un flagelle au stade prédivisionnel (juste avant la septation). Les deux cellules filles résultantes sont ainsi différentes : une est pédonculée et continue à se répliquer tandis que l'autre devient une cellule de dissémination qui est susceptible de nager dans le milieu à la recherche d'une niche meilleure (Jones *et al.*, 2001).

Etant donné son rôle central, CtrA doit être soigneusement contrôlé et les mécanismes de sa régulation sont extrêmement précis et relativement bien connus (Jacobs *et al.*, 2003).

Les expériences de phosphorylation *in vitro* et/ou *in vivo* ainsi que l'étude de suppresseurs multicopy ont montré que CtrA était phosphorylé par trois voies différentes (Figure 18) ; 1° un phosphorelais multiple impliquant les HK DivJ et PleC ainsi que DivK, laquelle est un RR monodomaine essentiel (Burton *et al.*, 1997; Reisinger *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 1998) ; 2° une voie dépendante de l'HK hybride CckA, essentielle pour la survie et dont le domaine senseur N-terminal est requis pour la localisation polarisée au cours du cycle (Jacobs *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 1999) et 3° une voie dépendante de l'HK DivL, essentielle à la survie et à la division et présentant la particularité d'être phosphorylée sur un résidu tyrosine plutôt que sur une histidine.

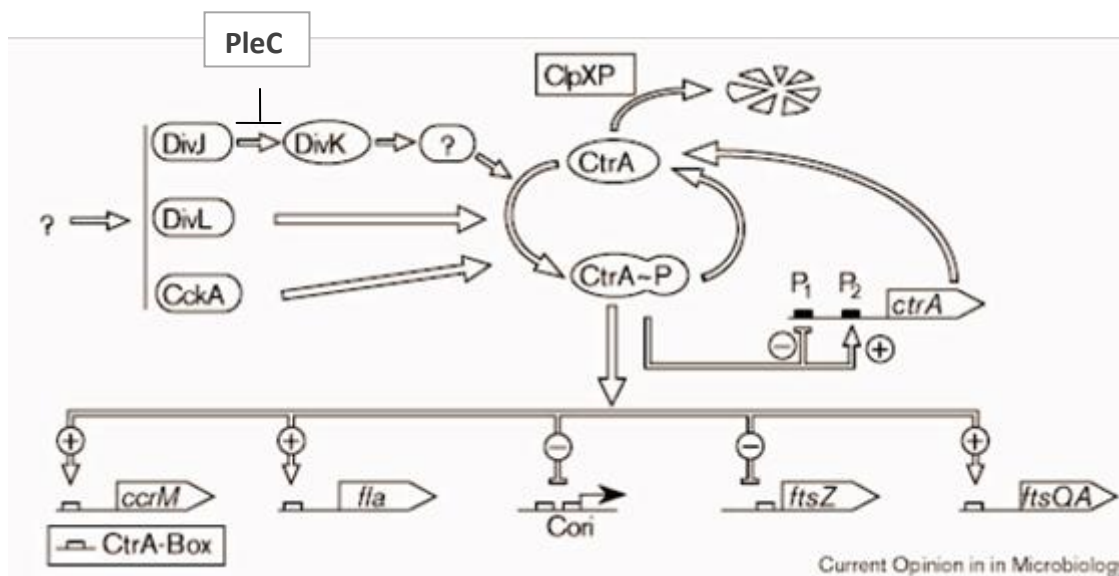


Figure 18 : Modèle qui représente les mécanismes employés pour contrôler les niveaux de CtrA, l'activité et le rôle de CtrA phosphorylé (CtrAP) dans la régulation transcriptionnelle. Les kinases senseurs DivJ, DivL et CckA sont activées en réponse à un signal inconnu du cycle cellulaire. Le groupe phosphoryl est transféré à CtrA directement ou par l'intermédiaire d'un phosphorelais. Les promoteurs qui sont régulés + ou - par CtrA ~P sont indiqués par P1 et P2. L'emplacement de CtrA-binding (CtrA box) est montré schématiquement. La dégradation par la protéase ClpXp est indiquée. (Adapté de (Osteras and Jenal, 2000))

Bien que les *Brucellae* aient une morphologie distincte de *C. crescentus*, qu'elles n'aient pas d'organelles polaires facilement discernables et qu'elles entretiennent des relations avec leur environnement complètement différentes (pathogène des animaux) de celles de *C. crescentus*, elles présentent également (tout comme d'autres α -protéobactéries) une asymétrie lors de leur fission binaire et donnent naissance à deux cellules filles différentes au moins par la taille et peut être par la fonction (Hallez *et al.*, 2007).

Néanmoins, le core central de régulation du cycle cellulaire de *B. abortus* est étonnamment homologue à celui du phosphorelais de *C. crescentus*. La conservation est particulièrement bien marquée pour les RR ; ainsi DivK et CtrA ont 80% d'identité et CpdR 60 % d'identité avec leur correspondant chez *C. crescentus* (Barnett *et al.*, 2001; Bellefontaine *et al.*, 2002). Du point de vue de CtrA la comparaison va aussi plus loin que l'homologie de séquence :

i-CtrA de *B. abortus* (BaCtrA) à un motif de liaison à l'ADN quasi identique à celui de CtrA de *C. crescentus* (CcCtrA) et sa liaison est augmentée quand il est phosphorylé (Bellefontaine *et al.*, 2002).

ii- Bien que les régulateurs de BaCtrA et CcCtrA ne soient pas complètement identiques ils semblent contrôler des cibles similaires : ainsi la formation du Z-ring est sous la dépendance de CcCtrA en réprimant *ftsZ* tandis que BaCtrA régule l'expression de *minC* (chez *E. coli* MinC avec MinD régule la localisation de FtsZ). En outre, alors que chez *C. crescentus* des contrôles feedback de l'activité de CtrA opèrent par le biais de la régulation des promoteurs de *divK* et de *clpP*, chez *B. abortus* CtrA se lie aux promoteurs de *pleC* et est prédit comme étant capable de se lier aux promoteurs de *divL*, *divJ* et de *pdhS* (Bellefontaine *et al.*, 2002).

iii-D'autres protagonistes du circuit génétique de contrôle et du ciblage protéolytique de CtrA sont également très conservés tant au niveau protéines (GcrA, DnaA, CcrM, CpdR, ClpXP et RcdA) qu'au niveau de site(s) de méthylation et du site de liaison de CtrA à son propre promoteur indiquant une régulation potentielle de CtrA par lui-même et par CcrM (Bellefontaine *et al.*, 2002).

Au contraire les domaines senseurs des HK de ce phosphorelais sont peu conservés entre *C. crescentus* et *B. abortus*. Cette observation correspond vraisemblablement à une divergence évolutive des mécanismes senseurs en réponse à des environnements et un mode de vie différent.

A signaler une divergence importante de ce réseau, le génome de *B. abortus* encode un paralogue de PleC et de DivJ appelé PdhS (PleC/DivJ homolog sensor (Hallez *et al.*, 2004).

PdhS apparaît essentielle chez *B. abortus* et serait la kinase de DivJ (Hallez *et al.*, 2007)

I.4.3. Comparaison avec les alpha-protéobactéries

Avec 22 RR et 18 HK identifiés, *B. melitensis* semble avoir un plus faible nombre de systèmes à deux composants que *S. meliloti*, *M. loti*, *C. crescentus*, *A. tumefaciens*. Néanmoins, rapporté à son génome plus petit et probablement à son cycle de vie de parasite intra-cellulaire “ facultativement extracellulaire ” ce nombre de SDC reste dans la proportion de 1% de la taille du génome.

I.4.4. Les mutants décrits

Eu égard à leur importance dans l'intégration des signaux environnementaux externes ou internes avec l'expression génique, il n'est pas surprenant que plusieurs HK ou RR de *Brucella* spp. aient été décrits comme étant impliqués dans la virulence de cette bactérie.

Un bref descriptif de ces mutants est donné ci-dessous.

I.4.4.1. BvrS/R

Ce système est de loin le SDC le plus caractérisé de *Brucella* spp. (Guzman-Verri *et al.*, 2002). Très homologue aux systèmes ChvI/ExoS et ChvI/ChvG connus pour être impliqués dans la symbiose et la pathogénicité de *S. meliloti* et *A. tumefaciens* respectivement, ce système est, chez *Brucella*, impliqué dans la régulation de composants de la membrane externe (Omp and Lipid A) (Lopez-Goni *et al.*, 2002). Des mutants transpositionnels dans chacun des partenaires de ce SDC sont atténués

dans tous les modèles d'infection testés. Notons cependant que chez *Brucella* tout comme chez *S. meliloti*, ces gènes semblent essentiels et qu'il n'est virtuellement pas possible de créer des délétants de ce système (I. Lopez-Goni et G. Walker communication personnelle). La conservation, chez de nombreuses α -protéobactéries, de l'organisation génomique de ce SDC en amont de gènes impliqués dans le PTS et en aval de la pyruvate carboxykinase suggère que ce système BvrS/R pourrait être également impliqué dans la régulation des métabolismes carbonés et azotés.

I.4.4.2. FeuP/Q

Ce TCS fut un des premiers TCS décrits pour une *Brucella* sp (Dorrell *et al.*, 1998). Alors que le système homologue est impliqué dans le contrôle de l'assimilation du fer chez *R. leguminosarum*, le mutant *feuP* de *B. suis* n'a aucun problème de croissance sur milieu pauvre en fer. Le même mutant ne semble pas affecté dans sa survie en modèle d'infection cellulaire ou murin. Cependant, un mutant *feuQ* de *B. melitensis* a été identifié lors d'un crible STM en souris et confirmé comme atténué en modèle cellulaire (Lestrade *et al.*, 2003). La raison de cette divergence pourrait être liée à la différence d'espèce.

I.4.4.3. NtrC

Dorrell *et al.* ont également identifié chez *B. suis* l'homologue du RR NtrC (Dorrell *et al.*, 1999). Ce RR avec sa kinase associée (NtrB) est décrit comme participant au métabolisme de l'azote chez de nombreuses bactéries et pourrait également jouer un rôle dans la virulence de certaines d'entre elles (ex : régulation de l'uréase de *K. pneumoniae*). Le mutant *ntrC* de *B. suis* a une courbe de croissance similaire à la souche sauvage sur milieu riche mais est déficient dans la métabolisation de certains acides aminés. Ce mutant n'est pas atténué en macrophage mais montre une certaine atténuation en modèle murin.

I.4.4.4. NtrY

Le gène *ntrY* a été identifié lors d'un crible STM de *B. suis* affectés dans leur survie intracellulaire en macrophages (Foulongne *et al.*, 2000). Ce gène encode une HK qui

avec le gène *ntrX* adjacent pourrait faire partie d'un régulon jouant un rôle dans la synthèse de glutamine. La glutamine a été décrite comme cruciale dans la survie intracellulaire de *Brucella*. Ce NtrY/NtrX SDC est encodé en aval de l'opéron *nifR3ntrBC*. Cette organisation génomique est conservée chez *S. meliloti*, *M. loti* et *Bradyrhizobium*. Il a été proposé chez *Azospirillum brasilense* que les paires senseurs/régulateurs NtrY/X and NtrB/C soient capables de cross-talk (Ishida *et al.*, 2002).

I.4.4.5. NodV

La pCDS II0052, qui encode une des trois HK du chromosome II, a été mutée lors d'une étude visant à caractériser des gènes de *Brucella* homologues à des gènes impliqués dans la symbiose des Rhizobiaceae (Loh *et al.*, 1997). Ce mutant est atténué dans un modèle d'infection murin.

I.4.4.6. FtcR

La pCDS II0158 encode un RR orphelin localisé dans un des loci flagellaire de *B. melitensis* et donc appelé FtcR pour Flagellar two component regulator. Un mutant dans ce régulateur a été construit pour identifier un éventuel régulateur de l'expression de la cascade flagellaire. Ce mutant n'est pas atténué en modèle d'infection cellulaire mais l'est en modèle murin 4 semaines post infection. Il a été montré que FtcR, capable de se lier au promoteur de *fliF* (encodant l'anneau MS du corps basal), était le régulateur maître de l'expression des gènes flagellaires et était lui-même sous contrôle d'un régulateur de Quorum sensing (Leonard *et al.*, 2007). Il est à noter que le gène *rem* de *S. meliloti* partage avec *ftcR* la même organisation génomique et le rôle de régulateur maître (Rotter *et al.*, 2006)

I.4.4.7. CemR

La pCDS BMEI0066 encode un autre RR orphelin. Un mutant transpositionnel dans cette ORF est atténué en infection de macrophages ainsi qu'en modèle murin, (Wu *et al.*, 2006).

I.4.4.8. BMEII0679

Cette HK est sensible à la lumière bleue via son domaine PAS. L'infection de macrophages est stimulée par la lumière bleue et le mutant nul voit sa capacité à infecter les macrophages diminuée (Swartz *et al.*, 2007).

I.4.4.9. PrIR

Un mutant atténué nommé 3G4 a été identifié dans le crible STM de *B. melitensis* en souris (Lestrade *et al.*, 2000). Ce mutant est aussi atténué en macrophages et en cellules HeLa. Le transposon est localisé entre la pCDS I1607 qui encode un RR de la famille NarL et une grosse ORF en orientation inverse qui encode une HK hybride avec 11 segments transmembranaires de la famille Na⁺/solute symporters (Jung, 2001). Ce régulateur a été dénommé PrIR (Proline Regulator) et l'HK adjacente PrIS (Proline sensor, expliqué dans le point III.1). Cette HK et le RR en orientation inverse sont conservés chez *S. meliloti* et *M. loti*.

Ce dernier régulateur fera l'objet de ce travail.

PARTIE II

OBJECTIFS

I. OBJECTIFS

Lors d'un travail antérieur visant à identifier, par «signature tagged mutagenesis» (STM), des mutants de *B. melitensis* atténués en souris, P. Lestrade a isolé le mutant 3G4. Ce mutant transpositionnel avait une disruption du gène codant pour le senseur d'un système à deux composants (SDC)

Sur la base des homologies détectées à l'époque, ce SDC a été nommé PrlS/PrlR pour «proline senseur»

Dans ce travail nous nous sommes proposés de caractériser phénotypiquement les mutants du système à deux composants PrlS/PrlR, et de définir le régulon PrlS/PrlR c'est-à-dire les cibles régulées par ce système.

PARTIE III

RÉSULTATS

III. RÉSULTATS

Pendant son cycle infectieux, comme pathogène intracellulaire, *Brucella* doit s'adapter aux conditions rigoureuses de son environnement dans le milieu extra- et intracellulaire de son hôte eucaryote. Nous avons décrit dans l'introduction, diverses modalités qui permettent à *Brucella* de réguler de façon fine certains déterminants moléculaires nécessaires à son adaptation en fonction des conditions environnementales. Parmi ces modalités, les systèmes à deux composants (SDC) occupent une place prépondérante. Par conséquent, pour mieux comprendre la pathogénie d'une bactérie, la caractérisation d'un SDC impliqué dans la virulence et l'identification de son régulon sont souvent très instructives. Dans ce travail nous nous focaliserons sur le système à deux composants PrlS/PrlR de *Brucella*. Ce système est composé par une protéine histidine kinase transmembranaire hybride (PrlS) et par un régulateur de réponse (PrlR). Dans ce travail, notre intérêt s'est principalement porté sur la caractérisation phénotypique des mutants de ce système et sur la définition de son régulon.

Afin de caractériser phénotypiquement le système à deux composants, PrlR/PrlS chez *B. melitensis*, nous avons construit des mutants disruptants et des mutants propres, nous avons ensuite étudié, dans un premier temps l'impact de ces mutations sur la virulence. Pour ce faire, nous avons infecté des macrophages bovins, des trophoblastes humains JAR73 et des modèles murins avec les souches *Brucella melitensis* 16 M, 16M Δ prlR et 16M Δ prlS.

Les mutants disruptifs et les mutants propres montrent un phénotype d'agrégation. Sur la base de phénotypes produits il semble que le système PrlR/PrlS agisse sur la régulation de gènes impliqués dans le phénomène d'agrégation, c'est-à-dire des gènes codant pour des protéines impliquées dans la modification de

propriétés de surface de la bactérie (OMPs, le flagelle, le système de sécrétion type IV, exopolysaccharides (EPS), etc....).

Afin de pouvoir suivre le niveau d'expression du gène codant PrlR et la production de la protéine nous avons produit et purifié la protéine de fusion His₆-PrlR en *E. coli*. L'immunisation de lapin nous a permis de produire un anticorps polyclonal très spécifique. Ensuite, la construction d'un plasmide dans lequel le promoteur *prlR* a été cloné en amont du rapporteur *lacZ* nous a permis de suivre l'expression du gène codant *prlR*.

Par la suite nous avons analysé la régulation de gènes cibles préalablement identifiés (par exemple protéines de surface Omps, flagelle) en vue de déterminer les conditions dans lesquelles les gènes sont exprimés. Nos résultats laissant à penser que PrlR est un régulateur «global», nous avons donc décidé d'employer une analyse comparative du profil transcriptomique d'une culture de *Brucella melitensis* sauvage et du délétant $\Delta prlR$, afin d'obtenir une image à l'échelle du génome entier des cibles directes et indirectes de ce régulateur (PrlR).

Pour ce faire, les techniques de Microarray et RT-PCR ont été employées en parallèle. La caractérisation de ce système à deux composants et de son régulon potentiel nous permettra de mieux comprendre le rôle de PrlS/PrlR au sein de cette bactérie et son implication dans l'adaptation de *Brucella* à son environnement.

Les résultats de ce travail sont présentés en six parties: La première partie décrit les généralités du mutant 3G4 de *Brucella melitensis*, la deuxième partie donne la caractérisation phénotypique des mutants, la troisième partie concerne la caractérisation des agrégats, la quatrième partie montre l'implication de PrlR dans la régulation des protéines de membrane externe (OMP) et autres structures de surface, la cinquième partie donne l'analyse de la production de PrlR et de l'expression de PrlR et PrlS et la sixième partie montre l'approche transcriptomique pour étudier le rôle régulateur de PrlR.

III.1. Le mutant 3G4 de Brucella melitensis

Dans le crible STM (signature-tagged mutagenesis) que Pascal Lestrade avait employé pour identifier des gènes impliqués dans la virulence de *B. melitensis* 16M, (Lestrade *et al.*, 2000), le mutant 3G4 contient un transposon mini-Tn5Km2. Une PCR arbitraire a été employée pour cloner le fragment d'ADN disrupté par le transposon. Ce fragment a été ensuite identifié par séquençage (Lestrade *et al.*, 2000). Ce transposon s'est inséré dans le gène encodant le polypeptide senseur d'un système à deux composants avec en amont et en sens inverse un régulateur de réponse. Pour cette protéine senseur la meilleure homologie dans les banques de données de l'époque était observée avec une protéine kinase hybride d'*Aeromonas hydrophila* annotée comme probable proline senseur et impliquée dans la régulation de la mobilité. Pour cette raison ce SDC de *Brucella* a été dénommé PrlS/PrIR.

Dans son article, P. Lestrade signale qu'avec BlastX la séquence obtenue du fragment génique disrupté par le transposon présente 73% de similarité et 56% d'identité avec le gène *vsrB* de *Ralstonia solanacearum*. Chez cette bactérie le SDC VsrB-VsrC contrôle les gènes *eps*, impliqués dans la voie de biosynthèse et d'exportation de EPSI, un exopolysaccharide requis pour la virulence (Huang *et al.*, 1995; Huang and Schell, 1995).

III.1.2. Phénotypes décrits par P. Lestrade

Les phénotypes trouvés pour le mutant transpositionnel 3G4 de *B. melitensis* 16M par Pascal Lestrade sont: l'atténuation de la virulence en souris BALB/c à 5 jours post-infection (p.i.), ainsi que l'atténuation en macrophages murins J774 et cellules HeLa par rapport à la souche sauvage *B. melitensis*. En outre ce mutant présente un phénotype d'agrégation transitoire en 2YT et la coloration au cristal violet montre un phénotype rugueux (confirmé par l'absence d'agglutination par le sérum anti-LPS), probablement lié à la présence d'exopolysaccharides à sa surface. (Lestrade *et al.*, 2000; Lestrade *et al.*, 2003). Dans d'autres bactéries comme *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* et *V. cholerae* la morphologie rugueuse des colonies est corrélée avec la formation de biofilms plus robustes et l'activation de gènes qui produisent plus d'EPS (Simm *et al.*, 2004; Wai *et al.*, 1998). Ces données nous permettent de supposer

que ce système à deux composants (PrIS/PrIR), suite à la perception de signaux inconnus, régule les propriétés de la surface des cellules bactériennes.

Depuis le travail initial de Lestrade de nouvelles données génomiques sont disponibles. Avant de caractériser plus avant le phénotype de ce mutant, nous allons procéder à des analyses bioinformatiques pour définir le contexte génomique de ces gènes et des orthologues chez d'autres espèces de *Brucella* ainsi que d'autres α -protéobactéries. Nous procéderons ensuite à des comparaisons de séquences et des prédictions de domaines sur nos protéines cibles PrIS/PrIR.

Tant le contexte génomique que les domaines et leur conservation au sein d'autres genres bactériens seront des pistes permettant d'émettre des hypothèses sur le rôle putatif de ce SDC.

III.1.3. Analyses du locus génomique du système *prlR/prlS*.

Nous avons analysé le système à deux composants PrIR/PrIS (figure 19). Ce système est situé sur le chromosome I. Le gène *prlS* (BMEI1606 (3918pb) coderait une protéine histidine kinase hybride de 1305 aa (142,26 kD). Adjacent à *prlS*, mais en sens opposé, on trouve le gène *prlR* (BME I1607) (642pb) qui code pour un régulateur de réponse de 213 aa (22.58 kD).

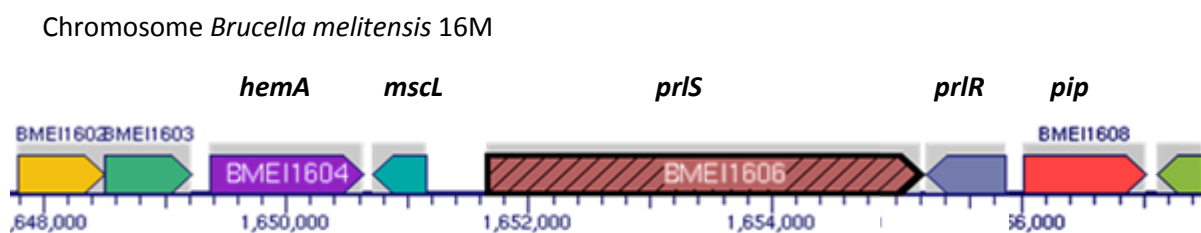


Figure 19 : Contexte chromosomique de la région d'intérêt du système à deux composants PrIS/PrIR de *B. melitensis*.

Nous avons donc analysé les séquences codantes (pCDS) situées de part et d'autre des gènes du système à deux composants *prlS/prlR*. En amont du gène *prlS* se trouvent la pCDS1602, (annotée comme une glycosyl transférase), la pCDS1603 (prédite comme acétylase de polysaccharide), la pCDS 1604 (gène *hemA*) annotée comme une synthétase d'acide 5-aminolévulinique impliquée dans la biosynthèse de

tétrapyrrole et enfin la pCDS1605, (annotée comme *mscL*) qui code pour une probable protéine de canal mécanosensitive. A droite de ce système à 230 nucléotides de *prlR* se trouve la pCDS 1608 (*pip*) qui code pour une probable proline iminopeptidase.

Cette région du chromosome est bien conservée dans toutes les espèces de *Brucella* à l'exception d'une petite ORF de 147pb qui se trouve en amont de *prlS* dans les autres espèces de *Brucella* et n'a pas été annotée dans le génome publié de *B. melitensis*, bien qu'elle soit présente (figure 20).

Remarquons néanmoins que l'ORF BMEI1606 encodant *prlS* est prédite plus longue que ses équivalents chez les autres *Brucella* et qu'elle empiète sur l'ORF encodant PrlR ce qui n'existe pas chez les autres *Brucella*. Nous discuterons ce point plus tard au point III.1.3.1.1.1.

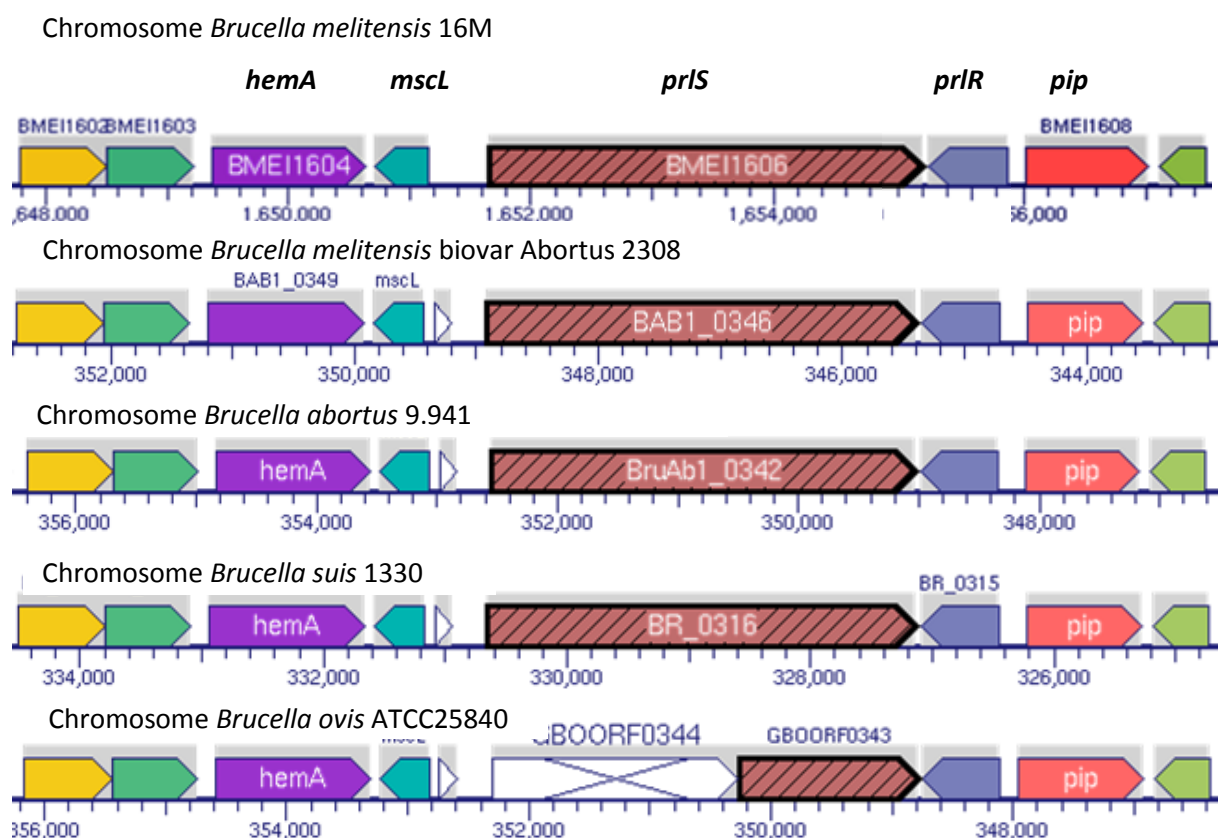


Figure 20 : Comparaison des contextes chromosomiques des orthologues des espèces de *Brucella*: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. ovis*.

Cette orientation inverse des gènes orthologues de l'histidine kinase PrlS et du régulateur de réponse PrlR est bien conservée chez d'autres α -protéobactéries que *Brucella*, comme: *Mesorhizobiun* sp BCN, *Sinorhizobiun meliloti* 1021, *Aurontimonas* sp SI85-9A1, *Nitrobacter hamburgensis*, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, et *Haella chejuensis* K (figure 21).

La conservation de la proximité génomique (et de l'orientation tête-bêche) des orthologues des gènes *prlS/prlR* nous conforte dans l'idée qu'il s'agit bien d'un système à deux composants.

Nous pouvons remarquer que dans la séquence de l'ORF *prlS* de *B. ovis* est présent un codon stop. Ce codon stop appartient à un pseudo gène, donc la séquence codant le gène *prlS* est plus petite par rapport à *B. melitensis* (voir figure 20).

Particulièrement remarquable est la présence conservée en amont de nombreux orthologues de *prlS* et en orientation inverse du gène *mscI*.

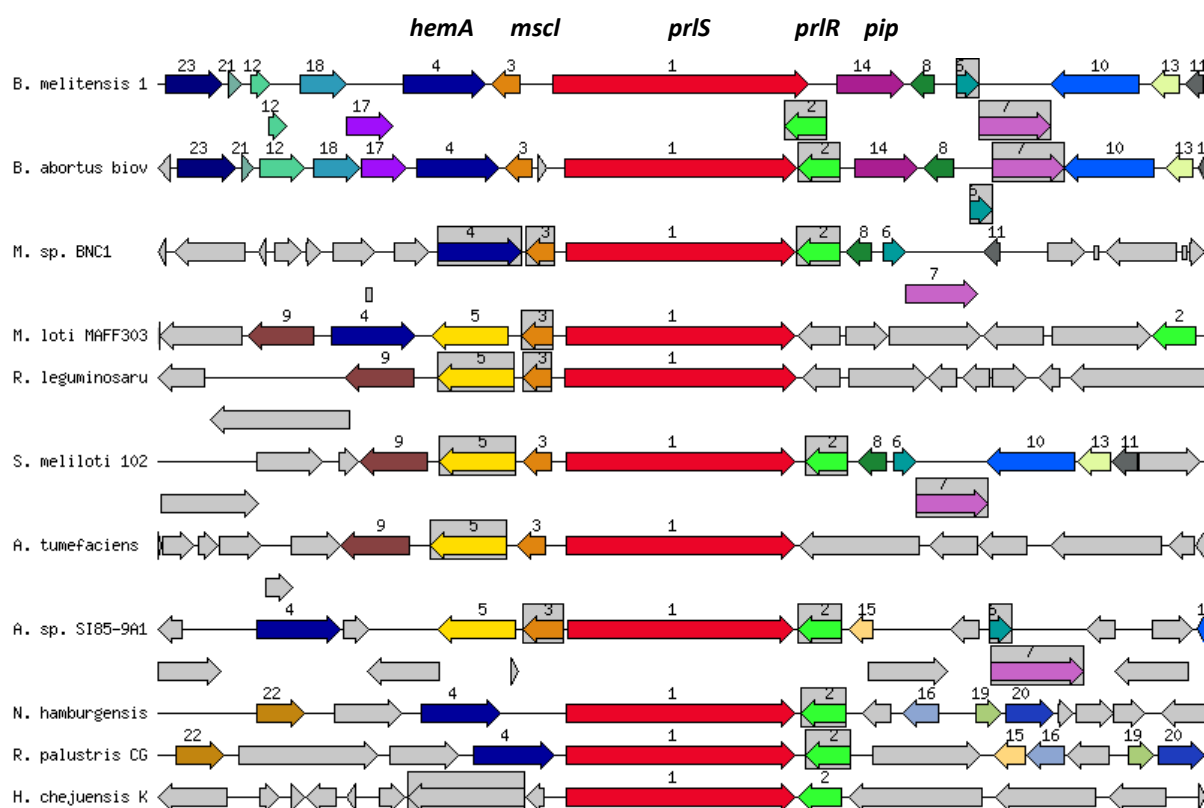


Figure 21 : Comparaison du contexte chromosomique des orthologues de *Brucella melitensis* avec les α -protéobactéries comme: (*Brucella abortus*, *Mesorhizobium* sp BNC1, *Mesorhizobium loti* MAFF303,

Rhizobium leguminosarum, *Sinorhizobium melilot* 102, *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Aurantimonas* sp SI85-9A1, *Nitrobacter hamburgensis*, *Rhodopseudomonas palustris* CG, *Haella chejuensis* K.

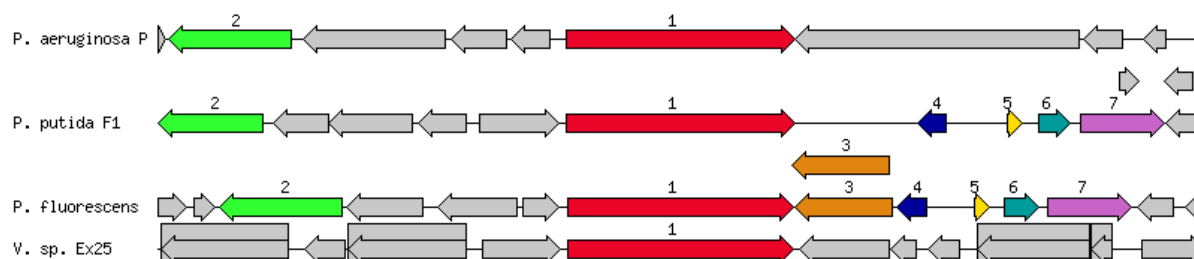


Figure 22 : Comparaison du contexte chromosomique des orthologues de *Brucella melitensis* avec les γ -protéobactéries comme: (*Pseudomonas aeruginosa* PAO, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas fluorescens* Pf5 et *Vibrio* sp Ex25).

Chez *E. coli* la protéine MscL est impliquée dans l'osmorégulation bactérienne. Des bactéries cultivées en condition hyper-osmotique accumulent des concentrations élevées d'ions et d'osmoprotectants pour contrebalancer l'osmolarité externe, (Sukharev *et al.*, 1994). Cette donnée pourrait laisser penser que le système PrlR/PrlS pourrait être impliqué dans l'osmorégulation.

III.1.3.1. Analyse de la séquence de PrlS et PrlR

III.1.3.1.1. PrlS

III.1.3.1.1.1. Comparaison de séquences

Une analyses BLAST (Altschul *et al.*, 2009) utilisant BLASTP sur la banque de séquences protéiques non redondantes montre que la protéine PrlS est très conservée (plus de 100 protéines bactériennes sont retrouvées avec une E value 0.0) dans le génome *Brucella* et d'autres α -protéobactéries mais également chez les gamma-protéobactéries (e.g. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas putida* F1 *Pseudomonas fluorescens* Pf5, *Vibrio* sp Ex25, etc.)

Le tableau 5 illustre ces données pour quelques exemples choisis.

Au vu de ces données, plusieurs points méritent d'être signalés.

Tableau 5 : Le tableau résume les résultats des alignements de séquences protéiques, les fonctions prédites, le groupe, la similarité, l'identité des acides aminés et la longueur des séquences pour PrIS qui été réalisée avec BLASTP 2.2.21.

Fonction putative d'après GenBank	Gène encodant la protéine homologue chez	Groupe	Similarité Acide aminé	Identité Acide aminé	Longueur de séquence
Senseur histidine kinase (dans gène banque)	<i>B. melitensis</i> 16M BMEI1606	α-protéobactérie	100%	100%	1305 aa
Senseur histidine kinase (après séquençage)	<i>B. melitensis</i> 16M BMEI1606	α-protéobactérie	100%	100%	1174 aa
Na/soluté symporter réponse régulateur	<i>B. melitensis</i> biovar <i>Abortus</i> 2308 BAB1_346	α-protéobactérie	99%	98%	1174 aa
Senseur histidine kinase / régulateur de réponse	<i>B. abortus</i> 9-941 BruAb1-0342	α-protéobactérie	99%	98%	1174 aa
Deux composants kinase senseur/ régulateur de réponse hybride	<i>B. suis</i> 1330 BR_316	α-protéobactérie	98%	98%	1174 aa
Senseur histidine kinase / régulateur de réponse	<i>B. pinnipedialis</i>	α-protéobactérie	98%	98%	1174 aa
Senseur histidine kinase / régulateur de réponse	<i>B. ceti</i> M644/93/1	α-protéobactérie	98%	98%	1174 aa
Senseur histidine kinase hybride	<i>B. canis</i> ATCC 23365	α-protéobactérie	98%	98%	1174 aa
Histidine kinase senseur/ régulateur de réponse	<i>B. ovis</i> ATCC25840 GB00RF0343	α-protéobactérie	89%	99%	1174 aa
Deux composants senseur histidine kinase	<i>M. loti</i> MAFF303099	α-protéobactérie	73%	58%	1169 aa
Senseur histidine kinase hybride	<i>R. leguminosarium</i> bv. <i>Viciae</i> 3841	α-protéobactérie	68%	51%	1173 aa
Deux composants histidine kinase senseur/ régulateur de réponse hybride	<i>A. tumefaciens</i> C58 Atu0527	α-protéobactérie	68%	52%	1169 aa
Protéine transmembranaire histidine kinase senseur	<i>S. meliloti</i> 1021 SMc02249	α-protéobactérie	68%	52%	1168 aa
Deux composants senseur/ régulateur hybride	<i>B. Japonicum</i> USDA 110	α-protéobactérie	63%	45%	1169 aa
prIS senseur histidine kinase, possible senseur de proline	<i>R. palustri</i> CGA009 RPA0853	α-protéobactérie	64%	47%	1169 aa
Probable senseur à deux composants	<i>P. aurescens</i> PA01 Pa3271	γ-protéobactérie	60%	41%	1159 aa
Protéine kinase senseur	<i>Vibrio fischeri</i> ES114	γ-protéobactérie	59%	39%	1146 aa
PrIS senseur de proline	<i>A. hydrophila</i> ATCC7966 AHA_976	γ-protéobactérie	38%	55%	1166 aa
VsrB Deux composants senseur kinase /réponse régulateur hybride régulateur de la transcription	<i>R. solanacearum</i> GMI1000 VsrB	B protéobactérie	22%	20%	638 aa

I. Alors que tous les homologues de PrlS ont une longueur entre 1150-1170 aa, la protéine de *B. melitensis* est prédite comme étant de 1305 aa. Soit environ 150 aa en plus. Dans l'analyse de séquence nous avons trouvé une erreur à la position 1129 qui ne génère plus de codon stop et le cadre ouvert de lecture est prolongé. Pour cette raison nous avons reséquéncé le gène *prlS* sur l'ADN du chromosome de *B. melitensis*.

Nous remarquons que la séquence a une taille de 1174 aa égale aux autres espèces de *Brucella*. A partir de là on ne travaille plus que sur la protéine de la bonne taille.

II. Parmi les annotations les plus fréquentes des orthologues on retrouve

- Periplasmic sensor hybride histidine kinase.
- Two component sensor histidine kinase.
- Na⁺/solute symporter.
- Sensor histidine kinase, probable proline sensor.

III. Alors que chez les *Brucella* spp et quelques α -protéobactéries le gène *prlS* est situé en orientation inverse, et en aval d'un régulateur de réponse d'un SDC et en amont d'un gène (*mscl*) encodant une protéine de canal mécanosensitive, chez les γ -protéobactéries le gène homologue à PrlS de *B. melitensis* n'est pas associé à un régulateur de réponse (voir figure 22).

IV. Les alignements de séquences protéiques présentés dans le tableau 5 montrent pour VrsB de *Ralstonia solanacearum* 20% d'identité. Ceci diffère des résultats donnés par Pascal Lestrade, qui avait trouvé 56% d'identité puisque l'alignement a été fait avec la région de PrlS où se trouve inséré le transposon et pas avec le gène entier. En outre le gène *vrSB* est 2 fois plus court que les autres.

Toutes ces indications ajoutées à l'analyse des domaines protéiques (voir ci-après) nous guideront dans les tests phénotypiques en vue de caractériser ce SDC chez *B. melitensis*.

III.1.3.1.1.2. Recherche et analyse de domaines protéiques de PrlS

L'analyse de la séquence de PrlS sur le site Conserved Domain Database du NCBI révèle la présence de trois domaines qui permettent de prédire les faits suivants (figure 23).

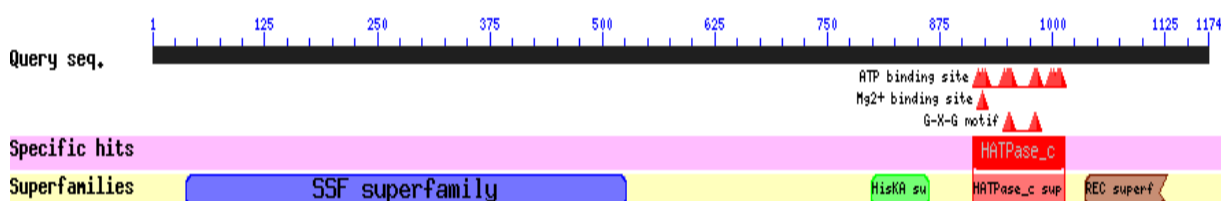


Figure 23 : Représentation des domaines conservés de la protéine senseur hybride PrlS. Le domaine PutP (Na⁺/proline symporter) est en bleu clair, en vert le domaine HisKA, en rouge le domaine HATPase-c et en orange le domaine REC.

- I. IL'extrémité NH₂ terminale contient entre les aa 37 et 527 un domaine senseur avec 12 segments transmembranaires correspondant à un domaine PupP (Na⁺/proline symporter) appartenant à la superfamille SSF (Na⁺/proline symporter).
- II. PrlS est bien une protéine histidine kinase puisque l'on retrouve les domaines HisKA et HATPase classiques (644-1013 aa) (voir Introduction point I.3.2.2.).
- III. La protéine histidine kinase PrlS est une kinase hybride puisque en position C-terminale on retrouve le domaine REC (aa 1036-1128) portant un aspartate conservé caractéristique du domaine receveur des régulateurs de réponse des SDC (voir Introduction point I.3).

Signalons enfin qu'il n'existe aucune publication relative à la caractérisation fonctionnelle d'une des kinases homologues à PrlS.

Les seuls indications indirectes dont nous disposons sont :

- la conservation chez les α -protéobactéries du gène *mclS* encodant une protéine de canal mécanosensitif donnant à penser que PrlS pourrait être associé à la perception de l'osmolarité.

- le signal perçu est associé à un phénomène de symport Na^+ /soluté et peut être Na^+ /proline ce qui pourrait renforcer le lien avec l'osmolarité puisque la proline est un osmoprotectant (Milner *et al.*, 1987).
- la protéine homologue à PrlS chez *Aeromonas hydrophila* a été prouvée impliquée dans la mobilité (Schmidt, 2001).

Notons cependant que dans ce dernier cas il n'y a pas de régulateur de réponse à proximité.

III.1.3.1.2. PrlR

III.1.3.1.2.1. Comparaison de séquences

L'analyse BLASTP sur la banque de séquences protéiques montre que la protéine PrlR est conservée chez de certaines espèces de *Brucella* et d'autres α -protéobactéries.

Le tableau 6 illustre ces données pour quelques exemples.

III.1.3.1.2.2. Recherche et analyse de domaines protéiques de PrlR

La BME I1607 se trouve à 369 pb en aval de PrlS et en orientation inverse (figure 20)

Annoté dans GenBank comme «glycerol metabolism activator», cette protéine est structurée comme un régulateur de réponse d'un SDC «bona fide».

En effet analysé, sur le site CD database elle permet d'identifier les deux domaines caractéristiques (figure 24).

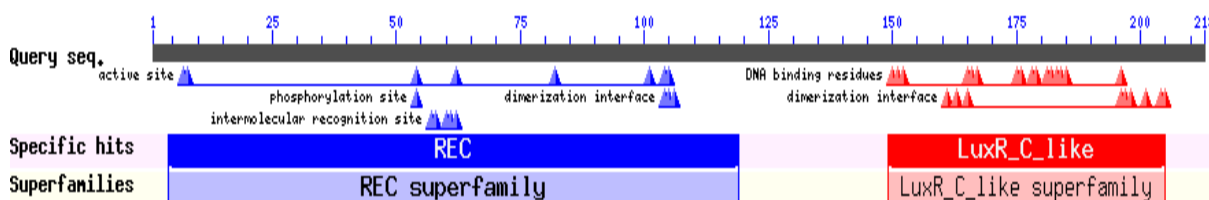


Figure 24 : Représentation des domaines conservés du régulateur de réponse PrlR. Le domaine receveur REC, en NH_2 terminal, en bleu. En rouge en C. terminal le domaine effecteur

Tableau 6 : Le tableau résume les résultats des alignements de séquences protéiques, les fonctions prédites et la longueur des séquences pour PrIR réalisées avec BLASTP2.2.21. Le choix des espèces pour lesquelles nous avons cherché des orthologues est basé sur les espèces présentes au tableau 5.

Fonction putative d'après GenBank	Gène encodant la protéine homologue chez	Groupe	Similarité Acide aminé	Identité Acide aminé	Longueur de séquence
Activateur du métabolisme de glycérol	<i>B. melitensis</i> 16M BMEI1607	α-protéobactérie	100%	100%	213 aa
Protéine régulateur de réponse receveur, famille luxR	<i>B. melitensis</i> biovar <i>Abortus</i> 2308 BAB1_345	α-protéobactérie	100%	100%	213 aa
Régulateur de réponse ADN-binding, famille luxR	<i>B. abortus</i> 9-941 BruAb1-0341	α-protéobactérie	100%	100%	213 aa
Régulateur de réponse ADN-binding, famille luxR	<i>B. suis</i> 1330 BR_315	α-protéobactérie	100%	100%	213 aa
Régulateur de réponse ADN-binding, famille luxR	<i>B. ovis</i> ATCC25840 GB00RF0342	α-protéobactérie	99%	99%	213 aa
Régulateur de réponse à deux composants	<i>M. loti</i> MAFF303099	α-protéobactérie	81%	69%	219 aa
Régulateur transcriptionnel	<i>S. meliloti</i> 1021 SMC02248	α-protéobactérie	79%	63%	215 aa
Régulateur de réponse à deux composants	<i>A. tumefaciens</i> C58 Atu0484	α-protéobactérie	75%	60%	216 aa
Régulateur de réponse à deux composants	<i>B. Japonicum</i> USDA 110	α-protéobactérie	75%	59%	223 aa
Régulateur de réponse à deux composants	<i>R. leguminosarium</i> bv. <i>Viciae</i> 3841	α-protéobactérie	74%	63%	215 aa
Régulateur transcriptionnelle à deux composants. Famille LuxR	<i>R. palustri</i> CGA009 RPA0852	α-protéobactérie	73%	57%	225 aa
AgmR Régulateur positive *	<i>A. hydrophila</i> ATCC7966 AHA_1213	γ-protéobactérie	68%	50%	214 aa
Régulateur de réponse à deux composants *	<i>P. aureginosa</i> PA01 Pa3604	γ-protéobactérie	67%	50%	217 aa
Régulateur transcriptionnel famille LuxR *	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	γ-protéobactérie	67%	48%	215 aa
VsrC protéine régulateur de réponse transcriptionnelle	<i>R. solanacearum</i> GM11000	B- protéobactérie	32%	41%	222 aa

* Ce régulateur n'est pas à proximité de PrIS.

- Le domaine NH₂ terminal REC (4-119aa) portant l'aspartate conservé caractéristique des domaines receveurs des régulateurs de réponse.

- Le domaine DNA binding (149-205aa) qui avec son motif HTH de la famille LuxR constitue le domaine effecteur du régulateur de réponse PrlR.

III.1.3.1.3. Le système PrlS/ PrlR

Dans le système à deux composants PrlS/PrlR que nous caractérisons, la protéine PrlS est une histidine kinase hybride qui, à travers son domaine de fonction inconnue PutP, peut percevoir un signal environnemental. Cette information est ensuite transmise par phosphorylation au régulateur de réponse PrlR qui donnera une réponse appropriée. Le système étant hybride, le transfert de groupe phosphoryl se fera du résidu H de PrlS vers le résidu D de son domaine RR puis il transitera via une protéine HPT inconnue vers le résidu D de PrlR, (figure 25).

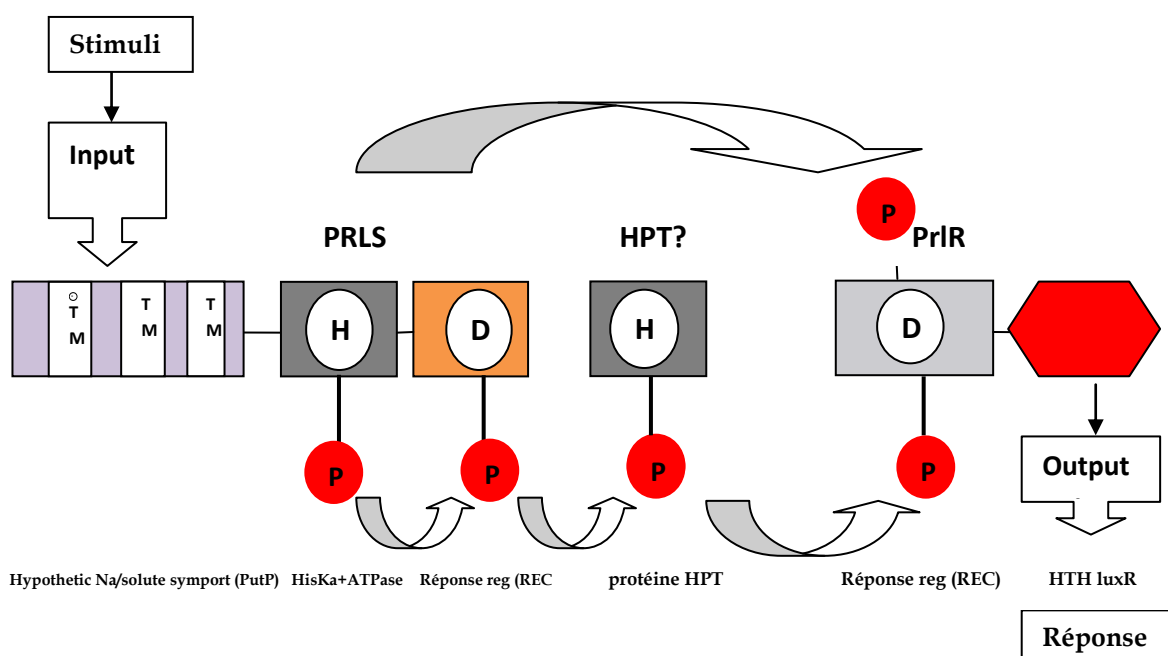


Figure 25: Ce schéma représente l'organisation du système à deux composants PrlS/PrlR et le phosphorelais. Ce système est composé d'une protéine histidine kinase PrlS et d'une protéine régulateur de réponse PrlR. L'histidine kinase contient trois domaines: un domaine de détection, un domaine kinase liant l'adénosine triphosphate et un domaine régulateur de réponse. Le régulateur de réponse PrlR contient deux domaines: un domaine récepteur (REC) comportant l'acide aspartique conservé et un domaine effecteur. Le lien entre ces deux systèmes doit se faire par une protéine HPT, encore inconnue.

Au vu de la conservation de ce système chez de nombreuses α -protéobactéries et son implication potentielle dans la virulence, dans la régulation de la production

d'exopolysaccharides et dans la régulation du flagelle, nous avons décidé de caractériser plus en détail ce système à deux composants. Pour ce faire, sachant que la souche *B. melitensis* wt ayant servi à faire le mutant 3G4 était atténuée (Fretin, 2003), nous avons entrepris de construire de nouveaux mutants ainsi que des outils dont nous aurons besoin. Les détails de ces constructions sont donnés dans l'annexe I.

III.2. Caractérisation des mutants prlR et prlS

Lors de sa thèse P. Lestrade a montré que le mutant 3G4 était rugueux, faisait des agrégats en 2YT et était atténué en modèle cellulaire et en modèle murin BALB/c à 5 jours. Nous savons cependant que la souche sauvage utilisée par P. Lestrade était vraisemblablement atténuée pour une raison inconnue et que les mutants réalisés dans ce background risquent d'être exagérément atténués. Ainsi, le mutant *fliF* de P. Lestrade est atténué à 5 jours d'infection en souris. Mais le mutant *fliF* construit par remplacement allélique dans une nouvelle souche de *B. melitensis* est atténué seulement à 4 semaines (Fretin *et al.*, 2005). Depuis ces données, nous avons décidé de refaire les mutants et d'analyser leurs phénotypes.

III.2.1. Les mutants ne sont pas rugueux et n'agrègent pas

Lors d'un test au cristal violet ces mutants apparaissent lisses comme la souche sauvage. Les mutants ont été soumis à une série de tests de croissance, en milieu 2YT, et tout en ne présentant pas de différence de croissance par rapport à la souche sauvage ils n'ont pas agrégé (non montré). Ces résultats sont différents de ceux du mutant 3G4, voir tableau 7.

III.2.2. Les mutants 16M::prlS et 16M::prlR ne sont pas atténués en modèles cellulaires

En vue de tester la virulence des mutants 16M::*prlS* et 16M::*prlR* de *Brucella melitensis*, nous avons comparé la survie intracellulaire de la souche virulente *Brucella* 16M et des mutants 16M::*prlS* et 16M::*prlR* en deux modèles d'infection cellulaire, les trophoblastes humains JAR713 et les macrophages bovins SV40.

Les trophoblastes sont des cellules du placenta pour lesquelles *Brucella* montre un tropisme marqué lors de l'infection d'une femelle gestante et représente l'endroit

où le degré de colonisation bactérienne est le plus élevé. Nous avons décidé d'utiliser les trophoblastes JAR713 disponibles au laboratoire (Watanabe *et al.*, 2008).

Les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'infection de l'hôte par *Brucella* et l'interaction entre ces cellules et *Brucella* a été largement documentée (Boschiroli *et al.*, 2001; Boschiroli *et al.*, 2002; Pizarro-Cerda *et al.*, 1999). *Brucella* est capable d'infecter de nombreux types de macrophages. Nous avons décidé d'évaluer la croissance intracellulaire des mutants 16M::*prlR* et 16M::*prlS* dans les macrophages bovins SV40.

Les souches de *Brucella* (la souche parentale et les différents mutants 16M::*prlS* et 16M::*prlR*) sont cultivées 24h à 37°C dans du milieu riche (2YT), cette suspension bactérienne sert ensuite à infecter des monocouches de cellules (les trophoblastes humains JAR713 et macrophages bovins SV40) à sous-confluence à raison de 300 bactéries par cellule. Après une heure d'incubation, les cellules sont traitées à la gentamycine, afin de tuer les bactéries extracellulaires. Elles sont ensuite incubées pendant 48 heures. Après 48 heures d'infection, les cellules infectées ont été traitées avec un détergent (PBS triton X100 0.1%) afin de libérer les bactéries intracellulaires. Des dilutions sériées des lysats cellulaires ont été déposées sur un milieu 2YT, afin de dénombrer les bactéries intracellulaires vivantes.

Les résultats de ces expériences sont présentés en colony forming unit (CFU) aux figures 26 et 27. Après 48 heures d'infection, le nombre de bactéries intracellulaires de la souche virulente 16M est similaire à celle des mutants 16M::*prlR* et 16M::*prlS* dans les deux modèles utilisés.

Cette expérience a été répétée trois fois. Les résultats obtenus sont similaires.

En conclusion, nos résultats montrent qu'aucun des mutants 16M::*prlS* et 16M::*prlR* n'est affecté dans la capacité à se multiplier dans les modèles cellulaires de trophoblastes humains JAR713 et de macrophages bovins. SV40, et ce par comparaison à la souche parentale *B. melitensis* 16M.

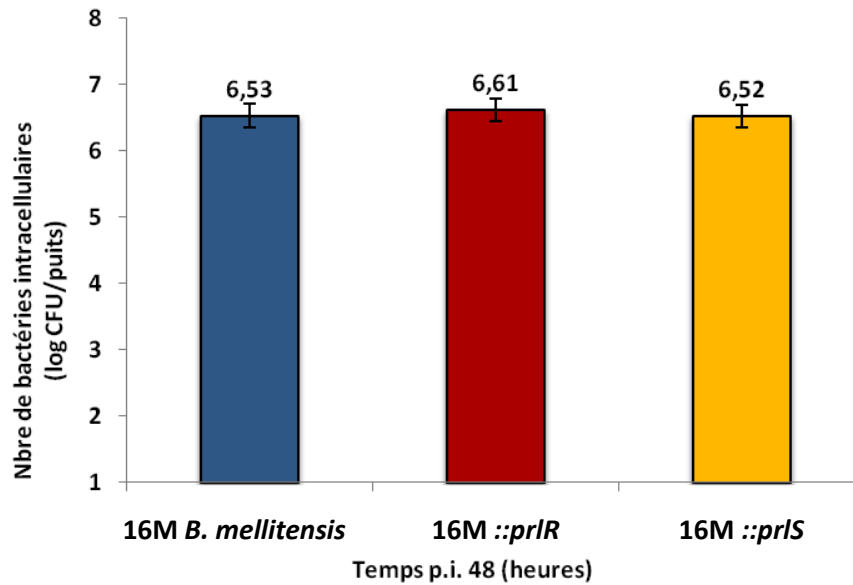


Figure 26 : Estimation du nombre de bactéries intracellulaires par puits pour la souche parentale *B. melitensis* 16M, et des mutants 16M *::prlR* et 16M *::prlS*, après 48 heures d'infection en macrophage SV40. Les barres représentent la moyenne des nombres estimés de bactéries intracellulaires (CFU) obtenus dans trois puits indépendants lors d'une expérience et exprimée sous forme logarithmique (Log CFU) $\pm$ l'écart-type.

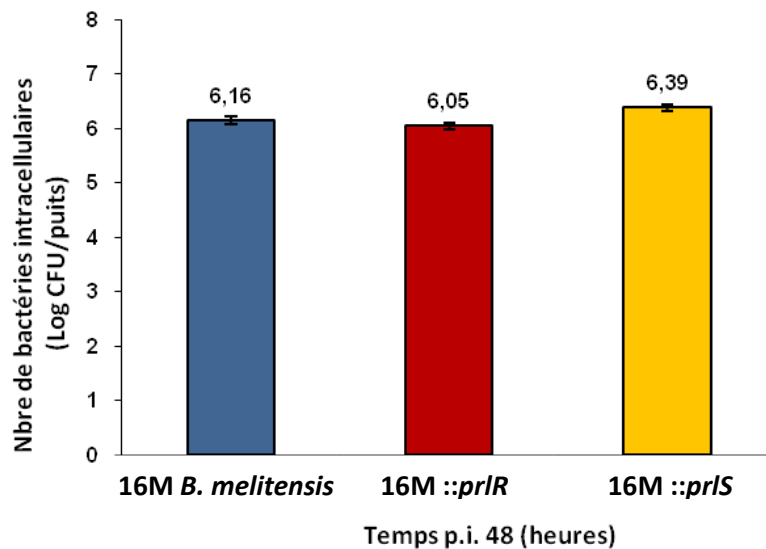


Figure 27 : Estimation du nombre de bactéries intracellulaires par puits pour la souche parentale *B. melitensis* 16M, des mutants 16M *::prlR* et 16M *::prlS*, après 48 heures d'infection en Trophoblastes JAR 723. Les barres représentent la moyenne des nombres de bactéries intracellulaires (CFU) obtenus dans

trois puits indépendants lors d'une expérience et exprimée sous forme logarithmique (Log CFU) $\pm$ l'écart-type.

III.2.3. Les mutants *prlR* et *prlS* sont atténués à 4 semaines en souris

Pour évaluer la virulence des mutants 16M Δ *prlR* et 16M Δ *prlS* en modèle murin, nous avons utilisé 3 groupes de 4 souris BALB/c. Après inoculation par voie intrapéritonéale par des souches de *B. melitensis* 16M et des mutants 16M Δ *prlR* et 16M Δ *prlS*, les souris ont été tuées après 1 semaine et 4 semaines d'infection. Le dénombrement des bactéries dans leur rate a été effectué. Les mutants 16M Δ *prlR* et 16M Δ *prlS* présentent un profil de survie identique à une souche sauvage après 1 semaine d'infection, mais les deux mutants sont fort atténués après 4 semaines d'infection (Figure 28) (le nombre de mutants 16M Δ *prlR* et 16M Δ *prlS* détectés est presque inférieur à 2 log par rapport à la souche sauvage). Trois expériences indépendantes ont permis de constater que les mutants 16M Δ *prlR* et 16M Δ *prlS* survivent moins bien dans ce modèle que la souche sauvage.

Nous avons effectué une ANOVA afin d'analyser nos données. Cette ANOVA est significative, ce qui signifie qu'au moins une moyenne est différente d'au moins une autre.

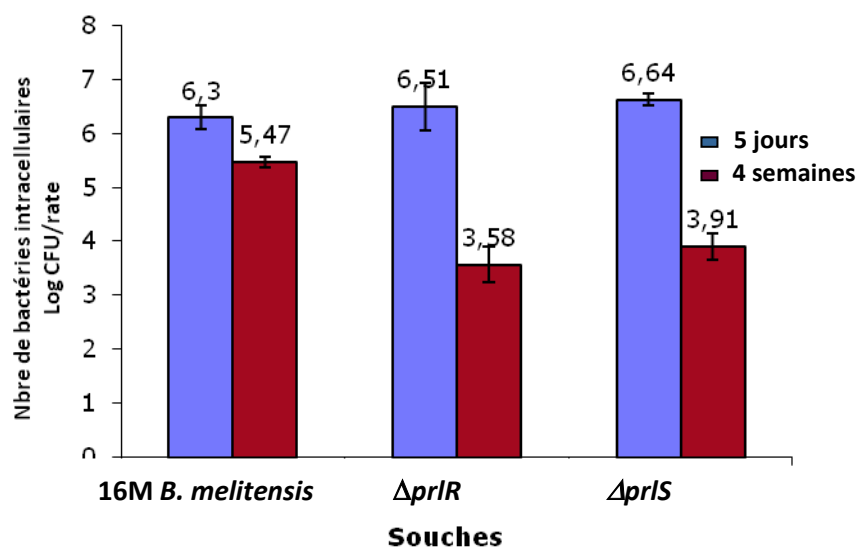


Figure 28 : Survie intracellulaire des mutants *ΔprlR*, *ΔprlS* et de la souche sauvage *B. melitensis* 16M dans la souris BALB/c. Temps post-infection 1 et 4 semaines. Les barres représentent la moyenne du log 10 du nombre de bactéries par rate obtenu pour 4 souris $\pm$ l'écart-type.

A ce stade nous pouvons résumer les différences constatées entre le mutant 3G4 et les mutants *prlR* et *prlS* que nous avons construits. Les mutants *prlS* et *prlR* ne sont ni rugueux ni n'agrègent en 2YT, en outre, ces mutants ne sont pas atténués en modèle cellulaire et sont atténués à 4 semaine en souris mais pas à 5 jours (voir tableau 7). Ces données suggèrent que PrlR de *B. melitensis* 16M serait donc impliqué dans la persistance de la virulence en souris, et nécessaire au bon déroulement du cycle infectieux dans le modèle murin, ce qui nous a encouragé à continuer notre travail.

Tableau 7 : Le tableau résume l'analyse phénotypique comparative des mutants *prlS* et *prlR* générés dans ce travail avec le mutant 3G4

	16M	3G4	Mutant <i>::prlR</i> et mutant $\Delta prlR$	Mutant <i>::prlS</i> et mutant $\Delta prlS$
Cristal violet	–	+	–	–
Agrégat en 2YT	–	+	–	–
Atténué en cellule	–	+	–	–
Atténué en souris	– –	+ 5 jours n.d.	- 5 jours + 4 semaines	- 5 jours + 4 semaines

III.2.4. Les mutants *prlR* et *prlS* ne montrent pas de différence de croissance notable en culture

Afin de déterminer, si les mutations dans le système à deux composants n'impliquent pas de retard de croissance, nous avons analysé le phénotype des mutants *prlS* et *prlR* dans différentes conditions de croissance (milieu riche liquide et solide) par rapport à la souche sauvage. Sauf mention contraire les mutants propres ont été utilisés (les mutants intégratifs donnent les mêmes résultats). Le comportement de croissance en 2YT liquide (10 ml en tube Falcon) (voir figure 29) et solide (non montré) des mutants est similaire à celui de la souche parentale.

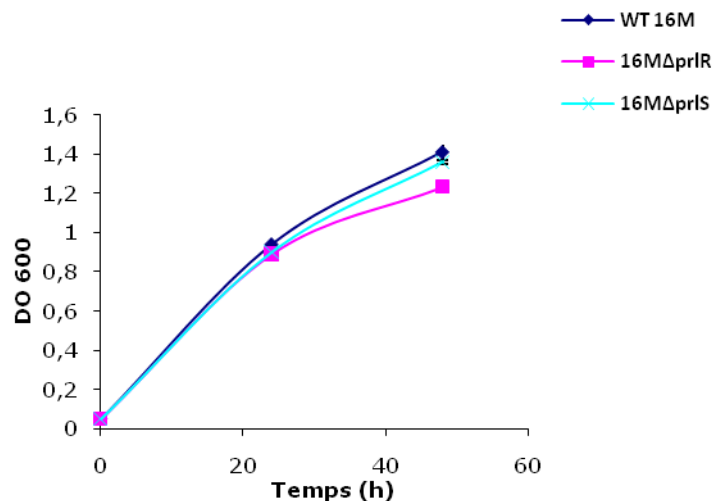


Figure 29 : Croissance de mutants 16MΔprlR, 16MΔprlS et de la souche sauvage dans 10 ml de milieu de culture 2YT Falcon, avec agitation à 37°C. Cette expérience a été répétée plusieurs fois. Les résultats obtenus sont similaires.

Vu l'implication possible du SDC PrlS/PrlR dans la régulation de l'osmolarité nous avons voulu comparer la croissance des souches mutantes à celle de la souche sauvage en 2YT liquide avec des concentrations croissantes de NaCl (50, 100, 200, 300 et 400 mM). Lors de culture en tube Falcon 10 ml peu ou pas de différence de croissance est constatée avec la souche WT et ce jusqu'à une concentration de 300 mM NaCl (figure 30).

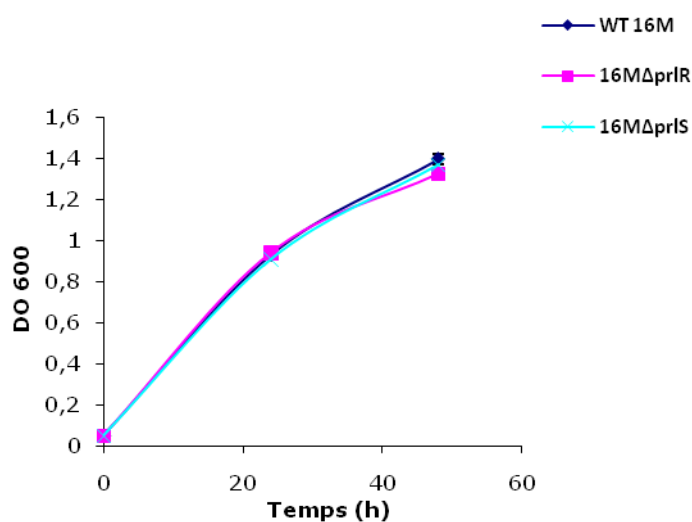


Figure 30 : Croissance de la souche sauvage 16M, des mutants 16MΔprlR et 16MΔprlS, dans 10 ml de

culture 2YT 300 mM NaCl (Falcon), avec agitation à 37°C. Cette expérience a été répétée plusieurs fois. Les résultats obtenus sont similaires.

A 400 mM NaCl la souche parentale et les souches mutantes sont comparables pendant les 24 premières heures à la suite de quoi les souches 16M $\Delta prlS$ et 16M $\Delta prlR$ montrent à 48 heures une DO légèrement plus faible que la souche wt (figure 31).

Nous avons appliqué un test statistique expliqué ci-après. Ce test révèle que la DO entre la souche wt et la souche $\Delta prlR$ est significativement différent, mais que les comparaisons de DO wt/ $\Delta prlS$ et $\Delta prlR$ / $\Delta prlS$ sont non-significatives au point à 48 heures (résultats montrés à la figure 31).

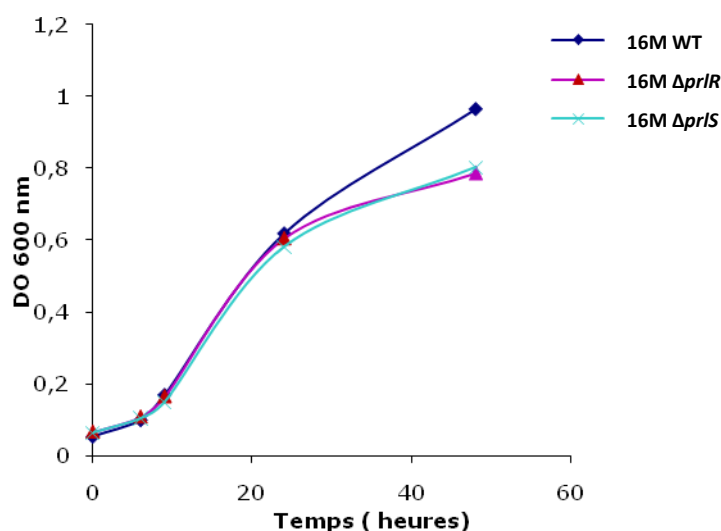


Figure 31 : Croissance de la souche sauvage 16M, des mutants 16M $\Delta prlR$ et 16M $\Delta prlS$, en 10 ml de culture 2YT NaCl 400 mM (Falcon), avec agitation à 37°C. Cette expérience a été répétée plusieurs fois. Les résultats obtenus sont similaires.

Les souches en milieu 2YT solide, ne croissent pas si elles sont cultivées avec des concentrations en NaCl supérieures à 200 mM NaCl (résultats non montrés) et aux concentrations inférieures aucune différence n'est discernable.

Le dénombrement de CFU de ces mêmes souches après 6 et 24 heures de croissance en milieu 2YT NaCl 400 mM (Falcon) (figure 32) ne permet pas de voir de différences significatives entre les souches. Mais le dénombrement de CFU à 48

heures de croissance en milieu 2YT NaCl 400 mM, on observe une différence significative entre la souche wt et $\Delta prlR$ et pas de différence entre la souche wt et la souche $\Delta prlS$.

La condition d'homoscédasticité étant remplie (test de Bartlett non-significatif), nous avons effectué une analyse ANOVA de nos données. Cette ANOVA est significative, ce qui signifie qu'au moins une moyenne est différente d'au moins une autre.

Un test de contraste (contrastes de Scheffé) a été nécessaire afin de déterminer la significativité des différences deux à deux. Ce test révèle que le dénombrement de CFU à 48 heures entre la souche wt et la souche $\Delta prlR$ est significativement différent, mais que les comparaisons wt/ $\Delta prlS$ et $\Delta prlR$ / $\Delta prlS$ sont non-significatives (résultats montres à la figure 32).

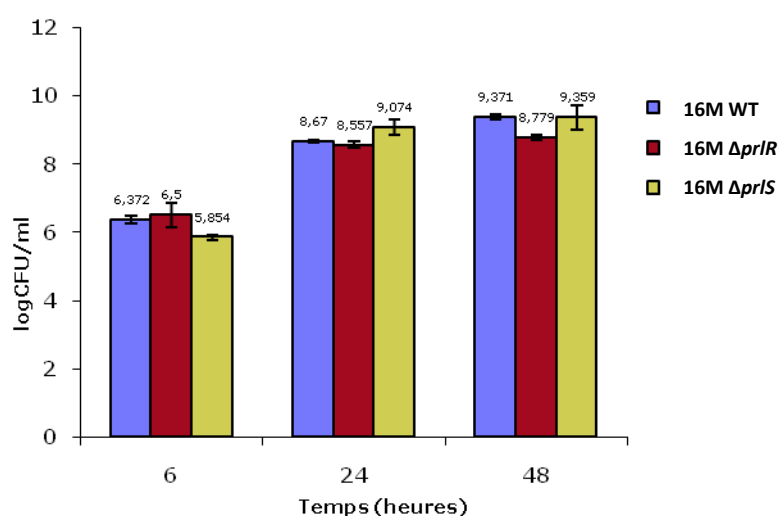


Figure 32 : Dénombrement de CFU des mutants $\Delta prlR$, $\Delta prlS$ et de la souche sauvage *B. melitensis* 16M après culture liquide en 2YT NaCl 400 mM. Les barres représentent la moyenne du log 10 du nombre des bactéries de trois clones indépendants $\pm$ l'écart-type.

Après que une différence de croissance a été constatée entre la souche wt et le mutant $\Delta prlR$ à 48 heures, nous avons néanmoins remarqué que la souche wt cultivée plus de 48 h en tube Falcon de 10 ml en 2YT 200 mM NaCl mais surtout 400 mM

NaCl produit des agrégats visibles à l'œil nu et que ces agrégats n'étaient pas présents chez les mutants.

Ce phénotype d'agrégation est le premier «vrai» phénotype facilement analysable que nous ayons observé pour les mutants *prlS*, *prlR*. Il est en tous les cas plus facile d'étudier ces phénotypes que d'analyser l'atténuation en modèle murin.

III.2.5. Les mutants *prlR* et *prlS* ne forment pas d'agrégats à forte concentration en NaCl

Dans les expériences suivantes nous avons lancé une analyse systématique de la formation des agrégats par les souches sauvages et mutantes. Nous allons en outre tester les mêmes conditions sur la souche *B. abortus* 2308 et ses mutants pour *prlS* et *prlR*.

Le choix de cette souche est justifié par le fait que l'agrégation bactérienne est souvent liée à la production d'une matrice exopolysaccharidique (Uzureau *et al.*, 2007) et que *B. abortus* 2308 diffère de *B. melitensis* par l'absence d'un locus de 25 Kpb contenant des gènes potentiellement impliqués dans la production de polysaccharides (Vizcaino *et al.*, 2001).

Les souches *B. melitensis* 16M, *B. abortus* 2308 et leurs mutants disruptants respectifs pour *prlR* et *prlS* ainsi que ces mutants complémentés ont été cultivés à 37°C en 10 ml 2YT et à différentes concentrations de NaCl (50, 100, 200, 400 mM) et sans NaCl ceci à une DO (600 nm) de départ de 0.05 en tube Falcon, voir tableau 8. Après 48 heures de culture nous avons observé la présence d'agrégats en 200 et 400 mM NaCl 2YT, chez les souches sauvages (*B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308), mais les souches mutantes *prlR* et *prlS*, ne produisent pas d'agrégats. L'intensité des agrégats est plus forte à 72 heures. En outre en apportant en trans une copie sauvage de *prlR* ou *prlS* le phénotype d'agrégation a été restauré. Cette dernière donnée indique que la différence de production d'agrégats chez les mutants *prlR* et *prlS* est bien due à l'absence de *prlS* ou *prlR*.

Tableau 8 : Le tableau résume les résultats du phénotype d'agrégation pour les souches *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308, les mutants disruptants 16M::*prlR*, 16M::*prlS*, 2308::*prlR*, 2308::*prlS*, et les mutants complémentés avec le plasmide pBBR *prlR* et pBBR *prlS* dans 2YT, 2YT sans NaCl et 2YT 50, 100, 200, 400 mM NaCl après 72 heures de culture à 37°C avec agitation. + (intensité d'agrégats) - (absence d'agrégats)

Milieu	BM 16M	16M:: <i>prlR</i>	16M:: <i>prlS</i>	16M:: <i>prlR prlR</i>	16M:: <i>prlS prlS</i>	BM2308	2308:: <i>prlR</i>	2308:: <i>prlS</i>	2308:: <i>prlR prlR</i>	2308:: <i>prlS prlS</i>
2YT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2YT 400 mM NaCl	+++	-	-	+++	+++	+++	-	-	++++	++
2YT 200 mM NaCl	++	-	-	++	++	++	+	-	+++	+
2YT 100 mM NaCl	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-
2YT 50 mM NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2YT sans Na Cl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nous avons aussi confirmé ce phénotype avec les mutants délétants. Le fait que la souche sauvage de *B. abortus* 2308 produise également des agrégats permet de dire que si ces agrégats contiennent des EPS, ceux-ci ne dépendent pas de l'activité du locus de 25 Kpb qui est absent chez *B. abortus* 2308.

Afin de confirmer ce phénotype, nous avons observé des cultures à 48 et 72 heures sur agarose pad (figure 33). Comme on peut le voir à la figure 33 la souche sauvage forme de grands agrégats dans lesquelles les bactéries semblent être enfoncées dans une matrice informe (figure 33a). Tandis que les cellules de la souche mutante 16MΔ*prlR* sont isolées (figure 33b).

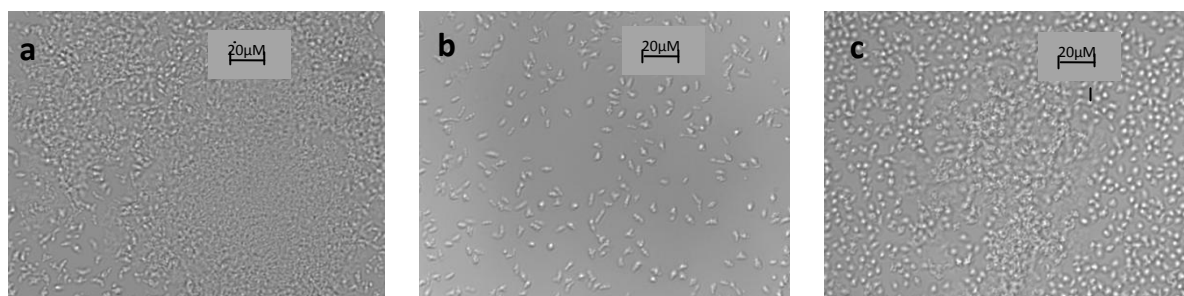


Figure 33 : a) Souche de *B. melitensis* 16M cultivée 72 heures en milieu liquide 2YT contenant 400 mM NaCl. Observation au microscope sur agarose pad. a) présence d'agrégats chez la souche sauvage. b)

les mutants 16M*prlR* ne forment pas d'agrégats mais montrent des bactéries isolées c) après complémentation des agrégats sont formés par la souche 16MΔ*prlR*pBBR*prlR*.

Notons encore que la complémentation de la souche 16MΔ*prlR* restaure la formation d'agrégats (figure 33c).

III.3. Caractérisation des agrégats

Les bactéries peuvent adhérer aux surfaces pleines et former un manteau gluant et glissant : un biofilm. Le cycle de croissance de la formation d'un biofilm, comprend diverses étapes (Costerton *et al.*, 1999), mais toujours, après l'étape initiale d'attachement qui peut ne prendre que quelques secondes pour s'activer, s'ensuit la formation de microcolonies qui regroupent des cellules bactériennes sessiles au sein d'agrégats et qui est probablement induite par les signaux environnementaux. Ces agrégats sont constitués majoritairement d'une matrice exopolysaccharidique (EPS) (Costerton *et al.*, 1999; John G, 2007).

Notons également que généralement la formation d'agrégats et de biofilm est régulée de manière inverse avec la production d'un flagelle. Ce dernier étant impliqué dans la mobilité des cellules planctoniques et inutile chez les cellules sessiles (Caiazza *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007).

III.3.1. Les agrégats contiennent de l'EPS

Afin de montrer la présence d'exopolysaccharides dans les agrégats, nous avons observé les cultures après 48 et 72 heures en 2YT 400 et 200 mM NaCl 2YT par microscopie confocale. Nous avons réalisé un marquage des agrégats en employant la lectine concanavaleine A couplée au FITC, qui est spécifique pour les résidu α-glucopyranosyl et α-D-mannopyranosyl, (Naismith and Field, 1996). S. Uzureau (2007) a montré que *Brucella* Δ*vjbR* produit un EPS riche en mannose colorable à la concanavaleine A-FITC (ConA-FITC). Pour cette coloration, outre la ConA-FITC, les bactéries fixées ont été colorées en rouge par l'iodure de propidium (IP).

Comme le démontre la figure 34A, la souche sauvage *B. melitensis* et la souche sauvage avec le plasmide vide pMR10 (figure 34B) ont produit une matrice qui s'est

colorée en vert par la ConA-FITC. Les souches mutantes 16M $\Delta prlR$ (figure 34C) et 16M $\Delta prlR$ pMR10 vide (non montré) ne sont pas capables de produire cette matrice. Par contre la souche 16M $\Delta prlR$ pMR10 $prlR$ (figure 34D) forme des agrégats. Ces résultats de coloration à la ConA-FITC démontrent que les souches sauvages et les souches mutantes complémentées peuvent produire l'EPS contenant des résidus α -D-mannopyranosyl et α -glucopyranosyl. L'EPS se présente en grande quantité dans ces souches.

Par contre la souche 16 M $\Delta prlR$ ne produit pas d'agrégats ni d'EPS détectable.

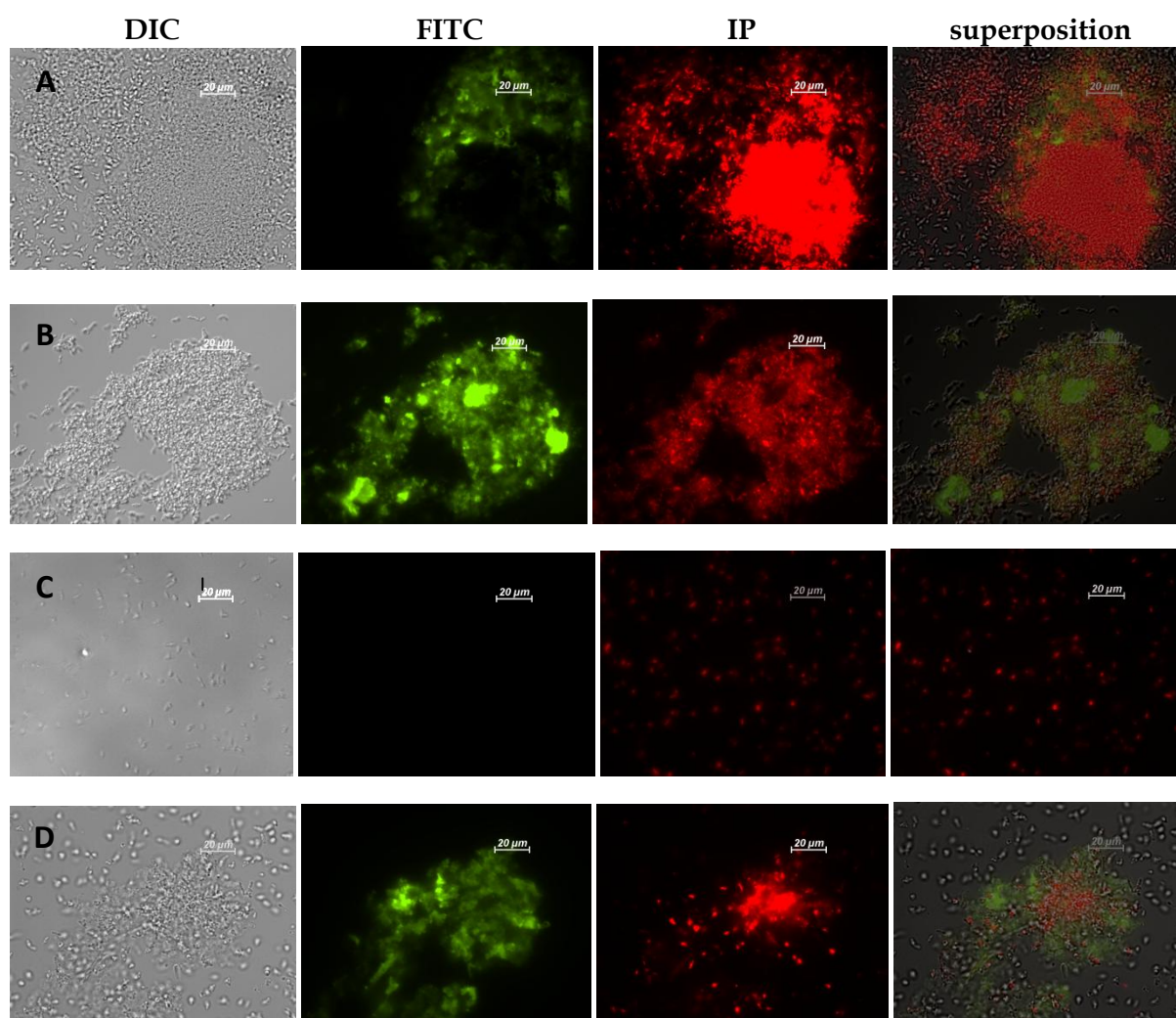


Figure 34 : Mise en évidence d'EPS(s) au sein des agrégats formés par les souches *B. melitensis* en 2YT 400 mM NaCl A) Souche wt, B) Souche wt pMR10 vide, C) souche $\Delta prlR$ et D) souche $\Delta prlR$ pMR10 $prlR$. Chaque souche a été observée en DIC (1^{re} colonne) et en microscopie à fluorescence

avec le filtre correspondant. En vert ConA-FITC (2^o colonne) on voit l'EPS, en rouge (3^o colonne), les bactéries sont colorées avec l'iodure de propidium. La dernière colonne correspond à la superposition des canaux vert et rouge.

III.3.2. Test Live Dead

Sachant que S. Uzureau et M. Godefroid (thèse) montrent des bactéries mortes au centre des agrégats, nous avons voulu étudier la viabilité des cellules bactériennes dans les agrégats formés dans nos conditions. Nous avons utilisé le kit (Live/Dead BacLight viability kits, Invitrogen). Ce kit utilise deux colorants d'acides nucléiques, le SYTO[®] 9 (fluorescence verte) et le colorant iodure de propidium (fluorescence rouge). Avec le SYTO[®] 9, les bactéries vivantes et mortes sont colorées. Par contre l'iodure de propidium pénètre seulement dans des bactéries dont les membranes sont endommagées, réduisant la fluorescence de SYTO[®] 9 quand les deux colorants sont présents. Les bactéries vivantes ayant des membranes intactes produisent une fluorescence verte, alors que les bactéries ayant des membranes endommagées produisent une fluorescence rouge (figure 35).

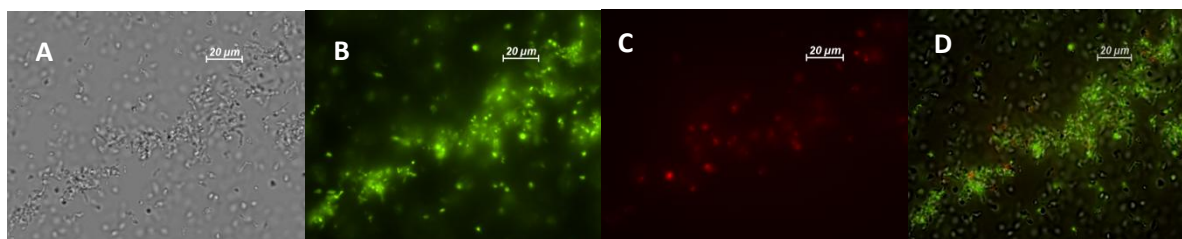


Figure 35 : Identification de bactéries vivantes à l'intérieur des agrégats formés par des souches *B. melitensis* en 400 mMNaCl 2YT. A) Agrégats formés par la souche wt, B) Bactéries vivantes colorées en vert, C) bactéries mortes colorées en rouge. D) superposition des 2 couleurs. Les souches ont été observées au microscope à fluorescence avec le filtre correspondant. En vert (Systo[®] 9), en rouge (iodure propidium).

III.4. Implication de *PrlR* dans les propriétés de surface

III. 4.1. Implication de *PrlR* dans la régulation des protéines de membrane externe (OMP)

Sur la base des phénotypes produits, il semble que le système *PrlR*/*PrlS* agisse sur la régulation de gènes impliqués dans le phénomène d'agrégation, et qu'il ait également un rôle dans l'expression de gènes impliqués dans la synthèse et l'exportation d'EPS. Nous savons par des travaux antérieurs (Uzureau *et al.*, 2007) que la production d'EPS suite aux perturbations du système QS s'accompagne de la modification de protéines impliquées dans la modification de propriétés de surface de la bactérie dont les protéines de membrane externe (OMP). Pour déterminer si le système à deux composants *PrlS*/*PrlR* agit également sur la production des OMPs, nous avons étudié par Dot bot avec des anticorps monoclonaux spécifiques pour chaque OMP, les changements d'expression des protéines de membrane externe (Omp 36, Omp 31, Omp 25, Omp19, Omp16 et Omp10) dans la souche sauvage, les mutants *prlR* et *prlS* et les souches complémentées. Le Dot blot a été effectué avec des extraits totaux de *B. melitensis* obtenus en phase stationnaire en 2YT. Les mêmes quantités de protéines de tous les échantillons ont été employées pour l'analyse de Dot blot (des dilutions ont été analysées suivant les indications de la figure 36 (les données sont représentatives de trois expériences). Dans les mutants *prlR* et *prlS* on a remarqué une légère diminution de l'abondance des Omp25 et Omp31, une forte diminution pour l'Omp36, une augmentation d'Omp19 et Omp10, aucun effet sur l'Omp16 par rapport aux résultats de la souche sauvage. Nous sommes arrivés à compléter le phénotype pour *prlR* avec le plasmide pBBR*prlR* pour les Omp 36, 10 et 19, mais pas pour les Omp 25 et Omp31. Une raison possible de cette difficulté de complémentation est que le plasmide pBBR vide provoque à lui seul chez la souche sauvage une forte diminution des OMP 25 et 31.

Il nous est difficile de tirer des conclusions avec la complémentation *prlS* puisque les effets de la mutation sur les OMPs sont faibles (à l'exception de l'effet sur OMP36).

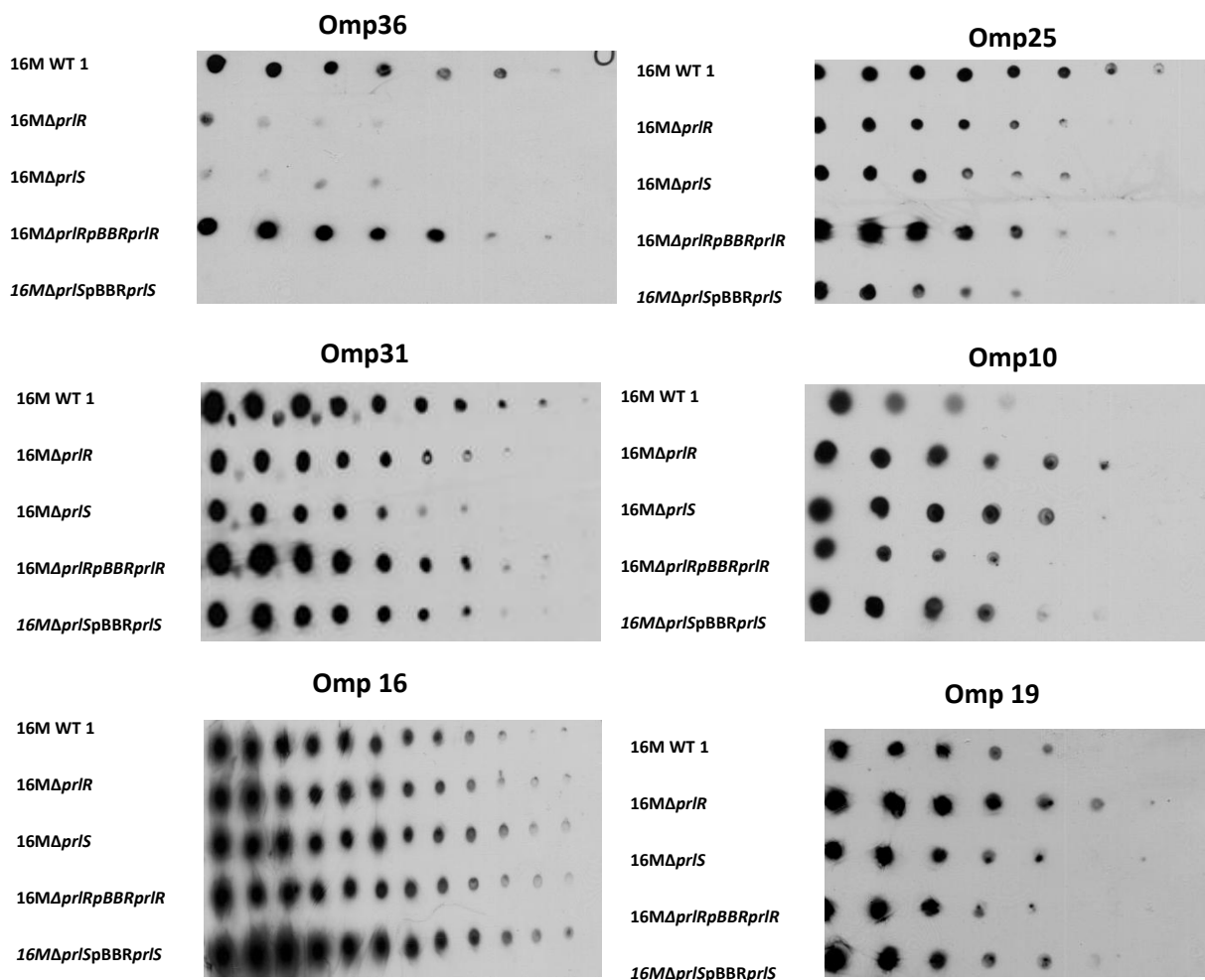


Figure 36 : Analyses de Dot blot d'OMP dans les souches *B. melitensis* et les mutants *prlR* et *prlS* et les souches complémentées.

Ces expériences suggèrent que le système *PrlS/PrlR* de *B. melitensis* affecte la production de plusieurs Omps c'est-à-dire que *PrlR* serait impliqué dans une régulation positive des Omp (36, 31 et 25) et négative sur les Omp19 et Omp10. Reste encore à déterminer si cette régulation est directe ou indirecte.

III.4.2. Autres structures de surface modifiées

Sachant que le flagelle et les systèmes de sécrétion de type IV (T4SS) sont aussi des structures de surface présentes chez *Brucella*, nous avons cherché à voir si le système *PrlR/prlS* en régulait l'expression.

La logique à priori d'analyser l'expression de ces deux systèmes dans les mutants *prlS/prlR* peut se justifier par les points suivants.

L'EPS de *Brucella* (Uzureau *et al.*, 2007) en cours de caractérisation (M. Godefroid thèse en cours) est produit lors de perturbations du système Quorum sensing (QS). Or le QS est connu pour réguler aussi les systèmes flagellaires et de sécrétion de Type IV (T4SS).

Il est souvent fait mention dans la littérature relative aux biofilms d'une régulation coordonnée (et souvent inverse) de la production d'EPS et d'expression du flagelle (Caiazza *et al.*, 2007; Hall-Stoodley and Stoodley, 2002; Watnick *et al.*, 2001).

Enfin le seul phénotype associé à une mutation d'un gène homologue à *prlS* est une atténuation de la mobilité chez *Aeromonas hydrophila* (Schmidt, 2001)(Schmidt and Pemberton; 2001)

III.4.2.1. Le flagelle

D'après les résultats obtenus au laboratoire (thèse S. Léonard, 2005) et (Fretin *et al.*, 2005) nous savons que le promoteur du gène encodant l'anneau MS (*fliF*) du corps basal du flagelle est exprimé en début de phase de croissance en milieu riche 2YT. C'est aussi dans ces conditions, aux alentours d'une DO (600 nm) de 0,2 que les protéines du coude (FlgE) et du filament (FliC) sont détectables par Western blot.

Nous avons donc suivi l'expression du promoteur *pfliF* et la production des protéines FlgE et FliC dans les mutants *prlR* et *prlS* par comparaison avec la souche sauvage *B. melitensis* 16M.

Nous avons suivi l'activité de *pfliF*, par dosage de la β -galactosidase, en utilisant le plasmide pBBR*pfliF-lacZ* construit par David Fretin, introduit dans la souche sauvage *B. melitensis* 16M et les mutants *::prlR* et *::prlS* tout au long de la courbe de croissance en 2YT à (2, 4, 6, 8, 10, 24 et 48 heures).

La figure 37 illustre que *pfliF* s'exprime bien dans les conditions décrites par Fretin (Fretin *et al.*, 2005) dans la souche sauvage mais que cette expression est plus faible pour les mutants *::prlS* et *::prlR*. Ces résultats ont été confirmés en utilisant les mutants propres $\Delta prlR$ et $\Delta prlS$ (résultats non montrés).

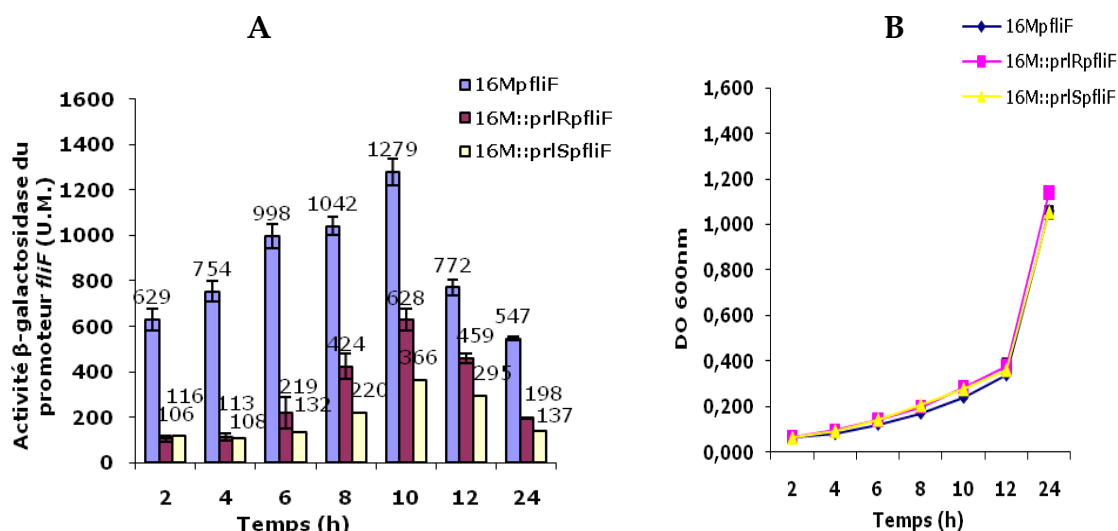


Figure 37: A) Activité du promoteur *fliF* (en unité Miller) pendant la croissance en 2YT de *B. melitensis* 16M et des mutants *prlR/prlS* grâce au plasmide pBBRCmp*fliF-lacZ*. **B)** Croissance de la souche sauvage 16Mp*fliF*, des mutants 16M::prlRp*fliF* et 16M::prlSp*fliF*, dans 20 ml de culture 2YT (Falcon), avec agitation à 37°C. Cette expérience a été répétée plusieurs fois. Les résultats obtenus sont similaires. (n=3 moyenne $\pm$ l'écart-type)

Malgré les différentes tentatives nous n'avons pas été capables de compléter ce phénotype en introduisant le gène *prlR* en trans sur un pMR10 ou pBBR ni même en réintroduisant la copie de *prlR* à son locus chromosomique.

Par ailleurs nous avons voulu voir si cet effet de PrlS/PrlR se manifestait sur des éléments structuraux plus externes de l'appareil flagellaire en suivant la production de la protéine FlgE et FliC par Western blot (WB).

La production de FlgE et FliC dans les mutants *prlR* a été analysée par Western blot, avec des polysera anti-FlgE et anti-FliC, avec des extraits totaux des bactéries récoltées après 8 heures ($DO_{600}=0.2$) de culture en 2YT. Comme contrôle négatif on a utilisé la souche $\Delta vjbR$ et la sauvage *B. melitensis* 16M à 24 heures qui ne produisent pas ou quasiment pas de FlgE et de FliC (Fretin *et al.*, 2005).

La figure 38 illustre le fait que FliC et FlgE dans les mutants ::*prlS* et ::*prlR* sont bien détectés comme dans la souche sauvage. Ces résultats ne montrent aucun effet

du système PrlS/PrlR sur la production de protéines d'extracteurs externes du flagelle comme FlgE et FliC dans les conditions testées.

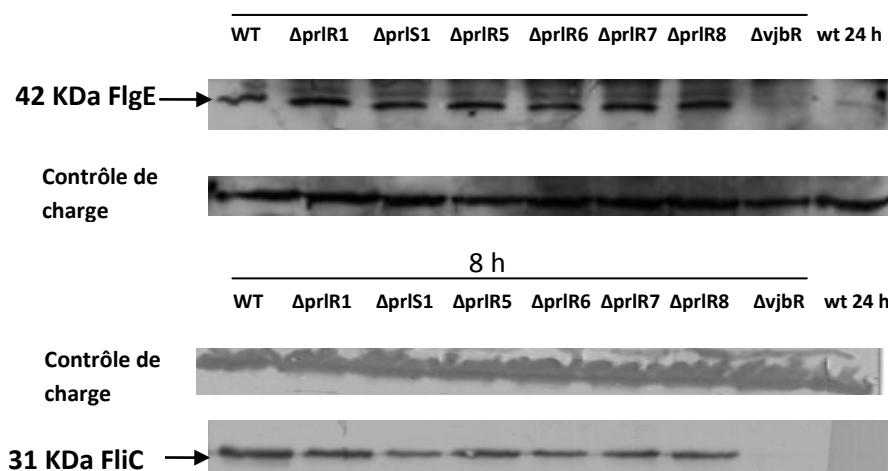


Figure 38 : Analyses d'abondance de FlgE et FliC (flageline) par Western blot dans la souche sauvage (wt), les mutants *prlR* ($\Delta prlR$ 1, $\Delta prlR$ 5, $\Delta prlR$ 6, $\Delta prlR$ 7 et $\Delta prlR$ 8), le mutant *prlS* ($\Delta prlS$ 1), le mutant $\Delta vjbR$ et la souche sauvage (wt à 24 heures de culture). Les souches ont été cultivées en 2YT. Les extraits totaux ont été prélevés à une $DO_{600} = 0.2$.

III.4.2.2. Le système de sécrétion du type 4SS (VirB)

Les systèmes de sécrétion de type IV (SST4) sont des machines de sécrétion utilisées par de nombreuses bactéries pathogènes pour libérer des molécules effectrices dans les cellules eucaryotes au cours d'une infection. (Baron *et al.*, 2002)

Le système de sécrétion type IV de *Brucella* est codé par l'opéron *VirB*. Il est composé de 12 gènes (*virB1* à *vir12*). Il est nécessaire pour la survie, la virulence et la répllication de *Brucella*, (Boschiroli *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009).

Pour rechercher une éventuelle régulation par le système PrlS/PrlR sur le système de sécrétion type IV, nous avons testé l'activité du promoteur *virB* par dosage de la β -galactosidase, dans la souche sauvage *B. melitensis* 16M et les mutants *prlR* et *prlS* contenant le plasmide pBBR*pvirB-lacZ*. Cette souche est cultivée en 2YT. Le dosage a été réalisé tout au long de la courbe de croissance (4, 24 et 48H).

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence d'activité du *pvirB* dans les deux mutants par rapport à celle de la souche sauvage (résultats non montrés)

A ce stade du travail nous savons que le système à deux composants PrlS/PrlR de *B. melitensis* est impliqué dans le contrôle de la production d'un EPS, qu'il contrôle aussi l'expression de diverses OMPs et vraisemblablement l'expression du corps flagellaire basal.

Toutes ces données associées à l'atténuation importante des mutants après 4 semaines d'infection en modèle murin, nous donne à penser que ce SDC joue un rôle important dans les capacités d'adaptation de *Brucella*.

Nous avons dès lors envisagé de faire une analyse transcriptomique globale afin de définir les gènes potentiellement ciblés par ce SDC.

A cette fin nous nous devons de connaître les conditions d'expression de SDC.

Pour ce faire nous avons d'une part entrepris de produire des Ac en vue de suivre la production de PrlR et de suivre l'expression du promoteur *prlR* dans diverses conditions. Ces deux approches sont décrites ci dessous.

III.5. Analyses de la production de PrlR et de l'expression de PrlS et PrlR chez Brucella melitensis

En vue de trouver les conditions expérimentales d'une production de PrlR nous avons procédé aux étapes suivantes: surexpression, purification de PrlR, et production d'anticorps.

III.5.1. Surexpression, purification et production d'anticorps polyclonaux

Afin de mettre en évidence la production de PrlR par Western blotting, nous avons produit des anticorps polyclonaux contre PrlR.

III .5.1.1. Surproduction et la purification de la protéine PrlR

III.5.1.1.1. Surproduction de la protéine PrlR chez E. coli

La souche *E. coli* BL21 (DE3) a été transformée avec le vecteur pET15b*prlR* contenant un tag-His₆ en N-terminal d'une masse de 2 kDa. Les *E. coli* recombinantes ont été induits avec 1 mM d'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) afin d'induire la

production de l'ARN polymérase du bactériophage T7 dans la souche BL21 (DE3) et donc la surproduction de la protéine recombinante d'intérêt (voir partie VI.10 Matériel et Méthodes et 1.2.5.3 de Annexe I).

Après l'induction avec l'IPTG pendant 4 heures de culture des *E. coli* contenant le plasmide pET15bprlR, les extraits cellulaires totaux sont analysés par SDS-PAGE, suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. Après induction les clones testés surexpriment une protéine de taille proche de 28 kDa (figure 39). Normalement on devrait, s'attendre à une taille approximative pour la protéine recombinante His₆-PrIR de 25 kDa (23+2 kDa).

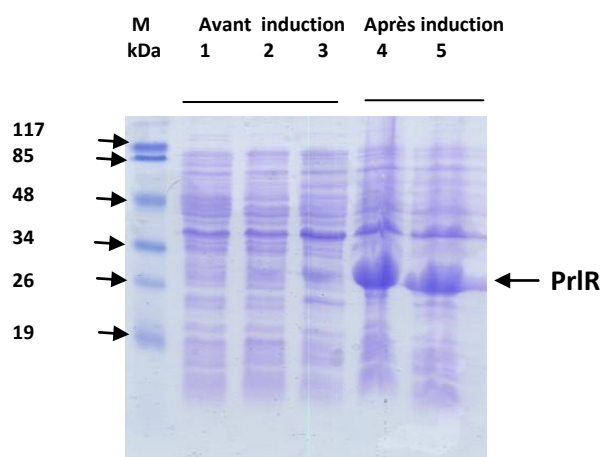


Figure 39 : A : Analyse par SDS-PAGE, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie d'extraits totaux de la souche BL21(DE3) contenant le plasmide pET15bprlR, avant et après induction: les pistes 1,2,3 montrent 3 clones avant l'induction, les pistes 4 et 5 montrent les 2 premiers clones après 4 heures d'induction avec l'IPTG.

III.5.1.1.2. Purification et renaturation de la protéine His₆-PrIR.

La purification de la protéine a été réalisée sur une résine (Resin sepharose High performance GE Helthcare) chargée aux ions nickel. Etant donné que la majorité de PrIR était retrouvée dans la phase insoluble (c'est-à-dire, en corps d'inclusions), nous avons procédé à la purification en conditions dénaturantes dans une solution d'urée 8 M. La protéine His₆-PrIR a été encore localisée dans la phase insoluble. Finalement nous sommes arrivés à la solubiliser en présence de guanidine 6M (non montré).

Après la purification, la protéine His₆-PrIR recombinante a été renaturée par dialyse contre du tampon TRIS 20 mM et 500 mM NaCl, et a ensuite été reconcentrée par ultra centrifugation sur membrane Amicon Ultra15 de Millipore et sa concentration évaluée par la méthode BCA (acide bicinchoninique Sigma). La protéine purifiée a été visualisée par bleu de Coomassie et nitrate d'argent voir figure 40. Aucun contaminant n'est discernable même après coloration à l'argent.

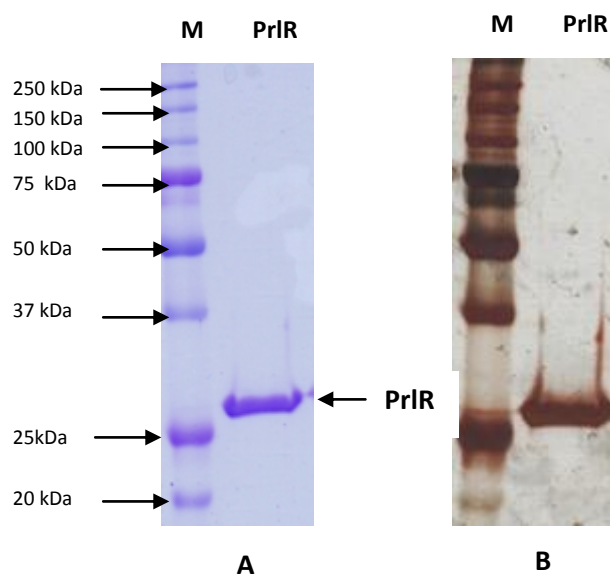


Figure 40 : Analyse par SDS-PAGE, de la protéine PrIR recombinante purifiée, renaturée après la dialyse contre le tampon NaCl 0,5 M et TRIS HCl 20 mM et concentrée par centrifugation **A**). Coloration au bleu de Coomassie **B**) Coloration au nitrate d'argent.

III.5.1.2. Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine PrIR purifiée

A ce stade nous avons immunisé deux lapins avec la protéine PrIR purifiée afin d'obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre PrIR de *Brucella*. Après immunisation, la réponse sérologique du lapin contre PrIR a été analysée en ELISA, (figure 41). Après les 3 immunisations, le sérum des deux lapins présente un titre en anticorps anti PrIR supérieur à 100.000. Le sérum du lapin 1 avant immunisation reste à des valeurs de DO au niveau basal, ce qui atteste de l'efficacité et la spécificité de l'immunisation.

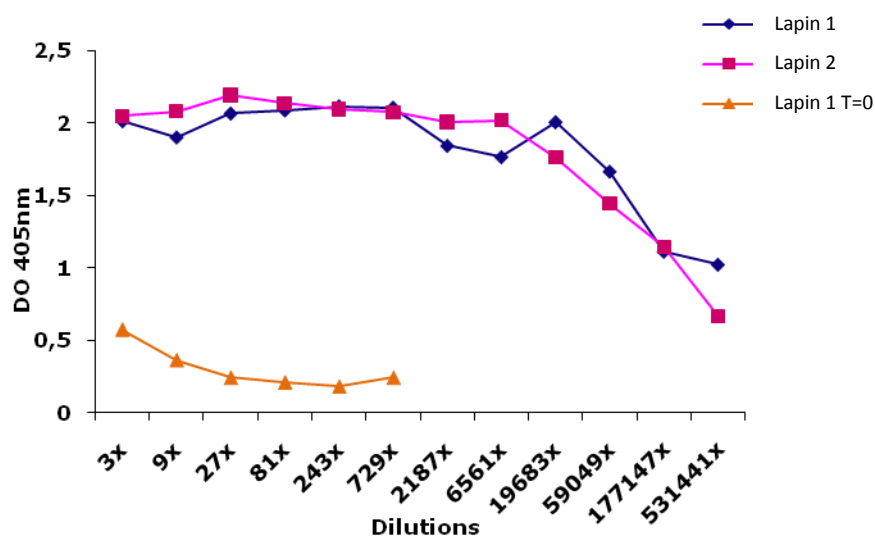


Figure 41 : Analyses de sérum des lapins avant et après immunisation avec la protéine PrlR purifiée par ELISA.

Le sérum a ensuite été testé en WB sur un extrait d'*E. coli* recombinant exprimant la protéine PrlR ainsi que sur la protéine purifiée. La figure 42 montre que dans les deux cas une bande majoritaire aux environs de 28 kDa correspondant à la protéine de fusion His₆-PrlR est détectée. Notons également une bande aux environs de 56 kDa, qui correspond probablement à la forme dimérique et une bande aux environs de 19 kDa qui pourrait correspondre à la protéine dégradée. Malgré la charge en protéines sur ce gel peu de bandes contaminantes sont détectées ce qui confirme le degré de pureté de l'Ag immunisant (figure 42).

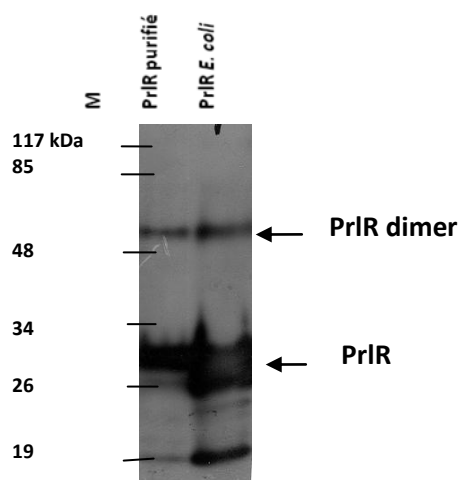


Figure 42 : Western blot anti-PrlR de protéine recombinante His₆-PrlR purifiée et sur un extrait de *E. coli* exprimant PrlR.

Le même sérum a ensuite été testé en WB sur des extraits de *B. melitensis* wt, et sur la souche wt portant un pBBR vide ou un pBBR $prlR$ -flag (figure 43). Dans les trois cas on détecte PrlR à la taille attendue de 23 kDa. La protéine est donc produite en quantité détectable en condition normale chez *B. melitensis*. Pour la souche surexprimant $prlR$ -Flag on détecte en outre une bande aux environs de 26 kDa. Dans les extraits de *Brucella* aucune forme polymérique de PrlR n'est détectée.

L'anticorps polyclonaux anti-PrlR que nous avons obtenu est très spécifique et nous a permis de valider l'expression de cette protéine lors de nos tests de complémentation.

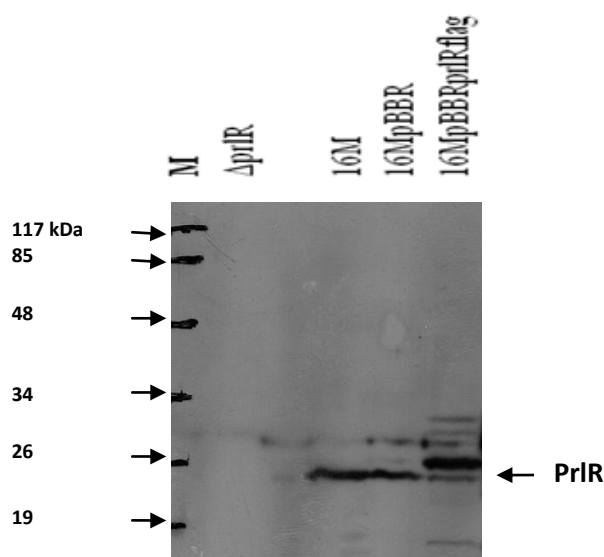


Figure 43 : Western blot anti-PrlR réalisé sur des extraits totaux de *B. melitensis* 16M, La souche sauvage portant le pBBR vide, la souche sauvage pBBR $prlR$ -flag. Comme contrôle négatif nous avons utilisé la souche $\Delta prlR$.

III.5.2. Expression de $prlR$ au niveau ARNm et protéique

Afin de pouvoir suivre l'expression de la protéine PrlR, nous avons testé l'expression de $prlR$ en fonction de la densité de population. L'effet de la densité de population a été testé en prélevant des échantillons à différentes phases d'une culture bactérienne réalisée à 37°C en milieu riche 2YT. Nous avons prélevé des échantillons de cultures bactériennes à DO_{600} de 0.1, 0.2 et 1 pour être analysés en Western blot. Les résultats sont présentés à la figure 44.

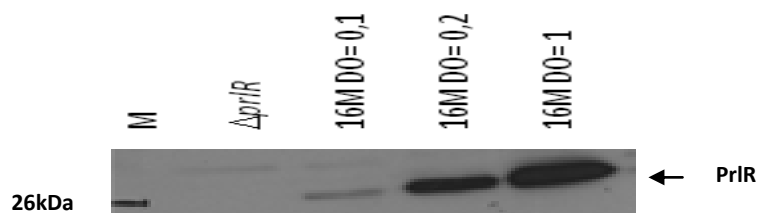


Figure 44 : Expression de PrlR en fonction de la courbe de croissance suivie en Western blot. Une culture de *B. melitensis* a étéensemencée à une DO_{600} de 0.05. Des échantillons ont été prélevés après 6 heures à un $DO=0,1$, après 12h à une $DO= 0,2$ et après 24h à une $DO=1$. Les échantillons ont été ensuite concentrés à une DO de 10.

Nous avons également testé l'expression de *prlR* à une DO de 1 en 2YT et 2YT 400 mM NaCl. En 2YT 400 mM on a détecté une expression plus forte de la protéine PrlR (voir figure 45). Ce résultat renforce l'hypothèse que *prlR* puisse être impliqué dans une adaptation à des conditions hyperosmotiques. Rappelons que dans ces conditions la souche wt produit de l'EPS mais que les mutants du SDC en sont incapables (voir figure 34).

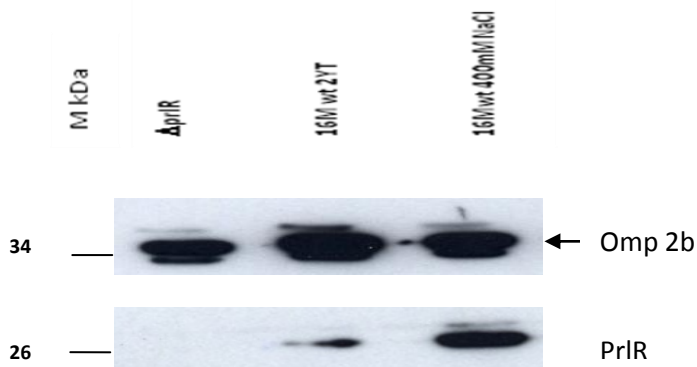


Figure 45 : Expression de PrlR en fonction de la courbe de croissance en 2YT et 2YT 400 mM NaCl suivie en Western blot. Une culture de *B. melitensis* a étéensemencée à une DO_{600} de 0,05. Des échantillons ont été prélevés après 24 heures à une $DO_{600}=1$. Les échantillons ont été ensuite concentrés à une DO de 10.

III.5.2.1. Activité des promoteurs de *prlR* et *prlS* in vitro

Afin de pouvoir suivre l'activité des promoteurs des gènes codant PrlR et PrlS le long d'une courbe de croissance, nous avons construit les plasmides pBBRpprlR-lacZ et pBBRpprlS-lacZ dans lequel le promoteur (500 pb en amont de gène) de *prlR* ou *prlS* a

été cloné en amont du rapporteur *lacZ* encodant la β -galactosidase. Ces plasmides ont été introduits chez *B. melitensis* 16M sauvage et les mutants 16M Δ *prlR* ou 16M Δ *prlS*, et nous avons analysé l'activité du promoteur soit de *prlR*, soit de *prlS* en mesurant l'activité enzymatique de la β -galactosidase à différents temps de culture en 2YT.

L'examen de la figure 46 montre que chez la souche wt l'expression de *pprlR* (figure 46A) et de *pprlS* (figure 46B) suivent globalement le même pattern au cours du temps.

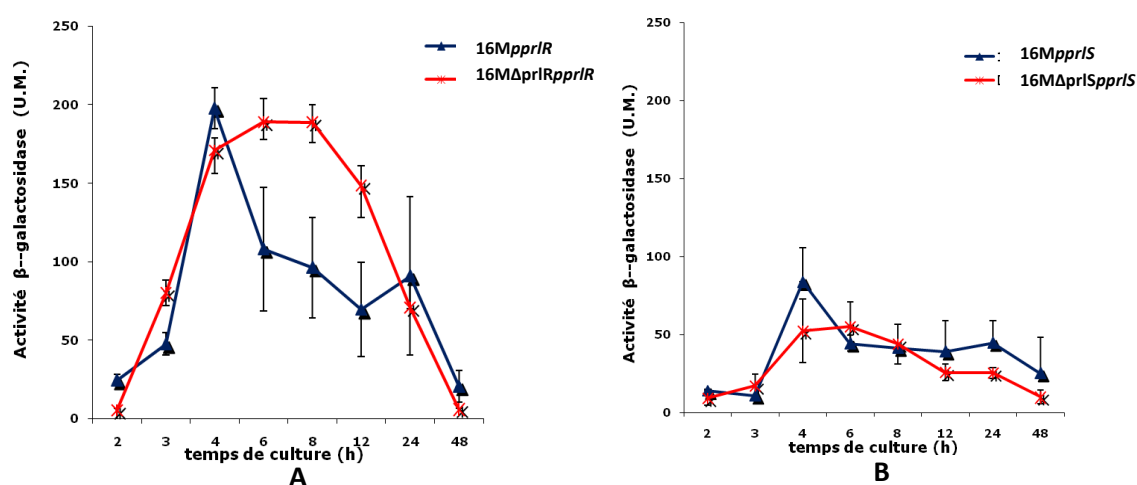


Figure 46 : Activité du promoteur de *prlR* et *prlS* (en unité Miller) pendant la croissance in vitro de *B. melitensis* en milieu riche 2YT. **A)** L'activité du promoteur de *prlR* est suivie à l'aide du plasmide pBBrrprlR-lacZ après transformation dans la souche sauvage (en jaune) et dans le mutant Δ *prlR* (en violet), par mesure de l'activité β -galactosidase sous forme d'unités Miller **B)** L'activité du promoteur *prlS*. (n=3 moyenne $\pm$ l'écart-type).

Un pic d'activité vers 4 h de culture suivie d'une stabilisation à un niveau moyen d'activité entre 6 et 24 heures pour finalement retourner vers la valeur initiale en fin de culture.

La mutation de *prlR* à peu d'effet sur le pic d'induction de son promoteur, par contre l'activité reste plus élevée entre 4 et 12 h avant de décroître au même rythme que chez la souche sauvage.

La mutation de *prlS* (figure 46B) ne montre pas d'effet significatif sur l'activité β -galactosidase de *prlS* par rapport à la sauvage et ce quel que soit le temps.

Pour la préparation de l'ARN en vue de l'analyse transcriptomique nous utiliserons la phase de croissance montrant un pic d'expression soit entre 4 et 6 heures (voir figure 46A)

III.5.2.2. Expression du promoteur de *prlR* in vivo

III.5.2.2.1. Le promoteur de *prlR* est actif au cours du cycle infectieux

Nous avons cloné le promoteur *prlR*, dans le plasmide pBBR en amont du gène rapporteur *gfp*. Des macrophages SV40 ont été infectés avec des *Brucella* transformées par ce plasmide pBBR*prlR-gfp*. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde 4% à différents temps après inoculation (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 et 48 h) et le lipopolysaccharide bactérien détecté par des anticorps anti-LPS (marqué aux l'Alexa 568- red). Ces cellules sont ensuite montées sur lame avec du mowiol.

L'observation des préparations au microscope à fluorescence révèle que la souche qui porte le promoteur de *prlR* est actif et produit de la GFP à l'intérieur des macrophages SV40 et ceci à tous les temps post-inoculation (voir figure 47 B, C, D) (expériences réalisées avec la collaboration de Christian Didembourg). En revanche, la souche qui porte le plasmide pBBR1-*gfp* (où la *gfp* n'a pas de promoteur) n'exprime pas la GFP (figure 47A) et est utilisée comme contrôle négatif.

Malgré l'absence d'atténuation du mutant *prlR* en modèle cellulaire on constate que le promoteur de ce gène est actif en intracellulaire. Remarquons que sur milieu 2YT les *B. melitensis* portant le plasmide pBBR*prlR-gfp* sont déjà fluorescentes (non montré).

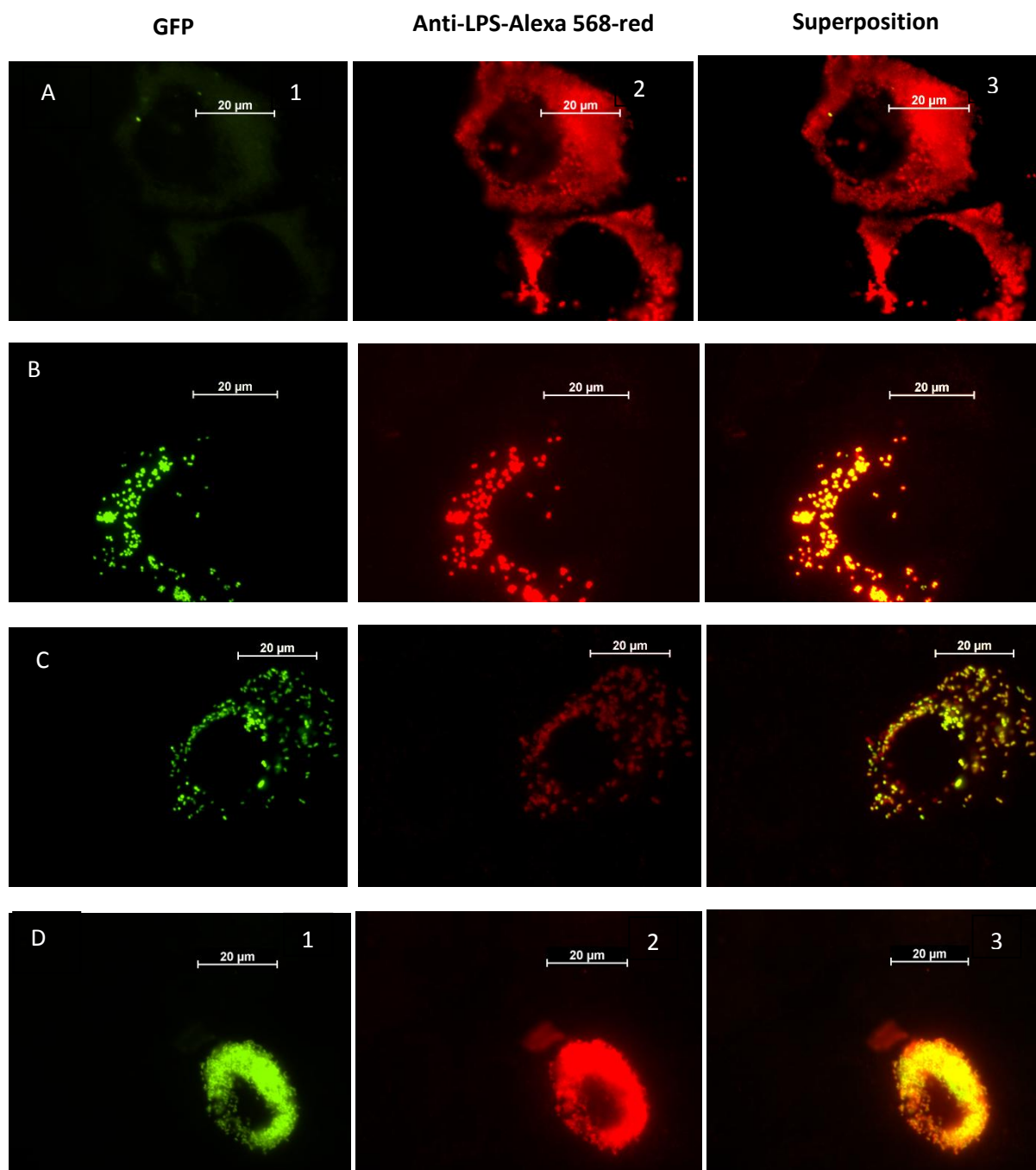


Figure 47 : Analyse de l'expression de GFP en macrophage SV40 par microscopie (bar ~ 20 µm. A) Résultats obtenus pour la souche *Brucella melitensis* contenant le plasmide pBBR-*gfp* à 48h post infection. B, C et D infection de macrophages SV40 avec *B. melitensis* pBBRpprIR-*gfp* après 10, 24 et 48h d'infection respectivement.

III.6. Analyses transcriptomiques du mutant prlR chez Brucella melitensis

Les gènes régulés par PrlR chez *Brucella* ne sont pas connus. Nos résultats laissent à penser que PrlR est un régulateur « global ». Afin d'obtenir une image à l'échelle du génome de la régulation qui nous permettra de connaître l'ensemble de cibles directes et indirectes potentiellement régulées transcriptionnellement par ce régulateur (PrlR), nous avons décidé d'employer la transcriptomique. Cette technologie a été appliquée sur l'ARN total extrait des souches sauvages et $\Delta prlR$ de *Brucella melitensis* à une DO_{600} de 0.2, puisque on a constaté dans nos résultats d'expression que *prlR* s'exprime au début de la phase de croissance.

Trois échantillons indépendants de chaque souche ont été utilisés.

III.6.1. Analyses transcriptomiques

Brièvement, la technique d'analyse transcriptionnelle par puce à ADN consiste à extraire l'ARN total d'une souche bactérienne, à générer à partir des ARN messagers de l'ADN complémentaire marqué avec un fluorochrome et à hybrider cet ADN complémentaire sur une plaque de verre contenant l'ensemble des séquences codantes sous forme de spots. L'intensité de fluorescence de chaque spot indique alors l'abondance des ARNm pour chacun des gènes. La création des puces à ADN et les étapes de transcription reverse, de marquage, d'hybridation et de lecture ont été effectuées par la firme NimbleGen™ Systems, INC.

Le patron d'expression de souche $\Delta prlR$ a été comparé aux profils produits pour la souche wt (le traitement des données a été effectué par le laboratoire de biologie quantitative, Eric Depiereux, URBM, Facultés Notre Dame de la Paix).

Sur base des résultats statistiques fournis, nous avons défini, en nous basant sur les publications récentes, les critères de sélection afin de déterminer les cibles régulées: un test ANOVA2 avec un $P \text{ value} \leq 1 \times 10^{-4}$ et le ratio $ARN \Delta prlR / ARN wt > 1,50$ pour ne pas avoir trop de cibles.

III.6.2. Généralités

Dans cette analyse nous avons déterminé que PrlR régule potentiellement l'expression de 205 gènes, démontrant que 6.41 % du génome est directement ou indirectement régulé par PrlR (tableau 9). Cette observation confirme un rôle global de PrlR dans la régulation génique chez *B. melitensis*.

III.6.2.1. Distribution chromosomique

L'analyse de la distribution de gènes cibles de PrlR sur les deux chromosomes du *B. melitensis* pour les données de microarrays montrent que 60,98% des cibles (125 gènes) se trouvent dans le chromosome II et 39.02% des cibles (80 gènes) dans le chromosome I. PrlR se comporte comme un régulateur de type répresseur pour 59.02% de ses cibles (121 ORF sont réprimés) et comme un régulateur de type activateur pour 40.98% de ses cibles (84 ORF sont activés) voir tableau 9.

III.6.2.2. Localisations prédites des cibles de PrlR

L'objectif de cette analyse est de voir si nous pouvons identifier un biais de localisation (prédite) de cibles de PrlR par rapport à la localisation (prédite) de toutes les ORFs du génome.

Le tableau 10 montre que parmi les cibles de PrlR il y a un peu moins de protéines cytoplasmiques (27.94%) et un peu plus de protéines de membrane cytoplasmique (24%) que ce que l'on trouve comme répartition dans le génome entier (37 et 18% respectivement).

Néanmoins l'élément le plus marquant est l'appauvrissement très net dans les cibles de PrlR de protéines de membrane externe (1.47% contre 19.72% dans le génome) et l'enrichissement de protéines périplasmiques (7,84% contre 2.73% dans le génome).

Tableau 9 : Identification de cibles de PrIR par des analyses transcriptomiques.

Fonction cellulaire	Locus Tag	Protéine	Rapport $\Delta prIR/WT$	P value annova
Class I: Réprimé par PrIR				
Biogénèses d'enveloppe et de la paroi	BMEI0133	Diaminopimelate epimerase	1,57	1,23E-04
	BMEI0577	UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase	1,55	1,83E-04
	BMEI1302	Soluble lytic murein transglycosylase	1,97	3,45E-05
	BMEI1548	Spore-cortex-lytic enzyme prepeptide precursor	1,54	5,57E-05
	BMEI1597	Murein hydrolase exporter	2,79	2,12E-06
	BMEI0472	Membrane fusion protein MtrC	1,74	1,31E-04
	BMEI0782	Lysozyme M1 precursor	1,64	1,49E-05
	BMEI1101	Bactoprenol glucosyl transferase / bactoprenol apolipoprotein N-acyltransferase	1,66	3,90E-05
Chaperonne/ folding, sorting et dégradation	BMEI0087	Thiol:disulfide interchange protein TlpA	2,00	1,06E-06
	BMEI0123	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,54	3,47E-05
Cycle de division cellulaire	BMEI1596	LrgB protein	2,38	2,35E-06
	BMEI0470	Integral membrane protein	1,59	1,93E-07
Hypothétique	BMEI0030	Hypothetical cytosolic protein	1,61	9,72E-06
	BMEI0055	Hypothetical protein	1,66	2,68E-07
	BMEI0078	Hypothetical protein	1,51	2,51E-06
	BMEI0366	Hypothetical protein	1,64	9,68E-05
	BMEI0906	Hypothetical protein	1,65	1,79E-08
	BMEI1215	Hypothetical membrane spanning protein	1,74	3,01E-08
	BMEI1312	Hypothetical membrane spanning protein	2,02	1,63E-04
	BMEI1800	Hypothetical cytosolic protein	1,71	9,48E-05
	BMEI0006	Hypothetical protein	1,73	1,03E-05
	BMEI0010	Hypothetical membrane associated protein	2,08	1,36E-06
	BMEI0044	Hypothetical protein	1,58	1,00E-04
	BMEI0153	Hypothetical protein	1,81	1,75E-05
	BMEI0171	Hypothetical cytosolic protein	2,57	5,44E-06
	BMEI0172	Hypothetical protein	2,06	3,05E-07
	BMEI0173	Hypothetical protein	2,14	5,92E-08
	BMEI0174	Hypothetical protein	1,90	1,17E-04
	BMEI0293	Hypothetical protein	1,82	1,02E-07
	BMEI0609	Hypothetical protein	1,52	1,86E-05
	BMEI0680	Hypothetical protein	1,56	1,83E-05
	BMEI1013	Hypothetical cytosolic protein	2,09	1,69E-05
	BMEI1083	Hypothetical protein	1,74	2,75E-05
	BMEI1106	Hypothetical protein	2,07	3,39E-06
	BMEI1111	Hypothetical protein	2,14	2,34E-05
Métabolisme d'acides aminés	BMEI0522	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	1,97	1,11E-04
	BMEI0526	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	1,57	8,05E-05
	BMEI0979	Glutaminé synthetase	1,76	7,47E-07
	BMEI1039	Cysteine desulphydrase / selenocysteine lyase	1,54	2,78E-05
	BMEI1261	Leucine aminopeptidase	1,52	3,71E-05
	BMEI1650	Uréase accessory protein UreF	2,49	9,21E-06
	BMEI1651	Uréase accessory protein UreE	2,74	1,04E-05
	BMEI1652	Uréase alpha subunit	1,96	8,50E-07
	BMEI1655	Uréase accessory protein UreD	1,82	1,00E-07
	BMEI0528	Glutamate-cysteine ligase	1,80	4,82E-10
	BMEI0560	Glycine cleavage system H protein	1,69	5,35E-07
	BMEI0561	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	1,85	9,14E-08
Métabolisme de carbohydrates	BMEI1095	L-fucose phosphate aldolase	1,92	1,63E-04
Métabolisme central	BMEI0424	Ribose 5-phosphate isomerase	1,93	9,65E-09
	BMEI0425	Triosephosphate isomerase	1,96	2,59E-06
	BMEI0140	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	1,87	1,67E-04
Métabolisme de cofacteurs et de vitaminés	BMEI0197	Lysostaphin (protéolyse metalloendopeptidase)	1,51	1,80E-04
Métabolisme de lipides	BMEI1212	Phosphatidylglycerophosphatase B	1,76	1,39E-06
	BMEI1235	Short-chain dehydrogenase	2,25	1,17E-06
	BMEI1252	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	1,53	1,84E-04
Métabolisme de nucléotides	BMEI0669	Dihydroorotase	1,52	7,36E-05
Métabolisme de carbohydrates	BMEI1255	Glycoprotein/polysaccharide metabolism	1,92	6,88E-06
	BMEI1394	Mannose-6-phosphate isomerase	1,66	3,16E-05
	BMEI0428	D-erythrulose 4-phosphate dehydrogenase	2,60	1,60E-09
	BMEI0429	Erythritol-4-phosphate dehydrogenase	2,72	9,24E-08
	BMEI0430	Erythritol kinase	1,84	5,12E-08
	BMEI1032	Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase	1,79	6,36E-05
	BMEI1092	Hydroxypyruvate isomerase	1,91	4,93E-05

Fonction cellulaire	Locus Tag	Protéine	Rapport $\Delta prlR/WT$	P value annova
Mobilité cellulaire	BMEI0151	Flagellar M-ring protein FliF	3,27	1,33E-10
	BMEI0152	Flagellar M-ring protein FliF	2,47	1,21E-09
	BMEI0159	Flagellar hook protein FlgE	1,65	8,39E-06
	BMEI0160	Flagellar hook-associated protein 1	2,32	2,20E-08
	BMEI0161	Flagellar hook-associated protein 3	1,95	8,12E-06
	BMEI0162	FlaF protein	2,01	1,44E-04
	BMEI0163	FliB protein	2,15	1,46E-04
	BMEI0165	Flagellar biosynthetic protein FliQ	2,16	6,78E-06
	BMEI0166	Flagellar biosynthetic protein FliH	2,32	2,60E-05
	BMEI0170	Flagellar protein FlgJ	3,05	4,08E-09
	BMEI1080	Flagellar biosynthetic protein FliP	1,72	9,69E-05
	BMEI1082	Flagellar I-ring protein FlgH	1,94	3,61E-05
	BMEI1084	Flagellar p-ring protein FlgI	2,21	4,90E-06
	BMEI1085	Flagella basal body p ring formation protein FlgA	2,36	1,69E-06
	BMEI1086	Flagellar basal-body rod protein FlgG	2,32	3,98E-08
	BMEI1087	Flagellar hook-basal body complex protein FliE	2,36	2,03E-07
	BMEI1088	Flagellar basal-body rod protein FlgC	2,97	3,67E-11
	BMEI1089	Flagellar basal-body rod protein FlgB	2,33	2,16E-06
	BMEI1107	Flagellar basal-body rod protein FlgF	2,45	1,23E-07
	BMEI1108	Flagellar basal-body rod protein FlgF	2,12	4,45E-07
	BMEI1109	Chemotaxis motA protein	2,16	4,17E-07
	BMEI1110	Flagellar motor switch protein FliM	2,22	1,68E-06
	BMEI1112	Flagellar motor switch protein FliN	1,98	2,55E-05
Non assigné	BMEI0040	Integrase/recombinase XerD	1,56	7,57E-06
	BMEI0196	Motif ErfK/SrfK	1,88	5,30E-05
	BMEI0420	Oxidoreductase	1,61	2,94E-05
	BMEI0504	Extensin-like protein	1,50	4,20E-05
	BMEI0985	PhnP protein (lactamase)	1,57	9,95E-05
	BMEI0007	Rhodanese-related sulfurtransferases	1,73	9,10E-08
	BMEI0578	AhpD	1,86	1,25E-04
	BMEI0681	Virulence protein	2,09	2,77E-10
	BMEI0682	Oxacillin resistance-associated protein FmtC	2,24	5,70E-11
Production d'énergie	BMEI1320	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase precursor	1,66	3,81E-06
Traduction	BMEI0242	Leucyl-tRNA synthetase	1,59	9,37E-10
	BMEI0428	TRNA(5-methylaminomethyl-2-thiouridylyl) -methyltransferase	1,70	8,60E-05
	BMEI1867	Florfenicol resistance protein	1,65	9,74E-05
	BMEI0890	16s ribosomal rna m(5)C 967 methyltransferase	1,53	1,90E-06
	BMEI1055	Histidyl-tRNA synthetase	1,54	9,43E-06
Transcription/régulation	BMEI0218	Transcriptional regulatory protein, LysR family	1,55	2,61E-05
	BMEI1094	Exopolysaccharide production negative regulator precursor	1,78	8,19E-05
	BMEI1453	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 2 (EAL)	1,78	9,28E-07
	BMEI1913	Transcriptional regulatory protein, LysR family	2,22	1,06E-07
	BMEI0419	GTP-binding protein tya/BipA	1,54	3,14E-05
	BMEI0427	Eri operon repressor (DeoR family)	1,95	1,37E-07
	BMEI0436	Transcriptional regulator, DeoR family	2,06	1,68E-05
	BMEI0648	Transcriptional regulator, AraC family	1,53	1,16E-06
	BMEI1014	Two component response regulator	1,53	8,92E-10
Transport de membrane	BMEI0088	Emg2 protein	1,90	1,65E-09
	BMEI0622	KUP system potassium uptake protein	1,56	7,89E-07
	BMEI0717	22 kda outer membrane protein precursor	1,71	3,25E-05
	BMEI0869	Trk system potassium uptake protein TrkA	1,51	1,73E-09
	BMEI1138	Lipoprotein releasing system atp-binding protein LolD	2,14	6,86E-08
	BMEI1139	Lipoprotein releasing system transmembrane protein LolE	1,54	6,13E-07
	BMEI0005	Molybdate-binding périplasmique protein	1,64	1,71E-07
	BMEI0432	Ribose transport atp-binding protein RbsA	2,10	7,15E-05
	BMEI0433	Ribose transport system permease protein CbsC	2,32	3,20E-05
	BMEI0435	D-ribose-binding périplasmique protein precursor	1,85	1,87E-04
	BMEI1034	Glutathione-regulated potassium-efflux system protein	1,57	8,02E-07
Class II: Activé par PrlR				
Chaperonne/ folding, sorting et dégradation	BMEI0932	Glutaredoxin	0,56	6,80E-05
	BMEI1047	10 kda chaperonin GroES	0,21	1,22E-07
	BMEI1048	60 kda chaperonin GroEL	0,28	1,50E-06
Hypothétique	BMEI0057	Hypothetical membrane spanning protein	0,43	4,98E-06
	BMEI0180	Hypothetical cytosolic protein	0,62	1,94E-05
	BMEI0692	Hypothetical protein	0,57	1,65E-05
	BMEI1006	Hypothetical cytosolic protein	0,61	3,29E-06
	BMEI1523	Hypothetical protein	0,47	4,16E-05
	BMEI1572	Hypothetical membrane spanning protein	0,57	2,45E-05
	BMEI1998	Hypothetical cytosolic protein	0,63	4,15E-07
	BMEI0237	Hypothetical protein	0,35	4,17E-07
	BMEI0855	Hypothetical protein	0,41	1,80E-05

RÉSULTATS

Fonction cellulaire	Locus Tag	Protéine	Rapport $\Delta pR/IWT$	P value annova
	BMEI0856	Hypothetical protein	0,27	1,07E-06
	BMEI0905	Hypothetical protein	0,63	6,83E-06
	BMEI0984	Hypothetical protein	0,62	4,58E-05
	BMEI0993	Hypothetical protein	0,66	1,32E-05
Métabolisme central	BMEI0238	Acetyl-coenzyme a synthetase	0,46	3,62E-07
	BMEI1466	Cytochrome C oxidase polypeptide II	0,65	2,50E-06
	BMEI0324	NAD(P) transhydrogenase subunit Alpha	0,66	1,86E-05
	BMEI0815	Acetyl-coenzyme a synthetase	0,48	6,17E-07
Métabolisme d'acides aminés	BMEI0688	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	0,66	3,05E-06
	BMEI1643	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase	0,64	1,53E-04
	BMEI1757	Omega-amino acid-pyruvate aminotransferase	0,60	1,51E-05
	BMEI0748	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	0,43	8,36E-06
	BMEI0862	Dihydrodipicolinate synthase	0,64	1,94E-04
Métabolisme de lipides	BMEI0283	Toluenesulfonate zinc-independent alcohol dehydrogenase	0,53	2,58E-05
	BMEI0817	Acetyl-CoA acetyltransferase	0,49	8,79E-06
Métabolisme de nucléotides	BMEI0296	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	0,66	5,99E-07
	BMEI1639	Dihydropyrimidine dehydrogenase (NADP+)	0,44	3,56E-07
Métabolisme de carbohydrates	BMEI0474	Mannonate dehydratase	0,51	2,92E-08
	BMEI0857	N-acetylmannosaminé-6-phosphate 2-epimerase / N-acetylmannosaminé kinase	0,35	5,51E-06
Non assigné	BMEI0839	Come operon protein 3	0,58	5,77E-05
	BMEI1945	Probable enoyl-CoA hydratase	0,59	3,08E-05
	BMEI0141	Aldehyde dehydrogenase	0,55	1,88E-04
	BMEI0238	HdeD protein	0,57	1,12E-04
	BMEI0282	Aldehyde dehydrogenase	0,52	1,83E-04
	BMEI0339	Alcohol dehydrogenase (acceptor)	0,40	5,86E-05
	BMEI0415	Lactoylglutathione lyase	0,65	4,58E-05
	BMEI0540	Putative regulator of purine biosynthesis	0,52	1,39E-07
	BMEI0751	Oxidoreductase	0,57	2,72E-06
	BMEI0865	1-carboxy-3-chloro-3,4-dihydroxycyclo hexa-1,5-diene dehydrogenase	0,49	1,38E-04
	BMEI0906	Protein HdeA precursor	0,59	9,57E-06
	BMEI0992	Mrp protein homolog A	0,63	2,31E-05
Production d'énergie	BMEI0302	Quinone oxidoreductase	0,62	3,23E-09
Transcription/régulation	BMEI0095	Succinoglycan biosynthesis regulator	0,35	3,10E-06
	BMEI1194	Exopolysaccharide synthesis regulatory protein MucS	0,66	1,06E-06
	BMEI1751	Two component response regulator	0,54	1,19E-06
	BMEI0858	Transcriptional regulator, GntR family	0,54	2,11E-06
Transport de membrane	BMEI0697	Transporter, DME family	0,63	2,52E-07
	BMEI1210	General L-amino acid transport system permease protein AapQ	0,43	8,01E-06
	BMEI1211	General L-amino acid-binding périplasmique protein AapJ precursor	0,56	9,24E-05
	BMEI1715	Maltose transport system permease protein MalF	0,40	8,32E-06
	BMEI0038	D-serine/d-alanine/glycine transporter	0,58	3,42E-08
	BMEI0109	Aliphatic sulfonates-binding lipoprotein	0,48	1,70E-05
	BMEI0144	Xylose transport system permease protein XylH	0,51	1,96E-07
	BMEI0145	D-xylose transport atp-binding protein XylG	0,63	1,39E-05
	BMEI0340	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein LivM	0,42	1,37E-04
	BMEI0341	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein LivH	0,42	1,30E-04
	BMEI0342	High-affinity branched-chain amino acid transport atp-binding protein LivF	0,34	9,64E-05
	BMEI0343	High-affinity branched-chain amino acid transport atp-binding protein LivG	0,46	3,64E-06
	BMEI0344	Branched-chain amino acid abc transporter, périplasmique amino acid- binding protein	0,28	4,97E-05
	BMEI0542	Sugar-binding protein	0,62	4,73E-06
	BMEI0565	Iron(III)-binding périplasmique protein precursor	0,64	1,23E-04
	BMEI0590	Sugar-binding protein	0,23	1,82E-05
	BMEI0591	Sugar transport system permease protein	0,27	2,14E-07
	BMEI0592	Sugar transport system permease protein	0,34	1,96E-06
	BMEI0593	Glucose ABC transporter ATPase	0,49	2,69E-05
	BMEI0600	Cystine transport system permease protein	0,63	7,47E-08
	BMEI0734	périplasmique oligopeptide-binding protein precursor	0,48	1,85E-06
	BMEI0735	périplasmique oligopeptide-binding protein precursor	0,46	2,26E-08
	BMEI0736	Oligopeptide transport system permease protein OppB	0,47	1,61E-06
	BMEI0737	Oligopeptide transport system permease protein OppC	0,48	6,06E-05
	BMEI0750	Maltose/maltodextrin transport atp-binding protein MalK	0,48	3,34E-08
	BMEI0752	Maltose transport system permease protein MalG	0,60	5,07E-06
	BMEI0754	Sugar-binding protein	0,40	7,30E-07
	BMEI0755	Sugar-binding protein	0,61	1,60E-05
	BMEI0859	Oligopeptide-binding protein appa precursor	0,47	2,57E-06
	BMEI0962	Taurine transport permease protein TauC	0,56	1,19E-04
	BMEI0983	D-galactose-binding périplasmique protein precursor	0,58	6,32E-05
	BMEI0258	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein LivH	0,46	1,40E-05
	BMEI0259	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein LivM	0,50	7,87E-05
	BMEI0263	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	0,38	3,32E-05
	BMEI0264	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	0,61	2,77E-09
	BMEI0673	Thiosulfate-binding protein precursor	0,45	9,04E-05

Tableau 10: Localisation prédite des protéines codées par le génome entier de *B. melitensis* et des gènes cibles de PrlR

Localisation	% dans le génome entier	% dans les cibles régulées par PrlR	% des gènes réprimés par PrlR	% des gènes activés par PrlR
Cytoplasme	37.1	27.94	61.40	38.60
Membrane cytoplasmique	18.1	24	51.14	48.60
Membrane externe	19.72	1.47	100	0
Périplasma	2.73	7.84	68.75	31.25
Non connu	40.92	38.72	70.89	29.11

III.6.3. Classification fonctionnelle des cibles régulées par PrlR

Le tableau 9 reprend les cibles de PrlR réparties en cibles réprimées ($P \text{ value} \leq 1 \times 10^{-4}$ $\Delta prlR/\text{wt} > 1,50$) et en cibles activées ($P \text{ value} \leq 1 \times 10^{-4}$ et $\Delta prlR/\text{wt} < 0,663$). Au sein de chacune de ces catégories une sous-classification a été réalisée en suivant plus ou moins les catégories fonctionnelles définies par le site KEGG. Cette classification nous permettra de mieux appréhender le rôle fonctionnel du régulateur PrlR.

Dans chacune des sous-catégories les cibles sont classées suivant leur ordre dans le génome ce qui permet de visualiser les ORFs contigües faisant potentiellement partie d'un opéron et de valider ainsi leur co-régulation.

Le tableau 11 ne reprend que les cibles les plus fortement régulées ($\Delta prlR/\text{wt} < 0,35$ ou $\Delta prlR/\text{wt} > 2$) ce qui représente 52 gènes, soit environ 25% des gènes cibles (tableau 9) qui retiendront particulièrement notre attention.

Tableau 11 : Cibles les plus fortement régulées par PrIR mises en évidence par les expériences de microarray (Fold Change= mRNA $\Delta prlR$ /mRNA wt.

	Fonction cellulaire	Locus Tag	Protéine	Rapport $\Delta prlR$ /WT
Fold Change < à 0,35	Chaperonne/ folding, sorting et dégradation	BMEII1047	10 kda chaperonin groeS	0,21
	Transport de membrane	BMEII0590	Sugar-binding protein	0,23
	Hypothétique	BMEII0856	Hypothetical protein	0,27
	Transport de membrane	BMEII0591	Sugar transport system permease protein	0,27
	Transport de membrane	BMEII0344	Branched-chain amino acid ABC transporter, périplasmique amino acid-binding protein	0,28
	Chaperonne/ folding, sorting et dégradation	BMEII1048	60 kda chaperonin groeL	0,28
	Transport de membrane	BMEII0342	High-affinity branched-chain amino acid transport atp-binding protein LivF	0,34
	Transport de membrane	BMEII0592	Sugar transport system permease protein	0,34
	Métabolisme d'hydrates de carbone	BMEII0857	N-acetylmannosaminé-6-phosphate 2-epimerase / N-acetylmannosaminé kinase	0,35
	Biogénèses d'enveloppe et de la paroi	BMEI0095	Succinoglycan biosynthesis regulator	0,35
	Hypothétique	BMEII0237	Hypothetical protein	0,35
Fold change > à 2	Chaperonne/ folding, sorting et dégradation	BMEI0087	Thiol:disulfide interchange protein TlpA	2,00
	Mobilité cellulaire	BMEII0162	FlaF protein	2,01
	Hypothétique	BMEI1312	Hypothetical membrane spanning protein	2,02
	Hypothétique	BMEI0172	Hypothetical protein	2,06
	Transcription/régulation	BMEII0436	Transcriptional regulator, DeoR family	2,06
	Hypothétique	BMEII1106	Hypothetical protein	2,07
	Hypothétique	BMEII0010	Hypothetical membrane associated protein	2,08
	Non assigné	BMEII0681	Virulence protein	2,09
	Hypothétique	BMEII1013	Hypothetical cytosolic protein	2,09
	Transport de membrane	BMEII0432	Ribose transport atp-binding protein RbsA	2,10
	Mobilité cellulaire	BMEII1108	Flagellar basal-body rod protein FlgF	2,12
	Transport de membrane	BMEI1138	Lipoprotein releasing system atp-binding protein LolD	2,14
	Hypothétique	BMEI0173	Hypothetical protein	2,14
	Hypothétique	BMEII1111	Hypothetical protein	2,14
	Mobilité cellulaire	BMEI0163	FlbT protein	2,15
	Mobilité cellulaire	BMEII1109	Chemotaxis MotAprotein	2,16
	Mobilité cellulaire	BMEII0165	Flagellar biosynthetic protein FliQ	2,16
	Mobilité cellulaire	BMEII1084	Flagellar p-ring protein FlgI	2,21
	Mobilité cellulaire	BMEII1110	Flagellar motor switch protein FlmM	2,22
	Transcription/régulation	BMEI1913	Transcriptional regulatory protein, LysR family	2,22
	Non assigné	BMEII0682	Oxacillin resistance-associated protein FmtC	2,24
	Métabolisme de lipides	BMEI1235	Short-chain dehydrogenase	2,25
	Mobilité cellulaire	BMEII1086	Flagellar basal-body rod protein FlgG	2,32
	Mobilité cellulaire	BMEI0160	Flagellar hook-associated protein 1	2,32
	Transport de membrane	BMEII0433	Ribose transport system permease protein CbsC	2,32
	Mobilité cellulaire	BMEII0166	Flagellar biosynthetic protein FlhA	2,32
	Mobilité cellulaire	BMEII1089	Flagellar basal-body rod protein FlgB	2,33
	Mobilité cellulaire	BMEII1087	Flagellar hook-basal body complex protein FliE	2,36
	Mobilité cellulaire	BMEII1085	Flagella basal body p ring formation protein FlgA	2,36
	Cycle de division cellulaire	BMEI1596	LrgB protein	2,38
	Mobilité cellulaire	BMEII1107	Flagellar basal-body rod protein FlgF	2,45
	Mobilité cellulaire	BMEII0152	Flagellar M-ring protein FlhF	2,47
	Métabolisme d'acides aminés	BMEI1650	Uréase accessory protein UreF	2,49
	Hypothétique	BMEI0171	Hypothetical cytosolic protein	2,57
	Métabolisme d'hydrates de carbone	BMEII0428	D-erythrulose 4-phosphate dehydrogenase	2,60
	Métabolisme d'hydrates de carbone	BMEII0429	Erythritol-4-phosphate dehydrogenase	2,72
	Métabolisme d'acides aminés	BMEI1651	Uréase accessory protein UreE	2,74
	Biogénèses d'enveloppe et de la paroi	BMEI1597	Murein hydrolase exporter	2,79
	Mobilité cellulaire	BMEII1088	Flagellar basal-body rod protein FlgC	2,97
	Mobilité cellulaire	BMEI0170	Flagellar protein FlgJ	3,05
	Mobilité cellulaire	BMEII0151	Flagellar M-ring protein FlhF	3,27

III.6.3.1. Les gènes réprimés par PrIR (ratio $\Delta prlR/wt > 1,50$)

L'examen de cette classe des cibles directes ou indirectes permet de reléver différentes particularités dans les diverses catégories fonctionnelles.

a) **Mobilité** : 23 gènes flagellaires (voir figure 48) répartis sur les trois loci flagellaires sont up-régulés chez le mutant et la majorité de ceux-ci sont parmi les gènes les plus fortement influencés par la mutation *prlR* (voir tableau 11)

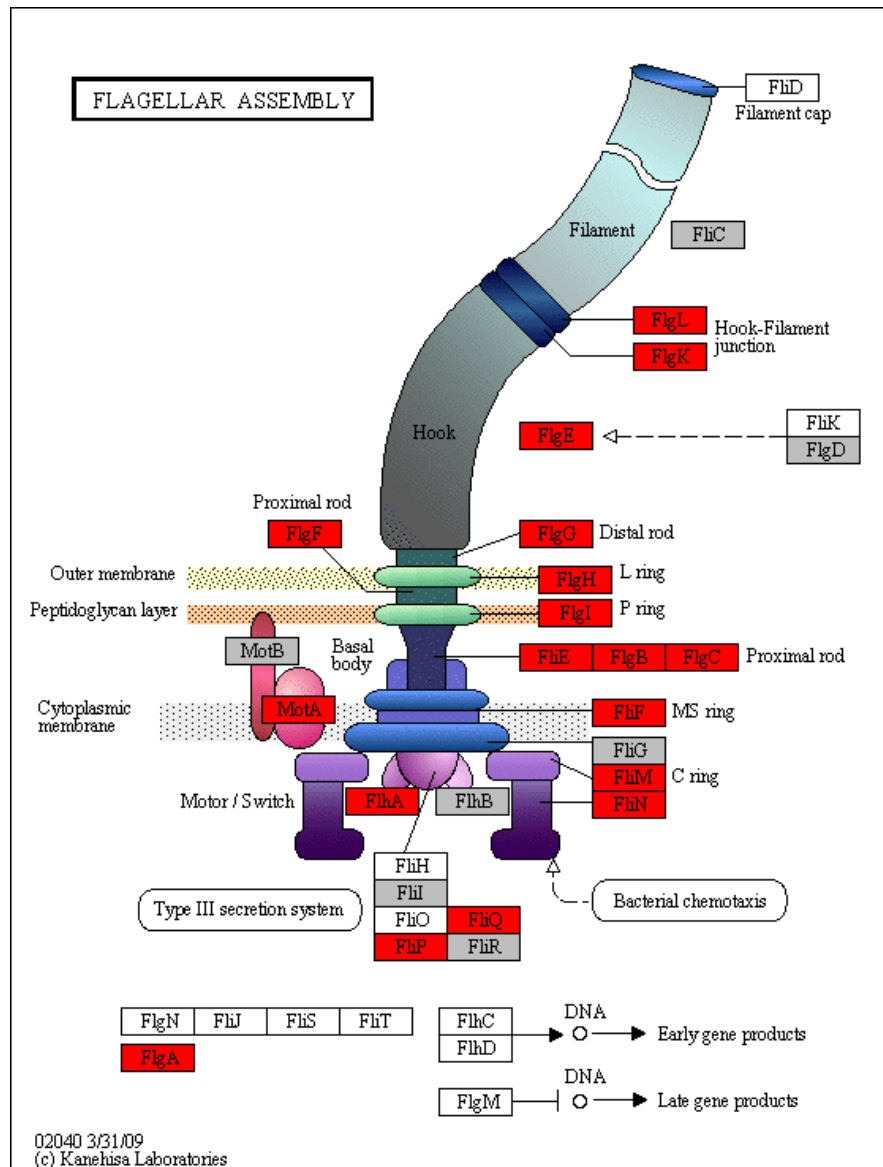


Figure 48 : Représentation schématique de la structure flagellaire avec les gènes flagellaires présents chez *B. melitensis* selon le site KEGG Pathway (KEGG, 2009). Les gènes réprimés par PrIR sont en rouges, les gènes non détectés chez *B. melitensis* sont en blanc, les gènes présents en gris.

Dans le schéma les gènes régulateurs *flbT* et *flaF* impliqués dans le contrôle de flagelline chez *C. crescentus* et le gène *flgJ* qui code pour une protéine qui permet l'assemblage de la tige mais dégrade également la couche de peptidoglycane (PG) grâce à son activité hydrolase (Nambu and Kutsukake, 2000) ne sont pas repris, mais restent de cibles potentielles de PrlR.

Chez *B. melitensis*, plusieurs régulateurs flagellaires ont été caractérisés. Parmi ceux-ci, on distingue VjbR (Vacuolar Hijacking *Brucella* Regulator), FtcR (Flagellar two-component Regulator), BlxR (*Brucella* LuxR-like Regulator).

VjbR régulateur transcriptionnel localisé dans le 3^{ème} locus flagellaire est impliqué dans l'activation des gènes flagellaires de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2005). En effet la mutation de *vjbR* (BMEII1116) inhibe l'activité du promoteur de *fliF* et la production de FlgE et FliC. VjbR agit sur les gènes flagellaires en contrôlant l'expression de *ftcR*. Dans un mutant *vjbR* comparé à une souche sauvage, l'activité du promoteur de *ftcR* est diminuée, ce qui laisse supposer que VjbR régule la transcription de *ftcR* (Leonard *et al.*, 2007).

FtcR est classé comme le régulateur principal appartenant au système à deux composants, qui contrôle l'expression des gènes flagellaires de *Brucella* (Leonard *et al.*, 2007). La mutation de *ftcR* annule complètement l'expression de gènes flagellaires. Le gène *ftcR* (BMEII0158) est situé en amont du gène *flgE* du premier locus flagellaire, (Leonard *et al.*, 2007).

Récemment, le régulateur BlxR de type LuxR a été découvert et contrôlerait l'activation du flagelle de *Brucella* (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). En outre, BlxR joue un rôle sur les gènes *virB* du système de sécrétion type IV. En plus il s'auto-active et contrôle l'activation de VjvR (Rambow-Larsen *et al.*, 2008).

Il y a d'autres régulateurs comme MucR chez *S. meliloti* impliqués dans le contrôle de la production d'EPS (Bertram-Drogatz *et al.*, 1998). Il inhibe la production du flagelle en se fixant sur le promoteur de *rem* (Bahlawane *et al.*, 2008). La formation

de biofilm par *Brucella* suggère un lien entre le système flagellaire via MucR (Uzureau, 2007).

Un autre régulateur maître des gènes flagellaires et du cycle cellulaire chez *C. crescentus* est CtrA (McAdams *et al.*, 2004). *B. abortus* possède aussi un homologue de CtrA (Hallez *et al.*, 2004). CtrA peut également être un candidat potentiel dans l'activation de l'expression de gènes flagellaires (Hallez *et al.*, 2004).

Les facteurs sigma extracytoplasmiques (ECF) interviennent dans l'intégrité de la paroi bactérienne (Raivio and Silhavy, 2001). Ils contrôlent l'expression des gènes impliqués dans le reploiement des protéines dénaturées ou la dégradation des protéines endommagées dans le périplasme et en membranes. *Brucella* possède 2 facteurs sigma ECF nommés RpoE1 et RpoE2 (Delory *et al.*, 2006). La mutation de *ropE1* (BMEI0371) provoque une augmentation de l'activité du promoteur de *fliF* chez *Brucella*, ce qui empêche l'action d'un répresseur encore inconnu sur l'activation des gènes flagellaires (Delory *et al.*, 2006).

Ces résultats nous suggèrent l'hypothèse que PrlR pourrait être le répresseur encore inconnu sur l'activation des gènes flagellaires.

b) Métabolisme : Au niveau de cette catégorie fonctionnelle les particularités suivantes sont constatées.

- ❖ **Acides aminés :** 1 opéron uréase BMEI 1649 à BMEI 1655 est up régulé chez le mutant Δ prlR. Notons que *Brucella* possède deux opérons uréase (Bandara *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007) et que le second opéron (BMEI0645 à BMEI0640 BMEI0646, BMEI0649 à BMEI0647) bouge plutôt dans le sens down régulé bien que non significativement suivant nos critères.
- ❖ **Carbohydrides :** L'ensemble de l'opéron (BMEII0427 à BMEII0430) de catabolisme d'érythritol, (Sangari *et al.*, 2000) est également concerné par cette augmentation d'expression chez le mutant.
- ❖ **Au niveau du métabolisme central :** 3 gènes (BMEII0424, BMEII0425 et BMEI0140) apparaissent comme étant réprimés par

PrlR. Ces gènes codent respectivement pour des enzymes impliqués dans la voie des pentoses phosphate (ribose-5-phosphate-isomérase), dans la glycolyse (triose phosphate isomérase), dans le cycle de Krebs (2-oxoglutarate déshydrogénase). Remarquons (i) que la triose phosphate isomérase (TPI) est indispensable au catabolisme de l'érythritol, (ii) que ce gène est situé en aval de l'opéron érythritol et (iii) que *Brucella* possède un autre gène encodant une TPI (BMEI0846) dont l'expression n'est pas modifiée par la mutation de PrlR.

c) Dans la catégorie fonctionnelle Biogénèse de l'enveloppe et de la paroi : On retrouve 4 gènes encodant des protéines impliquées dans le remaniement de la muréine.

d) Dans la catégorie transport : 2 faits marquants peuvent être signalés.

- ❖ 3 gènes encodant des protéines impliquées dans le transport du K⁺.
- ❖ 1 opéron annoté comme transporteur de ribose qui est situé en amont de l'opéron érythritol et qui est vraisemblablement le transporteur de l'érythritol.

e) Dans la classe fonctionnelle transcription/régulation : On retrouve

- ❖ 5 gènes encodant des régulateurs transcriptionnels « classiques » 2 de la famille LysR, 1 de la famille AraC, et 2 de la famille DeoR.
- ❖ 1 gène encodant un régulateur de réponse d'un système à 2 composants
- ❖ 1 gène encodant une protéine à domaine diguanylate cyclase/phosphodiesterase (EAL) (voir Introduction point I.2.1.2.).
- ❖ Outre ce dernier gène qui régule la teneur en di-GMP-cyclique, messenger souvent associé à la régulation de la production d'EPS et du flagelle, un autre gène encodant une protéine décrite chez *S. meliloti* comme contrôlant l'expression de la production d'EPS (Reed *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 2004).

Au vu de l'impact de PrlR sur des régulateurs, il est évident que bon nombre des cibles que nous avons identifiées ne sont pas des cibles directes de PrlR.

f) Enfin parmi les gènes réprimés par PrlR on retrouve 23 annotés comme **hypothétiques** et 9 comme étant de **fonction non assignée**.

Remarquons que puisque nous en détectons la transcription le statut « Hypothétique » n'est plus applicable à ces gènes.

III.6.3.2. Les gènes activés par PrlR (ratio $\Delta prlR/wt < 0,663$)

Parmi les gènes activés, la catégorie fonctionnelle majoritaire (36 gènes) est représentée par les systèmes de transport (figure 49).

Au sein de ceux-ci les transporteurs d'acides aminés (surtout les acides aminés branchés) ou d'oligopeptides sont prépondérants.

On retrouve aussi plusieurs gènes impliqués dans la régulation dont 2 décrits chez *S. meliloti* comme impliqués dans la régulation de la synthèse d'EPS (Lloret *et al.*, 2002).

Notons également 25 gènes de la catégorie hypothétique/non assigné.

III.6.4. Validation des résultats transcriptomiques par qRT-PCR

Les résultats de l'analyse transcriptomique ont été confirmés par qRT-PCR et de façon quantitative comme montré dans le tableau 12 sur des échantillons d'ARN préparés au début de la phase de croissance (à la même $DO_{600}=0.2$ que pour les expériences de transcriptomique). L'ARN total a été extrait des souches wt et 16M $\Delta prlR$ cultivés en 2YT liquide. Un contrôle négatif nous a permis de s'assurer qu'il n'y avait pas d'ADN génomique dans la préparation lors de la Real Time PCR. Le résultat pour chaque ARNm cible a été normalisé avec de l'ARNm de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*). Les séquences d'oligonucléotides pour l'analyse qRT-PCR sont montrées dans Matériel et Méthodes tableau 15.

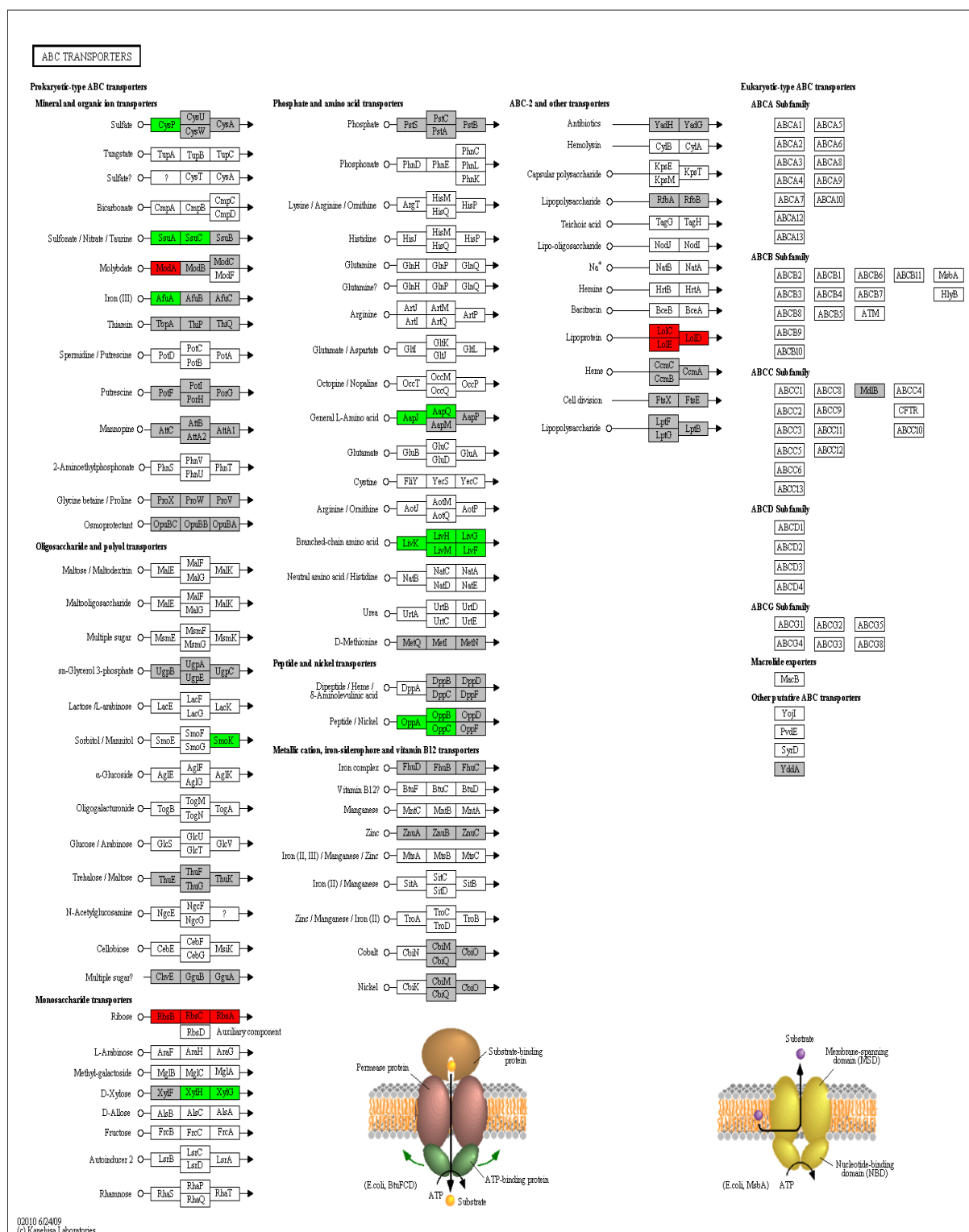


Figure 49 : Représentation schématique des gènes impliqués dans les transports (transporteurs ABC) présents chez *B. melitensis* selon le site KEGG Pathway (KEGG, 2009). Les gènes présents en gris. Les gènes non détectés chez *B. melitensis* sont en blanc. Les gènes réprimés par PrIR sont en rouges et les gènes activés en vert.

Nous avons choisi de valider les résultats pour les cibles qui nous donnaient des pistes fonctionnelles intéressantes. Ces cibles sont justifiées ci-dessous et la comparaison des résultats de la qRT-PCR et des données transcriptomiques est reprise dans le tableau 12.

Tableau 12: Comparaison des rapports de fold change d'ARNm correspondant à des cibles choisies de PrlR obtenus par transcriptomique ou qRT-PCR. L'ARN a été extrait à une $DO_{600} = 0,2$

Locus Tag	Product Description	Rapport $\Delta prlR/wt$ Fold change	P value annova	qRT-PCR Fold change
Production d'EPS				
BMEI0095	Succinoglycan biosynthesis regulator	0,35	3,10E-06	0,32
BMEI1094	ExoR exopolysaccharides production negative regulator precursor	1,78	7,46E-07	2,38
BMEI1393	Mannosyltransferase C	1,43	8,76E-05	1,5
Urée				
BMEI0086	Arginino succinate lyase (urea cycle)	1,4	4,96E+06	1,41
BMEI0522	Carbamoyl Phosphate synthetase large chain	1,97	0,00011	2,01
BMEI0648	Urease beta subunit	0,61	0,015	0,6
BMEI1652	Urease alfa subunit (urea catabolism)	1,96	8,50E-07	1,96
Cycle de Krebs				
BMEI0137	Malate dehydrogenase (TCA)	1,78	0,0082	1,39
BMEI0141	Dehydrolipoamide succinyltransferase component (E2) of 2 oxoglutarate dehydrogenase complex (TCA)	1,63	0,0026	2,05
Division cellulaire				
BMEI0072	Cell division ATP binding protein FtsE	1,41	2,58E-07	1,17
BMEI1596	LrgB protein (cell division)	2,38	2,35E-06	2,75
Metabolisme d'azote				
BMEI0979	Glutamine synthetase	1,76	7,47E-07	–

I. Dans le phénotype d'agrégation des mutants *prlR* impliquant la production d'EPS à base de mannose nous avons choisi de valider :

- Le gène BMEI1094 codant pour une protéine annotée ExoR et décrite chez *S. meliloti* comme étant un répresseur d'EPS.
- Le gène BMEI1193 encodant une mannosyltransférase.
- Le gène BMEI0095 annoté comme régulateur de la biosynthèse du succinoglycan.

semblent également affectés par la mutation de *prlR*, nous avons effectué une validation pour la BMEI0137 (malate déshydrogénase) et BMEI0141 (composant E2 de l'oxoglutarate déshydrogénase) dans ces 2 cas également la qRT-PCR a validé les données obtenues par les microarray (figure 51).

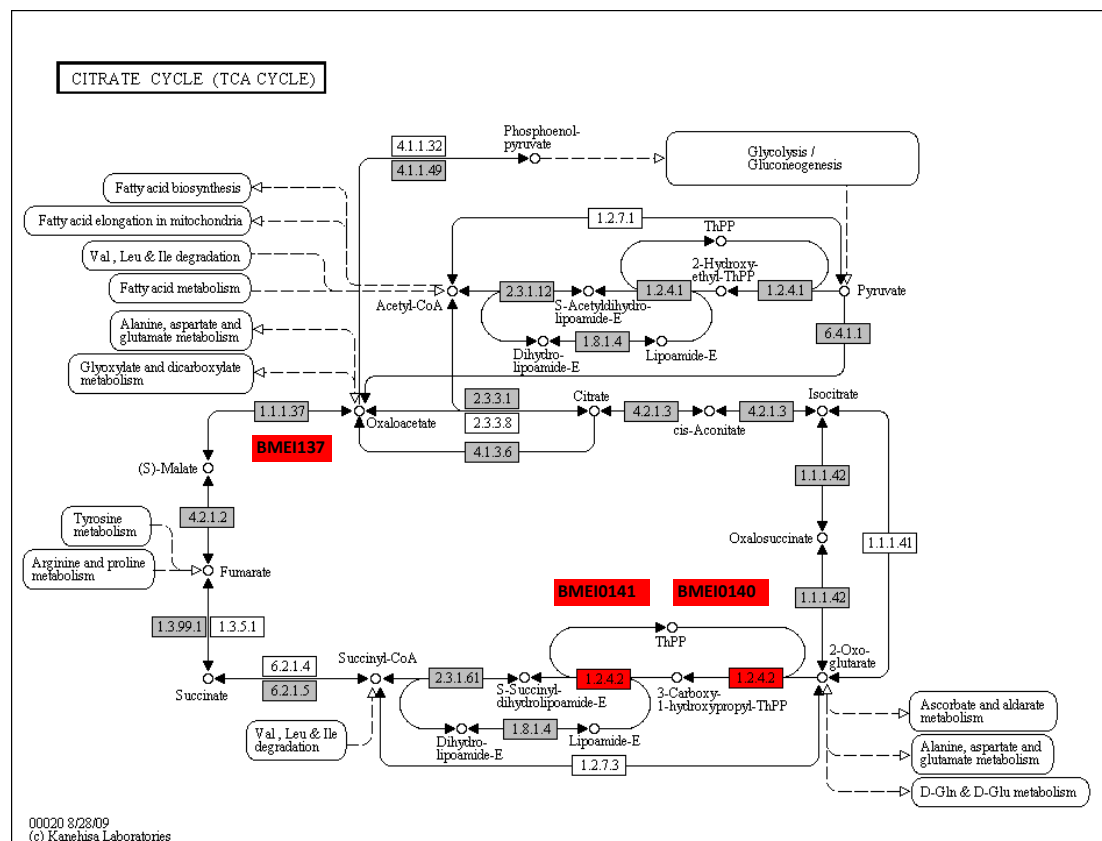


Figure 51: Représentation schématique des gènes impliqués dans le cycle de Krebs présents chez *B. melitensis* selon le site KEGG Pathway (KEGG, 2009). Les gènes présents en gris. Les gènes non détectés chez *B. melitensis* sont en blanc. Les gènes réprimés par *PrlR* sont en rouges.

IV. La BMEI1596 étant annotée comme impliquée dans le remodelage de la muréine et portant dans la division cellulaire, nous avons choisi de tester par qRT-PCR un autre gène impliqué dans la division (BMEI0072, FtsE) qui montrait une répression significative par *PrlR* mais inférieure au seuil de >1,5 que nous avons fixé.

III.6.5. Mise en parallèle des résultats transcriptomique avec des données biologiques

III.6.5.1. Protéines de membrane externe (Omps)

Ainsi nous avons vu au point III.4.1. que l'expression des OMPs détectée par Dot blot était altérée chez les mutants du SDC PrlS/PrlR. Le tableau 13 compare ces observations avec les résultats obtenus en transcriptomique. Même si aucun des gènes encodant les OMPs ne rencontre les critères stricts que nous avons utilisés pour sélectionner les cibles directes ou indirectes de PrlR (voir tableau 13), nous constatons néanmoins que le ratio mesuré entre le mutant et la souche sauvage est majoritairement cohérent avec les observations en Dot blot. La différence de résultat pour l'Omp10 est probablement due à la régulation post-transcriptionnelle. La transcriptomique analyse l'expression du gène et le Dot blot montre l'expression de la protéine OMP.

Tableau 13 : Comparaison des données transcriptomique et des données Dot blot pour les Omps

Nom ORF	Δ prlR/WT Rapport transcriptomique	P value	Données Dot blot
Omp36 BMEI1305	0.65	0,001044	régulation positive
Omp 31BMEI0402	0.75	0,135459	régulation positive
Omp 31BMEI0796	0.76	0,000734	régulation positive
Omp31BMEI0844	0.85	0,012988	régulation positive
Omp 25BMEI1005	0.65	0,000210	régulation positive
Omp 25 BMEI1007	0.44	0,000987	régulation positive
Omp 25 BMEI1829	0.62	0,007087	régulation positive
Omp 25 BMEI1830	0.55	0,007648	régulation positive
Omp19 BMEI0885	1.12	0,032907	régulation negative
Omp10 BMEI0017	0.85	0,002019	régulation negative

III.6.5.2. Exopolysaccharides

En ce qui concerne les agrégats et la surproduction d'EPS observés pour la souche wt en milieu hyperosmotique il est difficile d'établir un parallèle avec les données transcriptomiques. En effet l'analyse transcriptomique s'est déroulée dans un milieu d'osmolarité normale et à une DO différente de celle où les agrégats sont

observés. En outre, ni les gènes de biosynthèse ni les régulateurs contrôlant la production d'EPS actuellement connus.

Notons néanmoins que 4 cibles identifiées sont homologues à des gènes connus chez *S. meliloti* ou d'autres bactéries comme intervenant dans la régulation de la production d'EPS (voir chapitre IV.3 Discussion et perspectives).

III.6.5.3. Flagelle

Enfin alors que nous avons constaté avec le rapporteur β -galactosidase que l'activité du promoteur du gène *fliF* (encodant l'anneau MS du corps basal flagellaire) était fortement diminuée dans le mutant *prlR*, nous constatons au contraire que pas moins des 21 gènes flagellaires (dont le gène *fliF*) sont surexprimés chez le mutant *prlR*. Ces résultats contradictoires sont probablement dûs à la présence du plasmide réplcatif pBBR medium copy utilisé pour tester l'activité du promoteur *fliF*. Le grand nombre de copies pourrait interférer avec le phénotype de la répression. Ces données suggèrent que PrlR est (directement ou indirectement) un répresseur des opérons flagellaires.

III.6.5.4. Métabolisme

Finalement, au niveau métabolique, notre étude indique que PrlR régule des gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme de carbohydrates (glycolyse, voie pentose phosphate), d'acides aminés, du métabolisme central, d'acides gras et de la phosphorylation oxydative.

Au vu des résultats transcriptomiques dans la régulation de voies métaboliques importantes, pour comparer le profil métabolique, des expériences de croissance en différentes conditions ont été réalisées pour les mutants et la souche sauvage de *B. melitensis*. Pour ce faire des courbes de croissance sont réalisées à l'aide du Bioscreen (le Bioscreen est un système automatisé conçu pour le suivi des courbes de croissance sur micro-plaque) en milieu minimum et en présence de diverses sources de C ou d'N. Nous avons utilisé l'arginine, l'histidine, le citrate et l'ornithine comme sources de carbone ou d'azote. Dans ces conditions, ni la souche wt, ni les

mutants ne croissent (résultats non montrés). Nous avons aussi testé la proline comme sources de carbone et d’N. Dans la condition 1 g/l de proline, comme source de carbone, la croissance des mutants *prlR* et *prlS* est affectée par rapport à la souche wt comme on le voit dans la figure 52. Les souches ne croissent pas avec la proline comme source d’N. Ces résultats ont été confirmés par le test des galeries Biotype 100 (voir VI.16 de les Matériel et Méthodes).

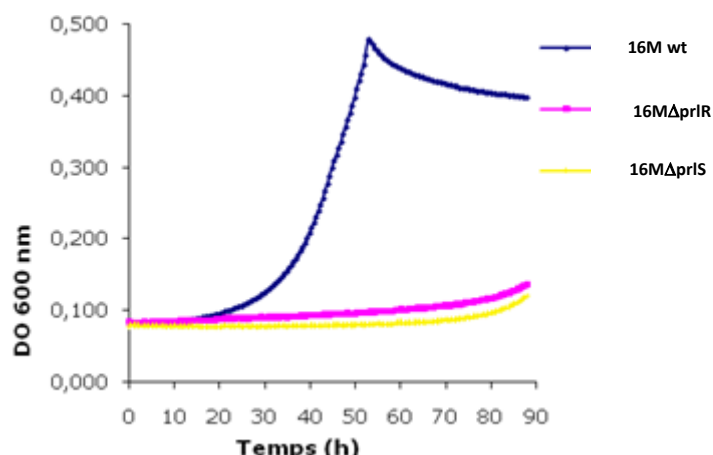


Figure 52: Croissance de mutants 16MΔ*prlR*, 16MΔ*prlS* et de la souche sauvage dans le Bioscreen en milieu minimum avec 1 gr/l de proline comme source de carbone, sous agitation à 37°C. Cette expérience a été répétée plusieurs fois, avec des résultats similaires.

Nous avons testé aussi la croissance sur milieu minimum avec du glutamate comme source de carbone, dans cette condition la différence de croissance entre la souche wt et les mutants n’est pas très significative de même que la croissance avec l’érythritol ou le galactose comme sources de carbone (non montré).

Nous avons aussi réalisé le test uréase dans le culot d’une culture (voir VI.17 Matériel et Méthodes). Le test donne une coloration positive (rouge violet) pour la souche 16M wt et le mutant Δ*prlR* (non montré). Nous avons aussi mesuré l’activité enzymatique de l’uréase dans le mutant Δ*prlR* et la souche wt après 1, 4,5, 13,5 et 21,5 heures (figure 53). Aucune différence d’activité n’a été observée dans les 2 souches testées. En même temps, nous avons testé la concentration des protéines par la méthode de Bradford, la concentration pour la souche wt et le mutant est la même dans le surnageant et le culot (non montré). Ces résultats n’ont montré aucune

différence d'activité uréase dans le mutant et la souche sauvage dans les conditions testées.

Le test uréase chez *B. melitensis* 16M est positif. Nous remarquons que la plupart de souches de *B. ovis* ont été négatives au test uréase (Corbel and Hendry, 1985; Tsolis *et al.*, 2009), ce qui est probablement dû à la différence dans l'ORF du gène *prlS* (voir figure 20).

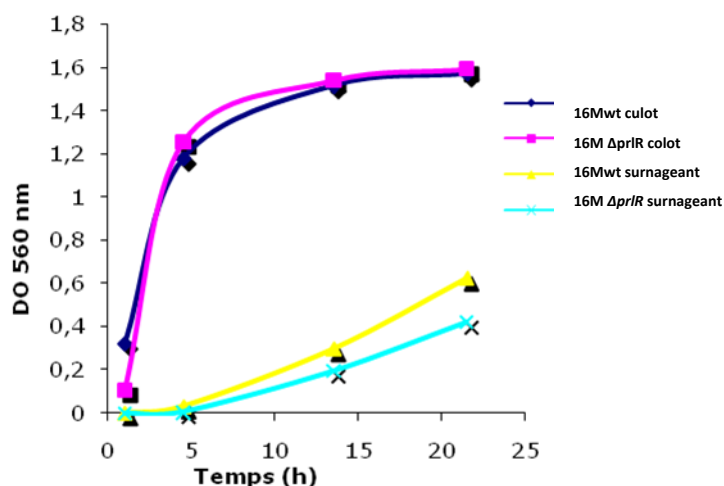


Figure 53 : Test de l'activité d'uréase dans la souche wt et chez le mutants $\Delta prlR$ dans le surnageant et le culot de cultures après 1, 4.5, 13.5 et 21.5 heures.

Nous avons aussi évalué les phénotypes métaboliques des deux mutants *prlR* et *prlS* utilisant le système du Biotype 100 (Biomerieux), un système d'assimilation de substrat (carboné) proposé pour l'identification des bactéries à Gram négatif. Suivant les indications du tableau 14, *B. melitensis* 16M peut assimiler 12 substrats différents (des sucres ou des acides aminés). Ces observations montrent que les souches mutantes *prlR* et *prlS* perdent la capacité d'assimiler la proline, l' α -cétoglutarate et le malonate. Les mutants *prlR* ne peuvent pas se développer avec la tyrosine et L-aspartate en tant que source de carbone unique. Une observation intéressante de cet essai est la capacité des mutants à incorporer des substrats que la souche wt ne peut pas assimiler, ce fait suggérant que plusieurs voies métaboliques sont réprimées (directement et indirectement) par PrlR. En effet le mutant *prlR* gagne la capacité d'assimiler le N-acétyl D-glucosamine, la D-glucosamine, le L-lactate et le

propionate. Le mutant *prlS* gagne la capacité de se développer sur D-glucosamine, tyrosine et propionate.

Tableau 14 : Essai d'assimilation de carbone utilisant le système biotype100 (Biomerieux), le «+» représente la croissance bactérienne après 6 jours d'incubation à 37°C, les cellules grises indiquent l'assimilation différentielle du substrat entre la wt et les souches mutantes *prlR* et *prlS*. Les résultats enregistrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

	wt	$\Delta prlR$	$\Delta prlS$
N-acétyl D glucosamine	-	+	-
L-Proline	+	-	-
D-Glucosamine	-	+	+
DL Lactate	-	+	-
L-Tyrosine	-	-	+
Propionate	-	+	+
L-Fucose	+	+	+
D+ Galactose	+	+	+
D+ Xylose	+	+	+
Adonitol	+	+	+
I -Erythritol	+	+	+
L-Glutamate	+	+	+
L-Sérine	+	+	+
L+ Arabinose	+	+	+
α -Cétoglutarate	+	-	-
L-Aspartate	+	-	+
Malonate	+	-	-

Le résultat obtenu à partir de cette analyse phénotypique est trop complexe pour le comparer avec des données transcriptomiques, car le système biotype 100 a été inoculé conformément aux recommandations du fabricant, avec une suspension bactérienne préparée à partir de colonies ayant poussé sur 2YT solide alors que l'analyse transcriptomique a été faite avec une culture en 2YT liquide à une DO₆₀₀ de 0.2. Néanmoins ces résultats suggèrent que plusieurs voies métaboliques soient sous la régulation de PrlR dans *B. melitensis*.

PARTIE IV

DISCUSSION

&

PERSPECTIVES

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail nous avons réalisé la caractérisation phénotypique des mutants du système à deux composants PrlS/PrlR et tenté de définir des cibles directes et indirectes régulées par ce système chez *B. melitensis*. Dans le prochain paragraphe, nous discuterons des résultats obtenus ainsi que des perspectives de ce travail.

IV.1. Système à deux composants PrlS/PrlR.

D'une part l'analyse BLAST (Altschul *et al.*, 2009) de séquences de ce système à deux composants, réalisée dans ce travail, a mis en évidence que le gène *prlR* code une protéine PrlR ayant les attributs d'un régulateur de réponse et le gène *prlS* qui code pour la protéine histidine kinase hybride PrlS. PrlS peut être considéré comme une kinase hybride puisqu'en position C terminale on retrouve le domaine RR. Nous avons supposé que PrlS pourrait requérir la présence d'une Hpt séparée pour transporter le groupe phosphoryl sur l'aspartate conservé du domaine RR de PrlR. Une protéine Hpt peut agir comme un intermédiaire récepteur et donneur du groupe phosphoryl entre le domaine RR de l'histidine kinase hybride et l'autre RR du régulateur de réponse (Laub *et al.*, 2007). Comme les domaines Hpt sont difficiles à identifier en raison du bas niveau de conservation des séquences, nous n'avons pas identifié cette protéine Hpt. Il serait possible de l'identifier par la technique de « phosphotransfer profiling », cette technique permet l'identification rapide et systématique des cibles de régulateur de réponse d'une kinase donnée (Skerker *et al.*, 2005).

La technique de « phosphotransfer profiling » *in vitro* permet de cartographier la connectivité de protéines de transduction du signal à deux composants ou de phosphorelais. Dans cette analyse, une histidine kinase peut être testée *in vitro* pour sa capacité de transférer un groupe phosphoryle à son régulateur de réponse purifié. Cette technique est avantageuse par le fait que les histidines kinases montrent une grande préférence cinétique *in vitro* pour leur substrat *in vivo* (Skerker *et al.*, 2005). D'abord nous devons identifier des phosphotransférases (Hpt) putatives dans le génome de *B. melitensis*, pour ce faire on doit chercher par analyses bioinformatiques

les gènes prévu comme codants des protéines portant les caractéristiques communes suivantes. (i) plus petite que 250 acides aminés, (ii) ayant plus que 70% de structure secondaire α -hélicoïdal prédite, (iii) des motifs conserve HXXKG dans un hélice alpha prédite (Biondi *et al.*, 2006). Une fois identifié, le gène qui coderait une histidine phosphotransférase, la protéine Hpt pourrait être testée pour sa capacité à transférer un groupe phosphoryle depuis PrlS jusqu'à PrlR.

Nous avons observé par analyses informatiques que les gènes de ce système se trouvent dans l'orientation inverse et bien conservée sur le locus génomique des orthologues de *Brucella* (*B. abortus*, *B. suis* et *B. canis*) et aussi chez d'autres α -protéobactéries (*Mesorhizobium* sp BCN, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Aurantimonas* sp SI85-9A1, *Nitrobacter hamburgensis*, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, et *Haella chejuensis* K). Cette information, plus la présence des domaines conservés de ces systèmes et la similitude du phénotype des mutants *prlS* et *prlR* nous laisse supposer que *prlS* et *prlR* agissent comme un système à deux composants. Chez les γ -protéobactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* PAO, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas fluorescens* Pf5 et *Vibrio* sp Ex25, seul le gène *prlS* est bien conservé.

Nous avons aussi montré une atténuation en souris BALB/c à 4 semaines dans les mutants *prlS* et *prlR*. Ces données peuvent suggérer que ce système à deux composants PrlS/PrlR de *B. melitensis* serait impliqué dans la capacité d'adaptation de *Brucella*.

IV.2. Fonctions du Système à deux composants PrlS/PrlR

La comparaison de séquences et des prédictions de domaines de ce système à deux composants donne une idée sur son rôle putatif. Entre autre la co-localisation avec le gène *mscL* en amont et en orientation inverse de nombreux orthologues de *prlS*, suggère la probabilité que ce système PrlS/PrlR pourrait être impliqué dans l'osmorégulation bactérienne.

En condition de haute osmolarité (NaCl) le cytoplasme de la bactérie est exposé à une concentration ionique élevée. La bactérie pour s'adapter aux fluctuations de la concentration en sel, doit développer une série de stratégies pour

maintenir l'équilibre osmotique et la concentration cytoplasmique en sel (Sleator and Hill, 2002). La diminution de la pression osmotique externe est surmontée par une expulsion rapide d'une série de molécules osmotiquement actives (osmolytes) par les canaux mécanosensitif (MscL et MscS). La première réponse plus rapide à un choc hyper-osmotique est l'accumulation du potassium (McLaggan *et al.*, 1994). Le potassium est contrebalancé par des contre-ions qui contribuent à l'activité osmotique. La réponse secondaire est l'accumulation d'osmoprotectants (proline, glycine-bétaines, etc)(Whatmore *et al.*, 1990). L'intervention de porines est importante pour le transport d'eau et l'efflux de solutés pour régénérer le volume et l'hydratation cellulaire.

Bien que tous les solutés contribuent à la pression osmotique d'une solution, les ions seuls contribuent à la force ionique. Un ion en solution module les interactions moléculaires par réduction de forces électrostatiques, par interaction entre les surfaces des macromolécules. (Mahmood *et al.*, 2006). La réponse au stress osmotique peut produire des changements comme l'hydratation cellulaire en réponse au stress ou comme l'altération des structures, et des fonctions de macromolécules individuelles dans le cytoplasme et la membrane cytoplasmique (Minton, 2006).

En effet le gène *mscL* chez de nombreuses bactéries, comme *E. coli*, *B. subtilis*, etc., code pour une protéine de canal mécanosensitif (MscL, mecanosensitive channel of large conductance). Le rôle de cette protéine est l'osmorégulation, elle est impliquée dans le flux d'osmolytes des cellules soumises à des changements osmotiques. (Levina *et al.*, 1999). En condition de perte d'équilibre osmotique un échange d'ions et d'osmolytes à travers des canaux va se mettre en place, ceci est essentiel pour la croissance cellulaire (Schleyer *et al.*, 1993).

En outre le nombre de SDC rapportés comme étant impliqués dans la formation d'agrégats augmente constamment. Pour exemple, un de ces SDC conservé GacS/GacA (BarA/UvrY) de *P. aeruginosa*, *E. coli* et *V. cholerae* qui a été montré comme régulateur de la production d'exopolysaccharides et de la formation

d'agrégats (Karatan and Watnick, 2009). D'autre part, la virulence de *Brucella* est liée aux composants de l'enveloppe de cellules et bien connectée à la fonction du système à deux composants BvrS/BvrR) (Lamontagne *et al.*, 2007).

Nous avons trouvé qu'à forte concentration en NaCl (200 et 400 mM) la souche sauvage *B. melitensis* forme des agrégats et que les mutants *prlR* et *prlS* en sont incapables. La complémentation des mutants avec la copie sauvage de *prlR* ou *prlS* restaure le phénotype d'agrégation. Cette donnée montre que l'absence d'agrégats est due à *prlR* ou *prlS* et le lien avec l'osmolarité. En condition de haute osmolarité chez de nombreuses espèces bactériennes telles que *P. fluorescens*, *S. typhimurium*, *E. coli* et *V. cholerae*, l'osmolarité régule la formation des agrégats (Goller *et al.*, 2006; Jubelin *et al.*, 2005; Kapfhammer *et al.*, 2005; O'Toole and Kolter, 1998a; Romling *et al.*, 1998). Dans beaucoup de cas l'osmolarité empêche la formation d'agrégats bien que cet effet pourrait dépendre du type d'osmolytes dans l'environnement. Par exemple chez *P. fluorescens* la formation d'agrégats est empêchée dans des conditions environnementales de haute osmolarité produites par l'addition du NaCl ou de sucre (O'Toole and Kolter, 1998a) (O'Toole and Kolter, 1998b). Dans *P. typhimurium* la croissance en concentrations élevées de NaCl supprime la transcription du *csgD*, un régulateur centrale de la formation de biofilm (Romling *et al.*, 1998). De même; quand *E. coli* est cultivé dans le milieu contenant 100 mM en NaCl, la transcription des gènes curli est réprimée par le facteur de transcription CpxR (Jubelin *et al.*, 2005). *V. cholerae*, une bactérie aquatique halophile, forme des agrégats à forte concentration en NaCl si les cellules sont protégées par le soluté compatible glycine-bétaïne (Kapfhammer *et al.*, 2005). Un soluté compatible est un composé qui maintient l'équilibre osmotique sans interférer avec le métabolisme cellulaire. Par conséquent, les divers effets de l'osmolarité sur la formation d'agrégats reflètent probablement des différences dans la physiologie de ces organismes.

Pendant la réponse osmotique, de nombreux gènes codant pour des transporteurs spécifiques peuvent s'exprimer; par exemple, la première réponse à un choc osmotique est le transport de K⁺ (Ly *et al.*, 2004). Nous nous sommes basés sur notre analyse transcriptomique chez *B. melitensis* du mutant *prlR*. Nous avons

identifié de nombreux gènes impliqués dans le transport qui peuvent être régulés par ce SDC. Nous présumons que les gènes *kuP*, *trkA* et le gène BMEII1034 (*kefC*) impliqués dans le transport de K⁺ sont réprimés par PrlR et peuvent être impliqués dans la régulation de l'osmolarité par PrlS/PrlR. Les protéines de ces trois gènes chez *E. coli* sont impliquées dans le transport d'ions potassium sous l'effet hyperosmotique à un pH faible (Munro *et al.*, 1991; Trchounian, 1997; Trchounian and Kobayashi, 1999). Il serait donc intéressant de mettre en évidence le lien de PrlR avec ces protéines.

IV.3. Phénomène d'agrégation lié au système à deux composants PrlS/PrlR

Nous avons aussi vu le phénomène d'agrégation dans un milieu hyperosmotique (200 à 400 mM NaCl) chez la souche *B. abortus* 2308, mais chez les mutants *prlS* et *prlR* ce phénotype n'existe pas. Chez *B. abortus* il manque le locus de 25 Kpb contenant les gènes impliqués dans la production de polysaccharides (Vizcaino *et al.*, 2001). Ce résultat nous permet de supposer que la production d'EPS dans ces agrégats ne dépend pas de l'activité du locus de 25 kpb.

Les composants les plus intensivement étudiés de la matrice des agrégats sont des exopolysaccharides, suivis des protéines et des structures tels que des fimbria, pili (Bodenmiller *et al.*, 2004) l'ADN. La composition de ces polysaccharides peut varier selon les différentes bactéries. Les EPS sont les composants majoritaires de la matrice d'agrégats (Karatan and Watnick, 2009). Nous avons montré que les agrégats produits par la souche *B. melitensis* sauvage et les souches mutantes complémentées en condition de haute osmolarité peuvent produire de grandes quantités d'EPS contenant des résidus α -mannopyranosyl et α -glucopyranosyl en faisant le marquage des agrégats employant la lectine ConA couplée au FITC (Naismith and Field, 1996). Chez *B. melitensis*, dans les agrégats produits par la souche $\Delta vjbR$ un EPS riche en mannose colorable à la concanavaleine A-FITC est présent (Uzureau *et al.*, 2007). Les mutants *prR* et *prlS* ne produisent pas d'agrégats. Ces résultats nous font supposer que le système à deux composants PrlS /PrlR soit impliqué dans la régulation et la production de EPS en condition de haute osmolarité.

En outre nous avons trouvé dans les cibles révélés par les analyses transcriptomique, certaines cibles régulées par PrlR qui peuvent être impliqués dans la production d'EPS comme :

- Le gène BMEI1094 (exopolysaccharides production negative regulator) codant pour une protéine homologue à ExoR. ExoR est décrite chez *S. meliloti*, comme un inhibiteur du système à deux composants ExoS/ChvI. ExoS/ChvI sont les régulateurs clés de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de l'EPS, la formation de biofilm et la mobilité (Chen *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2004). En outre *chvG/chvI* et *BvrS/bvrR* homologues d'*exoS/chvI* des α -protéobactéries *A. tumefaciens* et *B. abortus* sont requis pour le changement des propriétés de surface (Guzman-Verri *et al.*, 2002; Sola-Landa *et al.*, 1998). Comme *exoR*, qui est un répresseur de l'EPS, est réprimé par PrlR, donc PrlR pourrait jouer un rôle comme activateur de la production d'EPS.
- On trouve aussi que le gène *mucS* (BMEI1194) est activé par PlrR. Le gène *mucS* code MucS, un activateur transcriptionnel de galactoglucane (EPSII) chez *S. meliloti* (Astete and Leigh, 1996); (Lloret *et al.*, 2002).
- Le gène BMEI1453 encode une protéine à domaine diguanylate cyclase/phosphodiesterase (EAL) (voir point I.2.1.2). Cette protéine catalyse la dégradation de c-di-GMP.(Christen *et al.*, 2005). Ce messenger secondaire est crucial dans la régulation de l'expression du flagelle, la formation de biofilm et l'expression de gènes de synthèse d'EPS chez *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. enterica* (Caiazza *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Mendez-Ortiz *et al.*, 2006; Toutain *et al.*, 2007). Cette protéine est réprimée par PrlR et ces données nous mènent à penser que PrlR pourrait activer l'expression de gènes impliqués dans la production d'EPS.
- Le gène BMEI0095 encodant la protéine succinoglycan biosynthesis regulator est activé par PrlR. L'homologue chez *S. meliloti*, *exsB*, codant une protéine qui contrôle la biosynthèse de succinoglycane (EPSI). Les mutants d'*exsB* de *S. meliloti* produisent une plus grande quantité d'EPS I par rapport à la souche

sauvage. En revanche, un nombre élevé de copies d'*exsB* entraîne une diminution au niveau d'EPS I. (Becker *et al.*, 1995). Il a été démontré aussi que cette influence n'est pas due à la régulation transcriptionnelle de gènes *exo*. (Becker *et al.*, 1995). PrlR induit *exsB* codant une protéine qui diminue la production d'EPS, est donc un régulateur négatif de la production d'EPS I.

Au vu de ces données concernant la régulation d'EPS, PrlR pourrait jouer un rôle d'activateur de l'expression de gènes impliqués dans la production d'EPS chez *B. melitensis*. Cette observation nous permettra de voir un lien entre le système BvrS/BvrR homologue d'ExoS/ChvI de *S. meliloti* impliqué dans la régulation de la synthèse d'EPS (Chen *et al.*, 2008), le système QS de *Brucella* aussi impliqué dans la production d'EPS (Uzureau, 2007) et PrlR impliqué également dans la régulation d'EPS. Dans différentes publications, la production d'EPS qui fait partie de la matrice cellulaire des agrégats pourrait avoir différents rôles. Dans plusieurs maladies produites par les bactéries, l'adhérence aux muqueuses ou aux cellules cibles est liée à la formation de biofilm. Ces processus sont liés à la virulence des bactéries.

La littérature fait souvent mention d'une régulation inverse entre la formation d'agrégats et l'expression du flagelle et que le seul phénotype associé à la mutation d'un gène homologue à *prlS* est l'atténuation de la mobilité chez *Aeromonas hydrophila* (Schmidt, 2001). Sachant que le système PrlR/PrlS régule la formation d'EPS donc il peut être cohérent de penser que PrlR/PrlS peut réguler le flagelle. Nous avons cherché à voir si le système PrlR/PrlS régulait l'expression du flagelle. Lors de ce travail, nous avons montré *in vitro* que *prlR* et *prlS* contrôlent l'expression du promoteur *pfliF* chez *B. melitensis* dans les conditions décrites par (Fretin *et al.*, 2005). Nous pouvons conclure de ce résultat que le SDC PrlR /PrlS est un activateur direct ou indirect du gène *fliF* (codant l'anneau MS de la base du flagelle). Nous avons aussi cherché si l'effet de PrlR et PrlS se manifeste sur des éléments structuraux plus externes du flagelle c'est-à-dire en suivant la production de FlgE et FliC par Western blot sans montrer aucun effet de ce SDC. Mais les résultats de l'analyse transcriptomique ont montré que 23 gènes répartis sur les trois loci flagellaires sont réprimés par PrlR.

Comme le flagelle (Lauriano *et al.*, 2004; Watnick *et al.*, 2001), les Omps (Burdman *et al.*, 1999), les adhésines (Li *et al.*, 2005; Sherlock *et al.*, 2005) ou l'ADN (Matsukawa and Greenberg, 2004; Spoering and Gilmore, 2006) peuvent être impliqués dans la production d'agrégats chez *B. melitensis*. Dans le cas de *C. jejuni*, le flagelle est impliqué dans la formation de biofilm et le phénomène d'auto-agglutination (AAG) (Guerry 2007). Le flagelle intervient également dans la formation de biofilm chez *Y. enterocolitica* ou chez différentes espèces d'*Aeromonas* (Kim *et al.*, 2008; Kirov, 1974; 2003; Nather *et al.*, 2006). Les souches défectueuses pour la biosynthèse du flagelle sont souvent incapables de former un biofilm (Korber *et al.*, 1994). Les études du profil transcriptionnel d'une série de bactéries suggèrent que l'expression de gènes flagellaires et la synthèse de la matrice d'EPS soient inversement régulées (Garrett *et al.*, 1999; Moorthy and Watnick, 2004; 2005; Prigent-Combaret *et al.*, 1999). Diverses études montrent l'implication des régulateurs dans le flagelle. Les gènes flagellaires sont nécessaires lors de l'infection de l'hôte et démontrent un rôle du flagelle dans la virulence (Fretin *et al.*, 2005) (Zygmunt *et al.*, 2006). Si nous considérons que l'expression de gènes flagellaires et la synthèse de la matrice d'agrégats (EPS) soient inversement, régulées, cela confirme alors le rôle de régulation de PrlR dans la formation des agrégats, la production d'EPS, le flagelle et le lien avec la virulence chez *B. melitensis*.

IV.4. Régulon du PrlR

L'analyse statistique des données transcriptomiques nous a permis d'identifier des gènes cibles potentiellement régulés par PrlR (régulon PrlR) chez *B. melitensis* c'est-à-dire la recherche d'acteurs potentiellement contrôlés par ce régulateur. Dans ce travail, nous avons montré que PrlR régule directement et indirectement l'expression d'une fraction significative des gènes du génome (6.41%) chez *B. melitensis* (tableau 11). PrlR régule des gènes localisés sur les deux chromosomes de *B. melitensis*. Cette information confirme le rôle de PrlR dans la régulation. En effet, PrlR contrôle les gènes impliqués dans les mêmes processus cellulaires telles que la virulence, la mobilité, le métabolisme, la biogénèse de l'enveloppe et de la paroi, les transports, la transcription/régulation. Par exemple, PrlR contrôle positivement

l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la production d'EPS, contrôle aussi l'expression de diverses OMPs et vraisemblablement l'expression du système flagellaire.

Dans la première partie du travail le phénotype d'agrégation présenté dans la souche sauvage et pas dans le mutant *prlR* a permis de mettre en évidence l'implication de PrlR dans la régulation de structures de surface comme le flagelle. Nous avons aussi montré l'effet de la régulation de PrlR sur la production de nombreuses Omps dû à la mutation de *prlR*. En outre, notre étude, basée sur notre analyse transcriptomique dans le mutant *prlR*, a montré l'implication de PrlR dans la régulation de l'expression de nombreux gènes encodant des protéines membranaires impliquées dans le transport de divers substrats : sucres, acides aminés, ions, oligopeptides, oligoéléments... Cette analyse montre que PrlR a un rôle majeur dans la régulation des structures de surface. Des observations semblables ont été faites chez *S. meliloti*, ExoS/ChvI, homologue aux systèmes à deux composants ChvG/ChvI et BvrS/BvrR des α -protéobactéries *A. tumefaciens* et *B. abortus*, est impliqué dans le contrôle de structures de surface comme l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de l'EPS, la formation de biofilm et la mobilité (Chen *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2004)(Chen *et al.*, 2008). D'autres études ont démontré l'implication de BvrS/BvrR dans la régulation des Omps (Guzman-Verri *et al.*, 2002). D'autre part les analyses des vésicules membranaires des mutants *bvrS* et *bvrR* du système à deux composants BvrS/BvrR de *B. abortus* par rapport à la souche sauvage ont confirmé le rôle de ce régulateur dans le contrôle de la production de nombreuses protéines périplasmiques impliquées dans le transport de substrats (Lamontagne *et al.*, 2007). En outre l'étude transcriptomique d'un mutant de *vjbR* chez *B. melitensis* a montré l'implication de VjbR dans le contrôle de la composition de la membrane et dans la virulence (Uzureau, 2007). Ces résultats nous donnent à penser que entre BvrS/BvrR, VjbR et PrlR il pourrait y avoir une relation. Pour tenter d'établir un schéma relationnel entre ces différents régulateurs et dans ce cas-ci entre PrlR et VjbR et PrlR et BvrR, il serait intéressant de tester l'expression de protéines cibles régulées par PrlR dans le double mutant de ces systèmes ($\Delta prlR$ - $\Delta vjbR$ et

$\Delta prlR$ - $\Delta bvrR$), et de la comparer à l'expression dans les simples délétants et la souche sauvage par Western blot. Donc une meilleure connaissance des signaux et des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des agrégats serait nécessaire pour comprendre la survie environnementale de *B. melitensis* et son implication dans la virulence.

Dans l'analyse transcriptomique sur le mutant *prlR*, nous avons identifié des protéines requises spécialement pour le métabolisme : le métabolisme des acides aminés (concerne aussi l'urée), les carbohydrates plus concernés au niveau du catabolisme de l'érythritol, ainsi qu'au niveau du cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphate. Lors de l'utilisation des galeries métaboliques nous avons signalé que les mutants du système à deux composants *prlS* et *prlR* peuvent croître sur certains substrats et perdre de la croissance avec d'autres substrats. Afin de confirmer cette hypothèse (que PrlR soit impliqué dans le métabolisme), nous avons testé la croissance du mutant *prlR* en différents substrats. Le seul phénotype le confirmant est la déficience de croissance sur proline comme source de carbone.

Les résultats de l'analyse transcriptomique ont été confirmés par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) sur les cibles les plus importantes régulées par PrlR c'est-à-dire une série de gènes impliqués dans la production d'EPS, le métabolisme de l'urée, des composants du cycle de Krebs, dans le remodelage de muréine et la division cellulaire. Il serait donc important de définir les cibles potentielles de PrlR en faisant des analyses protéomiques sur le mutant *prlR*, ce qui nous permettra la mise en évidence de nombreuses cibles régulées par PrlR pour confirmer les résultats transcriptomiques. En même temps il serait important de mettre en évidence les cibles directes de PrlR par la technique d'immunoprécipitation chromatinienne.

En ce qui concerne notre travail chez *B. melitensis*, il serait intéressant d'étudier in vivo les rôles de gènes en amont et aval de ce système à deux composants, c'est-à-dire les gènes *mcsL* et *pip*.

PARTIE V

CONCLUSION

VI. CONCLUSION

Le système de transduction du signal à deux composants (SDC) PrlS/PrlR est très conservé dans le génome des espèces de *Brucella*.

Dans ce travail de caractérisation des mutants du système à deux composants PrlS/PrlR, nous avons mis en évidence que *B. melitensis* peut être capable de produire des agrégats en condition de haute osmolarité et que les mutants *prlR* et *prlS* du système à deux composants PrlS/PrlR ne produisent plus ces agrégats. Nous avons aussi prouvé que les agrégats contiennent de l'EPS, c'est ce qui nous pousse à croire que la formation de ces agrégats est due à la régulation directe ou indirecte par ce SDC des gènes impliqués dans le phénomène d'agrégation et qu'il est aussi impliqué dans le contrôle de la production et de la synthèse d'EPS et également dans le contrôle de l'expression des diverses OMPs et vraisemblablement l'activateur du gène encodant l'anneau MS (*fliF*) du corps flagellaire basal, qui est la base de la construction flagellaire. Toutes ces données associées à l'atténuation importante des mutants après 4 semaines d'infection en modèle murin, nous donnent à penser que ce SDC joue un rôle important dans les capacités d'adaptation de *Brucella*.

Nous avons mis en évidence que le promoteur de *prlR* s'exprime au début de la phase de croissance en 2YT et que la mutation de *prlR* a peu d'effet sur le pic d'induction de son promoteur. En même temps nous avons montré que le promoteur *prlR* est actif au cours de l'infection intracellulaire. Sur base de résultats préliminaires, nous avons détecté une expression plus forte de la protéine PrlR en 2YT NaCl 400 mM par rapport au milieu 2YT seul. L'anticorps polyclonal anti-PrlR très spécifique que nous avons obtenu nous a permis de valider l'expression de cette protéine. Il serait important de caractériser la régulation de l'expression et l'activation de PrlR.

Il serait important de tester l'expression de *prlR* dans des mutants de délétion des différents gènes cibles chez *B. melitensis*. En ce qui concerne les gènes déjà identifiés, il faudrait tout d'abord valider la fonction biologique attribuée sur base de

leur séquence. Pour ce faire, des expériences de délétions et de complémentations devraient être réalisées.

L'analyse transcriptomique préliminaire des profils d'ARN total de la souche sauvage et du mutant *prlR* suggère que PrlR régule approximativement 6.41% du génome de *B. melitensis*. Au niveau de la régulation de PrlR, les conclusions les plus importantes de notre investigation sont l'implication de PrlR dans la régulation de nombreuses structures de surface comme la régulation du flagelle, l'implication dans la production et la synthèse d'EPS, la régulation de nombreuses Omps, la biogénèse d'enveloppe et de la paroi, le métabolisme, le transport de diverses molécules (acides aminés, sucre et autres) chez *B. melitensis*. Sur base de ces résultats, nous tirons la conclusion que PrlR peut réguler des gènes cibles importants. PrlR semble être un régulateur global impliqué dans le contrôle de processus cellulaires importants dans la capacité d'adaptation de *Brucella melitensis* pathogène intracellulaire ce qui reste à être investigué. Ces données, encore préliminaires, méritent d'être analysées en profondeur à l'avenir.

Le schéma de la figure 54 représente un modèle de régulation du flagelle et de l'EPS de *Brucella* dans lequel PrlR est impliqué et l'intégration de différents régulateurs sur la régulation des gènes flagellaires et de l'EPS.

FtcR est considéré comme le régulateur maître des gènes flagellaires (Leonard *et al.*, 2007). Il est démontré expérimentalement que FtcR se lie au promoteur du *fliF* et contrôle la production de FlgE et FliC. L'activité de *ftcR* est dépendante de *vjbR* (Leonard *et al.*, 2007).

VjbR et BlxR deux régulateurs de type LuxR qui ont un rôle d'activateur des gènes flagellaires. Ces deux gènes régulateurs activent leur propre promoteur mais s'activent réciproquement (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). VjbR et BlxR sont impliqués dans la régulation du flagelle et du système de sécrétion type IV (Delrue *et al.*, 2005; Rambow-Larsen *et al.*, 2008)

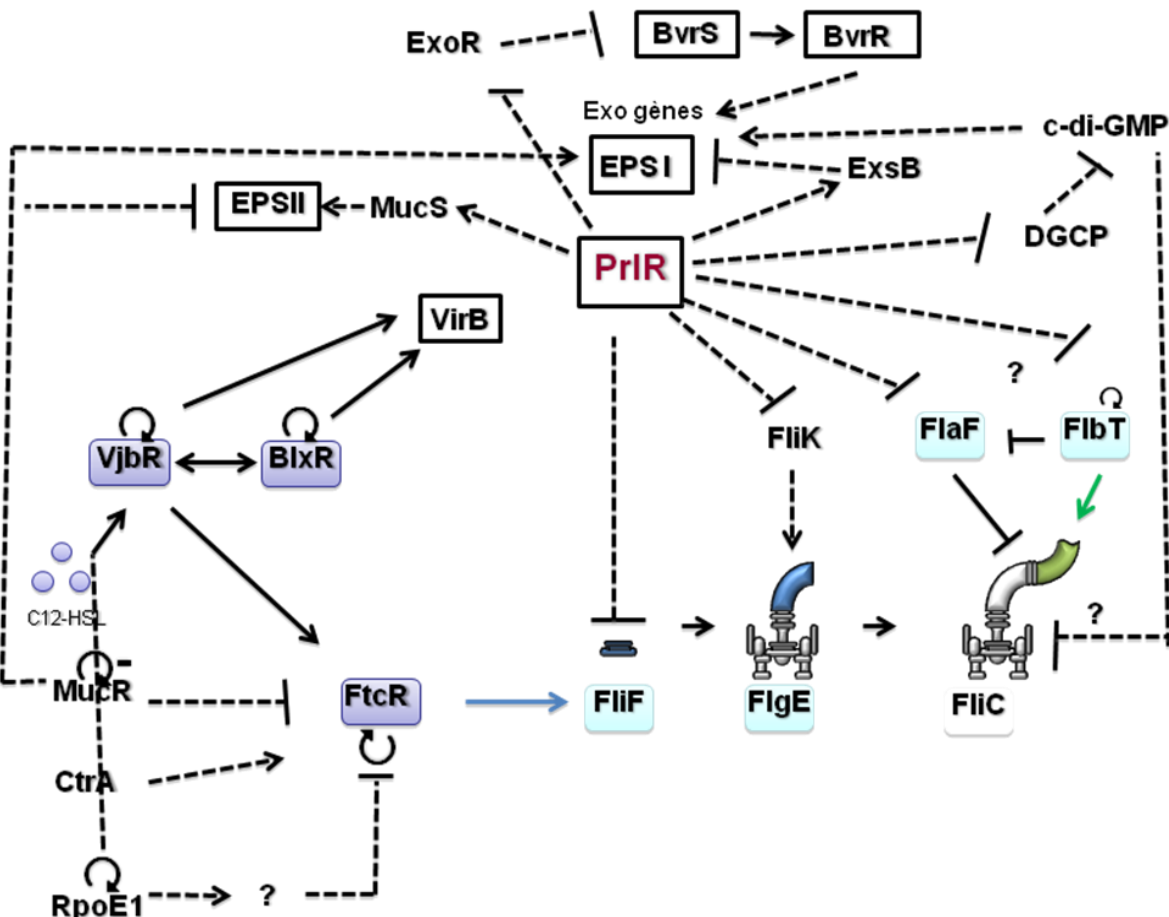


Figure 54 : Schéma de la cascade hiérarchique de régulation de flagelle de *Brucella* et la cascade de régulation d'EPS dans lequel intervient PrlR. Une auto-régulation est présentée par une flèche circulaire. Une activation est présentée par une flèche pleine. Une activation hypothétique est présentée par une flèche en pointillée. Une barre représente une répression.

La C12-HSL a un effet sur le mutant *vjbR* et aussi sur les gènes flagellaires (Uzureau *et al.*, 2007). Il est probable que les C12-HSL inhibent l'activité de *vjbR* sur les gènes flagellaires (Delrue *et al.*, 2005).

La mutation de *rpoE1* induit une surexpression des gènes flagellaires *fliF*; *flgE*, *fliC*, *flbT* et *flaF*, ces gènes flagellaires sont inhibés par le facteur RpoE1 donc, le facteur RpoE1 contrôle l'expression d'un gène codant un inhibiteur de gènes flagellaires qui probablement pourrait contrôler directement ou indirectement *ftcR* pour contrôler les gènes flagellaires, et aussi produire une auto-régulation de *rpoE* tel que décrit chez d'autres bactéries (Rhodius et al 2006).

Pour l'analyse transcriptomiques nous avons montré que PrlR réprime les gènes du système flagellaire comme *fliF*, *fliK*, *flbT*, *flaF*, *flgE*, et *fliC* donc pourrait avoir un lien avec le facteur RpoE1 en tant que répresseur du flagelle.

Notons que le coude flagellaire est probablement contrôlé par FliK comme chez *S. meliloti* (Eggenhofer *et al.*, 2006).

PrlR réprime aussi le gène BMEI143 (DGCP) impliqué dans la dégradation de c-di-GMP (Christen *et al.*, 2005). Ce messenger secondaire et crucial dans l'expression du flagelle, la formation de biofilm et l'expression de gènes de synthèses d'EPS chez *P. aeruginosa*, *E. coli* (Mendez-Ortiz *et al.*, 2006; Toutain *et al.*, 2007)

En outre, les régulateurs CtrA et MucR pourrait contrôler l'expression des gènes flagellaires. CtrA comme activateur et MucR comme répreur de *ftcR* chez *Brucella*. MucR est caractérisé comme régulateur de la production de l'EPS et de la mobilité chez *S. meliloti*. (Ranaudi *et al* 2009)

Dans notre schéma de régulation PrlR réprime le gène BMEI1094 homologue d'*exoR*, ExoR est un régulateur négatif du système à deux composants ExoS-ChvI chez *S. meliloti* homologue du système BvrS-BvrR de *Brucella* (Guzman-Verri *et al.*, 2002). Ces systèmes pourraient être impliqués dans la régulation de gènes impliqués dans la synthèse d'EPS, la formation de biofilm et le flagelle. ExoR est physiquement associé à *exoS*. (Chen *et al.*, 2008).

PrlR active le gène BMEI0095 homologue d'*exoB* de *S. meliloti*. Le gène *exoB* code pour une protéine ExsB qui diminue la production d'EPS (Becker *et al.*, 1995) donc PrlR agirait comme un répresseur d'EPS.

Finalement PrlR active le gène *mucS* impliqué comme activateur transcriptionnel d'EPS de type II chez *S. meliloti* (Lloret *et al.*, 2002). MucR est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle de *mucS*. Un double mutant *exoR-exoS* ne produit pas galactoglucane (Lloret *et al.*, 2002).

Au terme de ce travail, nous pensons avoir contribué à mettre en évidence une partie du régulon potentiel de PrlR chez *B. melitensis*.

PARTIE VI

MATÉRIEL

&

MÉTHODES

VI. MATÉRIEL ET MÉTHODES

VI.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes de *Brucella* spp. utilisées dans ce travail sont dérivées de *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308. Les souches d'*E. coli* ont toutes été cultivées à 37°C dans un milieu solide ou liquide Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al* 1989). Les souches d'*E. coli* DH10B (Invitrogen Life-technologies), DB3.1 (Invitrogen Life-technologies), S17-1 (Simon *et al* 1983) et BL21(DE3) (Novagen) ont été utilisées respectivement pour le clonage, la conjugaison avec *B. melitensis* et *B. abortus*, et la surproduction de PrlR. La souche de surproduction de protéine His₆-PrlR a été cultivée à 37°C dans un milieu complexe 2YT (extrait de levure 1%, tryptone 10g litre⁻¹, NaCl 5g litre⁻¹), contenant les antibiotiques appropriés aux concentrations finales suivantes : acide nalidixique (Nal), 25 µg/ml ; kanamycine (Kan), 50 µg/ml, ampicilline (Amp), 100 µg/ml, gentamycine (Gm), 20 µg/ml et chloramphénicol (cm), 20 µg/ml.

Pour préparer les extraits protéiques totaux de *B. melitensis* et de *B. abortus*, les bactéries ont été cultivées dans une étuve à 37°C sous agitation pendant une nuit. Les cultures bactériennes ont ensuite été diluées dans 10 ml de 2YT pour obtenir une DO₆₀₀ finale de 0,05. Après elles sont soumises à une incubation à 37°C jusqu'à leur phase stationnaire de croissance. Les bactéries sont ensuite inactivées à 80°C pendant 1 heure. Les cultures ont ensuite été centrifugées et les extraits ont été resuspendus dans du tampon de chargement pour gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl-sulfate (SDS-PAGE) à une DO₆₀₀ finale de 10.

VI.2. Constructions plasmidiques

Les plasmides pGEM-T (Promega), pDONR201, pBBRmcs4GW, pMR10GW et pBBR1-GFP ont été utilisés pour les clonages, le plasmide pET15b (Novagen) pour la surproduction de la protéine His₆-PrlR recombinante et le plasmide pBBR1-MCS (Kovach *et al.*, 1994) comme vecteur navette, puisqu'il est réplcatif à la fois dans *E.*

coli et dans *Brucella*. Le tableau A1 (annexe I) reprend la liste des amorces dont nous nous sommes servis au cours de ce travail.

Les souches disruptantes *prlR* et *prlS* ont été construites par intégration du plasmide pSKoriT::*prlR*KanR ou pSKoriT::*prlS*KanR qui porte un fragment interne des gènes *prlS* et *prlR* chez *B. melitensis* et *B. abortus* amplifié par PCR sur l'ADN génomique de chacun, pour *prlR* avec les amorces F*prlR* 5'-GCATTCATTATCGCTGATG-3' et R*prlR* 5'-TCAGCCGATTTGGAGATGAAAC-3', et pour *prlS* avec les amorces F*prlS* 5'-TATGCAGGGCTGGGGGATC-3' et R*prlS* 5'-TCACAGCGCGATATAGGGAATG -3'. Les amorces R contiennent un codon stop TGA pour éviter la production d'une protéine tronquée fonctionnelle. Les produits amplifiés ont été insérés dans le site *EcoRV* du vecteur mobilisable pSK-oriTKan. Les souches de *E. coli* S17-1 transformées par les plasmides pSKoriT::*prlR*KanR et pSKoriT::*prlS*KanR ont permis de transférer ces plasmides à *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308 par conjugaison, et les clones résultants sont Nal^R et Kan^R. Un événement simple de recombinaison homologue conduit à l'intégration du plasmide dans le chromosome.

Les mutants propres Δ *prlR* et Δ *prlS* ont été construits par amplification de la région amont de chaque gène par PCR, sur l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M, avec les amorces F1-D1607 : 5'-GGGTTTCGGCATAGGCAAG-3' et R1-D1607 : 5'-AAACAGCGGGTGGTCATCAGCGATAATGAAATGCATTTG-3' et la région aval avec les amorces, F2-D1607 : 5'-ATCGCTGATGACCACCCGCTGTTTAGCGACGTTCTGGGCGTTTGA-3' et R2-D1607 : 5'-CCGCCAGCCGAAGAGGTTA-3'; et *prlS* avec les amorces F1-D1606: 5'-CAGGGCGAATTCCTGAAATTC-3' et R1-D1606: 5'-CATTCCTCCCTTAGGCTTG-3' et la région aval avec les amorces, F2-D1606: 5'-CAAGCCTAAGGGAGGAACGATAAGCGGCAAAGGCCGA-3' et R2-D1606: 5'-ACGGGACTTTCCGGACTTGT-3', ensuite une deuxième PCR a été réalisée avec les amorces F1-D1607 et R2-D1607 pour *prlR* et avec les amorces F1-D1606 et R2-D1606 pour *prlS* (1606). La PCR d'assemblage est clonée dans le plasmide pGEM-T Easy comme décrit précédemment.

Pour la construction des plasmides de complémentation un fragment de 3521 bp contenant le gène *prlS* a été amplifié par PCR, sur l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M en utilisant les amorces attB1prlS 5'-**GGGGACAAGTTTGTCAAAA AAGCAGGCTCGATGCCGGCTATGCAG**-3' et attB2prlS 5'-**GGGGACCACTTTG TACAAGAAAGCTGGGTATTATCGTGTACTGCC**-3', ce fragment a été cloné dans le plasmide pDONR201 par réaction BP.

Pour la complémentation chromosomique des mutants *prlR*, nous avons amplifié par PCR la séquence de 647 bp de *prlR* et une région en amont et en aval de 501pb sur le ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M, en utilisant les amorces prlR amont 501 5'-ACGAGATCCCATGTGGTATTT-3' et prlR aval 501 5'-CCTCTTCGGCTGGCGG CGC-3'.

Le plasmide contenant le promoteur *prlR* fusionné à la *gfp* (pBBRpprlR-*gfp*) a été construit pour amplification sur l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M d'un fragment de 549 pb correspondant à la région amont de *prlR* et utilisant les amorces pprlR amont Asp718 5'-ATAGGTACCATCCCATGTGGTATT-3' et pprlR aval BglII 5'-ATTAGATCTTGCCGCAAAGCACCGCG-3'.

Les constructions permettant la fusion des promoteurs prlR ou prlS à lacZ ont été construites à partir des amplifications de promoteur à l'aide des amorces suivantes. Les amorces pprlR amont *Xba*I 5' ATATCTAGATCCATGTCCGCGACGAG-3' et pprlR aval *Bam*HI 5'-ATTGGATCCTGCCGCAAAGCACCGCG-3' pour le promoteur de *prlR* (566 pb). Les amorces pprlS amont *Xba*I 5'ATATCTAGATCACGAATGCGGATCGCA3' et pprlS aval *Bam*HI 5'ATTGGATCCAGCAGGTATAAAAAGGC3' pour le promoteur *prlS* (569 pb).

La souche BL21(DE3) transformée par pET15b*prlR* a été cultivée en LB contenant de l'ampicilline, additionné de 1 mM d'IPTG (isopropyl-β-D-Thiogalactosidase) dès la phase exponentielle de croissance afin d'induire la production de l'ARN polymérase du bactériophage T7, de déréguler le promoteur T7lac du pET15b*prlR*, et donc d'induire la surproduction de la protéine recombinante His₆-PrlR (voir point IV.10).

VI.3. Infection en cellules, marquage des bactéries et observation au microscope

On procède à une infection de monocouches de cellules (trophoblastes humains JAR713 et macrophages bovins SV40) à sous-confluence à raison de 300 bactéries par cellule (*multiplicity of infection* ou MOI de 300) dans du RPMI1640 10% FCS (Fetal Calf Serum décomplémenté, Difco) et 2mM de L-glutamine (Difco). Les cellules sont cultivées dans des plaques 24 puits. Une fois les bactéries placées au contact des cellules, les plaques sont centrifugées 10 min à 1200 rpm afin de favoriser le contact des bactéries avec les macrophages. Les plaques sont incubées 1 heure dans une atmosphère avec 5% de CO₂ à 37°C. Après, les cellules sont traitées à la gentamycine (50 µg/ml), afin de tuer les bactéries extra-cellulaires. Les cellules infectées sont ensuite incubées durant différents temps, jusqu'à 48h post-infection. On libère les bactéries intracellulaires en lysant des cellules infectées avec du PBS Triton X100 0.1%. On met les dilutions sériées des lysats cellulaires sur milieu solide 2YT, afin de dénombrer les bactéries intracellulaires vivantes capables de former des colonies (ou CFU pour *colony forming units*).

VI.3.1. Préparation pour l'observation en microscopie

Pour réaliser la microscopie, les cellules sont cultivées en plaques 24 puits sur coverslips. L'infection est également réalisée à raison de 300 bactéries par cellule. Après 48 heures, les coverslips sont lavés 3 fois avec 500 µl de PBS pH7.4. Ensuite ils sont incubés pendant 20 min dans 400 µl de paraformaldéhyde 4% en PBS pH7.4 à température ambiante, puis lavés dans 500 µl de PBS 1X. Ils sont traités avec 500 µl de PBS 1 % de BSA, 0.1 % de Triton X100 pour perméabiliser les cellules pendant 10 min, puis lavés avec 500 µl de PBS (3 fois), ils sont alors incubés avec l'anticorps primaire monoclonal A7612G12 dirigé contre la chaîne O du LPS (Cloeckaert *et al.*, 1992), dilué 500 fois en PBS-BSA 1%. Chaque coverslip est déposé, cellules dirigées vers le bas, dans une goutte de 25 µl d'anticorps primaire sur une languette de parafilm. Les coverslips sont alors placés dans une chambre humide pendant 1 nuit à température ambiante. On réalise ensuite 3 lavages en PBS-BSA 1%, puis les coverslips sont incubés avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa-568 (ou au Texas-

Red) dilué 1000X (Jackson ImmunoResearch Laboratories) pendant 1 heure à température ambiante. Après, 3 lavages en PBS-BSA 1% sont réalisés, puis les coverslips sont montés sur lame avec du milieu de montage Mowiol 4.88 (Aldrich). Le montage est réalisé pendant 1 nuit à température ambiante à l'obscurité, avant de l'observation en microscopie.

VI.4. Infection des souris

Ces infections sont réalisées sur des souris BALB/c âgées de 6 à 8 semaines suivant la procédure de l'article de Fretin *et al.* (Fretin *et al.*, 2005). Elles sont infectées par voie intrapéritonéale avec une suspension de 10^5 bactéries dans du PBS (0.2 ml), pour chaque souche testée. Après une 1 ou 4 semaines d'incubation, les souris sont tuées par dislocation cérébrale et leur rate est récupérée et broyée dans 2 ml de PBS 0,1% Triton X100. Des dilutions de ces broyats sont ensuite déposées sur boîtes de 2YT agar afin de dénombrer le nombre de bactéries (CFU) par rate.

Les données sont exprimées en logarithme du nombre de CFU par rate. Les résultats obtenus ont été analysés par ANOVA.

VI.5. Southern blotting

Après l'extraction de l'ADN chromosomique, celui-ci a été digéré toute la nuit avec les enzymes de restriction *EcoRV* ou *HindIII*. La séparation a été faite par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, suivie d'un transfert sur une membrane de nylon chargée positivement (Hudbond N⁺, Amershan). Les sondes d'ADN utilisées au cours de ce travail ont été obtenues par amplification PCR. Les fragments d'ADN ont été marqués avec le kit « Randon Primed DNA Labeling » (Invitrogen). Le marquage a été réalisé grâce à l'incorporation de ^{32} P α -dCTP lors de l'élongation par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. L'hybridation a été réalisée en conditions stringentes.

VI.6. Marquage d'EPS dans les agrégats avec la Concanavaline A couplée au FITC

Pour l'observation d'exopolysaccharide (EPS) en microscopie à fluorescence, 500 μ l de paraformaldéhyde (PFA) sont ajoutés à 0,1 ml de suspension bactérienne, pour

fixer les cellules. Après l'avoir incubé 20 min à température ambiante, le mélange a été centrifugé 3 min à 7000 rpm. Le culot a ensuite été resuspendu dans 0,05 ml de concanavaline A (ConA-Isothiocyanate de fluorescéine (FITC) 1mg/ml dans NaCl 0,2% et 1 µl 20mM d'iodure de propidium). On laisse ensuite 30 min à l'obscurité à 37°C. La suspension est ensuite centrifugée 3 min à 7000 rpm. Le culot est resuspendu dans 100 µl de PBS pH 8,5, et recentrifugé 3 min à 7000 rpm (2 fois). Finalement le culot est resuspendu dans 100 µl de PBS. 5 µl de la suspension sont déposés sur lame pour l'observation en microscopie de fluorescence.

VI.7. Viabilité des bactéries dans les agrégats

Pour montrer la viabilité des bactéries dans les agrégats, on prélève 100 µl de suspension bactérienne, on lui ajoute 1 µl de SYTO® 9 3.34 mM et 1 µl d'iodure de propidium 20mM, composants du kit (Live/Dead BacLight Bacterial Viability kits, Invitrogen). Le mélange est incubé 15 min à température ambiante à l'obscurité. Les bactéries sont ensuite observées au microscope de fluorescence. Nous avons utilisé le filtre FITC (excitation 480 nm, excitation 520nm) pour la fluorescence verte et le filtre Texas-Red pour la fluorescence rouge (excitation 596nm, excitation 635 nm). Les bactéries avec les membranes intactes et celles avec les membranes endommagées sont colorées avec le SYTO® 9. En revanche l'iodure de propidium pénètre seulement les bactéries avec les membranes endommagées, causant une réduction de fluorescence de la souche à SYTO 9.

VI.8. Analyse en Dot blot

Des extraits bruts ont été préparés comme pour l'extraction des protéines mentionnées ci-dessus. Les extraits bruts concentrés à une DO₆₀₀ de 10 ont été employés pour faire des dilutions doubles. Deux microlitres de chaque dilution ont été appliqués sur une membrane de nitrocellulose (Hybond Amersham). L'immunodétection d'*outer membrane proteins* (OMP) a été exécuté avec des anticorps monoclonaux (Cloeckaert *et al.*, 1990) suivants : anti-Omp36 (A68/25G5/A5) dilué 1/100, anti-Omp31 (A59/10F9/G10) dilué 1/100, anti-Omp25 (A68/4B10/F5) dilué 1/100, anti-Omp19 (A68/25H10/A5) dilué 1/5, anti-Omp16 (A68/08CO3/G03) dilué

1/10 et anti-Omp10 (A68/7G11C10) dilué 1/5). La détection des anticorps a été réalisée en utilisant des anticorps secondaires de chèvre anti-souris conjugués à la peroxidase HRP (Amersham) (dilué 1/5000). La détection des anticorps HRP a été réalisée par chémoluminescence grâce aux réactifs du kit de révélation ECL (Amersham Pharmacia Biotech). L'Omp16 (lipoprotéine PAL) a été utilisé comme contrôle de chargement. Cette protéine n'a montré aucun changement dans les différentes conditions examinées. Les résultats de la révélation sont observés par autoradiographie grâce à des films Fujifilm (Fuji Medical X-Ray Film).

VI.9. Migration de protéines en gel SDS-PAGE et Western blot

Du milieu riche (2YT) a été inoculé avec les souches d'intérêt puis placé dans une étuve à 37°C sous agitation pendant une nuit. Les cultures bactériennes ont ensuite été diluées dans 10 ml de 2YT pour obtenir une DO₆₀₀ finale de 0,05. Après une incubation à 37°C, les bactéries ont été inactivées à la chaleur lors d'une incubation d'une heure dans un bain à 80°C. Les cultures ont ensuite été centrifugées et les culots resuspendus dans du PBS 1X dans un volume tel que la DO₆₀₀ finale soit égale à 10. Ces cultures concentrées et inactivées sont ensuite conservées à -20°C.

20 µl d'échantillon contenant 1 µl de bleu de chargement (SDS 5%, Tris 62,5 mM, 2-mercaptoéthanol 25%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,025%, pH 6,8) sont bouillis 5 min, et déposés sur gel. Les protéines sont séparées par migration dans un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) 12% et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Pharmacie Biotech) pour la technique de transfert semi-sec (Biorad).

La détection de protéines a été réalisée dans les lysats totaux de cellules avec un anticorps polyclonal anti-FliC (dilué 1/3000) et anti-FlgE (dilué 1/5000) après saturation dans PBS-lait 5%). La détection des anticorps a été réalisée en utilisant un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin conjugués à la peroxidase HRP (Amersham). La détection de l'HRP a été réalisée par chémoluminescence grâce aux réactifs du kit de révélation ECL Western blotting RPN2209 (Amersham Pharmacia

Biotech). Les résultats de la révélation sont observés par autoradiographie grâce à des films Fujifilm (Fuji Medical X-Ray Film).

Pour la détection de la protéine PrlR, nous avons prélevé des échantillons de cultures bactériennes à une DO₆₀₀ de 0,1; 0,2 et 1. Nous avons concentré tous les échantillons à une DO de 10 pour les analyser en Western blot, tel que décrit ci-dessus

Le Western blot a été réalisé avec les anticorps polyclonaux anti-His₆-PrlR que nous avons obtenus en immunisant les lapins (dilué 1000x), après saturation avec du PBS-lait 5%. La détection des anticorps a été réalisée tel que décrit ci-dessus.

VI.10. Surexpression, purification et renaturation de la protéine His₆-PrlR

Après la culture de la souche BL21(DE3) porteuse du plasmide pET15BprlR et son induction avec 1 mM d'IPTG, les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 4000 rpm à 4°C et resuspendues à raison de 4 ml par 50 ml de culture dans du tampon de lyse ajusté à pH 8 (3,6 ml de PBS, 400 µl de Triton X100 10%, 40 µl de PMSF 100 mM). Les bactéries étaient ensuite lysées par sonication. Les lysats ont été centrifugés à 40000 rpm à 4°C pour en séparer la fraction insoluble. La fraction insoluble a été resuspendue avec un tampon de contenant de la guanidine 6M, ajusté à pH 8 (0,5 M NaCl, 20 mM TrisHCl, 6 M guanidine). La suspension est incubée 1 nuit, et ensuite analysée sur gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie.

La protéine recombinante His₆-PrlR a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de 3 ml de résine (IMAC Sepharose High Performance Media, GE Healthcare) chargée aux ions nickel, en conditions dénaturantes, à l'aide d'imidazole dans le tampon d'élution contenant également de la guanidine à 6 M (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 500 mM d'imidazole et 6 M de guanidine à pH 8). Il est à noter que la résine a été lavée et conditionnée avec le tampon de lavage (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20 mM d'imidazole et 6 M de guanidine à pH 8) préalablement à l'élution. La protéine His₆-PrlR recombinante purifiée a été analysée par SDS-PAGE dans l'échantillon élué, après précipitation au TCA 10% (acide

trichloré acétique) après 30 min d'incubation à 37°C. Ensuite on a centrifugué à 40000 rpm à 4°C pour en séparer la fraction insoluble. Le gel SDS-PAGE a été coloré au bleu de Coomassie.

Après purification, la protéine His₆-PrlR recombinante a été renaturée par dialyse contre du tampon Tris-HCl 20 mM et 500 mM NaCl à pH 8 dans un premier bain durant 2 heures à 4°C sous agitation, suivis d'un autre bain dans le même tampon durant 12 heures à 4°C sous agitation. La protéine His₆-PrlR resolubilisée a ensuite été concentrée par ultrafiltration sur membrane Amicon Ultra15 de Millipore et sa concentration a été évaluée par la méthode BCA (acide bicinchoninic, Sigma). Après SDS-PAGE, la protéine a été visualisée par bleu de Coomassie et coloration au nitrate d'argent.

VI.11. Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine His₆-PrlR

Les anticorps très spécifiques dirigés contre His₆-PrlR de *B. melitensis* ont été obtenus par immunisation après trois injections intramusculaires de deux lapins. La première immunisation a été réalisée avec 171 µg de protéine recombinante purifiée His₆-PrlR dans 300 µl de tampon Tris-HCl 20 mM et 500 mM NaCl à pH 8 et 300 µl d'adjuvant de Freud. Après 43 jours les lapins ont été immunisés une deuxième fois avec 85 µg de protéine purifiée dans les mêmes conditions que la première fois et une troisième fois avec 50 µg après 50 jours de la deuxième immunisation. Pour les analyses par Immunoblot, les protéines ont été soumises à une migration électrophorétique sur gel SDS-PAGE, et transfert sur membrane de nitrocellulose Hybon-C (Amersham Pharmacia Biotech). Les immunoblots ont été testés avec l'anticorps polyclonal anti-His₆-PrlR dilué 1000X. La détection a été réalisée par chémoluminescence avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit de révélation ECL Western blotting (Amersham Pharmacia Biotech).

VI.11.1. Réponse sérologique du lapin contre His₆-PrlR par ELISA

La réponse sérologique du lapin contre His₆-PrlR a été analysée en ELISA, pour ce faire nous avons déposé 100 µl de la protéine (10 µg/ml) purifiée par puits dans une

plaque 96 puits (MaxiSorp Nunc, Denmark). Après avoir incubé toute la nuit à 4°C, la plaque a été saturée en ajoutant 250 µl de PBS HC (Hydrolysate de caséine). On la laisse ensuite 2 heures à température ambiante, puis le surnageant est éliminé. Des dilutions de sérum de lapin sont faites en déposant 50 µl de sérum de lapin anti-His₆-PrIR dans 100 µl de PBS HC dans le premier puits et des dilutions de 3 en 3 sont réalisées avec du PBS dans les puits suivants. Les plaques sont incubées pendant 1 heure à température ambiante, puis lavées 3 fois avec du PBS. Le contenu des puits est éliminé, et 50 µl d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué 2000X, sont ajoutés et les plaques sont incubées 1 heure à température ambiante. Après avoir fait 3 lavages et 100 µl de K-blue sont ajoutés dans chaque puits (Enhansend-K-blue-TMB substrat 388177, Neogen Corporation Lexington). Les plaques sont incubées 10 min environ, et 100 µl de H₂SO₄ 2 N sont ajoutés dans chaque puits. L'absorbance a été mesurée à 405 et 630 nm en lecteur de multiplaque.

VI.12. Mesure de l'activité β -galactosidase

Pour quantifier l'activité des promoteurs *pprlR* ou *pprlS*, les plasmides pBBRmcs1-*lacZ* porteur des promoteurs fusionnés au rapporteur *lacZ* encodant la β -galactosidase ont été transférés par conjugaison dans la souche sauvage et dans les mutants *prlR* et *prlS*. Les souches résultantes ont été cultivées en milieu 2YT sous agitation à 37°C contenant du chloramphénicol (20µl/ml) pendant 24 heures, ensuite ces souches ont été cultivées en triplicat, sous agitation, à une DO₆₀₀ de départ de 0,05. Un dosage de la β -galactosidase a été réalisé en suivant la méthode décrite par Miller (Miller, 1972). La β -galactosidase est une enzyme qui clive des liens β -galactosidiques. Elle est capable d'hydrolyser le substrat chromogène synthétique ONPG (*O*-nitrophenyl- β -D-galactoside) en générant de l'*O*-nitrophénol.

Après différents temps de culture, la DO₆₀₀ a été mesurée et 1 ml de culture a été prélevé et centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min. Le surnageant fut éliminé et le culot a été resuspendu dans 1 ml de tampon Z contenant du β -mercaptoéthanol, auquel 3 gouttes de chloroforme et 2 gouttes de SDS 0,1% sont ajoutés pour perméabiliser les cellules bactériennes. Chaque tube a alors été vortexé pendant 10

secondes et incubé 10 min à 28°C. Ensuite à intervalle de 0,5 sec min on ajoute 0,2 ml de substrat chromogène ONPG en générant de l'O-nitrophénol un composé jaune. L'incubation en présence d'ONPG est réalisée à température ambiante. Pour stopper la réaction, 0,5 ml de Na₂CO₃ 1 M sont ajoutés chaque 0,5 min. Le Na₂CO₃ donne un pH de 11 à la réaction, à ce pH la majorité l'O-nitrophénol est convertie en forme anionique un composé jaune. Le mélange est centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min, 1 ml de surnageant est prélevé et sa DO₄₂₀ est mesurée. Les résultats sont exprimés sur la forme d'unités Miller.

Unités de la β -galactosidase = $1000 \times (DO_{420}/DO_{600}) \times (1/t \text{ (min)}) \times \text{facteur de dilution}$

Composition du tampon Z : 8,05 g Na₂HPO₄.7H₂O; 2,75 g NaH₂PO₄.H₂O; 0,375 g KCl; 0,123g MgSO₄.7H₂O, ajuster à pH 7 et porter à 0,5 litre. On ajoute 2.7µl/ml de β -mercaptoéthanol

VI.13. Extraction d'ARN total de *Brucella* spp. avec le kit TRIzol

Des échantillons d'ARN totaux ont été préparés avec la souche sauvage (WT) de *B. melitensis* 16M et le mutant $\Delta prlR$, au début de la phase de croissance de la culture en 2YT liquide, à une DO₆₀₀ = 0.2, avec 45 ml de ces cultures (en triplicat). Les cultures ont été centrifugées à 3500 rpm pendant 15 min. Les culots bactériens ont été resuspendus dans 100 µl de SDS 10%, 20 µl de protéinase K (20 mg/ml, Invitrogen) et 20 µl de RNaseOUT (Invitrogen) et incubés à 37°C avec agitation pendant 1 heure. Ensuite 5 ml de réactif TRIzol® Reagent (Invitrogen) sont ajoutés. La suspension est ensuite vigoureusement agitée quelques secondes. Après 10 min d'incubation à 65°C, 1 ml de chloroforme est ajouté à la suspension et elle est ensuite placée sous agitation pendant 15 à 20 secondes. L'échantillon est ensuite incubé 5 à 10 min à température ambiante et centrifugé à 1400rpm pendant 15 min à 4°C. On récupère alors délicatement la phase aqueuse dans un nouveau tube et l'ARN est précipité en y ajoutant 2,5 ml d'isopropanol. Les échantillons sont stockés à -20°C durant la nuit, après on centrifuge pendant 30 minutes à 14000 rpm à 4°C, on élimine le surnageant et on ajoute 1 ml d'éthanol 75% RNase Free sur le culot. On centrifuge pendant 5

minutes à 8500 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est séché (10-15 minutes à température ambiante). Le culot est resuspendu dans 50 à 100 µl d'eau RNase Free et on incube 10 min à 55°C. Ensuite le traitement à la DNase est réalisé avec le kit approprié (DNaseI, RNase-Free, Fermentas). L'ARN est élué avec 100 µl d'eau « RNase-Free » et stocké à -80°C. L'intégrité de l'ARN et l'absence de l'ADN ont été vérifiées par électrophorèse. La quantité d'ARN a été mesurée avec l'appareil NanoDrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific) et par dépôt sur gel d'agarose 1,5%.

VI.14. Design et expérimentation de Microarray (« Puces à ADN »)

La technologie des damiers à ADN à haute densité, a pour avantage de permettre l'analyse de l'expression de tous les gènes au niveau ARNm sur un simple microdamier (Leming 2002). Sur le microdamier sont fixées des petites séquences d'acides nucléiques simple brin. Chaque séquence du damier est unique et spécifique d'un seul gène. Les séquences génétiques à analyser, issues d'échantillons biologiques, sont marquées et déposées sur le microdamier. Après l'hybridation et après les étapes de lavage, le damier est scanné et une image informatique de celui-ci est acquise.

Le design des damiers à ADN et l'expérimentation sur les damiers (hybridation, scan, acquisition d'image, extraction et analyse des données) ont été réalisés par la firme NimbleGen™ Systems, Inc. Le design des amorces pour les chromosomes I (NC-003317) et II (NC-003318) de *B. melitensis* 16M a été fait à raison de 20 sondes par gène (10 sondes avec hybridation parfaite et 10 sondes avec un *mismatch*). Chaque sonde (60 mères) est présente en triplicats sur le damier.

En résumé l'ARN de chaque souche a été rétro-transcrit en ADNc double brin et l'ADNc est marqué avec le fluorochrome Cy3. Cette expérience a été faite en triple. Chaque échantillon d'ADNc a été déposé sur le microdamier portant des oligonucléotides correspondant à l'ensemble des séquences codantes prédites du génome de *B. melitensis* sous forme de spots. Après l'hybridation, l'intensité de signal fluorescent par spot dépend du taux d'expression de chacun des gènes. Chaque damier est scanné en vue d'acquies une image avec le logiciel Niblescan, avec les

différentes intensités par sonde. En suite un software permet à partir des images acquises d'extraire les données et ensuite de les traiter pour analyser la différence d'expression des gènes entre les souches wt et $\Delta prlR$.

Pour l'analyse des données, NimbleGen™ Systems applique l'analyse statistique RMA (Robust Multi-Array Analysis) (Bolstad *et al.*, 2003) (Irizarry *et al.*, 2003a) (Irizarry *et al.*, 2003b) qui permet un pré-traitement ('pre-processing') des données. Cet algorithme permet une correction pour le bruit de fond, une normalisation de damier à damier (qualifiée de « quantile normalization ») et un contrôle qualité des données :

La normalisation : elle vise à équilibrer les signaux entre damiers et est réalisée par l'algorithme RMA sur base de la méthode appelée « quantile normalization » (Boes and Neuhauser, 2005). Cette méthode suppose que les distributions d'intensité pour tous les damiers sont les mêmes pour une souche donnée et ajuste les différents damiers de telle sorte que les quantiles pour chaque damier deviennent équivalents.

Les profils d'expression obtenus pour la souche $\Delta prlR$ ont été comparés aux profils obtenus pour la souche sauvage (wt), le « foldchange » a été calculé comme le rapport des moyennes de l'intensité de signal de chaque spot de trois mesures indépendantes pour chaque séquence codante ($\Delta prlR$ /wt). Le test ANOVA 2 a été employé en tant qu'analyse statistique, pour évaluer la significativité des changements d'expression. Des séquences codantes qui présentent un « foldchange » plus grand que 1.5 (ou en-dessous de 0.66) et un « P value » statistique ANOVA ≤ 0.0001 ont été définies comme sur- ou sous-exprimées (le traitement des données a été effectué par le laboratoire de biologie quantitative, Eric Depiereux, URBM, Facultés Notre-Dame de la Paix).

VI.15. RT-PCR Quantitative

Des échantillons d'ARN totaux ont été préparés comme décrits ci-dessus avec la souche sauvage *B. melitensis* 16M et le mutant *prlR*. Les deux souches ont été cultivées à 37°C dans du milieu 2YT sous agitation jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,2. Des échantillons ont été traités à la DNase (kit Fermentas), puis une transcription inverse

a été réalisée. Les échantillons de cDNA ont été employés comme matrice dans des réactions en PCR quantitative (qPCR ou real time PCR). Des amorces ont été conçues avec le programme PrimerExpress[®] 2.0 (les amorces sont listées au tableau 15) pour obtenir un produit PCR de 80 à 100 paires de bases. La réaction de qPCR a été exécutée avec le kit Roche (Transcriptor First strand cDNA synthesis kit) en plaque de 96 puits. Une quantification relative a été exécutée à l'aide d'une courbe standard pour chaque amorce dans un appareil « Applied Biosystems 7900HT real-time PCR instrument ». Le résultat pour chaque ARNm cible a été normalisé par rapport à l'ARNm de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*).

Tableau 15: Séquences des oligonucléotides pour l'analyse en real time PCR

Noun d'ORF	Amorces amont (5'-3')	Amorces aval (5'-3')
BMEI0072	GTTCCGGCACGGCTG	GATCGAGAATCATGCGCC
BMEI0086	CCCTCAAAAACCTGATCGAAG	GGAGATGGGTGAAACCCG
BMEI0095	GCAAGCCTGACCGGCT	CGTGACTTTCATCGTTTCTTCA
BMEI0137	ATTGCGGAAGGCACCC	CAGTGAACCTTCGCATCGAAAC
BMEI0141	CAGTCATGGAGCTGCGTAAC	TGAAGAAGCCCATGAAGCC
BMEI0522	GACACGTCCGACCGTCTCT	TGCCCTTTTGCTTCTCGA
BMEI0648	TTCATCTTCGGCTTCAACAA	GATTTGCGGGTTCGGC
BMEI0979	CAAAACGGCAACCTTCATG	TCTTCCAGATCGAGAAGTGAAC
BMEI1094	GCTTGCAGGCTATGTGAAAAA	TGCACATAAAGTTCACGCG
BMEI1393	TGCTGCGTTATTATAAAGGGCTA	CATCCCCGACAATGACAATAT
BMEI1596	TTTCGCCATGACTGTTTCC	CCAAATATGCCGGTCAGC
BMEI1652	ATGATCCTCAACAATGCCATG	AGGTGAGAAGTTCGCCGTC

VI.16. Tests d'assimilation de substrat Biotype100®

Dans la présente étude, un test d'assimilation de différentes sources de carbone a été effectué en utilisant le système Biotype 100 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Ce kit a été proposé pour l'identification de bactéries Gram négatives, et comporte 99 échantillons contenant des hydrates de carbone, des acides organiques, des acides aminés, et d'autres substrats carbonés ainsi qu'un contrôle négatif. La suspension d'inoculation a été obtenue en prenant plusieurs colonies identiques de la souche sauvage et des mutants de culture pure et fraîche sur 2YT agar. Elles ont été

resuspendues dans 5 ml d'H₂O distillée stérile pour préparer une suspension avec une turbidité équivalente à 3 sur la norme de McFaland standart (BioMérieux). Deux ml de cette préparation ont été transférés dans le milieu biotype moyen 2 (BioMérieux) d'assimilation semi-solide. Chacun des microtubes de système a été rempli de 400 µl de cet inoculat. Une croissance est observée après 6 jours d'incubation à 37°C.

Remarque : un test est considéré comme positif lorsque le degré d'opacité dans les microtubes est supérieur à celui du contrôle négatif.

VI.17. Test Uréase

Pour déterminer l'activité d'uréase, des extraits bruts contenant l'uréase ont été préparés comme suit. Des cultures en phase exponentielle à une DO₆₀₀ de 0,5, environ 10^{exp10} bactéries ont été récupérées par centrifugation à 14000 rpm à 4°C pendant 15 min, les culots sont lavées dans 1 ml du PBS froid, nous avons ensuite lysé les cellules puis nous les avons resuspendues en 150 µl du PBS et on ajoute l'équivalent de 400 µl de billes de verre froid en vortex 10 second 6X. Les lysats sont mis à la même DO avec du PBS. Ensuite la suspension a été centrifugée 10 min à 14000 rpm à 4°C. Après récupération de surnageant contenant la protéine soluble, nous avons ajouté à 500 µl de la suspension, 300 µl de uréase test Broth contenant 50mM d'urée, et 0.001g de réactif phénol rouge et incubé à 37°C pendant 2.0 heures. La densité optique à 595 nm des échantillons a été déterminée. La concentration de protéine totale a été mesurée par une analyse de Bradford.

Nous avons aussi fait le test qualitatif pour l'activité enzymatique de l'uréase comme suit. Nous avons inoculé 5 ml de milieu uréase test Broth (Falcon) avec 50 µl des cultures de chaque souche en phase exponentielle en TBS ou 2YT, ensuite après inoculation les falcons ont été incubés à 37°C sous agitation pendant 4, 8, 24 et 48 heures. Le changement de couleur a été mesuré à 595nm (Bradford, 1976)

VI.18. Analyses statistiques

L'analyse ANNOVA 2 a été employée pour les données de microarrays, où on a considéré l'effet du *probeset*, l'effet de la condition, l'effet de leur interaction, et les effets résiduels non modélisés.

L'équivalent définissant la variabilité a été examiné en définissant la variabilité totale par la somme des mesures de variabilités associées à chacun de ces termes, la « somme des carrés des écarts » et aux degrés de libertés (Barleu test).

Chacun des critères envisagés a été testé. Les sources de variabilité des différents critères sont définies et la comparaison de ces critères repose sur l'expression du rapport entre les carrés moyens associés à chaque critère, et la statistique obtenue est évaluée par rapport à la distribution de la valeur F associée aux degrés de liberté appropriés.

$$F_{ab} = MS_{ab} / MS_E \sim F((n_a - 1)(n_b - 1); n_a n_b (n_{repl} - 1))$$

Où n_a est le nombre de gènes, n_b est le nombre des conditions, et n_{repl} est le nombre de mesures effectuées pour chaque gène dans chaque condition (le nombre de répliques); MS symbolise le carré moyen (George Box *et al*).

PARTIE VII

ANNEXES

VII. ANNEXES

Annexe I

1. Construction d'outils

Dans ce chapitre, les constructions de souches et de plasmides sont décrites brièvement, et un matériel et méthodes (partie IV) donne tous les détails techniques associés à ces manipulations.

1.2. Création de mutants

1.2.1. Construction de mutants disruptants *B. melitensis* 16M::prlR et *fm*::prlS

Afin de disrupter les gènes *prlS* et *prlR* chez *B. melitensis* nous avons amplifié par PCR une région interne de 316 pb pour *prlR* et 396 pb pour *prlS* sur l'ADN génomique pour *prlR* avec les amorces FprlR 5'-GCATTTCATTATCGCTGATG-3' et RprlR 5'-TCAGCCGATTGAGATGAAAC-3', et pour *prlS* avec les amorces FprlS 5'-TATGCAGGGCTGGGGGATC-3' et RprlS 5'-TCACAGCGCGATATAGGGAATG-3'. Les fragments amplifiés ont été purifiés et insérés dans le site *EcoRV*, dans le vecteur mobilisable pSK-oriTKan non réplcatif chez *Brucella*, pour donner les plasmides pSKoriT:prlRKanR et pSKoriT::prlSKanR. Ces plasmides, dérivés de pSK-oriT (Tibor et al 2002), comportent une origine de transfert conjugatif de RP4 (oriT) et un gène conférant la résistance à la kanamycine. Les constructions obtenues ont été validées par séquençage.

La stratégie de construction est illustrée à la figure A1 pour le mutant *prlR*. «*Mutatis mutandis*» la même stratégie a été utilisée par *prlS* (non illustré)

1.2.1.1. Isolement de clones de *Brucella* candidats disruptants

La souche *E. coli* S17-1 (Simon et al., 1983), qui contient un dérivé du plasmide RP4 intégré, a été transformée par les plasmides pSKoriT::prlRKanR ou pSKoriT::prlSKanR, et les transformants obtenus ont été conjugués à *B. melitensis* 16M

Nal^R. Un événement de simple recombinaison homologue conduit donc à l'intégration du plasmide dans le chromosome, ce qui donne lieu à deux copies incomplètes de la CDS ciblée. Cette procédure a produit les souches *B. melitensis* 16M::*prlR* (disruptant *prlR*), et *B. melitensis* 16M::*prlS* (disruptant *prlS*) (figure A1).

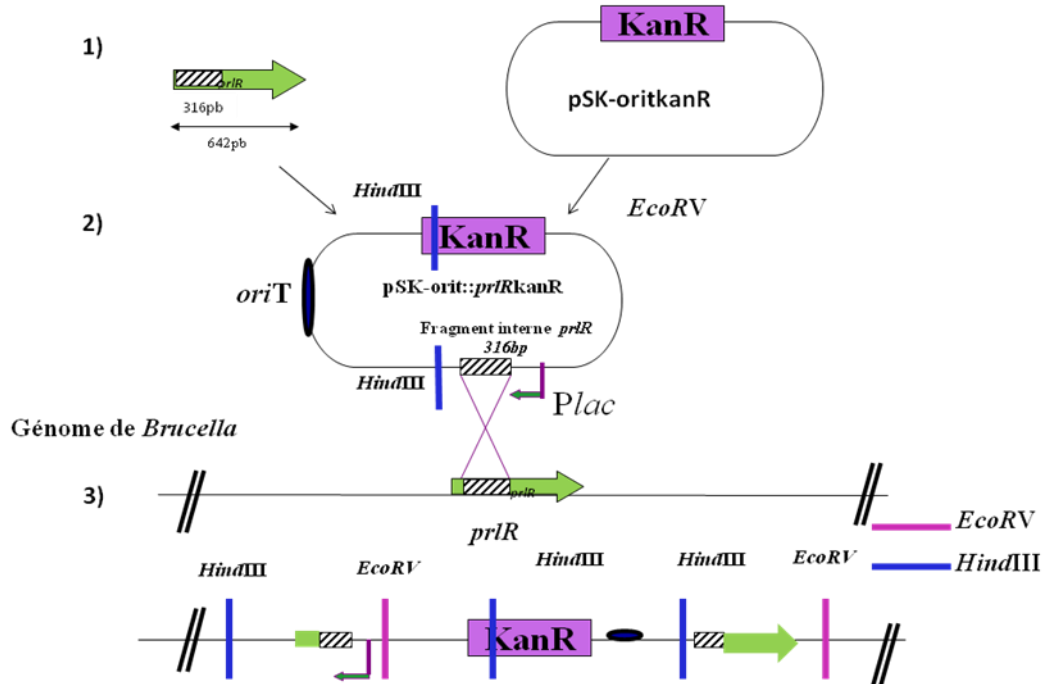


Figure A1 : Stratégie de construction des disruptants *prlR*. 1) Amplification d'un fragment interne de *prlR* 2) Clonage du fragment interne de *prlR* de 316pb dans le site *EcoRV* du plasmide pSKoriTKan 3) Recombinaison homologue au sein du génome de *B. melitensis* après conjugaison.

1.2.1.2. Validation des candidats intégratifs par Southern blot et Western blot

L'ADN génomique des candidats a été préparé et restreint par l'enzyme *HindIII* ou *EcoRV*. Après séparation sur gel d'agarose et dénaturation, les fragments obtenus ont été transférés sur une membrane de nylon. Une sonde correspondant au gène de résistance à la kanamycine (sonde kan^R) et une autre sonde correspondant au fragment interne de *prlR* (sonde *prlR*) ont été marquées au ³²P et mises en hybridation avec les membranes de nylons où se trouvait l'ADN génomique restreint des candidats.

Pour les candidats intégrant *prlR* les résultats des Southern blot après digestion par *EcoRV* et *HindIII* sont montrés aux figures A2 et A3 respectivement.

L'hybridation avec la sonde *prlR* sur la souche sauvage donne une bande de 1417 pb et il n'y a aucune bande avec la sonde kan^R.

L'hybridation avec la sonde *prlR* sur le disruptant *prlR* après la restriction *EcoRV*, donne une bande d'une taille approximative de 6186 pb tandis que la souche sauvage produit une bande de 1417 pb, tel que montré à la figure A2.

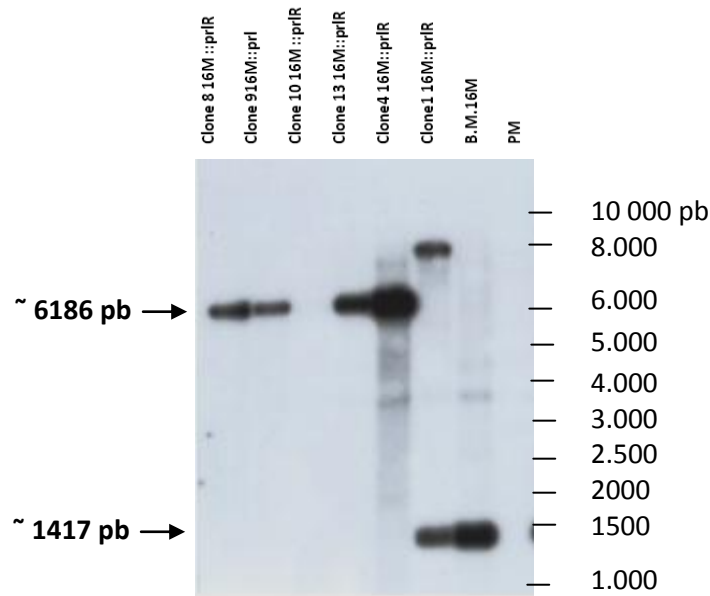


Figure A2 : Résultats de Southern blot avec la sonde *prlR* pour les clones de disruptants *prlR* et la souche sauvage de *B. melitensis* 16M (B.M.16M), après la restriction *EcoRV*.

L'hybridation avec la sonde *prlR* sur les disruptants *prlR* après la restriction *HindIII*, donne deux bandes approximativement de 4966 pb et 1649 pb et pour la sauvage une bande de 1875 pb, montrées à la figure A3.

Les candidats 8, 9, 13 et 4 de *B. melitensis* analysés sont bien des mutants intégratifs du gène *prlR*. En effet ces génomes restreints avec *EcoRV* montrent un fragment unique de 6186 kb avec la sonde kan^R (résultats non montrés) et avec la sonde *prlR* (voir figure A2). Pour la restriction *HindIII*, l'hybridation avec la sonde *prlR* présente deux fragments, de 4699 pb et 1649 pb (figure A3). L'hybridation avec la sonde kan^R montre aussi deux fragments, un fragment de 1649 pb et un autre de 2029 pb (résultats non montrés).

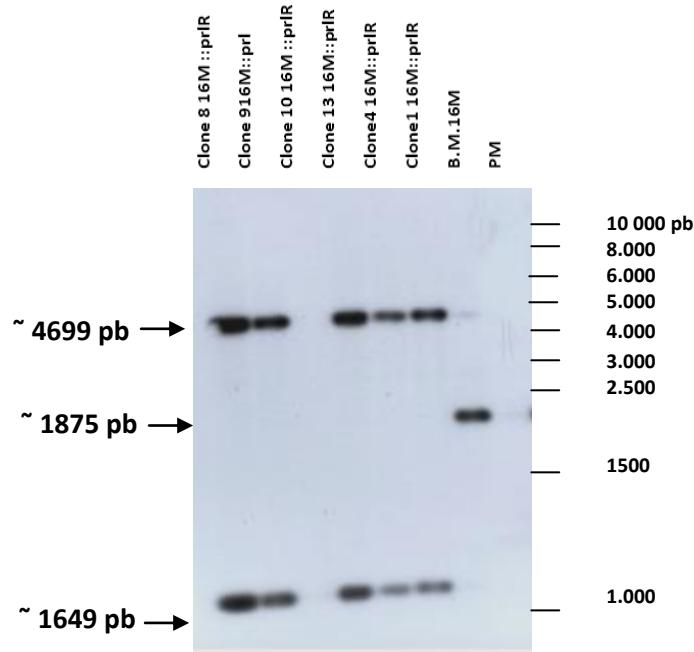


Figure A3 : Résultats de Southern blot avec la sonde de *prlR* pour les clones de disruptants *prlR* et la sauvage de *B. melitensis* 16M (B.M.16M), après restriction *HindIII*.

Pour les candidats intégratifs *prlS* le résultat des Southern blot après digestion *EcoRV* est illustré à la figure A4.

Le profil des clones 7, 8, 9, 1 et 4 de *B. melitensis* correspond bien au disruptant *prlS* après qu'il soit restreint avec *EcoRV* et hybridé avec la sonde kanamycine il montre un seul fragment de 5762pb (figure A4). L'hybridation avec la sonde *prlS* donne également un seul fragment de 5762pb (non montré). Pour la restriction *HindIII*, tant la sonde kanamicine que la sonde *prlS* donnent les fragments de tailles attendues (résultat non montré).

Parmi les candidats disruptants *prlR* et *prlS* validés par Southern blot, un clone a été choisi pour chacun (disruptant 8 par *prlR* et disruptant 9 par *prlS*). Les clones *prlR* ont aussi été analysés par Western blot avec l'anticorps anti-PrIR. Ces mutants ne produisent pas la protéine PrIR, (résultats montrés) comme attendu.

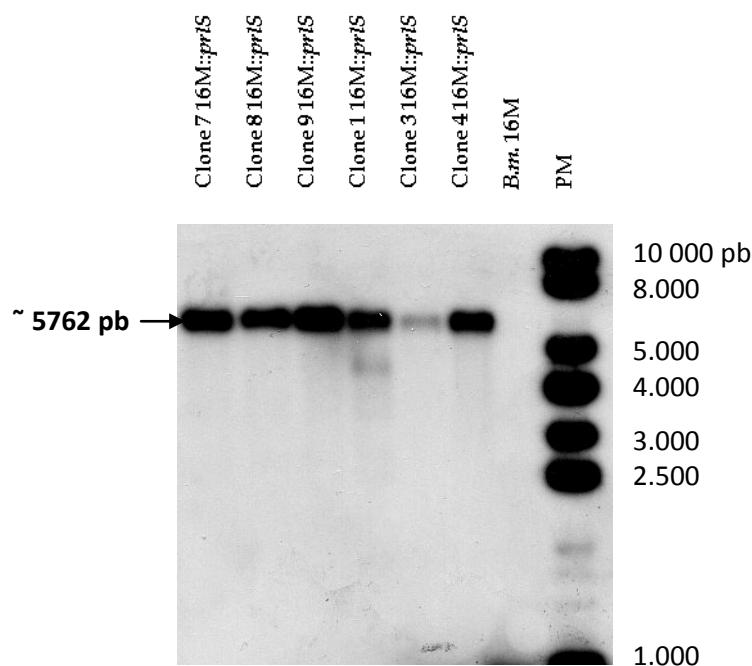


Figure A4 : Résultats de Southern blot avec la sonde kan^R pour les clones disruptants *prlS* de *B. melitensis* 16M, après restriction *EcoRV*. Comme contrôle nous avons utilisé la souche sauvage *B. melitensis* 16M (B.M.16M).

En conclusion nous avons obtenu et validé des mutants disruptants pour *prlR* et *prlS* de *B. melitensis* 16M. Nous avons également construit et validé ces mêmes mutants pour la souche *B. abortus* 2308 (non montré).

1.2.2. Construction de mutants propres par délétion de *prlS* ou *prlR* chez *B. melitensis*

Parallèlement à la construction des disruptants, nous avons construit des souches délétées pour les ORFs qui codent pour *prlS* ou *prlR*. Pour la stratégie de délétion propre, une région amont et aval d'environ 500pb de chaque gène a été amplifiée par PCR, sur l'ADN génomique de *Brucella melitensis* 16M, avec l'enzyme Expand High Fidelity. Ensuite, une PCR d'assemblage a été réalisée à partir des deux amplicons précédents (Figure A5). Après purification du produit PCR final sur gel, l'amplicon a été cloné dans le plasmide pGEM-T Easy, le plasmide recombinant obtenu a été restreint par *NotI* et *ScaI*, et le fragment contenant les régions amont et aval assemblées et flanquées de sites *NotI* a été purifié et inséré au site *NotI* du vecteur pJQ200uc1.

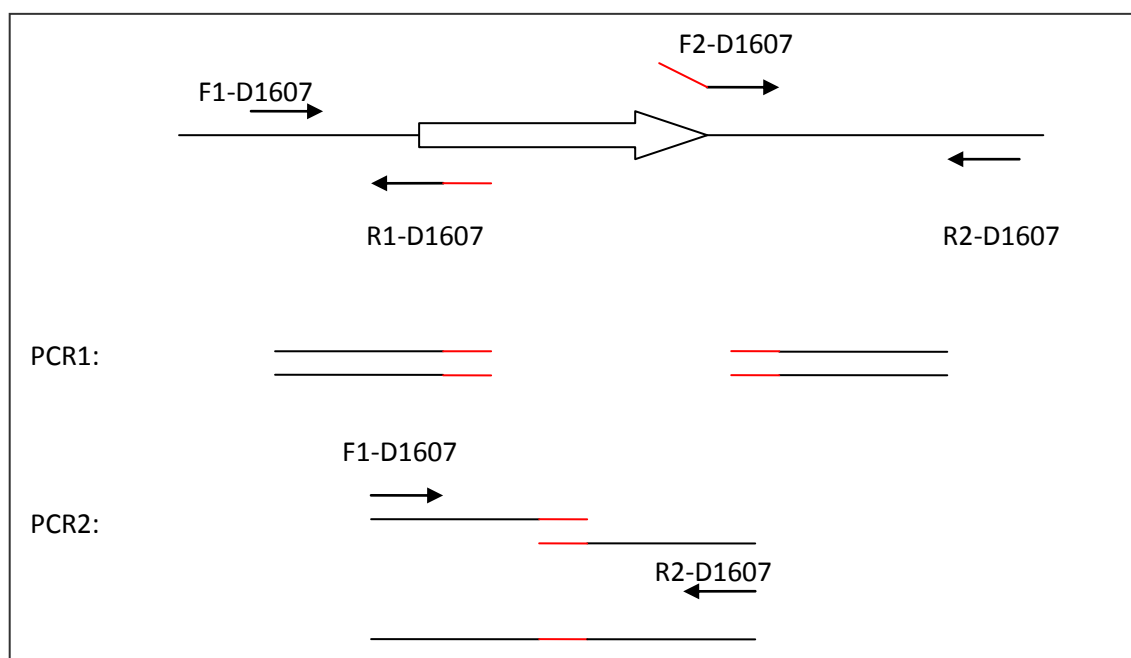


Figure A5 : Représentation schématique de la stratégie de PCR utilisée pour produire et assembler les régions amont et aval de la séquence codante de *prlR*.

Cette stratégie a permis l'obtention des plasmides pJQ200uc1 Δ *prlS* et pJQ200uc1 Δ *prlR*, permettant respectivement l'obtention de mutants de délétion pour *prlS* et *prlR*, qui ont été validés par séquençage.

1.2.2.1. Isolement de clones de *Brucella* candidats délétés pour *prlS* ou *prlR*

La souche *E. coli* S17-1 transformée par les plasmides pJQ200uc1 Δ *prlS*, ou pJQ200uc1 Δ *prlR* a été conjuguée à *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308. Des souches résistantes à la gentamycine (candidats intégrants, dans la région amont ou aval de *prlS* ou *prlR*) ont été isolées, cultivées en absence d'antibiotique puis sélectionnées en présence de saccharose pour sélectionner les délétants. Cette procédure a produit chez *Brucella* les souches 16M Δ *prlS*, 16M Δ *prlR*, 2308 Δ *prlS* et 2308 Δ *prlR*.

1.2.2.2. Validation des mutants propres par PCR et Western blot

Parmi les 24 clones analysés par PCR avec les amorces F1 et R2 (figure A6) nous avons identifié 3 candidats délétants pour chacune des ORFs cibles. Les candidats délétants ont été analysés par restriction du produit PCR, avec les enzymes de restriction *HindIII* pour 16M Δ *prlS*, et *NofI* et *NcoI* pour 16M Δ *prlR*. Les candidats 1 et

3 pour 16M $\Delta prlR$ ont été en outre analysés par Western blot afin de confirmer l'absence de la protéine PrlR (non montré).

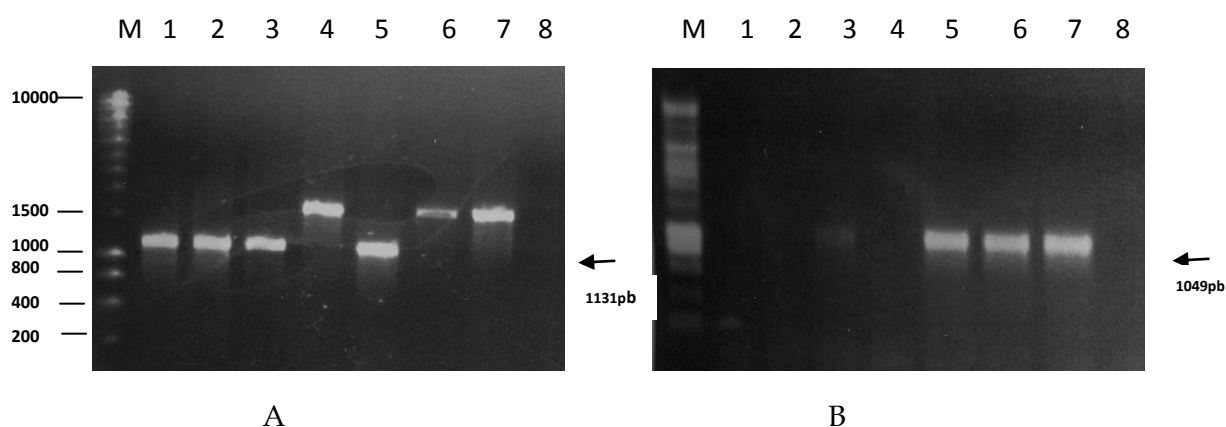


Figure A6: PCR diagnostique pour confirmer la délétion de *prlR* et *prlS* **A** : Les pistes 1 à 7 montrent des candidats pour le mutant *prlR* et la piste 8 est le contrôle négatif. **B**: les pistes 1 à 7 montrent des candidats pour le mutant *prlS* la piste 8 représente le contrôle négatif.

En conclusion, nous avons procédé à la construction et à la validation des mutants propres $\Delta prlS$ et $\Delta prlR$ chez *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308.

1.2.3. Construction de plasmides de complémentation pour *prlR* et *prlS*

1.2.3.1. Construction des plasmides réplicatifs chez *Brucella* porteur du gène *prlR* ou *prlS*

Pour la complémentation, un fragment de 3521 bp contenant le gène *prlS* a été amplifié par PCR en utilisant les amorces attB1prlS 5'-GGGGACAAGTTTGTCAA AAAAGCAGGCTCGATGCCGGCTATGCAG-3' et attB2prlS 5'-GGGGACCACTT TGTACAAGAAAGCTGGGTATTATCGTGTACTGCC-3', avec une ADN polymérase High Fidelity sur l'ADN génomique de *B. melitensis* 16M, ce fragment a été cloné dans le plasmide pDONR201 par réaction BP. Cette construction a été validée par restriction diagnostique avec *HpaI* et *PvuII* et par séquençage avec l'amorce attL1. Pour *prlR* nous avons utilisé le clone d'Entrée disponible dans l'ORFéome (Dricot *et al.*, 2004). Ces séquences codantes ont ensuite été transférées par réaction LR, dans le plasmide pBBR1MCSGW (Cm^R) et pMR10GW et transformés dans *E. coli* DH10B pour donner les plasmides pBBR-*prlR*, pMR10-*prlR*, pBBR-*prlS* et pMR10-*prlS*.

1.2.3.2. Isolement de souches complémentées

Une fois que la souche donneuse *E. coli* S17-1 a été transformée par le plasmide pBBR-*prlR*, pMR10-*prlR*, pBBR-*prlS*, ou pMR10-*prlS*, les plasmides sont transférés par mobilisation à la souche sauvage de *B. melitensis* ainsi qu'aux mutants appropriés par conjugaison (mutant *prlR* ou mutant *prlS*). Le mélange de conjugaison a été étalé sur un milieu de culture 2YT contenant l'acide nalidixique (Nal, 25 µg/ml) pour éliminer les *E. coli* S17-1 donneuses, et aussi de la kanamycine ou du chloramphénicol pour sélectionner les souches de *Brucella* qui ont reçu le plasmide.

1.2.4. Construction d'un plasmide intégratif chez *Brucella*, porteur du gène *prlR*

Pour éviter les effets de surdosage liés à l'utilisation de plasmides réplcatifs, nous avons envisagé une complémentation chromosomique. Pour la complémentation chromosomique du mutant *prlR* nous avons amplifié par PCR la séquence de 647 pb de *prlR* plus 501pb en amont et 501pb en aval sur l'ADN génomique de *B. melitensis* 16M, avec les amorces *prlR* amont 501 5'-ACGAGATCCCATGTGGTATTT-3' ET *prlR* aval 501 5'-GCGCCGCCAGCCGAAGAGG-3'. Ensuite le produit PCR a été cloné dans le plasmide pGEM-T Easy, et vérifié par séquençage. La restriction de ce pGEM-T *prlR* avec *NotI* et *ScaI* libère un fragment qui a été cloné dans le site de restriction *NotI* du pJQ200uc1. Ce plasmide portant la résistance à la gentamycine (Gm) a été transformé dans la souche donneuse *E. coli* S17-1 et ensuite transféré au mutant propre *prlR* par mobilisation et le plasmide peut s'intégrer par recombinaison homologue. Les clones obtenus sont Nal^R et Gm^R. Par la suite, les clones peuvent subir un second événement de recombinaison conduisant au remplacement de l'allèle muté $\Delta prlR$, par l'allèle *prlR* sauvage. Cette procédure a produit avec succès la souche *Brucella* 16M $\Delta prlR$ complémentée (figure A7). Le génotype de cette souche a été vérifié par PCR en utilisant les amorces *prlR* interne 5'-GATACGGTCAGGAAA CTGGT-3' et *prlR* aval 501 5'-GCGCCGCCAGCCGAAGAGG-3'.

1.2.5. Construction de plasmides rapporteurs pour les gènes *prlR* et *prlS*, et d'un plasmide de surexpression

1.2.5.1. Construction des plasmides réplicatifs pBBR*pprlR-gfp* chez *Brucella melitensis* 16M porteur du promoteur *prlR*

Pour suivre l'expression du promoteur *prlR* lors de l'infection dans les macrophages bovins SV40, un fragment de 549 pb correspondant à la région amont de *prlR* (*pprlR*) a été amplifié par PCR sur l'ADN génomique de *B. melitensis* 16 M. Après la purification du produit PCR sur gel, il a été inséré dans le plasmide pGEM-T Easy, qui fut ensuite vérifié par restriction par *EcoRI* et par séquençage. Le plasmide pGEM-T *pprlR* fut ensuite digéré avec les enzymes *Asp718* et *BglII* et le fragment résultant fut cloné dans le plasmide pBBR1-- en fusion transcriptionnelle avec la *gfp*. Ensuite le plasmide pBBR*pprlR-gfp* a été transféré dans la souche sauvage *B. melitensis* par conjugaison à partir d'*E. coli* S17-1 donneuses (figure A8).

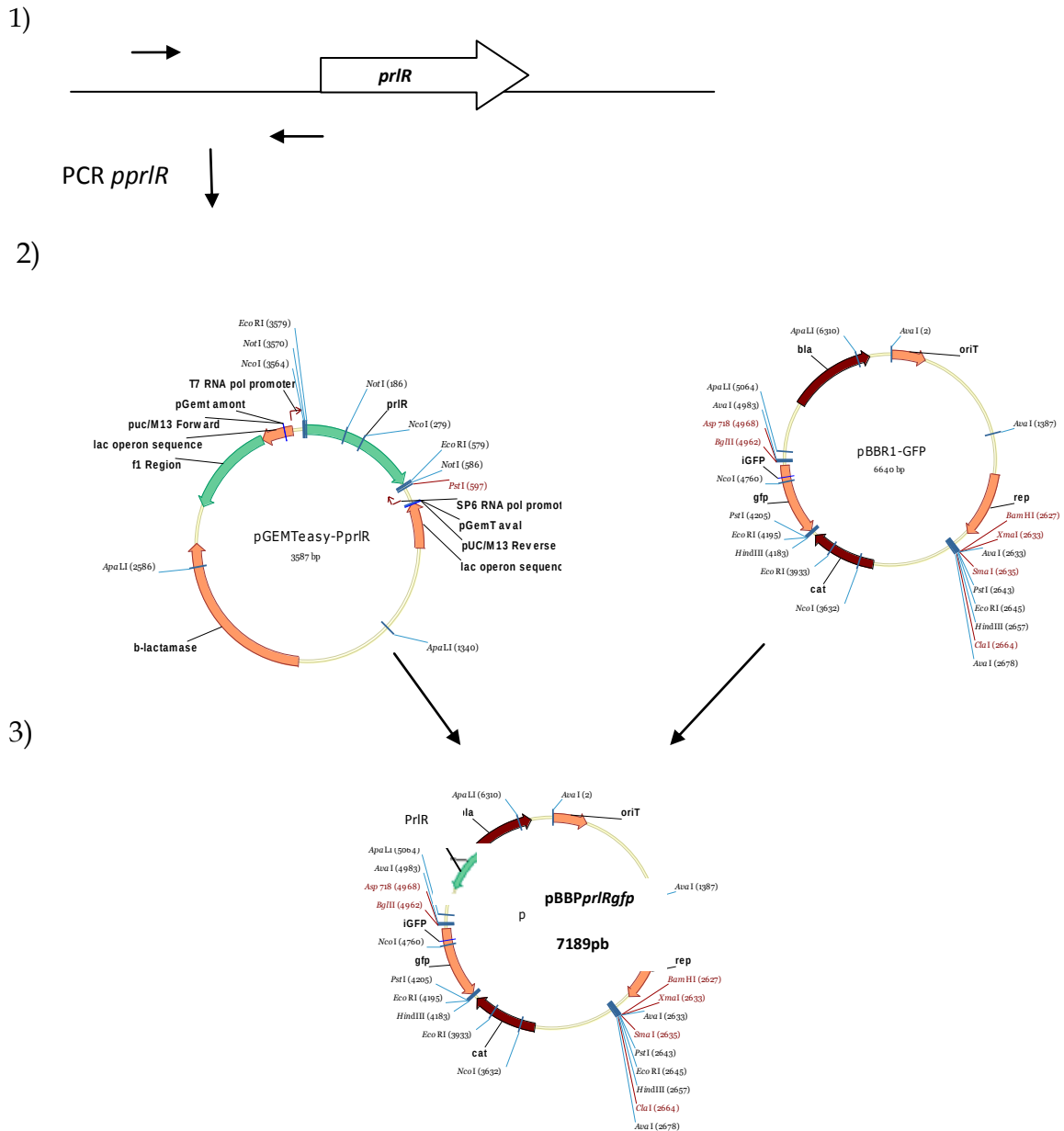


Figure A8 : Stratégies employées pour la construction de vecteur réplcatif pBBR*pprlR-gfp* porteur du promoteur *prlR*. 1) amplification par PCR de la région amont du *prlR*, avec les sites de restriction *Asp* 718 et *Bgl* II 2) clonage dans pGEMT-easy 3) clonage du promoteur *prlR* dans pBBR-*gfp*.

1.2.5.2. Construction des plasmides réplcatifs porteurs de fusions *pprlR-lacZ* et *pprlS-lacZ*

Des constructions plasmidiques visant à suivre l'expression du promoteur *prlR* et du promoteur *prlS* chez *B. melitensis* ont été construit. Pour ces constructions, un fragment de 566pb en amont du gène *prlR* et un autre de 569 pb en amont de gène *prlS* ont été amplifiés par PCR sur l'ADN génomique de *B. melitensis*. Après la purification du produit PCR sur gel, le produit PCR fut cloné dans le plasmide

pGEM-T Easy, ensuite et après la restriction de pGEM-T avec *Xba*I et *Bam*HI, il fut transformé dans la souche *E. coli* GM2163 (souche mutante *dam dcm*). Les plasmides pGEM-T *ppr*lR et pGEM-T *ppr*lS digérés avec les enzymes *Xba*I et *Bam*HI furent clonés dans le plasmide pBBR1MCS (Elzer *et al.*, 1994) en amont du gène rapporteur *lacZ*, encodant la β -galactosidase. (Nous avons utilisé le plasmide pBBR1MCS dont la région codante du gène *lacZ* est déletée des 27 premiers nucléotides. Ce plasmide a déjà servi pour la construction du plasmide pBBRCmpfliF-*lacZ* (Fretin *et al.*, 2005). Ces plasmides soit pBBR*ppr*lR-*lacZ* ou pBBR*ppr*lS-*lacZ* (réplicatifs chez *Brucella*) ont été conjugués chez *B. melitensis* 16M, et dans les mutants 16M Δ *pr*lR et 16M Δ *pr*lS, après vérification par PCR avec les amorces amont pGEMT et *ppr*lR aval *Bam*HI ou *ppr*lS aval *Bam*HI.

Tableau A1: Liste des amorces utilisées pour la construction des mutants *pr*lR, *pr*lS et plasmides de complémentation du *pr*lR et *pr*lS

Amorces	Séquences
FprlR	5'-GCATTTCATTAT CGCTGATG-3'
RprlR	5'-TCAGCCGATTGGAGATGAAAC-3'
FprlS	5'-TATGCAGGGCTGGGGGATC-3'
RprlS	5'-TCACAGCGCATATAGGGAATG -3'
F1-D1607	5'-GGGTTTCGGCATAGCAAG-3'
R1-D1607	5'-AAACAGCGGGTGGTCATCAGCGATAATGAAATGCATTTG-3'
F2-D1607	5'-ATCGCTGATGACCAACCGCTGTTTAGCGACGTTCTGGGCGTTTGA-3'
R2-D1607	5'-CCGCCAGCCGAAGAGGTTA-3'
F1-D1606	5'-CAGGGCGAATTCCTGAAATTC-3'
R1-D1606	5'-CATTT CCTCCCTTAGGCTTG-3'
F2-D1606	5'-CAAGCCT AAGGGAGGAACGATAAGCGGCAAAGGCCGA-3'
R2-D1606	5'-ACGGGACTTT CCGGACTTGT-3'
attB1prlS	5'- GGGGACAAGTTTGTCA AAAAAGCAGGCTCGATGCCGGCTATGCAG-3
attB2prlS	5'- GGGGACCACTTTGTACA AGAAAGCTGGGTATTATCGTGTAAGTCC-3'
pprlR amont Asp718	5'-ATAGGTACCATCCCATGTGGTATT-3'
pprlR aval BglII	5'-ATTAGATCTTGCCG CAAAGCACCGCG-3'
pprlR amont <i>Xba</i> I	5'-ATATCTAGATCCATGTGCGCGACGA-G

Amorces	Séquences
pprIR aval <i>Bam</i> HI	5'-ATT GGATCCTGCCGCAAAGCACCGCG-3'
pprIS amont <i>Xba</i> I	5'-ATATCTAGATCACGAATGCG GATCGCA-3'
pprIS aval <i>Bam</i> HI	5'-ATTGGATCCAGCAGGTATAAAAAGGC-3'
<i>prlR</i> amont 501	5'-ACGAGATCCCATGTGGTATTT-3'
<i>prlR</i> aval 501	5'-GCGCCGCCAGCCGAAGAGG-3'
<i>prlR</i> interne	5'- GATACGGTCAGGAACTGGT-3'
F2-D1606	5'-GATTATTACGGAGCAGCC-3'
F3-D1606	5'-CAATGGCGACCTTTACGT -3'
F4-D1606	5'-CACCGGAAAATGCCGCGA-3'
F5-D1606	5'-CAATTGCTGGACGATGCT-3'
F6-D1606	5'CTgATgCATgTgAACgAT3'
F7-D1606	5'CATTGCGCCACAAAACTG3'
F8-D1606	5'GCCGCCAGCCGAAGAGGT3'
primer igfp :	5'CGTATGTTGCATCACCTTC 3'

1.2.5.3. Construction des plasmides qui permettent la surproduction de la protéine PrIR .

Pour permettre la surproduction et la purification de la protéine PrIR, nous avons séquencé le plasmide d'entrée porteur de *prlR* (pDONR201-*prlR*) extrait de l'ORFéome, puis nous avons transféré la séquence codante *prlR* par réaction LR dans le vecteur receveur Gateway (pET-15bGW), pour obtenir le plasmide pET15b*prlR*. Le clonage en pET15b place la séquence d'intérêt en fusion traductionnelle avec une séquence encodant un «tag» de 6 histidines à l'extrémité N-terminale d'une masse de 2kDa, et place son expression sous la dépendance d'un promoteur fort T7. Le «tag» permet la purification ultérieure de la protéine par chromatographie d'affinité sur une colonne chargée en cations de Ni²⁺.

Le vecteur pET15b*prlR*, une fois vérifié par restriction et séquençage, a été transformé dans la souche *E. coli* BL21(DE3).

Anexe II

Donné transcriptomique de *B. melitensis* 16M.

Tableau A2 : Liste des gènes de donné transcriptomique de *B. melitensis*. Les cibles choisies sont souligné en gris.

Locus Tag	Protéine	ΔprlR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔprlR/WT	P value annova
BMEI0001	Uroporphyrinogen decarboxylase	2688	3172	0,85	0,00251685
BMEI0002	Cytochrome functioning/assembly related protein	3515	4373	0,8	0,000199113
BMEI0003	Transcription termination factor rho	4413	4717	0,94	0,735116302
BMEI0004	Hypothetical cytosolic protein	142	162	0,88	0,034400535
BMEI0005	Thymidylate kinase	157	217	0,73	0,223732298
BMEI0006	Thiophene and furan oxidation protein ThdF	198	206	0,96	0,827294844
BMEI0007	Glucose inhibited division protein A	493	380	1,3	0,06710563
BMEI0008	Glucose inhibited division protein b	843	733	1,15	0,177270551
BMEI0009	Chromosome partitioning protein para	5462	4349	1,26	0,247468537
BMEI0010	Chromosome partitioning protein parb	2241	1806	1,24	0,059472885
BMEI0011	DNA polymerase III, delta subunit	226	171	1,32	0,001746793
BMEI0012	ABC transporter ATP-binding protein	355	328	1,08	0,079936865
BMEI0013	ABC transporter integral membrane protein	940	1160	0,81	0,00035592
BMEI0014	Hypothetical protein	99	166	0,6	0,09458252
BMEI0015	ABC transporter substrate-binding protein	2761	2884	0,96	0,54933915
BMEI0016	Hypothetical protein	275	637	0,43	0,006414376
BMEI0017	Alkanal monooxygenase alpha chain	532	666	0,8	0,266573485
BMEI0018	Hypothetical cytosolic protein	155	236	0,66	0,080781
BMEI0019	LacI-family transcription regulator	320	429	0,74	0,446452926
BMEI0020	Glucose-fructose oxidoreductase precursor	113	152	0,74	0,088135062
BMEI0021	Acetyl-CoA:acetoacetyl-CoA transferase alpha subunit	150	250	0,6	0,019868413
BMEI0022	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	133	212	0,63	0,065642175
BMEI0023	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	76	83	0,92	0,309256775
BMEI0024	L-sorbose dehydrogenase, NAD(P) dependent	105	123	0,85	0,088390084
BMEI0025	L-sorbose dehydrogenase (FAD)	128	198	0,65	0,058719377
BMEI0026	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase	99	103	0,96	0,700759773
BMEI0027	L-sorbose dehydrogenase [FAD]	96	124	0,77	0,118371893
BMEI0028	L-sorbose dehydrogenase [FAD]	171	149	1,15	0,180438008
BMEI0029	L-sorbose dehydrogenase [FAD]	449	251	1,79	0,00024464
BMEI0030	Hypothetical cytosolic protein	7999	4977	1,61	9,72E-06
BMEI0031	Hypothetical cytosolic protein	217	373	0,58	0,027560258
BMEI0032	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase	523	511	1,02	0,54398248
BMEI0033	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	405	438	0,92	0,424816181
BMEI0034	N-acyl-L-L-amino acid amidohydrolase	2624	2908	0,9	0,03416706
BMEI0035	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	1278	681	1,88	0,001648465
BMEI0036	CobW protein	1532	723	2,12	0,00029712
BMEI0037	Hypothetical transcriptional regulatory protein	222	157	1,41	0,001796262
BMEI0038	Hypothetical protein	7916	6630	1,19	0,002822367
BMEI0039	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	1371	829	1,65	0,000226094
BMEI0040	Integrase/recombinase XerD	2500	1601	1,56	7,57E-06
BMEI0041	Hypothetical protein	886	679	1,31	0,01738048
BMEI0042	Shikimate kinase	599	545	1,1	0,274944591

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0043	3-dehydroquinate synthase	1266	1547	0,82	5,52E-07
BMEI0044	CBS domain containing protein	163	151	1,08	0,340841831
BMEI0045	BolA protein	230	195	1,18	0,031544121
BMEI0046	Hypothetical protein	1412	1292	1,09	0,448699493
BMEI0047	Molecular chaperones (DNAj family)	4894	3889	1,26	0,00154354
BMEI0048	Hypothetical protein	5495	4284	1,28	0,00621343
BMEI0049	CobS protein	4938	3782	1,31	0,002124131
BMEI0050	CobT protein	549	355	1,55	0,002654145
BMEI0051	Hypothetical protein	7133	10507	0,68	0,014970323
BMEI0052	Hypothetical protein	7972	11371	0,7	0,052230715
BMEI0053	Cation-transporting ATPase PacS	1792	2474	0,72	0,001780123
BMEI0054	Mercuric resistance operon regulatory protein	350	430	0,81	0,022603613
BMEI0055	Hypothetical protein	2493	1503	1,66	2,68E-07
BMEI0056	Lsu ribosomal protein L28P	10611	14246	0,74	0,005104639
BMEI0057	Hypothetical membrane spanning protein	1741	4092	0,43	4,98E-06
BMEI0058	Extracellular serine protease	924	1231	0,75	0,081596666
BMEI0059	Hypothetical protein	235	303	0,78	0,022832802
BMEI0060	Hypothetical protein	650	710	0,92	0,383319756
BMEI0061	Hypothetical protein	1255	1461	0,86	0,248286557
BMEI0062	Hypothetical protein	2511	2422	1,04	0,738693262
BMEI0063	Hypothetical membrane spanning protein	4101	4785	0,86	0,211954361
BMEI0064	Hypothetical protein	557	473	1,18	0,050553085
BMEI0065	Hypothetical cytosolic protein	199	181	1,1	0,131673395
BMEI0066	Two component response regulator	1751	1710	1,02	0,717241442
BMEI0067	Camp-dependent protein kinase regulatory subunit	424	359	1,18	0,215424827
BMEI0068	Exodeoxyribonuclease III	699	568	1,23	0,02904898
BMEI0069	Outer membrane lipoproteins carrier protein precursor	17066	11552	1,48	0,000231
BMEI0070	Aquaporin	1079	1395	0,77	0,020390266
BMEI0071	Hypothetical protein	3152	1956	1,61	0,004627544
BMEI0072	Cell division ATP-binding protein FtsE	817	579	1,41	2,58E-07
BMEI0073	Cell division protein FtsX	1816	1258	1,44	0,06210004
BMEI0074	Hypothetical protein	4289	3144	1,36	0,014599653
BMEI0075	L-acyl-SN-glycerol-3-phosphate acyltransferase	2967	2556	1,16	0,079641198
BMEI0076	Inorganic pyrophosphatase	12274	10181	1,21	0,037257436
BMEI0077	Cation transport protein ChaC	212	370	0,57	0,139446118
BMEI0078	Hypothetical protein	438	290	1,51	2,51E-06
BMEI0079	Arogenate dehydrogenase / prephenate dehydrogenase	3296	2834	1,16	0,004779131
BMEI0080	Histidinol-phosphate aminotransferase	2393	2134	1,12	0,077176675
BMEI0081	Methyltransferase	151	141	1,07	0,342193345
BMEI0082	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	1082	1080	1	0,862098793
BMEI0083	Hypothetical protein	816	561	1,46	0,002172484
BMEI0084	Diaminopimelate decarboxylase	528	449	1,18	0,118219087
BMEI0085	Hypothetical protein	2490	2026	1,23	0,011953895
BMEI0086	Argininosuccinate lyase	2019	1453	1,39	4,97E-06
BMEI0087	Thiol:disulfide interchange protein TlpA	5751	2874	2	1,06E-06
BMEI0088	EMG2 protein	929	488	1,9	1,65E-09
BMEI0089	Ribonuclease BN	715	1086	0,66	0,030904674
BMEI0090	Short-chain dehydrogenase	178	214	0,83	0,069014493
BMEI0091	Hypothetical protein	160	191	0,84	0,005538087
BMEI0092	Adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase gamma subunit	138	157	0,88	0,106021785
BMEI0093	ExsD protein	255	413	0,62	0,003326185
BMEI0094	Vacuolar ATP synthase 16 kd proteolipid subunit	658	1589	0,41	0,000462445

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0095	Succinoglycan biosynthesis regulator	344	982	0,35	3,10E-06
BMEI0096	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	3894	3950	0,99	0,923054609
BMEI0097	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	2369	1944	1,22	0,008641454
BMEI0098	Hypothetical protein	1283	1142	1,12	0,133319043
BMEI0099	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	3167	3146	1,01	0,821600844
BMEI0100	Hypothetical protein	3148	2454	1,28	0,059605402
BMEI0101	Cysteine synthase A	1779	2287	0,78	0,217152436
BMEI0102	Universal stress protein family	7700	7388	1,04	0,537476959
BMEI0103	Cystathionine gamma-synthase	310	396	0,78	0,109375769
BMEI0104	Glucarate transporter	1866	3191	0,58	0,02176907
BMEI0105	L-asparaginase II	634	1057	0,6	0,034238406
BMEI0106	Transcriptional regulator, GntR family	1121	1471	0,76	0,079554158
BMEI0107	L-asparaginase	180	206	0,88	0,38373027
BMEI0108	Asparagine transport ATP-binding protein	229	295	0,78	0,070324839
BMEI0109	Aspartate ammonia-lyase	155	145	1,07	0,180731428
BMEI0110	Agmatinase	213	205	1,04	0,564265424
BMEI0111	Asparagine transport ATP-binding protein	78	103	0,76	0,039353442
BMEI0112	Asparagine transport system permease protein	107	145	0,74	0,121997951
BMEI0113	Asparagine transport system permease protein	97	172	0,56	0,056481451
BMEI0114	Asparagine-binding periplasmic protein precursor	134	160	0,84	0,122578589
BMEI0115	Asparagine-binding periplasmic protein precursor	181	204	0,89	0,068278366
BMEI0116	Transcriptional regulatory protein, lysr family	3071	2759	1,11	1,28E-05
BMEI0117	Hypothetical protein	415	353	1,17	0,48398041
BMEI0118	Integral membrane protein	14181	9489	1,49	1,27E-09
BMEI0119	Hypothetical protein	437	395	1,11	0,201376282
BMEI0120	Hypothetical protein	552	643	0,86	0,307249282
BMEI0121	Protein translocase, subunit SecA	1770	2030	0,87	0,126722324
BMEI0122	Hypothetical protein	273	438	0,62	0,048221748
BMEI0123	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	4343	2829	1,54	3,47E-05
BMEI0124	Glutamate n-acetyltransferase / amino-acid acetyltransferase	2200	1576	1,4	0,000225424
BMEI0125	Acetyltransferase	751	586	1,28	0,006601082
BMEI0126	Mutator mutt protein (7,8-dihydro-8-oxoguanine-triphosphatase) (8-oxo-dGTPase)	1277	1508	0,85	1,73E-05
BMEI0127	Hypothetical protein	595	438	1,36	0,001668545
BMEI0128	Hypothetical protein	1431	1092	1,31	0,022054995
BMEI0129	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	2053	1493	1,38	0,000683207
BMEI0130	Intracellular septation protein	2085	1435	1,45	0,003955679
BMEI0131	Signal recognition particle receptor FtsY	982	703	1,4	0,017978547
BMEI0132	Fe-S oxidoreductase	3105	2330	1,33	0,00602794
BMEI0133	Diaminopimelate epimerase	1081	689	1,57	0,000123444
BMEI0134	Hypothetical protein	369	905	0,41	0,023416384
BMEI0135	Outer membrane lipoprotein	742	653	1,14	0,255194124
BMEI0136	Putative ATPase N2b	998	925	1,08	0,421592457
BMEI0137	Malate dehydrogenase	7010	3934	1,78	0,008246114
BMEI0138	Succinyl-CoA synthetase beta chain	15525	11835	1,31	0,015281432
BMEI0139	Succinyl-CoA synthetase alpha chain	7895	5547	1,42	0,005042525
BMEI0140	2-oxoglutarate dehydrogenase e1 component	4942	2647	1,87	0,000166706
BMEI0141	Dihydrolipoamide succinyltransferase component (E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	3195	1953	1,64	0,002670558
BMEI0142	Hypothetical membrane spanning protein	7505	6170	1,22	0,002309548
BMEI0143	Threonine efflux protein	1875	1307	1,43	6,39E-06
BMEI0144	Hypothetical protein	1693	1385	1,22	0,049938056
BMEI0145	Dihydrolipoamide dehydrogenase	2836	2119	1,34	0,019753349

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0146	Hypothetical protein	817	859	0,95	0,588798635
BMEI0147	Integrase	172	164	1,05	0,307693783
BMEI0148	16s ribosomal RNA processing protein rimm	4393	5188	0,85	0,02672117
BMEI0149	tRNA (guanine-n1) -methyltransferase	2324	2826	0,82	0,011925712
BMEI0150	Transcriptional regulator, ArsR family	373	383	0,97	0,914074963
BMEI0151	Hypothetical protein	371	373	0,99	0,742138579
BMEI0152	Hypothetical cytosolic protein	303	312	0,97	0,836696612
BMEI0153	Hypothetical protein	213	218	0,97	0,915367919
BMEI0154	Hypothetical membrane spanning protein	321	505	0,64	0,226574877
BMEI0155	Putative allantoin permease	278	598	0,46	0,114110157
BMEI0156	LSU ribosomal protein L19p	2869	2449	1,17	0,060445105
BMEI0157	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	845	903	0,94	0,223549971
BMEI0158	Acetyltransferase	1454	1178	1,23	0,138370705
BMEI0159	Succinate dehydrogenase cytochrome B-556 subunit	5104	4890	1,04	0,971869972
BMEI0160	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein	9432	9236	1,02	0,937332044
BMEI0161	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	11244	9970	1,13	0,21030553
BMEI0162	Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	18608	18322	1,02	0,995264497
BMEI0163	Hypothetical protein	1566	1569	1	0,980148943
BMEI0164	Probable lactoylglutathione lyase	606	601	1,01	0,952897849
BMEI0165	2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	544	466	1,17	0,081447126
BMEI0166	Acyl-CoA thioesterase II	271	278	0,97	0,906606228
BMEI0167	Ammonium transporter	153	364	0,42	0,015611417
BMEI0168	Cell division protein ftsk	785	558	1,41	0,007236497
BMEI0169	Transcriptional regulator, gntr family / aminotransferase class-i	256	276	0,93	0,50871837
BMEI0170	Transporter, dme family	268	425	0,63	0,037801234
BMEI0171	Ribosomal protein L11 methyltransferase	730	679	1,08	0,234980579
BMEI0172	Hypothetical protein	1595	1448	1,1	0,205442101
BMEI0173	Hypothetical cytosolic protein	2634	2677	0,98	0,701336916
BMEI0174	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+)	458	428	1,07	0,464223859
BMEI0175	O-sialoglycoprotein endopeptidase	434	415	1,05	0,067825483
BMEI0176	Porphobilinogen deaminase	498	582	0,86	0,001783406
BMEI0177	Uroporphyrinogen-III synthase	818	1265	0,65	0,028856553
BMEI0178	Hypothetical protein	920	680	1,35	0,048887832
BMEI0179	Hypothetical protein	1261	1109	1,14	0,166809643
BMEI0180	Hypothetical cytosolic protein	1178	1894	0,62	1,94E-05
BMEI0181	Macrolide-efflux protein	981	874	1,12	0,027679668
BMEI0182	Biotin synthesis protein bioc	275	219	1,25	0,032496958
BMEI0183	Competence protein f	84	89	0,95	0,320710021
BMEI0184	Glutaredoxin	1357	1084	1,25	0,007815775
BMEI0185	Beta-ureidopropionase	1866	1379	1,35	0,003604304
BMEI0186	Hypothetical cytosolic protein	1097	781	1,41	0,002578079
BMEI0187	Transporter, dme family	719	923	0,78	0,121753482
BMEI0188	Hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase precursor	721	674	1,07	0,422326181
BMEI0189	Aspartokinase	578	597	0,97	0,139826039
BMEI0190	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase ptsp	1017	1013	1	0,824183458
BMEI0191	Bacterial peptide chain release factor 1 (rf-1)	432	424	1,02	0,793822838
BMEI0192	Methyltransferase	3589	4403	0,82	0,16260025
BMEI0193	Hypothetical protein	32379	23836	1,36	0,007055631
BMEI0194	Hypothetical cytosolic protein	20487	15127	1,35	0,084046622
BMEI0195	ATP-dependent clp protease, ATP-binding subunit clpb	435	583	0,75	0,131685803
BMEI0196	Protein Erk/SrfK	1120	595	1,88	5,30E-05
BMEI0197	Lysostaphin	1901	1262	1,51	0,000179777

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0198	Hypothetical protein	13754	11289	1,22	0,263839502
BMEI0199	Hypothetical protein	4685	5225	0,9	0,343838238
BMEI0200	Transposase	5692	4581	1,24	0,058957357
BMEI0201	Lsu ribosomal protein l21P	11406	11904	0,96	0,495876181
BMEI0202	Lsu ribosomal protein l27P	5212	5754	0,91	0,003340487
BMEI0203	Acetyltransferase	632	517	1,22	0,171840331
BMEI0204	Acetyltransferase	312	274	1,14	0,286258456
BMEI0205	Immunoglobulin-binding protein EibE	453	366	1,24	0,013664788
BMEI0206	GTP-binding protein	378	306	1,24	0,044594017
BMEI0207	Glutamate 5-kinase	301	246	1,23	7,10E-05
BMEI0208	Gamma-glutamyl phosphate reductase (GPR)	429	347	1,24	0,001449144
BMEI0209	Nicotinate-nucleotide adenyltransferase / nicotinamide-nucleotide adenyltransferase	195	169	1,15	0,017447798
BMEI0210	lojaP protein family	2943	2482	1,19	0,150617134
BMEI0211	Hypothetical cytosolic protein	3574	3187	1,12	0,28585437
BMEI0212	Hypothetical protein	1104	959	1,15	0,219487559
BMEI0213	Membrane proteins related to metalloendopeptidases	1280	861	1,49	0,002522476
BMEI0214	Tail-specific protease	13659	12088	1,13	0,11158308
BMEI0215	Invasion protein a	1807	2002	0,9	0,269738312
BMEI0216	Hypothetical protein	1109	1162	0,95	0,726704674
BMEI0217	Hypothetical protein	420	382	1,1	0,347525596
BMEI0218	Transcriptional regulatory protein, LysR family	515	333	1,55	2,61E-05
BMEI0219	Malonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating)	686	1585	0,43	0,000434392
BMEI0220	Hypothetical protein	306	443	0,69	0,002348505
BMEI0221	Pyridoxine kinase	448	367	1,22	0,097440999
BMEI0222	Carbonic anhydrase	2682	2037	1,32	0,045135492
BMEI0223	Membrane-bound lytic murein transglycosylase B	6669	6011	1,11	0,292748109
BMEI0224	Hypothetical protein	491	613	0,8	0,012315084
BMEI0225	Signal recognition particle, subunit FFH/SRP54	688	664	1,04	0,780878995
BMEI0226	Chorismate mutase	614	484	1,27	0,098625195
BMEI0227	SSU ribosomal protein S16P	875	822	1,06	0,698663861
BMEI0228	LemA protein	4538	4412	1,03	0,630622472
BMEI0229	Hypothetical membrane spanning protein	3840	4109	0,93	0,770076932
BMEI0230	Hypothetical protein	1862	2261	0,82	0,149454999
BMEI0231	NAD-specific glutamate dehydrogenase	7032	8705	0,81	0,010010603
BMEI0232	Transporter	582	778	0,75	1,15E-05
BMEI0233	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase / imp cyclohydrolase (ec 3.5.4.10)	1753	988	1,77	0,002989624
BMEI0234	Hypothetical cytosolic protein	729	570	1,28	0,024801247
BMEI0235	16s rRNA m(5)C 967 methyltransferase	379	347	1,09	0,376039753
BMEI0236	Protease HtpX	579	752	0,77	0,013182998
BMEI0237	Hypothetical cytosolic protein	804	840	0,96	0,864883137
BMEI0238	Acetyl-coenzyme a synthetase	667	1452	0,46	3,62E-07
BMEI0239	Usg protein	255	193	1,32	0,184605305
BMEI0240	Fusaric acid resistance protein fusb / fusaric acid resistance protein fusc	385	334	1,15	0,290619506
BMEI0241	Phosphate regulon sensor protein PhoR	155	160	0,97	0,529569115
BMEI0242	Leucyl-tRNA synthetase	1936	1220	1,59	9,37E-10
BMEI0243	Hypothetical protein	341	205	1,67	0,000240791
BMEI0244	Transaldolase	4661	3906	1,19	0,116027382
BMEI0245	Primosomal protein N'	197	213	0,93	0,30113087
BMEI0246	Primosomal protein n'	250	227	1,1	0,133692358
BMEI0247	Hypothetical protein	2790	3292	0,85	0,162770257
BMEI0248	ATP synthase delta chain	2300	1950	1,18	0,077798746

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0249	ATP synthase alpha chain	10439	9356	1,12	0,069147961
BMEI0250	ATP synthase gamma chain	10188	8972	1,14	0,0093134
BMEI0251	ATP synthase beta chain	21521	19379	1,11	0,000886094
BMEI0252	ATP synthase epsilon chain	961	744	1,29	0,018088683
BMEI0253	Transcriptional regulator, MarR family	6450	5390	1,2	0,667584038
BMEI0254	Transcriptional regulator, GntR family	960	751	1,28	0,220773946
BMEI0255	Hypothetical protein	157	428	0,37	0,003354338
BMEI0256	D-amino acid dehydrogenase small subunit	408	601	0,68	0,124367259
BMEI0257	Proline racemase	991	1287	0,77	0,030899078
BMEI0258	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livh	2190	4771	0,46	1,40E-05
BMEI0259	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livm	3226	6420	0,5	7,87E-05
BMEI0260	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein braf	1908	3232	0,59	0,000904378
BMEI0261	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein brag	1108	1663	0,67	0,01456
BMEI0262	Hypothetical protein	1036	1646	0,63	0,004338704
BMEI0263	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	619	1615	0,38	3,32E-05
BMEI0264	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	209	342	0,61	2,77E-09
BMEI0265	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	251	306	0,82	0,157815084
BMEI0266	Pyruvate carboxylase	1772	1914	0,93	0,37387641
BMEI0267	Membrane protein MosC	1940	1756	1,1	0,317011164
BMEI0268	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	3056	4201	0,73	0,001285133
BMEI0269	GcpE protein	1094	832	1,31	0,005880877
BMEI0270	Geranyltranstransferase	849	802	1,06	0,141395344
BMEI0271	Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase	1179	1426	0,83	0,02673685
BMEI0272	LSU ribosomal protein L32p	302	217	1,39	0,008208558
BMEI0273	GlcG protein	647	359	1,8	0,002010592
BMEI0274	Acetyl-CoA acetyltransferase	588	798	0,74	0,000202082
BMEI0275	ATP-dependent DNA helicase	1455	1587	0,92	0,394318385
BMEI0277	Heat shock protein 15	3715	4734	0,78	3,16E-13
BMEI0278	Ferredoxin II	2454	1419	1,73	0,017194781
BMEI0279	Transcriptional regulator	7305	7931	0,92	0,048968231
BMEI0280	RNA polymerase sigma-32 factor	10395	12166	0,85	0,138750099
BMEI0281	Hypothetical cytosolic protein	810	652	1,24	0,000276843
BMEI0282	Zinc metalloprotease	479	389	1,23	0,046214901
BMEI0283	Thiaminé transport ATP-binding protein ThiQ	186	179	1,04	0,123393272
BMEI0284	Thiaminé transport system permease protein ThiP	182	228	0,8	0,05790647
BMEI0285	Thiaminé-binding periplasmic protein precursor	1165	1608	0,72	3,76E-06
BMEI0286	Putative nucleotide-binding protein	181	439	0,41	0,023520882
BMEI0287	Hypothetical protein	690	732	0,94	0,799661454
BMEI0288	ABC transporter ATP-binding protein UUP	588	514	1,14	0,099292158
BMEI0289	Hypothetical cytosolic protein	11103	9134	1,22	0,077516869
BMEI0290	Hypothetical cytosolic protein	3573	3350	1,07	0,333454458
BMEI0291	Hypothetical protein	10913	9880	1,1	0,27225571
BMEI0292	Pyruvate kinase	3180	2575	1,23	0,03470059
BMEI0293	2-hydroxy-6-oxo-2,4-heptadienoate hydrolase	1488	1519	0,98	0,857525864
BMEI0294	LSU ribosomal protein L36p	2074	2341	0,89	0,013287588
BMEI0295	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	715	851	0,84	0,439939466
BMEI0296	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	1628	2466	0,66	5,99E-07
BMEI0297	Hypothetical cytosolic protein	1375	1580	0,87	0,144023482
BMEI0298	Hypothetical protein	2189	3323	0,66	0,00476319
BMEI0299	Hypothetical protein	3161	4057	0,78	0,123986538
BMEI0300	Transporter, mfs superfamily	1019	955	1,07	0,308139656
BMEI0301	Hypothetical protein	728	720	1,01	0,838464739

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0302	Quinone oxidoreductase	1468	2375	0,62	3,23E-09
BMEI0303	Hypothetical cytosolic protein	3498	3609	0,97	0,765028376
BMEI0304	Hypothetical cytosolic protein	53	59	0,89	0,083173818
BMEI0305	Transcriptional regulator, deor family	210	205	1,03	0,818874197
BMEI0306	Hypothetical protein	140	157	0,89	0,288916399
BMEI0307	Propionate-CoA ligase	181	270	0,67	6,71E-06
BMEI0308	Hypothetical protein	159	388	0,41	0,0322717
BMEI0309	Phosphoglycerate kinase	2966	2472	1,2	0,031288959
BMEI0310	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	17851	19523	0,91	0,067564072
BMEI0311	Transketolase	4323	4719	0,92	0,36245829
BMEI0312	Hypothetical cytosolic protein	11454	9473	1,21	0,013351766
BMEI0313	Hypothetical cytosolic protein	6062	5213	1,16	0,010098746
BMEI0314	Hypothetical protein	1402	1242	1,13	0,485761757
BMEI0315	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	153	279	0,55	0,006595643
BMEI0316	Hypothetical protein	984	763	1,29	0,001171212
BMEI0317	Integral membrane protein	527	677	0,78	0,01267306
BMEI0318	2Fe-2S ferredoxins, iron-sulfur binding protein	2465	2481	0,99	0,832332578
BMEI0319	Bioy protein	3804	2918	1,3	0,001031868
BMEI0320	Transcriptional regulator, gntr family	883	917	0,96	0,484786488
BMEI0321	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	1417	1442	0,98	0,587084347
BMEI0322	LSU ribosomal protein L31p	4176	3500	1,19	0,063440565
BMEI0323	Probable transport ATP-binding protein MsbA	1638	1497	1,09	0,201649765
BMEI0324	Chemotaxis MotB protein	4592	3867	1,19	0,04229221
BMEI0325	Mota/tolq/exbb proton channel family	5201	4799	1,08	0,154424618
BMEI0326	Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase	2976	2567	1,16	0,204962716
BMEI0327	Protein translation elongation factor P (EF-P)	4953	5050	0,98	0,58972677
BMEI0328	Tetratricopeptide repeat family protein	960	639	1,5	0,000436604
BMEI0329	Thiamin-phosphate pyrophosphorylase	617	456	1,35	0,034569039
BMEI0330	OpgC	1364	855	1,6	0,000986826
BMEI0331	Hypothetical protein	1075	922	1,17	0,01958529
BMEI0332	Crossover junction endodeoxyribonuclease ruvc	237	210	1,13	0,308807974
BMEI0333	Holliday junction DNA helicase RuvA	1116	1239	0,9	0,418253587
BMEI0334	Holliday junction DNA helicase RuvB	263	248	1,06	0,530426104
BMEI0335	4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase family active site	637	707	0,9	0,024463763
BMEI0336	TolQ protein	3899	2798	1,39	0,001350219
BMEI0337	Biopolymer transport exbd protein	10239	7135	1,44	6,61E-09
BMEI0338	Hypothetical protein	2439	1404	1,74	0,003392132
BMEI0339	TolB protein	12158	8768	1,39	0,000233137
BMEI0340	Peptidoglycan-associated lipoprotein	6080	6019	1,01	0,994100806
BMEI0341	Tpr repeat containing exported protein	784	604	1,3	0,000275846
BMEI0342	Cell cycle protein MesJ	455	368	1,24	0,147340875
BMEI0343	Cell division protein FtsH	11588	11686	0,99	0,951471474
BMEI0344	Phosphoglucosaminé mutase / phosphoacetylglucosaminé mutase / phosphomannomutase	2184	1980	1,1	0,004047692
BMEI0345	Heat resistant agglutinin 1 precursor	3329	2763	1,21	0,071576879
BMEI0346	Sodium/bile acid cotransporter homolog, SBF family	548	668	0,82	0,044473818
BMEI0347	Phosphoserine aminotransferase	1983	1876	1,06	0,905519968
BMEI0348	Hypothetical protein	824	850	0,97	0,713834867
BMEI0349	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1010	1163	0,87	0,168680583
BMEI0350	Acetyltransferase	305	356	0,86	0,130937348
BMEI0351	Adenylosuccinate synthetase	275	315	0,87	0,074108903
BMEI0352	Hypothetical transcription regulator	667	603	1,11	0,239567466

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0353	Proline/betaine transporter	1287	1239	1,04	0,71770662
BMEI0354	Hypothetical membrane spanning protein	146	136	1,08	0,071427034
BMEI0355	Glutaminé amidotransferases class-II	191	138	1,38	0,041619658
BMEI0356	Type 1 capsular polysaccharide biosynthesis protein j	2210	2334	0,95	0,736937582
BMEI0357	Transcriptional regulatory protein, AsnC family	226	625	0,36	0,005523542
BMEI0358	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	3499	4854	0,72	0,006070648
BMEI0359	Periplasmic component of efflux system	480	445	1,08	0,082392169
BMEI0360	ABC transporter ATP-binding protein / ABC transporter permease protein	408	344	1,18	0,00386026
BMEI0361	ABC transporter ATP-binding protein / ABC transporter permease protein	130	208	0,63	0,134428565
BMEI0362	Hypothetical protein	121	418	0,29	0,016242643
BMEI0363	TonB protein	331	451	0,73	0,358354479
BMEI0364	Biopolymer transport ExbD protein	171	139	1,23	0,173198715
BMEI0365	Biopolymer transport ExbB protein	211	154	1,37	0,0194715
BMEI0366	Hypothetical protein	2593	1586	1,64	9,68E-05
BMEI0367	Hypothetical protein	1908	1324	1,44	0,005007357
BMEI0368	Hypothetical protein	50181	52638	0,95	0,215262357
BMEI0369	Hypothetical protein	19828	19199	1,03	0,558582618
BMEI0370	Sensory transduction histidine kinase	753	806	0,93	0,602194386
BMEI0371	Regulatory factor VirF homolog	16884	15950	1,06	0,087032219
BMEI0372	Sensory transduction regulatory protein	29383	36241	0,81	0,000173971
BMEI0373	Hypothetical protein	23519	24884	0,95	0,398100859
BMEI0374	Sensory transduction histidine kinase	7584	8030	0,94	0,226855239
BMEI0375	Ferric uptake regulation protein	4599	4707	0,98	0,923690094
BMEI0376	Hypothetical protein	744	663	1,12	0,450185193
BMEI0377	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase d	1564	1628	0,96	0,76249071
BMEI0378	RNA polymerase sigma-32 factor	1684	1905	0,88	0,449084073
BMEI0379	Phosphinothricin N-acetyltransferase	251	233	1,08	0,246129185
BMEI0380	Malate synthase G	718	561	1,28	0,031600259
BMEI0381	Glutamyl-tRNA synthetase	153	140	1,09	0,109127173
BMEI0382	DNA-3-methyladenine glycosidase	115	128	0,9	0,323702856
BMEI0383	5-methylcytosine-specific restriction enzyme A	2924	1626	1,8	0,166534001
BMEI0384	Disulfide bond formation protein B	1668	1487	1,12	0,156277702
BMEI0385	Putative membrane-associated alkaline phosphatase	1236	1253	0,99	0,961720619
BMEI0386	Succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+)	1179	1412	0,84	0,06332723
BMEI0387	Transcriptional regulator, IclR family	860	1176	0,73	0,022666549
BMEI0388	Choline dehydrogenase	1265	1116	1,13	0,616635968
BMEI0389	Hypothetical protein	1384	1501	0,92	0,4908161
BMEI0390	Hypothetical cytosolic protein	237	309	0,77	0,130813783
BMEI0391	Sugar transport ATP-binding protein	119	119	1	0,84160657
BMEI0392	Ribose transport system permease protein RbsC	505	706	0,72	0,03654324
BMEI0393	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	583	984	0,59	0,006587467
BMEI0394	2-deoxy-d-gluconate 3-dehydrogenase	2096	2081	1,01	0,986796509
BMEI0395	2-deoxy-d-gluconate 3-dehydrogenase	270	210	1,28	0,072411656
BMEI0396	Dihydroxyacetone kinase	628	602	1,04	0,619331408
BMEI0397	Dihydroxyacetone kinase	454	399	1,14	0,338818414
BMEI0398	Deoxyribonucleoside regulator / dihydroxyacetone kinase	387	384	1,01	0,974027667
BMEI0399	Dihydroxyacetone kinase	547	556	0,98	0,962278553
BMEI0400	Hypothetical protein	6313	5463	1,16	0,160796743
BMEI0401	Hypothetical protein	649	634	1,02	0,789480178
BMEI0402	31 kda outer-membrane immunogenic protein precursor	129	172	0,75	0,135459588
BMEI0403	Multiple antibiotic resistance protein MarC	883	904	0,98	0,700750544
BMEI0404	Hypothetical protein	915	1085	0,84	0,033614906

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0405	7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	1153	1011	1,14	0,260387883
BMEI0406	7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	2380	2351	1,01	0,674621834
BMEI0407	Hypothetical protein	258	240	1,08	0,042181654
BMEI0408	Hypothetical protein	1091	887	1,23	0,027818162
BMEI0409	Isocitrate lyase	1256	1003	1,25	0,078844792
BMEI0410	Transcriptional regulator, MerR family	251	205	1,22	0,0142854
BMEI0411	Putrescine-binding periplasmic protein	3745	4004	0,94	0,104945488
BMEI0412	Putrescine transport ATP-binding protein PotG	438	513	0,85	0,382976212
BMEI0413	Putrescine transport system permease protein PotH	1670	1980	0,84	0,043032027
BMEI0414	Putrescine transport system permease protein PotI	485	426	1,14	0,219744946
BMEI0415	Hypothetical protein	450	377	1,19	0,022713255
BMEI0416	Hypothetical protein	217	292	0,74	0,016810469
BMEI0417	Non-motile and phage-resistance protein	533	531	1	0,857376432
BMEI0418	Lipooligosaccharide biosynthesis protein LIC2B	789	560	1,41	0,024687361
BMEI0419	Hypothetical protein	1270	1029	1,23	0,404479627
BMEI0420	Oxidoreductase	1981	1232	1,61	2,94E-05
BMEI0421	Pleiotropic regulatory protein	5206	3679	1,42	0,006623225
BMEI0422	Hypothetical protein	1980	1575	1,26	0,007342979
BMEI0423	Response regulator CtrA	4838	4600	1,05	0,430870976
BMEI0424	Hypothetical protein	860	770	1,12	0,376885938
BMEI0425	Hypothetical protein	7936	5258	1,51	0,002885222
BMEI0426	Acetyltransferase	1893	2470	0,77	0,001311226
BMEI0427	Hypothetical protein	494	381	1,3	0,020780858
BMEI0428	TRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate) -methyltransferase	1102	647	1,7	8,60E-05
BMEI0429	23S ribosomal RNA methyltransferase	121	93	1,31	0,016279692
BMEI0430	Nodulation protein NolR	3066	2245	1,37	0,017407283
BMEI0431	Hypothetical protein	552	443	1,25	0,130804562
BMEI0432	Hypothetical protein	418	359	1,17	0,072143994
BMEI0433	Periplasmic dipeptide transport protein precursor	5615	7831	0,72	0,000224282
BMEI0434	Periplasmic dipeptide transport protein precursor	927	955	0,97	0,507558956
BMEI0435	Dipeptide transport system permease protein DppB	226	182	1,24	0,021916204
BMEI0436	Dipeptide transport system permease protein DppC	275	226	1,22	0,000326616
BMEI0437	Dipeptide transport ATP-binding protein DppD	147	113	1,3	0,000166104
BMEI0438	Dipeptide transport ATP-binding protein DppF	194	186	1,04	0,647406985
BMEI0439	Glycine betaine/L-proline transport ATP-binding protein prov	668	557	1,2	0,047570442
BMEI0440	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein ProW	4544	6361	0,71	0,001682051
BMEI0441	Glycine betaine/L-proline-binding protein ProX	4051	5719	0,71	4,87E-07
BMEI0442	Hypothetical protein	105	155	0,68	0,029723588
BMEI0443	Hypothetical protein	292	345	0,85	0,129333159
BMEI0444	Methyltransferase	268	302	0,89	0,201734977
BMEI0445	Oxalate/formate antiporter	5422	4786	1,13	0,343725205
BMEI0446	Transcriptional regulator, MarR family	21522	15696	1,37	0,016105838
BMEI0447	Leucine-responsive regulatory protein	1711	2269	0,75	0,007904925
BMEI0448	Hypothetical protein	1269	1143	1,11	0,067252539
BMEI0449	Anthranilate synthase	1944	1980	0,98	0,951647232
BMEI0450	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcD	1300	1267	1,03	0,410432749
BMEI0451	2-isopropylmalate synthase	4697	6562	0,72	0,023627445
BMEI0452	Putative phosphohydrolases, ICC family	219	194	1,13	0,087506418
BMEI0453	MutT/NudIX family protein	882	973	0,91	0,338725281
BMEI0454	Outer membrane protein W precursor	1908	1786	1,07	0,769558848
BMEI0455	Glutathione S-transferase	196	398	0,49	0,0272329
BMEI0456	Acetyltransferase	414	338	1,23	0,02152483

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEI0457	Hypothetical membrane associated protein	969	684	1,42	0,005602513
BMEI0458	Hypothetical membrane spanning protein	748	510	1,47	0,007745429
BMEI0459	Hypothetical protein	573	438	1,31	0,008303463
BMEI0460	MoxR protein	782	589	1,33	0,037550632
BMEI0461	Hypothetical protein	682	638	1,07	0,138787993
BMEI0462	Phosphohydrolase (MutT/NudIX family protein)	578	521	1,11	0,021448606
BMEI0463	Poly(A) polymerase / tRNA nucleotidyltransferase	546	505	1,08	0,55223362
BMEI0464	Lipid A-myristate beta-hydroxylase	5453	4888	1,12	0,009657756
BMEI0465	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	1241	978	1,27	0,003348464
BMEI0466	Acetyltransferase	1148	1075	1,07	0,310138943
BMEI0467	Coproporphyrinogen III oxidase, aerobic	3911	4068	0,96	0,652865598
BMEI0468	Hypothetical cytosolic protein	2750	3541	0,78	0,057748347
BMEI0469	Purine nucleoside permease	16089	17863	0,9	0,632984894
BMEI0470	Ribosomal RNA methyltransferase	2789	2903	0,96	0,875291108
BMEI0471	ABC transporter ATP-binding protein	1082	970	1,12	0,234468944
BMEI0472	ABC transporter ATP-binding protein	916	1137	0,81	0,089466897
BMEI0473	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	5506	7340	0,75	0,007883291
BMEI0474	Cytochrome b	5437	6563	0,83	0,227756121
BMEI0475	Cytochrome c1	1083	836	1,29	0,06945456
BMEI0476	Adenine phosphoribosyltransferase	121	114	1,06	0,195218766
BMEI0477	Monoaminé oxidase regulatory protein, putative	1065	1352	0,79	0,00139849
BMEI0478	(R)-specific enoyl-CoA hydratase	930	1176	0,79	0,00279217
BMEI0479	GTP-binding protein	1373	932	1,47	0,00019992
BMEI0480	Peptidyl-tRNA hydrolase	3097	2990	1,04	0,449330394
BMEI0481	LSU ribosomal protein L25P	22013	24736	0,89	0,030562731
BMEI0482	Hypothetical ATP-binding protein	225	160	1,4	3,51E-06
BMEI0483	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	1868	1728	1,08	0,690069293
BMEI0484	Hypothetical protein	2092	2177	0,96	0,650959371
BMEI0485	XAA-pro dipeptidase	1670	1836	0,91	0,189966785
BMEI0486	Hypothetical cytosolic protein	1611	1476	1,09	0,2125187
BMEI0487	ATP synthase beta subunit/transcription termination factor rho	222	208	1,07	0,655288853
BMEI0488	Prolipoprotein diacylglycerol transferase	305	310	0,99	0,880308957
BMEI0489	Hypothetical protein	244	228	1,07	0,414651192
BMEI0490	Hypothetical cytosolic protein	4458	3884	1,15	0,235335895
BMEI0491	Protein secretion chaperonin CsaA	5525	5396	1,02	0,651864103
BMEI0492	Osmolarity sensor protein EnvZ	471	452	1,04	0,745643282
BMEI0493	Transcriptional regulatory protein OmpR	1368	1250	1,09	0,393328398
BMEI0494	Transcriptional regulatory protein PetP	552	757	0,73	0,04465819
BMEI0495	Hypothetical protein	1879	2234	0,84	0,02758934
BMEI0496	Hydroxyacylglutathione hydrolase	2191	2435	0,9	0,427979554
BMEI0497	Hypothetical membrane spanning protein	20792	23099	0,9	0,468409288
BMEI0498	Cold shock protein CspA	6934	8585	0,81	0,350851361
BMEI0499	Soluble lytic murein transglycosylase	148	150	0,99	0,764368481
BMEI0500	Soluble lytic murein transglycosylase	397	454	0,87	0,199337813
BMEI0501	Excinuclease ABC subunit b	743	749	0,99	0,87808153
BMEI0502	Hypothetical membrane spanning protein	255	335	0,76	0,258016442
BMEI0503	Acyl-CoA hydrolase	1510	1147	1,32	0,077161639
BMEI0504	Extensin-like protein	1972	1314	1,5	4,20E-05
BMEI0505	Hypothetical membrane associated protein	1513	1301	1,16	0,312950704
BMEI0506	Transporter, dme family	1187	858	1,38	0,000492158
BMEI0507	Hypothetical protein	3904	3480	1,12	0,439047866
BMEI0508	Transcription elongation factor GreA	9268	12507	0,74	0,025406163

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0509	Lipopolysaccharide core biosynthesis mannosyltransferase lpcc	1125	1287	0,87	0,235209586
BMEI0510	Leucine-responsive regulatory protein	877	774	1,13	0,228530353
BMEI0511	Trk system potassium uptake protein TrkH	748	783	0,96	0,512677629
BMEI0512	Thioredoxin reductase	5934	5101	1,16	0,062025597
BMEI0513	Transcriptional regulatory protein, LysR family	1533	1261	1,22	0,024033832
BMEI0514	Hypothetical protein	105	118	0,89	0,252568911
BMEI0515	Hypothetical protein	274	214	1,28	0,100625083
BMEI0516	Aspartate aminotransferase A	10906	9301	1,17	0,461773452
BMEI0517	Glutathione S-transferase	1455	768	1,89	0,000525012
BMEI0518	Cold shock protein CspA	18977	29316	0,65	0,017230291
BMEI0519	Phosphohydrolase (MutT/Nudix family protein)	1137	1554	0,73	0,028082406
BMEI0520	ABC transporter ATP-binding protein	371	468	0,79	0,109251634
BMEI0521	Hypothetical protein	768	542	1,42	0,025974102
BMEI0522	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	1694	859	1,97	0,000111082
BMEI0523	Hypothetical protein	1606	2207	0,73	0,008283705
BMEI0524	Hypothetical protein	195	547	0,36	0,067502475
BMEI0525	Zinc protease	1370	1291	1,06	0,280718081
BMEI0526	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	7559	4812	1,57	8,05E-05
BMEI0527	Hypothetical cytosolic protein	763	800	0,95	0,235022939
BMEI0528	Sodium-dependent phosphate transport protein	1463	1322	1,11	0,344994579
BMEI0529	Sodium-dependent phosphate transport protein	2008	2072	0,97	0,532680959
BMEI0530	DNA primase	310	276	1,12	0,001874632
BMEI0531	Hypothetical protein	4637	3909	1,19	0,212961444
BMEI0532	RNA polymerase sigma factor RpoD	589	673	0,88	0,656180482
BMEI0533	Hypothetical cytosolic protein	166	183	0,91	0,62103594
BMEI0534	Hypothetical cytosolic protein	957	1437	0,67	0,002595708
BMEI0535	Hypothetical protein	1238	986	1,25	0,05705948
BMEI0536	Periplasmic immunogenic protein	30067	21843	1,38	0,0021998
BMEI0537	Integrase/recombinase	245	638	0,38	0,084360289
BMEI0538	Hypothetical protein	140	234	0,6	0,083976786
BMEI0539	Hypothetical protein	924	828	1,12	0,256498857
BMEI0540	Hypothetical protein	142	146	0,97	0,840366528
BMEI0541	Hypothetical protein	74	104	0,71	0,140659345
BMEI0542	Hypothetical protein	4495	5939	0,76	6,55E-07
BMEI0543	Choloylglycine hydrolase	17055	23019	0,74	1,13E-05
BMEI0544	Hypothetical protein	1282	1308	0,98	0,679710882
BMEI0545	Integral membrane protein	2469	3070	0,8	0,026841201
BMEI0546	Pyrazinamidase / nicotinamidase	472	505	0,93	0,302147672
BMEI0547	Phna protein	450	602	0,75	0,00169239
BMEI0548	Flavohemoprotein	154	198	0,78	0,023411244
BMEI0549	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit	199	297	0,67	0,252736273
BMEI0550	Hypothetical protein	1437	1789	0,8	0,078382925
BMEI0551	Hypothetical protein	346	268	1,29	0,022763341
BMEI0552	Lysophospholipase I2	838	1141	0,73	0,035961974
BMEI0553	ABC transporter ATP-binding protein YjK	2997	2815	1,06	0,111796204
BMEI0554	Trans-aconitate methyltransferase	433	267	1,62	0,102909851
BMEI0555	Hypothetical protein	166	181	0,92	0,125171765
BMEI0556	Alpha-ketoglutarate permease	1211	1685	0,72	9,74E-06
BMEI0557	Hypothetical protein	1246	1033	1,21	0,043480421
BMEI0558	Transcriptional regulator, ArsR family	7661	5332	1,44	0,029340729
BMEI0559	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	1464	1136	1,29	0,102807376
BMEI0560	Transporter	289	281	1,03	0,90252149

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpriR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpriR/WT	P value annova
BMEI0561	Membrane-bound lytic murein transglycosylase B	926	817	1,13	0,159216678
BMEI0562	Lysozyme M1 precursor	188	258	0,73	0,164577638
BMEI0563	Hypothetical protein	680	708	0,96	0,281837146
BMEI0564	DNAJ-like protein DjlA	528	390	1,35	0,000511749
BMEI0565	Anhydro-n-acetylmuramyl-tripeptide amidase	1196	876	1,36	0,006584877
BMEI0566	Soluble lytic murein transglycosylase	3472	1825	1,9	0,007288436
BMEI0567	Hypothetical protein	451	392	1,15	0,188632362
BMEI0568	Hypothetical protein	21527	21032	1,02	0,884221199
BMEI0569	Manganese transport protein MntH	44237	48809	0,91	0,056494533
BMEI0570	Hypothetical protein	291	245	1,19	0,101230194
BMEI0571	Sam-dependent methyltransferase	1023	686	1,49	0,00236905
BMEI0572	Hypothetical protein	3544	2876	1,23	0,029083719
BMEI0573	Penicillin-binding protein 2	2162	1915	1,13	0,617257799
BMEI0574	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase	2420	1724	1,4	0,010292127
BMEI0575	Udp-n-acetylmuramoylalanyl-d-glutamyl-2, 6-diaminopimelate--d-alanyl-d- alanyl ligase	3819	2774	1,38	0,004942825
BMEI0576	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide- transferase	6510	5086	1,28	0,004458493
BMEI0577	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	1552	1000	1,55	0,00018278
BMEI0578	Cell division protein FtsW	2464	1882	1,31	0,006971042
BMEI0579	UDP-N-acetylglucosaminé--N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl- undecaprenol n-acetylglucosaminé transferase	451	318	1,42	0,009770048
BMEI0580	UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase	2437	1786	1,36	0,004729781
BMEI0581	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosaminé reductase	1195	801	1,49	0,005068144
BMEI0582	D-alanine--D-alanine ligase	1932	1629	1,19	0,014449023
BMEI0583	Cell division protein FtsQ	2800	1872	1,5	0,000413646
BMEI0584	Cell division protein FtsA	2482	1672	1,48	0,007019878
BMEI0585	Cell division protein FtsZ	3417	2842	1,2	0,155889629
BMEI0586	UDP-3-o-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosaminé deacetylase	2164	1666	1,3	0,00902108
BMEI0587	ComI, competence lipoprotein	5140	4062	1,27	0,000306537
BMEI0588	DNA repair protein RecN	808	552	1,46	0,003430862
BMEI0589	NAD-dependent DNA ligase	858	620	1,38	0,000311993
BMEI0590	Hypothetical protein	477	341	1,4	0,013249697
BMEI0591	Xaa-pro aminopeptidase	4828	3967	1,22	0,015774215
BMEI0592	Ribosomal protein L11 methyltransferase	2684	2646	1,01	0,754328874
BMEI0593	Sco2 protein	1922	1747	1,1	0,155598979
BMEI0594	Chloramphenicol acetyltransferase	213	397	0,54	0,043377301
BMEI0595	Crea protein	364	481	0,76	0,070727649
BMEI0596	DNA helicase II	941	981	0,96	0,456233632
BMEI0597	Serine/threonine protein kinases	646	573	1,13	0,299746065
BMEI0598	Hypothetical protein	2713	2426	1,12	0,379100103
BMEI0599	D-lactate dehydrogenase (cytochrome)	1699	1421	1,2	0,107658122
BMEI0600	Hypothetical membrane spanning protein	719	544	1,32	0,005054036
BMEI0601	Hypothetical protein	833	682	1,22	0,280176217
BMEI0602	Hypothetical protein	693	437	1,59	0,10415375
BMEI0603	Hypothetical protein	3692	4225	0,87	3,10E-05
BMEI0604	Transcriptional regulator, TetR family	1745	1917	0,91	0,488638899
BMEI0605	Bicyclomycin resistance protein	2265	2035	1,11	0,045884306
BMEI0606	Bicyclomycin resistance protein homolog	1996	1720	1,16	0,083170337
BMEI0607	Hypothetical cytosolic protein	1902	2217	0,86	0,001954472
BMEI0608	Thymidylate synthase	4647	4954	0,94	0,432280774
BMEI0609	Dihydrofolate reductase	1503	1558	0,97	0,506778672
BMEI0610	HflK protein	5085	7775	0,65	0,000720383
BMEI0611	HflC protein	1581	1869	0,85	0,295009118

Locus Tag	Protéine	Δ pRI moyenne	wt moyenne	Rapport Δ pRI/WT	P value annova
BMEI0612	Hypothetical protein	127	131	0,97	0,949623306
BMEI0613	Protease do	2273	1554	1,46	0,01265172
BMEI0614	NAD(fad)-utilizing dehydrogenases	947	635	1,49	0,0024822
BMEI0615	Phosphoserine phosphatase	135	118	1,14	0,095770506
BMEI0616	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	199	201	0,99	0,945278465
BMEI0617	Acetolactate synthase large subunit	4065	4982	0,82	0,08712105
BMEI0618	Acetolactate synthase small subunit	3745	3694	1,01	0,999952686
BMEI0619	Exodeoxyribonuclease v alpha chain	2381	2150	1,11	0,416486888
BMEI0620	Hypothetical protein	3026	2989	1,01	0,91886128
BMEI0621	Pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxJ	860	467	1,84	0,001206945
BMEI0622	Kup system potassium uptake protein	1015	650	1,56	7,89E-07
BMEI0623	Transcriptional regulator, TetR family	6486	1656	3,92	0,000375468
BMEI0624	Ketol-acid reductoisomerase	46571	28295	1,65	0,001166593
BMEI0625	Hypothetical protein	33425	18650	1,79	0,001324637
BMEI0626	Transcriptional regulator, GntR family / multiple substrate aminotransferase	10470	6725	1,56	0,001177058
BMEI0627	Hypothetical protein	826	843	0,98	0,809547619
BMEI0628	Hypothetical protein	1618	2505	0,65	0,004853041
BMEI0629	Hypothetical protein	221	252	0,88	0,352565981
BMEI0630	Phenazine biosynthesis protein PhzF	1998	2880	0,69	1,39E-05
BMEI0631	Hypothetical protein	7487	9792	0,76	0,000123865
BMEI0632	Hypothetical membrane spanning protein	63573	64547	0,98	0,098535581
BMEI0633	Integral membrane protein	3691	6616	0,56	0,005147048
BMEI0634	Integral membrane protein	662	707	0,94	0,570957875
BMEI0635	Cobalt transport ATP-binding protein CbiO	267	282	0,95	0,79762373
BMEI0636	Cobalt transport ATP-binding protein CbiO	249	327	0,76	0,093627766
BMEI0637	Cobalt transport protein CbiQ	306	309	0,99	0,985248298
BMEI0638	Hypothetical protein	557	512	1,09	0,320317947
BMEI0639	Cbim protein	2787	3353	0,83	0,065775101
BMEI0640	Cbim protein	1488	1551	0,96	0,955269724
BMEI0641	Hypothetical protein	2893	3166	0,91	0,752549969
BMEI0642	Urea transporter	525	756	0,69	0,040125451
BMEI0643	Uréase accessory protein UreD	173	261	0,66	0,009211116
BMEI0644	Uréase accessory protein UreG	219	220	1	0,737179045
BMEI0645	Uréase accessory protein UreF	292	340	0,86	0,086609208
BMEI0646	Uréase accessory protein UreE	103	113	0,91	0,1084382
BMEI0647	Uréase alpha subunit	234	294	0,79	0,002071459
BMEI0648	Uréase beta subunit	330	543	0,61	0,015478267
BMEI0649	Uréase gamma subunit	246	293	0,84	0,003144615
BMEI0650	Hypothetical protein	265	299	0,89	0,418831513
BMEI0651	Hypothetical cytosolic protein	1021	885	1,15	0,00420819
BMEI0652	Hypothetical protein	729	863	0,84	0,12553576
BMEI0653	Periplasmic component of efflux system	314	251	1,25	0,043523161
BMEI0654	ABC transporter ATP-binding protein	100	111	0,9	0,480304402
BMEI0655	ABC transporter ATP-binding protein	166	598	0,28	0,058231646
BMEI0656	Daunorubicin resistance transmembrane protein	126	302	0,42	0,03028177
BMEI0657	Metal chelate outer membrane receptor	1964	2112	0,93	0,637872482
BMEI0658	Metal chelate periplasmic binding protein	679	633	1,07	0,569974429
BMEI0659	Metal chelate transport system permease protein	544	544	1	0,767628705
BMEI0660	Metal chelate transport ATP-binding protein	216	190	1,14	0,103933404
BMEI0661	Myo-inositol 2-dehydrogenase	207	223	0,93	0,225470568
BMEI0662	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	279	300	0,93	0,235788094
BMEI0663	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	231	255	0,91	0,459003381

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0664	Sugar transport system permease protein	201	540	0,37	0,005419177
BMEI0665	Sugar transport ATP-binding protein	145	198	0,73	0,028232728
BMEI0666	Short-chain dehydrogenase	184	385	0,48	0,019012864
BMEI0667	Fucose operon fucu protein	1127	718	1,57	0,003664269
BMEI0668	Calcium binding protein	1610	1468	1,1	0,707074151
BMEI0669	Hypothetical protein	196	231	0,85	0,106357283
BMEI0670	Putative membrane-associated alkaline phosphatase	1195	1464	0,82	0,003239539
BMEI0671	Integral membrane protein / hemolysin	649	664	0,98	0,659728607
BMEI0672	Hypothetical protein	1258	1182	1,06	0,980959349
BMEI0673	Thiosulfate-binding protein precursor	801	1781	0,45	9,04E-05
BMEI0674	Sulfate transport system permease protein CysT	130	223	0,58	0,003151381
BMEI0675	Sulfate transport system permease protein CysW	125	158	0,79	0,015663423
BMEI0676	Hypothetical protein	123	110	1,11	0,145816861
BMEI0677	Hypothetical protein	380	240	1,59	0,003989672
BMEI0678	Low pH-induced protein A	20108	18520	1,09	0,35685698
BMEI0679	Potassium/proton antiporter RosB	1739	1186	1,47	0,00046881
BMEI0680	Protein translocase subunit secD / protein translocase subunit secE	6635	8812	0,75	0,000153434
BMEI0681	Hypothetical protein	806	1142	0,71	0,001488071
BMEI0682	Potassium efflux system KefA	969	852	1,14	0,003316892
BMEI0683	Hypothetical protein	3831	2417	1,59	0,049294879
BMEI0684	Sarcosine dehydrogenase	189	273	0,69	0,040718482
BMEI0685	Transcriptional regulator, arac family	115	185	0,62	0,039856301
BMEI0686	Transcriptional regulatory protein, LysR family	1104	1450	0,76	0,001556629
BMEI0687	Hypothetical protein	720	967	0,74	0,033329604
BMEI0688	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	360	547	0,66	3,05E-06
BMEI0689	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	134	192	0,7	0,012763284
BMEI0690	Cobyrinic acid synthase	442	648	0,68	0,124167014
BMEI0691	Hypothetical protein	3417	4492	0,76	0,011550537
BMEI0692	Hypothetical protein	1334	2323	0,57	1,65E-05
BMEI0693	Cobinamide kinase / cobinamide phosphate guanylyltransferase (ec 2.7.7.-)	526	755	0,7	0,013019168
BMEI0694	CobW protein	2420	3318	0,73	0,012435774
BMEI0695	CobN protein	577	629	0,92	0,484123579
BMEI0696	Cob(I)alamin adenosyltransferase	587	861	0,68	0,097147475
BMEI0697	Transporter, DME family	2971	4712	0,63	2,52E-07
BMEI0698	Transporter	971	1228	0,79	0,002382778
BMEI0699	Hypothetical protein	604	855	0,71	0,002301269
BMEI0700	Precorrin-3B C17-methyltransferase	350	405	0,86	0,054875671
BMEI0701	Precorrin-4 C11-methyltransferase	1262	1739	0,73	3,29E-06
BMEI0702	Precorrin-6X reductase	226	236	0,96	0,946925598
BMEI0703	CbiD protein	663	662	1	0,787477671
BMEI0704	Uroporphyrin-III C-methyltransferase	555	483	1,15	0,068170063
BMEI0705	Cobyrinic acid A,C-diamide synthase	554	481	1,15	0,000452978
BMEI0706	CobC protein	181	169	1,07	0,306915196
BMEI0707	CbiB protein	765	696	1,1	0,097599864
BMEI0708	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	424	543	0,78	0,164331601
BMEI0709	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase	1213	1283	0,95	0,877535525
BMEI0710	Hypothetical protein	569	766	0,74	0,178766776
BMEI0711	Hypothetical protein	777	642	1,21	0,139050588
BMEI0712	CbiG protein / precorrin-3b c17-methyltransferase	794	682	1,16	0,001562629
BMEI0713	Precorrin-2 C20-methyltransferase	504	468	1,08	0,197612019
BMEI0714	Precorrin-8x methylmutase	434	399	1,09	0,229530925
BMEI0715	CobG protein	2036	2347	0,87	0,243433821

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEI0716	Precorin-6y C5,15-methyltransferase (decarboxylating)	333	347	0,96	0,72953646
BMEI0717	22 kda outer membrane protein precursor	4743	2779	1,71	3,25E-05
BMEI0718	DNA repair protein RadC homolog	604	627	0,96	0,723460556
BMEI0719	Methionine aminopeptidase	5047	3583	1,41	2,71E-05
BMEI0720	Sugar fermentation stimulation protein homolog	1882	1385	1,36	0,000388089
BMEI0721	Hypothetical cytosolic protein	5596	4937	1,13	0,311592521
BMEI0722	Hypothetical protein	317	470	0,67	0,111733466
BMEI0723	Hypothetical protein	346	445	0,78	0,071368055
BMEI0724	Putative aminotransferase aatc	3386	2850	1,19	0,053329897
BMEI0725	Homoserine dehydrogenase	2683	2452	1,09	0,332004794
BMEI0726	GlpX protein	773	711	1,09	0,031887778
BMEI0727	D-alanine--D-alanine ligase a	14237	16058	0,89	0,15012492
BMEI0728	Single-stranded-DNA-specific exonuclease recJ	808	714	1,13	0,147427606
BMEI0729	Transporter	468	574	0,82	0,422210181
BMEI0730	Lactoylglutathione lyase	748	794	0,94	0,036515002
BMEI0731	Cold shock protein	1296	1225	1,06	0,722302345
BMEI0732	Hypothetical cytosolic protein	4256	5313	0,8	0,001127821
BMEI0733	Non-heme chloroperoxidase	1846	1926	0,96	0,935250354
BMEI0734	Serine acetyltransferase	1924	1835	1,05	0,483301726
BMEI0735	Hypothetical protein	1115	847	1,32	0,010555255
BMEI0736	Ferripyochelin binding protein	1165	1039	1,12	0,134754042
BMEI0737	Hypothetical protein	679	822	0,83	0,015078481
BMEI0738	Hypothetical protein	837	718	1,17	0,206043346
BMEI0739	Integral membrane protein (rhomboid family)	4720	4168	1,13	0,002537082
BMEI0740	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	5633	5449	1,03	0,777936901
BMEI0741	23s ribosomal RNA methyltransferase	1001	923	1,08	0,382063066
BMEI0742	Protein translation elongation factor TU (EF-TU)	37983	35147	1,08	0,173024736
BMEI0743	Protein translocase subunit SecE	16632	14166	1,17	0,007354988
BMEI0744	Transcription antitermination protein nusG	11399	9031	1,26	0,018691918
BMEI0745	Lsu ribosomal protein L11P	11325	11479	0,99	0,72629979
BMEI0746	Lsu ribosomal protein L1P	10136	10813	0,94	0,249673888
BMEI0747	Lsu ribosomal protein L10p	30596	32333	0,95	0,488012459
BMEI0748	Lsu ribosomal protein L12p (I7/L12)	6685	6560	1,02	0,92918068
BMEI0749	DNA-directed RNA polymerase beta chain	17770	20787	0,85	0,042728976
BMEI0750	DNA-directed RNA polymerase beta' chain	14268	16433	0,87	0,052222395
BMEI0751	Hypothetical protein	1020	748	1,36	0,000110511
BMEI0752	Ssu ribosomal protein S12P	21321	18347	1,16	0,24438588
BMEI0753	Ssu ribosomal protein S7P	25467	23085	1,1	0,230619694
BMEI0754	Protein translation elongation factor G (EF-G)	46622	45372	1,03	0,596769914
BMEI0755	Protein translation elongation factor TU (EF-TU)	30181	26593	1,13	0,062477968
BMEI0756	Ssu ribosomal protein S10P	5770	5252	1,1	0,393006432
BMEI0757	Lsu ribosomal protein L3P	13331	13533	0,99	0,925996481
BMEI0758	Lsu ribosomal protein L1E	14181	13926	1,02	0,754654417
BMEI0759	Lsu ribosomal protein L23P	26398	27811	0,95	0,73358103
BMEI0760	Lsu ribosomal protein L2P	24613	24208	1,02	0,794803876
BMEI0761	Ssu ribosomal protein S19P	38092	38962	0,98	0,844638209
BMEI0762	Lsu ribosomal protein L22P	26695	27744	0,96	0,68056224
BMEI0763	Ssu ribosomal protein S3P	31184	31385	0,99	0,800795124
BMEI0764	Lsu ribosomal protein L16P	48375	50479	0,96	0,478924074
BMEI0765	Lsu ribosomal protein L29P	19729	19197	1,03	0,984250403
BMEI0766	Ssu ribosomal protein S17P	31338	30005	1,04	0,782083666
BMEI0767	Lsu ribosomal protein L14P	15782	14565	1,08	0,42542575

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0768	Lsu ribosomal protein L24P	57037	53952	1,06	0,243787573
BMEI0769	Lsu ribosomal protein L5P	33478	32352	1,03	0,595100145
BMEI0770	Ssu ribosomal protein S14P	28554	27055	1,06	0,50341165
BMEI0771	Ssu ribosomal protein S8P	20585	19349	1,06	0,501205999
BMEI0772	Lsu ribosomal protein I6P	26775	26100	1,03	0,74592705
BMEI0773	Lsu ribosomal protein L18P	12282	11577	1,06	0,649338482
BMEI0774	Ssu ribosomal protein S5P	12661	11744	1,08	0,545679423
BMEI0775	Lsu ribosomal protein L30P	15477	13713	1,13	0,382862387
BMEI0776	Lsu ribosomal protein L15p	5663	6304	0,9	0,306990441
BMEI0777	Protein translocase subunit SecY	20702	21993	0,94	0,023184877
BMEI0778	Adenylate kinase	11370	10776	1,06	0,536461497
BMEI0779	Ssu ribosomal protein S13P	16095	17413	0,92	0,144290916
BMEI0780	Ssu ribosomal protein S11P	12370	13458	0,92	0,216827884
BMEI0781	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	12226	12300	0,99	0,875170973
BMEI0782	Lsu ribosomal protein L17P	2000	1493	1,34	0,001723783
BMEI0783	Protease DO	6013	4243	1,42	0,001008658
BMEI0784	ATPase associated with chromosome architecture/replication	1127	1069	1,05	0,263567749
BMEI0785	Transcriptional regulatory protein	1125	1234	0,91	0,072779914
BMEI0786	Outer membrane protein	7140	5361	1,33	0,002937102
BMEI0787	Reca protein	2576	2957	0,87	0,158287912
BMEI0788	Hypothetical protein	1900	1794	1,06	0,252000042
BMEI0789	Alanyl-tRNA synthetase	2675	2262	1,18	0,000248087
BMEI0790	Alkaline phosphatase	420	587	0,72	0,012505279
BMEI0791	Isocitrate dehydrogenase (NADH)	11701	10172	1,15	0,071450584
BMEI0792	Intracellular proteinase I	1007	1181	0,85	0,009214626
BMEI0793	Protease I	1330	1915	0,69	0,05710798
BMEI0794	SpoU family of rRNA methylases	998	706	1,41	1,93E-05
BMEI0795	Glutamate racemase	2030	1856	1,09	0,158734226
BMEI0796	31 kda immunogenic protein precursor	951	1239	0,77	0,000734582
BMEI0797	Transporter	2663	4079	0,65	0,001104098
BMEI0798	Hypothetical protein	2296	2613	0,88	0,043287467
BMEI0799	Methylmalonyl-CoA mutase	426	532	0,8	0,000201432
BMEI0800	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial	340	349	0,97	0,810357036
BMEI0801	Propionyl-CoA carboxylase beta chain	713	739	0,97	0,729275838
BMEI0802	Transcriptional regulator, MerR family	228	246	0,93	0,550904738
BMEI0803	Hypothetical protein	1148	1846	0,62	0,009332764
BMEI0804	Hypothetical cytosolic protein	10892	18900	0,58	0,000206751
BMEI0805	Hypothetical protein	9124	10080	0,91	0,186331646
BMEI0806	Hypothetical protein	992	805	1,23	0,002417085
BMEI0807	Hypothetical protein	898	874	1,03	0,614470348
BMEI0808	Transcriptional regulator, MerR family	291	216	1,35	0,000468132
BMEI0809	Hypothetical protein	1662	1517	1,1	0,23028369
BMEI0810	Putative membrane protein	482	489	0,99	0,777184078
BMEI0811	L-serine dehydratase 1	831	737	1,13	0,07081262
BMEI0812	Hypothetical protein	529	563	0,94	0,092215313
BMEI0813	Hypothetical protein	7100	6430	1,1	0,06507741
BMEI0814	Penicillin-binding protein 6 (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase fraction C)	4173	3408	1,22	0,039611715
BMEI0815	Protein yljA	4430	4912	0,9	0,17954023
BMEI0816	ATP-dependent clp protease ATP-binding subunit clpA	3035	3068	0,99	0,787118464
BMEI0817	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase (asymmetrical)	1278	1565	0,82	0,010700691
BMEI0818	Hypothetical cytosolic protein	1048	1136	0,92	0,562658955
BMEI0819	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	2929	3300	0,89	0,466940637

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0820	Translation initiation inhibitor	1899	2173	0,87	0,417302636
BMEI0821	Hypothetical protein	52863	51262	1,03	0,53376829
BMEI0822	Hypothetical protein	34766	33774	1,03	0,398461647
BMEI0823	Ssu ribosomal protein S2P	12937	13034	0,99	0,745998304
BMEI0824	Protein translation elongation factor TS (EF-TS)	3210	3029	1,06	0,249538269
BMEI0825	Uridylate kinase	727	662	1,1	0,06167357
BMEI0826	Ribosome recycling factor (RRF)	7214	6213	1,16	0,020149317
BMEI0827	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase	1107	876	1,26	0,032854783
BMEI0828	Phosphatidate cytidyltransferase	5144	5060	1,02	0,841607957
BMEI0829	Membrane metalloprotease	3611	3811	0,95	0,735161601
BMEI0830	Outer membrane protein	16447	18572	0,89	0,016435766
BMEI0831	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosaminé N-acyltransferase	1840	1931	0,95	0,651448039
BMEI0832	(3r)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase	5504	5567	0,99	0,881433985
BMEI0833	Acyl-(acyl-carrier-protein)-UDP-N- acetylglucosaminé O-acyltransferase	4958	5801	0,85	0,142431378
BMEI0834	Hypothetical protein	2187	3208	0,68	0,01039846
BMEI0835	Lipid-A-disaccharide synthase	816	1026	0,8	0,07825018
BMEI0836	Citrate synthase	14642	13871	1,06	0,401725336
BMEI0837	Glutamyl-tRNA synthetase	679	479	1,42	0,007943407
BMEI0838	Come operon protein 3	103	159	0,65	0,066097426
BMEI0839	Come operon protein 3	1423	2456	0,58	5,77E-05
BMEI0840	Lexa repressor	921	1060	0,87	0,586572831
BMEI0841	Molybdopterine biosynthesis moea protein	1027	946	1,09	0,131086996
BMEI0842	Molybdenum cofactor biosynthesis protein C	1856	1918	0,97	0,632900155
BMEI0843	Indole-3-glycerol phosphate synthase	636	504	1,26	0,203724106
BMEI0844	Anthrnilate phosphoribosyltransferase	1074	951	1,13	0,336528154
BMEI0845	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	8575	8863	0,97	0,581561064
BMEI0846	Triosephosphate isomerase	2027	1831	1,11	0,288195948
BMEI0847	Hypothetical protein	2951	2464	1,2	0,001669338
BMEI0848	Probable carnitine operon oxidoreductase CaiA	815	618	1,32	0,179518192
BMEI0849	Ctp synthase	5979	5181	1,15	0,018601138
BMEI0850	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	1535	1006	1,53	0,001874254
BMEI0851	Enolase	854	549	1,56	0,007136716
BMEI0852	Methyltransferase	436	472	0,92	0,41624506
BMEI0853	Hypothetical protein	863	879	0,98	0,980210564
BMEI0854	Pyruvate dehydrogenase e1 component, alpha subunit	5127	5865	0,87	0,004689561
BMEI0855	Pyruvate dehydrogenase e1 component, beta subunit	5090	4893	1,04	0,505365636
BMEI0856	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	2546	2377	1,07	0,261194031
BMEI0857	Dihydrolipoamide dehydrogenase	4441	4054	1,1	0,131212225
BMEI0858	Hypothetical protein	8659	7932	1,09	0,208933432
BMEI0859	Lipoic acid synthetase	4390	4152	1,06	0,755048149
BMEI0860	Hypothetical cytosolic protein	675	491	1,38	0,016675164
BMEI0861	Glucose 1-dehydrogenase II	2082	2767	0,75	0,000585115
BMEI0862	Putative competence-damage protein	356	245	1,45	0,000493358
BMEI0863	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase / 2-C-methyl-d-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (ec 2.-.-.-)	1971	1572	1,25	0,001377178
BMEI0864	Nitrogen regulation protein nifr3	2098	1796	1,17	0,127582889
BMEI0865	Nitrogen regulation protein ntrb	622	505	1,23	0,036430547
BMEI0866	Nitrogen assimilation regulatory protein	898	812	1,11	0,372524067
BMEI0867	Nitrogen regulation protein NtrY	1823	1407	1,3	0,00028087
BMEI0868	Nitrogen assimilation regulatory protein NtrX	1254	774	1,62	0,000690042
BMEI0869	Trk system potassium uptake protein TrkA	1257	834	1,51	1,73E-09
BMEI0870	Hypothetical protein	3004	2768	1,09	0,286590518

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEI0871	Hypothetical protein	1740	1436	1,21	0,103397961
BMEI0872	Nfra protein	2207	2081	1,06	0,668961669
BMEI0873	GTP-binding protein HflX	440	365	1,21	0,150640089
BMEI0874	ATP-dependent CLP protease proteolytic subunit	1986	2119	0,94	0,407475009
BMEI0875	ATP-dependent CLP protease ATP-binding subunit ClpX	8355	8783	0,95	0,16118694
BMEI0876	ATP-dependent protease Ia	3236	2569	1,26	0,064623601
BMEI0877	DNA-binding protein HU-α	14255	14130	1,01	0,795816864
BMEI0878	Excinuclease ABC subunit A	1515	1192	1,27	0,091558591
BMEI0879	Hypothetical protein	57	67	0,85	0,252112509
BMEI0880	Single-strand binding protein	2682	2318	1,16	0,18303015
BMEI0881	Transcriptional regulator, GntR family	4600	3992	1,15	0,192400304
BMEI0882	Phosphonates transport ATP-binding protein PhnN	530	456	1,16	0,042806151
BMEI0883	Multiple antibiotic resistance protein marC	1865	1835	1,02	0,736886112
BMEI0884	DNA gyrase subunit A	4606	3964	1,16	0,045785224
BMEI0885	Hypothetical protein	4138	3219	1,29	0,094856431
BMEI0886	Phosphopantetheine adenyltransferase	1110	973	1,14	0,217988863
BMEI0887	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	15737	16159	0,97	0,622548453
BMEI0888	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	931	741	1,26	0,111748467
BMEI0889	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	2109	2203	0,96	0,695777668
BMEI0890	Queuine tRNA-ribosyltransferase	623	453	1,38	0,038252282
BMEI0891	Transcriptional regulator, TetR family	1803	1931	0,93	0,871357803
BMEI0892	Membrane fusion protein MtrC	820	795	1,03	0,76231231
BMEI0893	Acriflavin resistance protein B	457	368	1,24	0,665479297
BMEI0894	Alkanal monooxygenase α chain	1642	1466	1,12	0,231427862
BMEI0895	Transcriptional regulatory protein, LysR family	723	616	1,17	0,18458621
BMEI0896	Transcriptional regulatory protein, LysR family	1199	1049	1,14	0,27291786
BMEI0897	Glutaryl-CoA dehydrogenase	2774	3378	0,82	0,027456033
BMEI0898	Predicted acyl-CoA transferases/carnitine dehydratase	1393	1480	0,94	0,362847887
BMEI0899	Phage-related DNA binding protein	312	504	0,62	0,055757452
BMEI0900	Hypothetical protein	198	212	0,94	0,917003582
BMEI0901	Resolvase	558	520	1,07	0,578712419
BMEI0902	Recombinase	3233	4974	0,65	0,165162206
BMEI0903	Hypothetical protein	3750	3206	1,17	0,157177045
BMEI0904	Hypothetical protein	5996	5341	1,12	0,278425705
BMEI0905	Hypothetical protein	430	314	1,37	0,000134128
BMEI0906	Hypothetical protein	2011	1218	1,65	1,79E-08
BMEI0907	Hypothetical protein	873	694	1,26	0,122730136
BMEI0908	Serine protease	629	547	1,15	0,235075789
BMEI0909	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	586	547	1,07	0,418451211
BMEI0910	GTP cyclohydrolase I	3680	3616	1,02	0,708248914
BMEI0911	NifU protein	3495	2223	1,57	0,000852015
BMEI0912	Alpha-hemolysin	355	237	1,5	0,006475283
BMEI0913	Penicillin-binding protein 6 (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase fraction C)	1243	383	3,25	0,000713691
BMEI0914	Penicillin-binding protein 6 (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase fraction C)	786	336	2,34	0,002260623
BMEI0915	Threonyl-tRNA synthetase	2149	1960	1,1	0,686511756
BMEI0916	Hypothetical protein	2036	1552	1,31	0,000163544
BMEI0917	Nitroreductase family	2111	2289	0,92	0,487215449
BMEI0918	Nitroreductase family	1769	1747	1,01	0,66861962
BMEI0919	Nitritotriacetate monooxygenase component B	1158	1096	1,06	0,48145572
BMEI0920	MazG protein	639	511	1,25	0,056827704
BMEI0921	UDP-glucose 4-epimerase	1067	856	1,25	0,002559946
BMEI0922	Sodium/bile acid cotransporter homolog, SBF family	1868	1837	1,02	0,787235528

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEI0923	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	544	385	1,41	0,000464072
BMEI0924	Xaa-pro dipeptidase	472	385	1,23	0,226731789
BMEI0925	Alcohol dehydrogenase	396	322	1,23	0,003954025
BMEI0926	Multidrug resistance protein A	270	280	0,96	0,972914052
BMEI0927	Multidrug resistance protein B	1009	1043	0,97	0,759046288
BMEI0928	Acetate CoA-transferase alpha subunit	4199	3496	1,2	0,405592085
BMEI0929	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 1 (ggdef)	598	566	1,06	0,486008797
BMEI0930	Acetyltransferase	8002	9335	0,86	0,140982465
BMEI0931	Putative thiosulfate sulfurtransferase	10581	12418	0,85	0,032699127
BMEI0932	Alanyl-tRNA synthetase	923	992	0,93	0,123558122
BMEI0933	Cysteine synthase	492	487	1,01	0,697785392
BMEI0934	ATP-dependent RNA helicase RhlE	3618	2851	1,27	0,599336857
BMEI0935	Threonine dehydratase biosynthetic	1551	1062	1,46	0,000314558
BMEI0936	Trp repressor binding protein	197	327	0,6	0,086216184
BMEI0937	Putative competence-damage protein	1655	2177	0,76	0,004934854
BMEI0938	Universal stress protein uspa and related nucleotide-binding proteins	1586	1504	1,05	0,497156727
BMEI0939	Hypothetical protein	344	302	1,14	0,126284062
BMEI0940	Xanthine-guanine phosphoribosyltransferase	1402	1138	1,23	0,013867339
BMEI0941	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase (asymmetrical)	1898	1321	1,44	4,92E-07
BMEI0942	Hypothetical protein	1828	1840	0,99	0,896857801
BMEI0943	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	6742	7818	0,86	0,01011668
BMEI0944	Putative transport	1179	1311	0,9	0,524427068
BMEI0945	6-aminohexanoate-dimer hydrolase	933	887	1,05	0,336254587
BMEI0946	NAD(FAD)-utilizing dehydrogenases	789	941	0,84	0,122279996
BMEI0947	Sensory transduction protein kinase	868	940	0,92	0,241074592
BMEI0948	Hypothetical protein	8755	11609	0,75	0,001420445
BMEI0949	DNAK suppressor protein homolog	5246	2242	2,34	0,027673462
BMEI0950	Phosphohistidine phosphatase SixA	1333	1261	1,06	0,430432624
BMEI0951	Amino acid regulated cytosolic protein	624	752	0,83	0,095053367
BMEI0952	GTP-binding protein	339	467	0,72	0,009337598
BMEI0953	Hypothetical protein	1417	1037	1,37	0,003815308
BMEI0954	2-amino-4-hydroxy-6- hydroxymethylidihydropteridine pyrophosphokinase	379	342	1,11	0,099402847
BMEI0955	Dihydroneopterin aldolase	190	149	1,28	0,007677339
BMEI0956	Dihydropteroate synthase	256	235	1,09	0,061377022
BMEI0957	Hypothetical protein	500	450	1,11	0,394152479
BMEI0958	Thioredoxin reductase	1199	1314	0,91	0,080836772
BMEI0959	Ferredoxin, 2FE-2S	455	356	1,28	0,000179802
BMEI0960	Hypothetical protein	3020	3183	0,95	0,469544537
BMEI0961	Kinesin-like protein	2261	2924	0,77	0,077753801
BMEI0962	Membrane lipoprotein lipid attachment site containing protein	1541	1544	1	0,928524275
BMEI0963	Toluene tolerance protein Ttg2C	3990	4714	0,85	0,099425377
BMEI0964	ABC transporter ATP-binding protein	2604	2269	1,15	0,135262551
BMEI0965	Toluene tolerance protein Ttg2B	1276	1594	0,8	0,000421102
BMEI0966	Muconate cycloisomerase I	615	635	0,97	0,897078804
BMEI0967	NAD-dependent malic enzyme	2696	2413	1,12	0,20338149
BMEI0968	Glutamyl-tRNA synthetase	987	742	1,33	0,024942627
BMEI0969	Glutaminé-dependent NAD(+) synthetase	1582	1308	1,21	0,004297657
BMEI0970	Diacylglycerol kinase	385	446	0,86	0,286362792
BMEI0971	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	3342	3061	1,09	0,038849462
BMEI0972	Glutathione reductase	2791	3149	0,89	0,000148045
BMEI0973	Hypothetical protein	6707	5517	1,22	0,013475599
BMEI0974	Ribose 5-phosphate isomerase	4492	5176	0,87	0,192146499

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI0975	Phosphoglycolate phosphatase	2326	2413	0,96	0,793823384
BMEI0976	Hypothetical protein	420	380	1,11	0,333997725
BMEI0977	Putative sugar kinase	228	214	1,07	0,273390876
BMEI0978	Nitrogen regulatory protein P-II	1425	1120	1,27	0,043009492
BMEI0979	Glutaminé synthetase	10633	6046	1,76	7,47E-07
BMEI0980	Hypothetical protein	1053	731	1,44	1,38E-05
BMEI0981	Phosphoglycolate phosphatase	734	519	1,41	0,000397126
BMEI0982	Transporter, DME family	479	469	1,02	0,718418287
BMEI0983	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase c	785	639	1,23	7,53E-07
BMEI0984	Beta-(1-->2)glucan export ATP-binding protein Ndva	614	320	1,92	0,004129177
BMEI0985	PhnP protein	1108	708	1,57	9,95E-05
BMEI0986	Sec-independent protein TatD	4013	3635	1,1	0,141855264
BMEI0987	Methionyl-tRNA synthetase	1820	1406	1,29	0,005739683
BMEI0988	DNA polymerase III, delta' subunit	349	261	1,34	0,046464406
BMEI0989	Thymidylate kinase	431	297	1,45	8,83E-05
BMEI0990	D-alanyl-d-alanine carboxypeptidase	904	773	1,17	0,12859046
BMEI0991	Rare lipoprotein A	2164	1770	1,22	0,143590241
BMEI0992	Arsenate reductase	4801	4236	1,13	0,175787004
BMEI0993	Hypothetical protein	1373	1945	0,71	0,002846905
BMEI0994	Hypothetical protein	579	1315	0,44	0,057501325
BMEI0995	Secretion activator protein	202	271	0,75	0,456257146
BMEI0996	Hypothetical protein	15999	13906	1,15	0,27364689
BMEI0997	Mannosyltransferase	30132	28993	1,04	0,556124124
BMEI0998	Glycosyltransferase	28510	29109	0,98	0,752913437
BMEI0999	Hypothetical protein	944	956	0,99	0,91285673
BMEI1000	Hypothetical protein	504	882	0,57	0,420950647
BMEI1001	Transposase	2490	2402	1,04	0,724917593
BMEI1002	Transposase	1258	1329	0,95	0,731578043
BMEI1003	Queuine tRNA-ribosyltransferase	677	611	1,11	0,2842609
BMEI1004	Hypothetical protein	635	689	0,92	0,07526872
BMEI1005	Hypothetical protein	678	1030	0,66	0,000210672
BMEI1006	Hypothetical cytosolic protein	920	1510	0,61	3,29E-06
BMEI1007	25 kda outer-membrane immunogenic protein precursor	5090	11420	0,45	0,000987604
BMEI1008	Hypothetical protein	635	1098	0,58	0,005234728
BMEI1009	Hypothetical protein	300	293	1,02	0,701782668
BMEI1010	Hypothetical protein	481	380	1,27	0,027720977
BMEI1011	Hypothetical protein	315	240	1,31	0,016903665
BMEI1012	Integrase/recombinase	3237	4359	0,74	0,000418042
BMEI1013	Hypothetical membrane spanning protein	515	576	0,9	0,169345446
BMEI1014	Cell wall degradation protein	233	259	0,9	0,74023201
BMEI1015	Hypothetical protein	576	550	1,05	0,515554374
BMEI1016	Fumarate hydratase class i, aerobic	1368	941	1,45	0,050994509
BMEI1017	Salicylate hydroxylase	152	136	1,12	0,032437987
BMEI1018	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase	200	157	1,27	0,000995169
BMEI1019	Molybdenum cofactor biosynthesis protein A	1523	1671	0,91	0,315991588
BMEI1020	Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein a	1511	1923	0,79	0,008352057
BMEI1021	Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein b	733	792	0,93	0,033308428
BMEI1022	Arginine/ornithine-binding periplasmic protein precursor	2718	3548	0,77	0,003630702
BMEI1023	Glutathione S-transferase III	3175	4131	0,77	0,024315097
BMEI1024	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	1404	1734	0,81	0,205495503
BMEI1025	Outer membrane protein E	250	354	0,7	0,00556462
BMEI1026	Outer membrane protein E	430	1449	0,3	0,00591336

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1027	Valyl-tRNA synthetase	3767	2721	1,38	5,05E-05
BMEI1028	Hypothetical protein	2551	2445	1,04	0,559967436
BMEI1029	Outer membrane protein TolC	5420	5735	0,95	0,348050457
BMEI1030	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	6778	6236	1,09	0,187586432
BMEI1031	Hypothetical protein	9440	9746	0,97	0,516205985
BMEI1032	Heavy metal binding protein	1453	1155	1,26	0,066372738
BMEI1033	Hypothetical protein	12802	11290	1,13	0,044265001
BMEI1034	Hesb protein	4262	4104	1,04	0,566236515
BMEI1035	ATP-dependent RNA helicase DeaD	3733	3057	1,22	0,069618195
BMEI1036	ATP-NAD kinase	1846	2007	0,92	0,333424876
BMEI1037	Glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis	15387	17318	0,89	0,067362912
BMEI1038	Phenylacetic acid degradation protein PaaD	869	734	1,18	0,208073362
BMEI1039	Cysteine desulphydrase / selenocysteine Lyase	692	450	1,54	2,78E-05
BMEI1040	ABC transporter ATP-binding protein	4159	3435	1,21	0,057178865
BMEI1041	ABC transporter ATP-binding protein	3176	2405	1,32	0,02420721
BMEI1042	ABC transporter-associated protein	4058	3476	1,17	0,147286429
BMEI1043	Nifs protein	158	144	1,09	0,128924263
BMEI1044	Alpha/beta hydrolase	2629	3560	0,74	0,000533095
BMEI1045	Quaternary ammonium compound-resistance protein qacE	1655	1936	0,85	0,069395073
BMEI1046	Transcriptional repressor	439	486	0,9	0,160890547
BMEI1047	Tyrosyl-tRNA synthetase	1872	1817	1,03	0,432126034
BMEI1048	Hypothetical membrane associated protein	1883	1305	1,44	0,010156872
BMEI1049	Bacterioferritin comigratory protein	1529	1568	0,98	0,756039562
BMEI1050	Hypothetical protein	751	775	0,97	0,816666851
BMEI1051	Hypothetical protein	1370	977	1,4	1,21E-05
BMEI1052	Transposase	2384	2269	1,05	0,60514861
BMEI1053	Transposase	1266	1384	0,91	0,520027756
BMEI1054	Bacterial peptide chain release factor 2 (RF-2)	3789	2930	1,29	0,037612788
BMEI1055	Penicillin-binding protein 1A	4277	3108	1,38	1,84E-07
BMEI1056	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	2380	1560	1,53	0,002973798
BMEI1057	Ribonuclease E / zinc metalloprotease	2286	2717	0,84	0,29244376
BMEI1058	Aspartate aminotransferase	1002	1055	0,95	0,966771818
BMEI1059	Zinc metalloprotease	1405	955	1,47	0,0015532
BMEI1060	Outer membrane protein	6322	5526	1,14	0,217533888
BMEI1061	3-dehydroquinate dehydratase	22354	20962	1,07	0,39907574
BMEI1062	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	6830	5712	1,2	0,006583881
BMEI1063	Biotin carboxylase	6010	4670	1,29	0,000123644
BMEI1064	Leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase	629	476	1,32	0,057965276
BMEI1065	Retrovirus-related pol polyprotein	5170	3897	1,33	0,003141374
BMEI1066	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B17.2 like protein	7621	5384	1,42	0,000228667
BMEI1067	Acetyltransferase	3343	3353	1	0,972632059
BMEI1068	Glutamyl-tRNA(GLN) amidotransferase subunit B	980	942	1,04	0,319545593
BMEI1069	Trigger factor, PPIase	20158	19864	1,01	0,762939113
BMEI1070	Hypothetical protein	350	353	0,99	0,926256138
BMEI1071	Hypothetical membrane spanning protein	1747	2684	0,65	0,005301228
BMEI1072	Hypothetical protein	30229	19040	1,59	0,018935026
BMEI1073	Glucose inhibited division protein A	628	660	0,95	0,486203817
BMEI1074	Phytoene synthase	287	222	1,29	0,053305255
BMEI1075	Hypothetical cytosolic protein	376	324	1,16	0,12642901
BMEI1076	Protein translocase subunit SecD / protein translocase subunit SecE	1702	1713	0,99	0,900320752
BMEI1077	Hypothetical protein	1793	1858	0,97	0,776436145
BMEI1078	ATP-dependent protease subunit	1781	1701	1,05	0,499268085

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1079	Lipoprotein NlpD	3492	2696	1,3	0,023482622
BMEI1080	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	599	499	1,2	0,107371177
BMEI1081	Stationary-phase survival protein SurE	3648	3427	1,06	0,360124133
BMEI1082	Seryl-tRNA synthetase	3296	2777	1,19	0,073123868
BMEI1083	Sec-independent protein translocase protein TatC	6739	5606	1,2	0,042542117
BMEI1084	Sec-independent protein translocase protein TatA	26879	27357	0,98	0,726692013
BMEI1085	Hypothetical cytosolic protein	785	759	1,03	0,656254669
BMEI1086	Hypothetical cytosolic protein	245	211	1,16	0,139132415
BMEI1087	Beta-hexosaminidase a	1326	1718	0,77	0,017758485
BMEI1088	Soluble lytic murein transglycosylase	4679	4881	0,96	0,697783966
BMEI1089	Arginyl-tRNA synthetase	2256	2079	1,09	0,092558643
BMEI1090	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	877	815	1,08	0,589227757
BMEI1091	Hesb protein	833	819	1,02	0,949324283
BMEI1092	Hypothetical protein	347	399	0,87	0,290819373
BMEI1093	Exodeoxyribonuclease III	413	385	1,07	0,049303093
BMEI1094	Exopolysaccharide production negative regulator precursor	3672	2064	1,78	8,19E-05
BMEI1095	Hypothetical protein	100	188	0,53	0,033503179
BMEI1096	Succinoglycan biosynthesis protein ExoI	246	336	0,73	0,002261001
BMEI1097	Uracil-DNA glycosylase	188	193	0,98	0,817910884
BMEI1098	Transcriptional regulatory protein, AsnC family	290	379	0,77	0,00164606
BMEI1099	Nicotinate-nucleotide-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase	411	307	1,34	0,048809739
BMEI1100	Cobalamin (5'-phosphate) synthase	254	232	1,09	0,173694728
BMEI1101	Hypothetical protein	320	347	0,92	0,137808967
BMEI1102	Transporter	275	250	1,1	0,084784495
BMEI1103	NifR3-like protein	718	604	1,19	0,000852272
BMEI1104	Arginine/ornithine-binding periplasmic protein precursor	1467	2023	0,73	2,75E-06
BMEI1105	Glycerol-3-phosphatase 1	1360	1197	1,14	0,099382528
BMEI1106	PhnM protein	203	164	1,24	0,000550137
BMEI1107	Hypothetical cytosolic protein	425	309	1,37	0,000116647
BMEI1108	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	179	186	0,96	0,815944347
BMEI1109	Aldose 1-epimerase	1003	978	1,03	0,657886284
BMEI1110	Secretion activator protein	277	636	0,44	0,015396801
BMEI1111	Acyl carrier protein	5392	5241	1,03	0,451951003
BMEI1112	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II	1942	1938	1	0,820804825
BMEI1113	Tetracenomycin c polyketide putative beta-ketoacyl synthase	1813	1705	1,06	0,366172465
BMEI1114	Alcohol dehydrogenase	1759	1407	1,25	0,012876204
BMEI1115	Lipid a biosynthesis lauroyl acyltransferase	1627	1222	1,33	0,031344023
BMEI1116	Ribulose-phosphate 3-epimerase	863	688	1,26	0,013655556
BMEI1117	Adenylosuccinate lyase	827	675	1,23	0,021435464
BMEI1118	Biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase III	410	457	0,9	0,213038216
BMEI1119	Hypothetical cytosolic protein	665	550	1,21	0,155758078
BMEI1120	Phosphotyrosyl phosphatase activator (PtpA)	1472	1240	1,19	0,12278862
BMEI1121	Hypothetical cytosolic protein	529	467	1,13	0,276735017
BMEI1122	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	10028	9365	1,07	0,017397408
BMEI1123	Phosphoribosylformylglycinamide synthase, PurS component	12990	12412	1,05	0,667590077
BMEI1124	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	9685	9019	1,07	0,465665286
BMEI1125	Maleylpyruvate isomerase	10131	11124	0,91	0,329721146
BMEI1126	Hypothetical cytosolic protein	5173	5454	0,95	0,791151758
BMEI1127	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	3313	3053	1,09	0,01157007
BMEI1128	Bola protein family	2940	2467	1,19	0,195181597
BMEI1129	Glutaredoxin	33510	24900	1,35	0,013041788
BMEI1130	Bicyclomycin resistance protein	1116	1085	1,03	0,805514658

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1131	Inositol monophosphatase and related sulfite synthesis enzyme	262	228	1,15	0,065045241
BMEI1132	ATPases of the pp superfamily	688	550	1,25	0,004014535
BMEI1133	Ssu ribosomal protein S4P	10148	7279	1,39	0,004905683
BMEI1134	Extensin-like protein	326	415	0,79	0,008888439
BMEI1135	Hypothetical protein	3429	2223	1,54	0,046748079
BMEI1136	Hypothetical cytosolic protein	1021	774	1,32	0,116392034
BMEI1137	DNA polymerase III, alpha chain	732	564	1,3	0,011722285
BMEI1138	Lipoprotein releasing system ATP-binding protein Iold	1637	765	2,14	6,86E-08
BMEI1139	Lipoprotein releasing system transmembrane protein Iole	7300	4730	1,54	6,13E-07
BMEI1140	Prolyl-tRNA synthetase	7586	5379	1,41	0,001446142
BMEI1141	Hypothetical membrane spanning protein	1829	2047	0,89	0,295550503
BMEI1142	Lactoylglutathione lyase	707	761	0,93	0,878440509
BMEI1143	Metal dependent hydrolase	792	681	1,16	0,194964986
BMEI1144	Biotin operon repressor / biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] synthetase	1730	1542	1,12	0,268469215
BMEI1145	NADH-quinone oxidoreductase chain N	13958	15255	0,92	0,226657694
BMEI1146	NADH-quinone oxidoreductase chain M	15153	16643	0,91	0,227221659
BMEI1147	NADH-quinone oxidoreductase chain L	24912	27073	0,92	0,224887872
BMEI1148	NADH-quinone oxidoreductase chain K	17523	18644	0,94	0,501574632
BMEI1149	NADH-quinone oxidoreductase chain J	34904	36009	0,97	0,743496806
BMEI1150	NADH-quinone oxidoreductase chain I	1399	1426	0,98	0,66010397
BMEI1151	NADH-quinone oxidoreductase chain H	21931	22090	0,99	0,996675319
BMEI1152	NADH-quinone oxidoreductase chain G	3535	2805	1,26	0,073821247
BMEI1153	NADH-quinone oxidoreductase chain F	3223	2637	1,22	0,084071794
BMEI1154	NADH-quinone oxidoreductase chain E	4575	3730	1,23	0,042735732
BMEI1155	NADH-quinone oxidoreductase chain D	3911	3243	1,21	0,088708426
BMEI1156	NADH-quinone oxidoreductase chain C	6531	5965	1,09	0,433913641
BMEI1157	NADH-quinone oxidoreductase chain B	4400	3887	1,13	0,27077701
BMEI1158	NADH-quinone oxidoreductase chain A	9465	7963	1,19	0,159944048
BMEI1159	Hypothetical protein	594	436	1,36	0,054931295
BMEI1160	Hypothetical protein	6073	4724	1,29	0,416235415
BMEI1161	Hypothetical protein	2455	2911	0,84	0,016025677
BMEI1162	Hypothetical protein	400	318	1,26	0,024247073
BMEI1163	Transposase	2423	2321	1,04	0,668134256
BMEI1164	Transposase	1215	1302	0,93	0,677664345
BMEI1165	Hypothetical membrane spanning protein	976	1866	0,52	0,022724716
BMEI1166	O-acetylhomoserine sulfhydrylase / o-acetylserine sulfhydrylase	1057	1499	0,71	6,13E-05
BMEI1167	Hypothetical protein	210	273	0,77	0,408558349
BMEI1168	Lsu ribosomal protein L13P	6763	10180	0,66	0,00187553
BMEI1169	Ssu ribosomal protein S9P	4601	6271	0,73	0,003069168
BMEI1170	Agmatinase	1057	964	1,1	0,345300404
BMEI1171	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	598	550	1,09	0,355036931
BMEI1172	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15	971	1063	0,91	0,118039659
BMEI1173	Hypothetical membrane spanning protein	574	595	0,96	0,864233372
BMEI1174	ATPase, ParA family	472	432	1,09	0,00896098
BMEI1175	Putative capsule polysaccharide export protein precursor	4107	3613	1,14	0,19253286
BMEI1176	Hypothetical protein	3051	2616	1,17	0,04107099
BMEI1177	Putative colanic biosynthesis udp-glucose lipid carrier transferase	669	596	1,12	0,001745115
BMEI1178	Transcriptional regulator, MerR family	9900	12300	0,8	4,97E-05
BMEI1179	Integration host factor alpha-subunit	625	810	0,77	0,040935622
BMEI1180	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	1606	1712	0,94	0,505591948
BMEI1181	PlsX protein	9921	10557	0,94	0,206047273
BMEI1182	Hypothetical cytosolic protein	894	917	0,98	0,635839211

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEI1183	Hypothetical protein	1435	1524	0,94	0,357309263
BMEI1184	Small protein a	3092	2492	1,24	0,119914635
BMEI1185	H ⁺ translocating pyrophosphate synthase	8061	11824	0,68	0,000453081
BMEI1186	N utilization substance protein B	2406	1978	1,22	0,01463869
BMEI1187	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	1014	747	1,36	0,065841747
BMEI1188	Riboflavin synthase alpha chain	1833	1977	0,93	0,886940768
BMEI1189	Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase / 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase (ec 1.1.1.193)	1137	1085	1,05	0,647408042
BMEI1190	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase	310	242	1,28	0,096827215
BMEI1191	Serine hydroxymethyltransferase	869	652	1,33	0,029817507
BMEI1192	Serine hydroxymethyltransferase	1264	1011	1,25	0,072751954
BMEI1193	Cell wall degradation protein	4427	2941	1,51	0,006574934
BMEI1194	Exopolysaccharide synthesis regulatory protein mucs	743	1132	0,66	1,06E-06
BMEI1195	Hypothetical membrane spanning protein	576	671	0,86	0,101436786
BMEI1196	Enoyl-CoA hydratase	832	1786	0,47	0,000527899
BMEI1197	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	1250	825	1,51	0,034295019
BMEI1198	Hypothetical membrane spanning protein	6767	6390	1,06	0,441380525
BMEI1199	Arginyl-tRNA--protein transferase	467	932	0,5	0,011886711
BMEI1200	Topoisomerase IV subunit A	927	917	1,01	0,868989333
BMEI1201	Hypothetical cytosolic protein	28220	21375	1,32	0,00012829
BMEI1202	Aspartyl-tRNA synthetase	2302	1862	1,24	0,001484442
BMEI1203	Ribonuclease D	1200	1138	1,05	0,492675876
BMEI1204	Exopolyphosphatase	598	419	1,43	0,002571814
BMEI1205	Polyphosphate kinase	2242	1770	1,27	0,006295676
BMEI1206	Hypothetical cytosolic protein	733	609	1,2	0,342165165
BMEI1207	Salicylate hydroxylase	1116	1035	1,08	0,405231579
BMEI1208	General l-amino acid transport ATP-binding protein aapp	924	1084	0,85	0,047810868
BMEI1209	General l-amino acid transport system permease protein aapm	282	436	0,65	0,018439938
BMEI1210	General l-amino acid transport system permease protein aapq	612	1436	0,43	8,01E-06
BMEI1211	General l-amino acid-binding periplasmic protein AapJ precursor	3810	6791	0,56	9,24E-05
BMEI1212	Phosphatidylglycerophosphatase b	5007	2852	1,76	1,39E-06
BMEI1213	Cystathionine beta-lyase	2954	3348	0,88	0,019419288
BMEI1214	Hypothetical protein	524	521	1,01	0,96025135
BMEI1215	Hypothetical membrane spanning protein	1914	1102	1,74	3,01E-08
BMEI1216	Hypothetical cytosolic protein	2210	1813	1,22	0,00427971
BMEI1217	ApeA	440	383	1,15	0,044728234
BMEI1218	Similar to phage protein	1875	1738	1,08	0,748884959
BMEI1219	Hypothetical protein	1041	888	1,17	0,183232104
BMEI1220	Hypothetical protein	2185	1875	1,17	0,111601376
BMEI1221	Hypothetical cytosolic protein	429	455	0,94	0,451343476
BMEI1222	Hypothetical protein	194	194	1	0,868352598
BMEI1223	Transposase	317	284	1,11	0,160606406
BMEI1224	Hypothetical protein	316	317	1	0,818059536
BMEI1225	Hypothetical protein	386	311	1,24	0,061661229
BMEI1226	Transcriptional regulator	2050	1633	1,26	0,012513155
BMEI1227	Hypothetical protein	6442	5284	1,22	0,002324574
BMEI1228	Adenylate kinase	5322	5072	1,05	0,672972962
BMEI1229	Hypothetical exonuclease	3682	3302	1,12	0,06026892
BMEI1230	Hypothetical cytosolic protein	7517	6839	1,1	0,003096351
BMEI1231	NADH-ubiquinone oxidoreductase 18 kd subunit	1604	1036	1,55	0,011805858
BMEI1232	L-lactate permease	90	117	0,77	0,011522724
BMEI1233	L-lactate permease	102	105	0,97	0,79208725

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1234	Hypothetical membrane associated protein	991	948	1,05	0,912784528
BMEI1235	Short-chain dehydrogenase	1068	474	2,25	1,17E-06
BMEI1236	Hypothetical exported proline-rich protein	1299	1012	1,28	0,001958282
BMEI1237	Udp-glucose 4-epimerase	381	291	1,31	0,000529093
BMEI1238	Insertion sequence IS21 putative ATP-binding protein	310	209	1,48	0,005131565
BMEI1239	Permease	2228	2759	0,81	0,094916698
BMEI1240	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	780	770	1,01	0,995500961
BMEI1241	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	102	95	1,07	0,107804292
BMEI1242	Hypothetical membrane spanning protein	3125	2566	1,22	0,055054012
BMEI1243	Formate dehydrogenase alpha chain	495	410	1,21	0,061965597
BMEI1244	Transporter, DME family	168	158	1,06	0,568451229
BMEI1245	Florfenicol resistance protein	515	521	0,99	0,928914628
BMEI1246	Hypothetical cytosolic protein	3920	4510	0,87	0,011103428
BMEI1247	Ribonuclease precursor	682	660	1,03	0,586595924
BMEI1248	Glutathione s-transferase	1208	1030	1,17	0,120149741
BMEI1249	25 kda outer-membrane immunogenic protein precursor	37483	31875	1,18	0,32218302
BMEI1250	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase	586	589	1	0,847968491
BMEI1251	Excinuclease ABC subunit C	435	396	1,1	0,030275598
BMEI1252	Cdp-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	3949	2588	1,53	0,000183847
BMEI1253	Molybdopterine (MPT) converting factor, subunit 1	6415	4277	1,5	0,004466447
BMEI1254	Molybdopterine (MPT) converting factor, subunit 2	4973	3298	1,51	0,024569318
BMEI1255	Glycoprotein/polysaccharide metabolism	7173	3745	1,92	6,88E-06
BMEI1256	Nucleoside diphosphate kinase	2057	1545	1,33	0,000258496
BMEI1257	Dinb protein	442	392	1,13	0,131321849
BMEI1258	ABC transporter ATP-binding protein	237	203	1,17	0,027093149
BMEI1259	Hypothetical membrane spanning protein	1636	1076	1,52	0,012272234
BMEI1260	DNA polymerase III, chi subunit	16032	12430	1,29	9,53E-05
BMEI1261	Leucine aminopeptidase	9482	6229	1,52	3,71E-05
BMEI1262	Hypothetical membrane spanning protein	4011	3570	1,12	0,214300419
BMEI1263	Putative permeases	1185	1096	1,08	0,60777198
BMEI1264	Organic solvent tolerance protein	3470	3134	1,11	0,17973773
BMEI1265	Survival protein sura precursor (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase sura)	9577	7607	1,26	1,17E-06
BMEI1266	Pyridoxal phosphate biosynthetic protein PdxA	3594	2588	1,39	4,93E-06
BMEI1267	Dimethyladenosine transferase	577	337	1,71	0,001270499
BMEI1268	Lysostaphin	1385	844	1,64	0,001184166
BMEI1269	Chloramphenicol-sensitive protein RarD	810	695	1,16	0,217531135
BMEI1270	2-isopropylmalate synthase	1428	1316	1,08	0,584674551
BMEI1271	2-isopropylmalate synthase	862	989	0,87	0,480467687
BMEI1272	CysteinyI-tRNA synthetase	2487	2675	0,93	0,477623602
BMEI1273	Hypothetical protein	227	441	0,52	0,009314045
BMEI1274	Transporter, lyse family	8227	5681	1,45	0,005016002
BMEI1275	Hypothetical protein	318	287	1,11	0,025945066
BMEI1276	Phosphohydrolase (MutT/Nudix family protein)	781	801	0,98	0,649103906
BMEI1277	Hypothetical cytosolic protein	534	376	1,42	0,002811913
BMEI1278	Hypothetical protein	5683	5835	0,97	0,679961631
BMEI1279	Hypothetical cytosolic protein	6961	7194	0,97	0,432133463
BMEI1280	Hypothetical cytosolic protein	2157	1716	1,26	0,041447212
BMEI1281	Dihydroorotase	512	383	1,34	0,00747423
BMEI1282	Aminomethyltransferase	609	563	1,08	0,377957549
BMEI1283	Hypothetical cytosolic protein	226	180	1,26	0,012987548
BMEI1284	Hypothetical protein-tyrosine phosphatase	253	344	0,74	0,083555738
BMEI1285	DNA repair protein RecO	325	324	1	0,827414518

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1286	GTP-binding protein ERA	2648	2338	1,13	0,487338431
BMEI1287	Ribonuclease III	1417	1111	1,27	0,090359779
BMEI1288	Signal peptidase I	5954	5573	1,07	0,309523139
BMEI1289	Holo-[acyl-carrier protein] synthase	1648	1346	1,22	0,203783788
BMEI1290	Hypothetical membrane spanning protein	1845	1065	1,73	0,001454472
BMEI1291	Transcriptional regulator, arac family	1309	1589	0,82	0,295071625
BMEI1292	Fosmidomycin resistance protein	947	1096	0,86	0,434079492
BMEI1293	Coproporphyrinogen III oxidase, anaerobic 1	1000	566	1,77	0,004596264
BMEI1294	Nitrogen fixation regulation protein FixK	1170	1014	1,15	0,462558101
BMEI1295	Orotate phosphoribosyltransferase	526	378	1,39	0,075095977
BMEI1296	Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase	1117	914	1,22	0,002302241
BMEI1297	DNA-directed RNA polymerase omega chain	1950	1230	1,59	0,00560202
BMEI1298	Hypothetical cytosolic protein	5584	4644	1,2	0,035953944
BMEI1299	Hypothetical cytosolic protein	252	190	1,32	0,038398417
BMEI1300	Small protein B	438	343	1,28	0,001164855
BMEI1301	Dihydrodipicolinate synthase	2186	1551	1,41	0,012181445
BMEI1302	Soluble lytic murein transglycosylase	3329	1693	1,97	3,45E-05
BMEI1303	Hypothetical cytosolic protein	1006	913	1,1	0,035374926
BMEI1304	Outer membrane porin f precursor	726	759	0,96	0,17058584
BMEI1305	Porin	10481	15999	0,66	0,001044385
BMEI1306	Porin	200	220	0,91	0,676925386
BMEI1307	Integrase	553	549	1,01	0,97896554
BMEI1308	Histidinol-phosphate aminotransferase	1373	1630	0,84	0,252696157
BMEI1309	Histidinol-phosphate aminotransferase	198	179	1,11	0,436609292
BMEI1310	Hypothetical membrane spanning protein	417	844	0,49	0,036450737
BMEI1311	Hypothetical protein	1694	1835	0,92	0,505782981
BMEI1312	Hypothetical membrane spanning protein	876	433	2,02	0,000162679
BMEI1313	Hypothetical cytosolic protein	296	319	0,93	0,37669803
BMEI1314	Hypothetical protein	284	302	0,94	0,773101213
BMEI1315	Sn-glycerol-3-phosphate transport ATP-binding protein ugpc	369	304	1,21	0,134336661
BMEI1316	Glutathione s-transferase	1443	933	1,55	0,004650634
BMEI1317	Hypothetical protein	12684	8749	1,45	0,033779325
BMEI1318	Amp nucleosidase	4845	4727	1,02	0,940277487
BMEI1319	Hypothetical membrane spanning protein	7645	6205	1,23	0,051099835
BMEI1320	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase precursor	1710	1032	1,66	3,81E-06
BMEI1321	DNA polymerase, bacteriophage-type	326	294	1,11	0,230439442
BMEI1322	Transporter, mfs superfamily	570	512	1,11	0,377608016
BMEI1323	Transporter, dme family	484	750	0,65	0,45546531
BMEI1324	Membrane alanine aminopeptidase	2139	2446	0,87	0,354617106
BMEI1325	Sensory transduction protein kinase	555	761	0,73	1,68E-05
BMEI1326	Lpsa protein	1967	1891	1,04	0,543512023
BMEI1327	Glutamate-ammonia-ligase adenyllyltransferase	247	305	0,81	0,004404846
BMEI1328	Sensory transduction histidine kinase	423	485	0,87	0,337251813
BMEI1329	Two component response regulator	418	478	0,87	0,900911057
BMEI1330	Protease do	964	1181	0,82	0,641461593
BMEI1331	Cytochrome c-type biogenesis protein CycL precursor	405	464	0,87	0,470774926
BMEI1332	Cytochrome c-type biogenesis protein CycK	320	278	1,15	0,048271631
BMEI1333	Cytochrome c-type biogenesis protein	1132	1228	0,92	0,84086662
BMEI1334	Cytochrome c-type biogenesis protein CycH	287	232	1,24	0,000793723
BMEI1335	17 kd surface antigen precursor	214	192	1,11	0,498109476
BMEI1336	Sensor protein PhoQ	445	477	0,93	0,241301083
BMEI1337	Transcriptional regulatory protein phop	1185	970	1,22	0,064704207

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEI1338	Hypothetical protein	1555	831	1,87	0,007008312
BMEI1339	Hypothetical protein	265	698	0,38	0,017800792
BMEI1340	Phage host specificity protein	87	110	0,8	0,000486059
BMEI1341	Phage host specificity protein	101	297	0,34	0,006463582
BMEI1342	Hypothetical protein	100	122	0,82	0,011379669
BMEI1343	Hypothetical protein	84	145	0,58	0,006016259
BMEI1344	Hypothetical protein	107	127	0,84	0,045115816
BMEI1345	Phage minor tail protein H	70	80	0,88	0,02727299
BMEI1346	Hypothetical protein	186	461	0,4	0,007576516
BMEI1347	Hypothetical protein	113	130	0,86	0,003224343
BMEI1348	Hypothetical protein	188	283	0,66	0,016678589
BMEI1349	Phage portal protein	92	131	0,7	0,01260368
BMEI1350	Phage DNA packaging protein	139	178	0,78	0,004053086
BMEI1351	Penicillin-binding protein 1A	412	323	1,28	0,063721748
BMEI1352	Hypothetical protein	384	350	1,1	0,460547404
BMEI1353	Hypothetical protein	167	137	1,21	0,008353465
BMEI1354	Hypothetical cytosolic protein	3129	2570	1,22	0,046234615
BMEI1355	Hypothetical cytosolic protein	530	404	1,31	0,003359334
BMEI1356	Peptidoglycan binding domain containing protein	1302	1131	1,15	0,264658531
BMEI1357	Histidine protein kinase DivJ	2287	1925	1,19	0,494022083
BMEI1358	Hypothetical cytosolic protein	551	1031	0,53	0,005952451
BMEI1359	Sufe protein probably involved in Fe-S center assembly	691	822	0,84	0,110035312
BMEI1360	Glutamyl-tRNA(gln) amidotransferase subunit a	202	167	1,21	0,000133837
BMEI1361	Hypothetical cytosolic protein	101	117	0,86	0,041746608
BMEI1362	Chromosomal replication initiator protein DnaA	89	104	0,85	0,049435954
BMEI1363	Hypothetical cytosolic protein	720	976	0,74	0,072900919
BMEI1364	Transcriptional regulatory protein mucr	13019	13178	0,99	0,655669553
BMEI1365	Protease II	2888	3651	0,79	0,032320737
BMEI1366	Hypothetical membrane spanning protein	477	611	0,78	0,000486912
BMEI1367	Superoxide dismutase (MN)	3598	2605	1,38	0,217419081
BMEI1368	2-haloalkanoic acid dehalogenase I	1059	1190	0,89	0,199553449
BMEI1369	Protein YbiS precursor	7506	8958	0,84	0,045544129
BMEI1370	ATPase	366	367	1	0,864471311
BMEI1371	Hypothetical protein	121	203	0,6	0,020056215
BMEI1372	Cyanate transport protein CynX	233	274	0,85	0,308422775
BMEI1373	Transcriptional regulator, gntr family	140	140	1	0,989606982
BMEI1374	Magnesium and cobalt transport protein CorA	1964	1764	1,11	0,001408711
BMEI1375	Hypothetical protein	5022	3848	1,3	0,067535833
BMEI1376	Death on curing protein	2084	1521	1,37	0,055338308
BMEI1377	Transcription elongation factor GreB	205	157	1,31	0,026054773
BMEI1378	L-asparaginase II	660	488	1,35	0,011106989
BMEI1379	Regulatory protein BetI	120	130	0,92	0,490461903
BMEI1380	Choline dehydrogenase	232	254	0,91	0,319382047
BMEI1381	Choline dehydrogenase	220	194	1,14	0,381929003
BMEI1382	Betaine aldehyde dehydrogenase	312	311	1,01	0,764856337
BMEI1383	Transcriptional regulator, AraC family	2549	2309	1,1	0,707428559
BMEI1384	Transcriptional regulator, AraC family	370	335	1,11	0,673572047
BMEI1385	Laci-family transcription regulator	96	100	0,96	0,334581118
BMEI1386	Xylulose kinase	173	181	0,95	0,908117565
BMEI1387	Xylose isomerase	488	641	0,76	0,109246618
BMEI1388	Oxidoreductase	405	414	0,98	0,890598544
BMEI1389	Iole protein	299	407	0,73	0,018407359

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1390	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	244	314	0,78	0,000733982
BMEI1391	Ribose transport system permease protein RbsC	265	417	0,64	0,024382643
BMEI1392	Ribose transport ATP-binding protein RbsA	199	211	0,94	0,506897012
BMEI1393	Mannosyltransferase C	8889	6211	1,43	8,76E-05
BMEI1394	Mannose-6-phosphate isomerase	10963	6604	1,66	3,16E-05
BMEI1395	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	13752	11818	1,16	0,008294934
BMEI1396	Phosphomannomutase	4043	4366	0,93	0,161906993
BMEI1397	Transposase	1048	695	1,51	0,006457282
BMEI1398	Transposase	1043	1031	1,01	0,737033885
BMEI1399	Transposase	399	272	1,47	0,02259043
BMEI1400	Transposase	506	375	1,35	0,108401954
BMEI1401	Transposase	525	480	1,1	0,613038689
BMEI1402	Transposase	4239	3878	1,09	0,70335213
BMEI1403	Transposase	1938	1618	1,2	0,136266599
BMEI1404	Mannosyltransferase	4407	4395	1	0,854464865
BMEI1405	Transposase	4828	4963	0,97	0,980069075
BMEI1406	Transposase	2425	2273	1,07	0,560003056
BMEI1407	Transposase	1225	1311	0,93	0,641550593
BMEI1408	Transposase	468	864	0,54	0,258925908
BMEI1409	Transposase	745	1035	0,72	0,220200671
BMEI1410	Transposase	840	711	1,18	0,031419238
BMEI1411	Transposase	381	248	1,54	0,014565576
BMEI1412	Transposase	515	386	1,34	0,074846745
BMEI1413	Gdp-mannose 4,6-dehydratase	46161	51886	0,89	0,043905075
BMEI1414	Perosaminé synthetase	41893	47336	0,89	0,009315429
BMEI1415	O-antigen export system permease protein RfbD	31274	32952	0,95	0,39747647
BMEI1416	O-antigen export system ATP-binding protein RfbB	22314	24056	0,93	0,292142766
BMEI1417	Perosaminé synthetase WbkB	30113	30770	0,98	0,767208783
BMEI1418	GDP-mannose 4,6-dehydratase / GDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-mannose formyltransferase	27468	26283	1,05	0,796460729
BMEI1419	Hypothetical protein	6154	4315	1,43	0,014152627
BMEI1420	Transposase	858	588	1,46	0,004593418
BMEI1421	Transposase	298	313	0,95	0,795585487
BMEI1422	Transposase	466	462	1,01	0,754445836
BMEI1423	Transposase	1358	1085	1,25	0,050634988
BMEI1424	Transposase	348	253	1,38	0,007662414
BMEI1425	Hypothetical protein	128	189	0,67	0,1178572
BMEI1426	Putative undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase	1349	1033	1,31	0,001499224
BMEI1427	CapD protein	976	709	1,38	0,001317732
BMEI1428	Ribonuclease III	450	563	0,8	0,133548836
BMEI1429	Transthyretin-like protein precursor	648	724	0,9	0,20623768
BMEI1430	Ureidoglycolate hydrolase	482	878	0,55	0,021210546
BMEI1431	Bioy protein	239	212	1,13	0,437437493
BMEI1432	Hydroxyacylglutathione hydrolase	544	382	1,43	0,004963914
BMEI1433	Hypothetical protein	500	451	1,11	0,301162624
BMEI1434	Hypothetical protein	2690	3036	0,89	0,010658584
BMEI1435	Polysaccharide deacetylase	1680	841	2	0,00049671
BMEI1436	Pyruvate,phosphate dikinase	584	423	1,38	0,006213588
BMEI1437	Putative hydroxylase	492	570	0,86	0,031412498
BMEI1438	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcD	1100	1717	0,64	0,023075694
BMEI1439	Chromosome segregation protein Smc2	201	177	1,13	0,060365271
BMEI1440	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	4781	4979	0,96	0,596972396

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1441	Hypothetical cytosolic protein	515	484	1,07	0,150986875
BMEI1442	A/g-specific adenine glycosylase	270	268	1,01	0,882855636
BMEI1443	2-haloalkanoic acid dehalogenase I	314	290	1,08	0,0523025
BMEI1444	Adenine-specific methyltransferase	909	1764	0,52	0,032359345
BMEI1445	Chloride channel protein	290	219	1,33	0,027135058
BMEI1446	Phosphoglycolate phosphatase	721	517	1,4	0,003285478
BMEI1447	Hypothetical protein	1022	836	1,22	0,020656704
BMEI1448	C-di-gmp phosphodiesterase A-related protein	1758	1519	1,16	0,193695237
BMEI1449	Hypothetical protein	1574	923	1,71	0,003523092
BMEI1450	Threonine synthase	1399	1240	1,13	0,210804981
BMEI1451	Processing peptidase	4940	5569	0,89	0,057559039
BMEI1452	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	1576	1434	1,1	0,045701703
BMEI1453	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 2 (eal)	3029	1697	1,78	9,28E-07
BMEI1454	Transcriptional regulator, AlgH	780	549	1,42	2,34E-06
BMEI1455	Thio:disulfide interchange protein	1820	1509	1,21	0,146283878
BMEI1456	Thiol peroxidase	2151	1847	1,16	0,169925041
BMEI1457	Ribonuclease HI	1144	1296	0,88	0,021705828
BMEI1458	Homoserine kinase	321	263	1,22	0,05435524
BMEI1459	LytB protein	1422	1302	1,09	0,40403873
BMEI1460	Surfeit locus protein 1	345	440	0,79	0,033252495
BMEI1461	Zinc-finger protein	420	588	0,72	0,014444979
BMEI1462	Cytochrome c oxidase polypeptide III	2607	3833	0,68	5,14E-06
BMEI1463	Cytochrome c oxidase assembly protein CtaG	1250	1432	0,87	0,455533794
BMEI1464	Protoheme IX farnesyltransferase	7961	6852	1,16	0,047418172
BMEI1465	Cytochrome c oxidase polypeptide I	2277	3404	0,67	7,88E-07
BMEI1466	Cytochrome c oxidase polypeptide II	5212	7986	0,65	2,50E-06
BMEI1467	Hypothetical protein	748	503	1,49	0,01232482
BMEI1468	TldD protein	900	756	1,19	0,043792128
BMEI1469	Guanylate kinase	502	484	1,04	0,646656427
BMEI1470	Protein YicC	422	306	1,38	0,014154376
BMEI1471	4-amino-4-deoxychorismate lyase	3473	2872	1,21	0,001158177
BMEI1472	Hypothetical protein	401	333	1,21	0,103630441
BMEI1473	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II	1603	1131	1,42	0,010312501
BMEI1474	Hypothetical protein	2209	1808	1,22	0,127413108
BMEI1475	Acyl carrier protein	5916	5736	1,03	0,567840712
BMEI1476	Hypothetical protein	3090	2970	1,04	0,554998463
BMEI1477	Short-chain dehydrogenase	4019	4229	0,95	0,399238115
BMEI1478	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	1335	1238	1,08	0,100750556
BMEI1479	Hypothetical protein	8436	9972	0,85	0,00858181
BMEI1480	Ssu ribosomal protein S6P	20622	20942	0,98	0,657918808
BMEI1481	Ssu ribosomal protein S18P	7713	6190	1,25	0,00468033
BMEI1482	Hypothetical protein	876	501	1,75	0,01252079
BMEI1483	Lsu ribosomal protein I9P	11667	11301	1,03	0,864979834
BMEI1484	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	4835	4946	0,98	0,697138021
BMEI1485	Replicative DNA helicase	3422	3364	1,02	0,724180844
BMEI1486	DNA repair protein RadA	1038	847	1,22	0,20323585
BMEI1487	Colicin v production protein	1639	1535	1,07	0,288763201
BMEI1488	Amidophosphoribosyltransferase	1508	1010	1,49	0,012170734
BMEI1489	Ribitol-5-phosphate dehydrogenase [NADp(+)]	666	515	1,29	0,02705498
BMEI1490	Cdp-diacylglycerol--serine o-phosphatidyltransferase	1021	824	1,24	0,055750272
BMEI1491	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	2812	2756	1,02	0,631294409
BMEI1492	Heavy metal tolerance protein precursor	2781	2718	1,02	0,758937277

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1493	Peptidoglycan binding protein (LysM domain)	698	530	1,32	0,004921868
BMEI1494	Hypothetical protein	7899	8453	0,93	0,500065057
BMEI1495	Lysine decarboxylase	1410	1452	0,97	0,388264649
BMEI1496	TRNA (uracil-5-) -methyltransferase	230	179	1,28	0,020915073
BMEI1497	Hemolysin	166	139	1,2	0,168848995
BMEI1498	1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase	886	763	1,16	0,013503901
BMEI1499	Pirin	218	247	0,88	0,055642436
BMEI1500	Hypothetical protein	214	291	0,74	0,000405456
BMEI1501	Transglycosylase associated protein	1283	1569	0,82	0,224779871
BMEI1502	Alkaline phosphatase like protein	217	247	0,88	0,157886466
BMEI1503	Exodeoxyribonuclease VII small subunit	1667	1255	1,33	0,046947322
BMEI1504	Acetylsermidine deacetylase	1687	1664	1,01	0,702660482
BMEI1505	GTP cyclohydrolase II / 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	429	368	1,17	0,20797006
BMEI1506	Chorismate synthase	207	170	1,21	0,016065471
BMEI1507	Hypothetical protein	3963	2446	1,62	0,000489405
BMEI1508	Putative lipoprotein	4807	8149	0,59	0,215581841
BMEI1509	Hypothetical protein	9520	13907	0,68	0,417491871
BMEI1510	Cold shock protein CspA	42621	46333	0,92	0,905193389
BMEI1511	Phosphoglycerate mutase/fructose-2,6-bisphosphatase	680	805	0,84	0,175767272
BMEI1512	Enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase (NADH)	1717	1731	0,99	0,800316059
BMEI1513	Chaperone protein DnaJ	1988	2019	0,98	0,78106085
BMEI1514	Hypothetical protein	1246	1262	0,99	0,822292768
BMEI1515	17 kd common-antigen	5381	5584	0,96	0,401576154
BMEI1516	Hypothetical protein	7336	8189	0,9	0,159916079
BMEI1517	Probable pyridoxaminé 5'-phosphate oxidase	888	1268	0,7	7,17E-06
BMEI1518	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase	252	262	0,96	0,246978007
BMEI1519	Phosphoribosylaminé-glycine ligase	241	202	1,2	0,06893241
BMEI1520	Response regulator protein	167	315	0,53	0,061468727
BMEI1521	Acyl-CoA dehydrogenase	152	187	0,81	0,031795503
BMEI1522	Dbi-related protein 1	242	340	0,71	0,054309121
BMEI1523	Hypothetical protein	528	1132	0,47	4,16E-05
BMEI1524	Hypothetical protein	131	308	0,43	0,000323738
BMEI1525	Helix-turn-helix protein, CopG family	633	939	0,67	7,90E-05
BMEI1526	Hypothetical cytosolic protein	1842	2531	0,73	0,000147052
BMEI1527	Glycolate oxidase subunit GlcD	946	649	1,46	0,001455896
BMEI1528	Sua5 protein	188	170	1,1	0,035641148
BMEI1529	Glycyl-tRNA synthetase beta chain	1574	1069	1,47	0,001584901
BMEI1530	Glycyl-tRNA synthetase alpha chain	4502	3514	1,28	0,013842659
BMEI1531	Tetratricopeptide repeat family protein	2763	2427	1,14	0,31945941
BMEI1532	Farnesyl pyrophosphate synthetase / geranyltranstransferase	1608	1560	1,03	0,681971302
BMEI1533	Hypothetical protein	407	344	1,18	0,021414193
BMEI1534	Methyltransferase	322	261	1,23	0,11370311
BMEI1535	Na(+)/H(+) antiporter 1 / protease IV	2993	3812	0,79	0,010735652
BMEI1536	Hypothetical protein	3125	2688	1,16	0,117888684
BMEI1537	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol kinase	388	403	0,96	0,81582896
BMEI1538	Hypothetical protein	137	255	0,54	0,037814132
BMEI1539	Hypothetical protein	7361	6668	1,1	0,419906076
BMEI1540	Glycosyltransferase	172	208	0,82	0,210445929
BMEI1541	Transporter	496	705	0,7	0,002933863
BMEI1542	Ribonuclease HII	220	193	1,14	0,135830791
BMEI1543	ATP synthase B chain	1024	769	1,33	0,069989309
BMEI1544	ATP synthase B' chain	4384	3887	1,13	0,012082515

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1545	ATP synthase C chain	14008	13183	1,06	0,474266238
BMEI1546	ATP synthase A chain	14277	12589	1,13	0,546358852
BMEI1547	ATP synthase	2585	1957	1,32	0,113494566
BMEI1548	Spore-cortex-lytic enzyme prepeptide precursor	850	552	1,54	5,57E-05
BMEI1549	Dnak protein	144	168	0,86	0,095341503
BMEI1550	GTP-binding protein	273	219	1,25	0,105920281
BMEI1551	Hypothetical membrane associated protein	735	601	1,22	0,071934329
BMEI1552	Hypothetical protein	2274	1377	1,65	0,003441981
BMEI1553	Bacteroid development protein BacA	9093	11323	0,8	2,58E-05
BMEI1554	Transporter, MFS superfamily	167	138	1,21	0,000585344
BMEI1555	Transporter, MFS superfamily	819	554	1,48	0,003081666
BMEI1556	Integral membrane protein	425	562	0,76	0,000118549
BMEI1557	Arsenate reductase	601	652	0,92	0,034336381
BMEI1558	ADA regulatory protein / O-6-methylguanine-DNA-alkyltransferase	446	435	1,03	0,992483225
BMEI1559	Salicylaldehyde dehydrogenase	1298	1302	1	0,762423699
BMEI1560	Salicylaldehyde dehydrogenase	212	209	1,02	0,351404578
BMEI1561	Outer membrane protein	529	632	0,84	0,209764773
BMEI1562	Hypothetical protein	1871	2163	0,87	0,312213316
BMEI1563	Ferric uptake regulation protein	16725	11827	1,41	0,006635954
BMEI1564	Cytochrome c oxidase polypeptide I homolog, bacteroid	1099	952	1,15	0,415446966
BMEI1565	Cytochrome c oxidase, monoheme subunit, membrane-bound	706	572	1,24	0,078474799
BMEI1566	Cytochrome c oxidase, diheme subunit, membrane-bound	1066	934	1,14	0,144170841
BMEI1567	Nitrogen fixation protein FixG	730	645	1,13	0,356754581
BMEI1568	Nitrogen fixation protein FixH	356	255	1,4	0,025569337
BMEI1569	Nitrogen fixation protein FixI (E1-E2 type cation ATPase FixI)	502	449	1,12	0,009420866
BMEI1570	Putative hydroxypyruvate reductase	506	846	0,6	0,031571446
BMEI1571	Guanine deaminase	204	218	0,94	0,216287497
BMEI1572	Hypothetical membrane spanning protein	638	1118	0,57	2,45E-05
BMEI1573	Transcriptional regulatory protein, LysR family	252	386	0,65	0,01052948
BMEI1574	XdhC protein (assists in molybdopterin insertion into xanthine dehydrogenase)	150	203	0,74	0,084162848
BMEI1575	Xanthine dehydrogenase	229	298	0,77	0,014090255
BMEI1576	Xanthine dehydrogenase	214	302	0,71	0,019858475
BMEI1577	Chitooligosaccharide deacetylase	215	261	0,82	0,077025737
BMEI1578	Glyoxylate induced protein	1199	1694	0,71	5,36E-05
BMEI1579	Periplasmic mannitol-binding protein	151	197	0,77	0,013867319
BMEI1580	Mannitol transporter, large subunit	181	321	0,56	0,010266916
BMEI1581	Tripartite transporter, small subunit	233	759	0,31	0,009120626
BMEI1582	Transcriptional regulatory protein DegU	656	844	0,78	0,00134841
BMEI1583	Sensor protein DegS	244	268	0,91	0,053998773
BMEI1584	Invasion protein B	14477	18123	0,8	7,69E-12
BMEI1585	Na ⁺ driven multidrug efflux pump	353	305	1,15	0,270139121
BMEI1586	Proline racemase	186	206	0,91	0,119255894
BMEI1587	Hypothetical protein	698	572	1,22	0,682279844
BMEI1588	Carboxynorspermidine dehydrogenase	6419	4625	1,39	0,001191949
BMEI1589	Carboxynorspermidine decarboxylase	1167	886	1,32	0,000129407
BMEI1590	Hypothetical protein	696	661	1,05	0,656920265
BMEI1591	Ferredoxin-NADP reductase	3685	2727	1,35	0,105389026
BMEI1592	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	526	598	0,88	0,014935035
BMEI1593	Pantoate-beta-alanine ligase	673	746	0,9	0,004804965
BMEI1594	Hypothetical protein	568	500	1,14	0,034473445
BMEI1595	Hypothetical protein	295	423	0,7	0,235191366
BMEI1596	Lrgb protein	648	272	2,38	2,35E-06

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1597	Murein hydrolase exporter	3225	1157	2,79	2,12E-06
BMEI1598	Transcriptional regulatory protein, LysR family	115	126	0,92	0,30376746
BMEI1599	Hypothetical protein	748	721	1,04	0,939697357
BMEI1600	Uréase operon 23 kDa accessory protein	3845	3947	0,97	0,706931653
BMEI1601	Hypothetical protein	1347	1123	1,2	0,450644181
BMEI1602	Glycosyltransferase	878	587	1,49	0,000177965
BMEI1603	Polysaccharide deacetylase	1377	1128	1,22	0,063690055
BMEI1604	5-aminolevulinic acid synthase	8109	6119	1,33	0,037728723
BMEI1605	Large conductance mechanosensitive channel	2544	2318	1,1	0,666043238
BMEI1606	Sensory transduction histidine kinase	139	145	0,96	0,736132623
BMEI1607	Glycerol metabolism activator	100	648	0,15	5,20E-08
BMEI1608	Proline iminopeptidase	3045	2975	1,02	0,663171138
BMEI1609	Hypothetical protein	602	413	1,46	0,006300935
BMEI1610	Hypothetical cytosolic protein	149	134	1,1	0,084001854
BMEI1611	Dihydroorotate dehydrogenase	531	418	1,27	1,73E-05
BMEI1612	Na ⁺ driven multidrug efflux pump	723	525	1,38	1,01E-09
BMEI1613	Hypothetical protein	4709	2394	1,97	0,000446161
BMEI1614	Hypothetical protein	5563	6979	0,8	0,19411309
BMEI1615	Transcriptional regulator, AraC family	471	583	0,81	0,150276261
BMEI1616	Deoxycytidine triphosphate deaminase	505	466	1,09	0,210953248
BMEI1617	O-succinylhomoserine sulfhydrylase	884	536	1,65	0,049579888
BMEI1618	ApaG protein	1214	942	1,29	0,108403559
BMEI1619	Hsp33 (redox regulated chaperone)	953	1042	0,91	0,637282376
BMEI1620	Ornithine carbamoyltransferase	1748	2073	0,84	0,113964603
BMEI1621	Acetylornithine aminotransferase	303	330	0,92	0,674376962
BMEI1622	Hypothetical protein	183	190	0,96	0,5971546
BMEI1623	Hypothetical protein	6223	4732	1,32	0,000524937
BMEI1624	Phosphate regulon sensor protein PhoR	273	263	1,04	0,327583208
BMEI1625	Udp-galactose-lipid carrier transferase	381	309	1,23	0,0643434
BMEI1626	N-acetylglucosaminyltransferase	189	183	1,03	0,634658622
BMEI1627	Arginine-binding periplasmic protein	1251	1095	1,14	0,025876109
BMEI1628	Hypothetical protein	504	365	1,38	0,055218122
BMEI1629	Multidrug resistance protein MexB	4687	5238	0,89	0,832963209
BMEI1630	Acriflavin resistance protein a precursor	1026	1257	0,82	0,677600972
BMEI1631	Transcriptional regulator, TetR family	1717	1775	0,97	0,894647695
BMEI1632	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase	241	279	0,86	0,143354184
BMEI1633	Hydrolases of the alpha/beta superfamily	256	218	1,17	0,049497764
BMEI1634	Phosphoglycolate phosphatase	335	270	1,24	0,132802162
BMEI1635	Arginine/ornithine transport operon protein AOT	1439	1237	1,16	0,196292091
BMEI1636	Glucose-6-phosphate isomerase / glucose-6-phosphate 1-epimerase	1622	1473	1,1	0,508435064
BMEI1637	CoxG protein	177	186	0,95	0,518072702
BMEI1638	Glutamate synthase (NADPH) small chain	1029	1424	0,72	0,018104483
BMEI1639	Dihydropyrimidine dehydrogenase (NADP ⁺)	611	1387	0,44	3,56E-07
BMEI1640	Phosphohydrolase (mutt/nudix family protein)	171	169	1,01	0,75071643
BMEI1641	Transcriptional regulator, TetR family	173	234	0,74	0,029222509
BMEI1642	Transcriptional regulator, TetR family	954	1303	0,73	0,033641296
BMEI1643	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase	296	463	0,64	0,000153461
BMEI1644	D-hydantoinase	158	251	0,63	0,000336978
BMEI1645	Acriflavin resistance protein B	420	367	1,15	0,833837628
BMEI1646	Acriflavin resistance protein E	808	793	1,02	0,880165673
BMEI1647	Hypothetical protein	507	682	0,74	0,125465915
BMEI1648	Sensory transduction protein kinase	334	245	1,36	0,006473479

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1649	Uréase accessory protein UreG	1242	619	2,01	0,000428747
BMEI1650	Uréase accessory protein UreF	820	329	2,49	9,21E-06
BMEI1651	Uréase accessory protein UreE	761	278	2,74	1,04E-05
BMEI1652	Uréase alpha subunit	5492	2801	1,96	8,50E-07
BMEI1653	Uréase beta subunit	1297	578	2,24	0,000233521
BMEI1654	Uréase gamma subunit	1785	791	2,26	0,000422875
BMEI1655	Uréase accessory protein UreD	272	150	1,82	1,00E-07
BMEI1656	Hypothetical protein	385	576	0,67	0,398810917
BMEI1657	Hypothetical protein	217	293	0,74	0,319008172
BMEI1658	Hypothetical protein	3236	2724	1,19	0,014025883
BMEI1659	Hypothetical protein	5686	5055	1,12	0,297361837
BMEI1660	Hypothetical protein	3726	3113	1,2	0,116705045
BMEI1661	Recombinase	910	1639	0,56	0,173371797
BMEI1662	Hypothetical protein	1375	3744	0,37	0,140273783
BMEI1663	Antirepressor protein ANT	271	197	1,37	0,001860281
BMEI1664	Hypothetical cytosolic protein	3826	2711	1,41	0,002503275
BMEI1665	Hypothetical protein	344	325	1,06	0,294562832
BMEI1666	Udp-n-acetylglucosaminé 1-carboxyvinyltransferase	5081	4332	1,17	0,057452553
BMEI1667	Hypothetical cytosolic protein	7206	6194	1,16	0,08851456
BMEI1668	Histidinol dehydrogenase	1362	1080	1,26	0,136072175
BMEI1669	Hypothetical cytosolic protein	243	169	1,44	0,027421064
BMEI1670	Arsenate reductase	226	167	1,35	0,041998652
BMEI1671	Bacterial protein translation initiation factor 1 (IF-1)	2025	1602	1,26	0,023187293
BMEI1672	MAF protein	1908	1405	1,36	0,015143129
BMEI1673	Non-essential pilus assembly protein	1368	1037	1,32	0,013539298
BMEI1674	Hypothetical protein	1468	1272	1,15	0,267370721
BMEI1675	Hypothetical protein	306	301	1,02	0,886895737
BMEI1676	Hypothetical protein	141	141	1	0,881398421
BMEI1677	Hypothetical protein	162	705	0,23	0,104434164
BMEI1678	Hypothetical protein	95	230	0,41	0,192521442
BMEI1679	Hypothetical protein	155	271	0,57	0,18233586
BMEI1680	Hypothetical protein	1448	1709	0,85	0,548160555
BMEI1681	Hypothetical protein	1154	1173	0,98	0,721649967
BMEI1682	Hypothetical protein	873	1008	0,87	0,22164263
BMEI1683	Zinc-dependent metallopeptidase	2686	2656	1,01	0,83458622
BMEI1684	Hypothetical protein	1336	1025	1,3	0,064181178
BMEI1685	Hypothetical protein	181	345	0,52	0,216292757
BMEI1686	Hypothetical protein	785	1439	0,55	0,048774657
BMEI1687	Hypothetical protein	568	639	0,89	0,356492614
BMEI1688	Hypothetical protein	1588	2530	0,63	0,026373579
BMEI1689	Hypothetical protein	370	399	0,93	0,597116626
BMEI1690	Hypothetical protein	1181	1009	1,17	0,090443392
BMEI1691	Hypothetical membrane spanning protein	1546	1408	1,1	0,251649354
BMEI1692	Flagellar protein FlgJ	379	382	0,99	0,902190821
BMEI1693	Hypothetical protein	737	804	0,92	0,275923128
BMEI1694	Hypothetical protein	2083	2788	0,75	0,002197967
BMEI1695	Hypothetical protein	512	554	0,92	0,310322778
BMEI1696	Hypothetical membrane spanning protein	219	264	0,83	0,095913077
BMEI1697	Virulence-associated protein E	228	405	0,56	0,05939855
BMEI1698	Hypothetical protein	419	330	1,27	0,05232254
BMEI1699	Hypothetical protein	122	109	1,12	0,360951002
BMEI1700	Hypothetical protein	365	249	1,47	0,021902544

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1701	Hypothetical protein	3388	3139	1,08	0,649527951
BMEI1702	Transposase	2874	2525	1,14	0,008091972
BMEI1703	Hypothetical protein	79	135	0,58	0,195698347
BMEI1704	Hypothetical protein	387	292	1,33	0,013463759
BMEI1705	Hypothetical protein	2138	1818	1,18	0,240189749
BMEI1706	Hypothetical protein	918	901	1,02	0,815922918
BMEI1707	Mandelate racemase	2296	2086	1,1	0,414668078
BMEI1708	2-hydroxyhepta-2,4-diene-1,7-dioate isomerase / 5-carboxymethyl-2-oxo-hex-3-ene-1,7-dioate decarboxylase	1860	1971	0,94	0,74809007
BMEI1709	Oxidoreductase UcpA	1379	1703	0,81	0,14105061
BMEI1710	Oxidoreductase	1468	1896	0,77	0,098715861
BMEI1711	Hypothetical protein	599	737	0,81	0,187233083
BMEI1712	Mandelate racemase	341	354	0,96	0,976850992
BMEI1713	Maltose/maltodextrin transport ATP-binding protein malk	217	267	0,81	0,353015146
BMEI1714	Maltose transport system permease protein MalG	645	929	0,69	0,068640918
BMEI1715	Maltose transport system permease protein MalF	1102	2786	0,4	8,32E-06
BMEI1716	Trehalose/maltose binding protein	1258	2437	0,52	0,000791671
BMEI1717	Transcriptional regulator, IclR family	332	393	0,85	0,211532497
BMEI1718	Purine/pyrimidine phosphoribosyl transferase	186	181	1,03	0,534413461
BMEI1719	Sarcosine oxidase gamma subunit	242	254	0,96	0,929886283
BMEI1720	Sarcosine oxidase alpha subunit	227	202	1,13	0,257097426
BMEI1721	Sarcosine oxidase delta subunit	160	170	0,94	0,505701293
BMEI1722	Sarcosine oxidase beta subunit	223	228	0,98	0,691331349
BMEI1723	NADP-specific glutamate dehydrogenase	856	1111	0,77	0,267954203
BMEI1724	Hypothetical protein	444	539	0,82	0,182524646
BMEI1725	Glycine betaine-binding protein precursor	440	458	0,96	0,499624492
BMEI1726	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein ProW	131	142	0,92	0,359771049
BMEI1727	Glycine betaine/L-proline transport ATP-binding protein ProV	128	147	0,87	0,04410409
BMEI1728	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein ProW	253	275	0,92	0,123819386
BMEI1729	Mercuric resistance operon regulatory protein	1245	2305	0,54	0,000782911
BMEI1730	Copper-transporting ATPase	225	229	0,98	0,950415283
BMEI1731	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 2 (eal)	699	620	1,13	0,081471569
BMEI1732	Phosphomethylpyrimidine kinase / hydroxymethylpyrimidine kinase	179	227	0,79	0,000222064
BMEI1733	Thiamin biosynthesis oxidoreductase thio	151	168	0,9	0,101895587
BMEI1734	Hypothetical protein	90	121	0,74	0,021945357
BMEI1735	ThiG protein	117	160	0,73	0,006602629
BMEI1736	Thiamin-phosphate pyrophosphorylase	101	118	0,86	0,002244666
BMEI1737	ABC transporter substrate-binding protein	188	321	0,59	0,002948513
BMEI1738	Transcriptional activator TenA	152	173	0,88	0,279029651
BMEI1739	ABC transporter integral membrane protein	147	217	0,68	0,035430088
BMEI1740	Aldehyde dehydrogenase	362	657	0,55	0,002008291
BMEI1741	Hypothetical protein	3289	5308	0,62	0,054287627
BMEI1742	ABC transporter ATP-binding protein	542	617	0,88	0,113445468
BMEI1743	ABC transporter ATP-binding protein	218	204	1,07	0,412416205
BMEI1744	Glucose-resistance amylase regulator	382	475	0,8	0,001544286
BMEI1745	Hypothetical protein	723	1122	0,64	0,028568254
BMEI1746	Alcohol dehydrogenase	5569	7738	0,72	0,05991112
BMEI1747	Aldehyde dehydrogenase	4314	6155	0,7	0,003924414
BMEI1748	Transcriptional regulator	708	706	1	0,844469665
BMEI1749	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	233	219	1,06	0,532695748
BMEI1750	Glycerol-3-phosphate regulon repressor	1283	1253	1,02	0,656598739
BMEI1751	Two component response regulator	187	347	0,54	1,19E-06

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1752	Transcription regulator, CRP family	217	252	0,86	0,525173201
BMEI1753	CysQ protein	219	173	1,27	0,004595457
BMEI1754	Sulfate adenylyltransferase / adenylylsulfate kinase	126	150	0,84	0,031693277
BMEI1755	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	99	169	0,59	0,032242288
BMEI1756	Hypothetical protein	81	90	0,9	0,019945952
BMEI1757	Omega-amino acid-pyruvate aminotransferase	1710	2836	0,6	1,51E-05
BMEI1758	Transcriptional activator, LuxR family	5671	6883	0,82	0,402978985
BMEI1759	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	5026	4219	1,19	0,196999817
BMEI1760	Hypothetical protein	270	280	0,96	0,522570426
BMEI1761	Hypothetical protein	250	187	1,34	0,012413107
BMEI1762	O-6-methylguanine-DNA-alkyltransferase	162	327	0,49	0,122299856
BMEI1763	Hypothetical protein	2804	2639	1,06	0,747339695
BMEI1764	Oxidoreductase	218	543	0,4	0,034428919
BMEI1765	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	112	126	0,89	0,146906962
BMEI1766	Sulfite reductase (ferredoxin)	197	278	0,71	0,105051557
BMEI1767	Hypothetical protein	207	553	0,37	0,026431623
BMEI1768	Uroporphyrin-III C-methyltransferase / precorrin-2 oxidase (ec 1.-.-.-) / ferrochelatase (ec 4.99.1.-)	85	147	0,58	0,044379147
BMEI1769	Endonuclease	139	136	1,02	0,979611147
BMEI1770	Methyltransferase	440	407	1,08	0,062638023
BMEI1771	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	606	509	1,19	0,16112567
BMEI1772	Nucleoside-triphosphatase	1427	1249	1,14	0,224393137
BMEI1773	Lactoylglutathione lyase, putative	395	336	1,18	0,200777803
BMEI1774	Lactoylglutathione lyase, putative	1459	1202	1,21	0,095588653
BMEI1775	Ribonuclease pH	742	774	0,96	0,91522435
BMEI1776	Heat-inducible transcription repressor HrcA	273	385	0,71	0,015060109
BMEI1777	GrpE protein	603	499	1,21	0,009602735
BMEI1778	Transporter	1292	1953	0,66	0,08310098
BMEI1779	Fructokinase	1053	1215	0,87	0,280208994
BMEI1780	Hypothetical protein	80	193	0,41	0,020970393
BMEI1781	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	407	717	0,57	0,066554097
BMEI1782	Endonuclease III	364	348	1,05	0,176839405
BMEI1783	Hypothetical membrane spanning protein	1004	930	1,08	0,616062389
BMEI1784	Small heat shock protein HspA	3082	2228	1,38	0,084456059
BMEI1785	Hypothetical protein	873	631	1,38	0,002158956
BMEI1786	Nitrogen regulatory IIA protein	385	326	1,18	0,184246969
BMEI1787	Putative sigma54 modulation protein / SSU ribosomal protein S30P	6222	6457	0,96	0,887188503
BMEI1788	Hypothetical protein	3963	4852	0,82	0,066866078
BMEI1789	RNA polymerase sigma-54 factor RpoN	364	412	0,88	0,135917066
BMEI1790	ABC transporter ATP-binding protein	1268	975	1,3	0,000516112
BMEI1791	Hypothetical periplasmic protein	1038	749	1,39	0,004986688
BMEI1792	Hypothetical protein	3112	2192	1,42	0,009856744
BMEI1793	Putative protease IV	485	407	1,19	0,167983088
BMEI1794	Integration host factor beta-subunit	6069	6804	0,89	0,080942235
BMEI1795	Hypothetical protein	492	393	1,25	0,082444646
BMEI1796	Methyltransferase	581	552	1,05	0,482071319
BMEI1797	Methyltransferase	402	376	1,07	0,376459849
BMEI1798	23s ribosomal RNA methyltransferase	587	559	1,05	0,845397709
BMEI1799	Lipoprotein signal peptidase	1022	1440	0,71	0,03793521
BMEI1800	Hypothetical cytosolic protein	1822	1066	1,71	9,48E-05
BMEI1801	DNA mismatch repair protein muts	247	200	1,23	0,004977787
BMEI1802	NADP-dependent malic enzyme	641	1140	0,56	0,003574913

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1803	NADP-dependent malic enzyme	141	145	0,97	0,406880704
BMEI1804	[protein-PII] uridylyltransferase	751	798	0,94	0,294861822
BMEI1805	Virulence factor MviN	1009	1047	0,96	0,937469186
BMEI1806	Tryptophanyl-tRNA synthetase	1321	1077	1,23	0,011923196
BMEI1807	Hypothetical cytosolic protein	485	412	1,18	0,01160201
BMEI1808	NifU protein	1352	1180	1,15	0,144033581
BMEI1809	Protein YbiS precursor	760	988	0,77	0,029156939
BMEI1810	Hypothetical protein	268	201	1,33	0,039477971
BMEI1811	Acid tolerance regulatory protein ActR	691	611	1,13	0,137579952
BMEI1812	Hypothetical protein	2264	3609	0,63	0,032495745
BMEI1813	Hypothetical protein	1741	1760	0,99	0,824944847
BMEI1814	Transposase	2503	2352	1,06	0,5529048
BMEI1815	Transposase	1233	1320	0,93	0,651639535
BMEI1816	Sensory transduction protein kinase	329	399	0,82	0,024660867
BMEI1817	ATP-dependent helicase hrpB	117	217	0,54	0,059173341
BMEI1818	ATP-dependent helicase hrpB	196	228	0,86	0,134855331
BMEI1819	Alcohol dehydrogenase class III	5411	6757	0,8	0,001609747
BMEI1820	Acetyltransferase	1728	2024	0,85	0,308716931
BMEI1821	Hypothetical protein	7721	9257	0,83	0,016553488
BMEI1822	S-formylglutathione hydrolase	3542	4194	0,84	0,24192241
BMEI1823	DNA gyrase subunit B	5371	6003	0,89	0,131037984
BMEI1824	ATP-dependent RNA helicase DeaD	3056	2202	1,39	0,136429233
BMEI1825	DNA polymerase I	701	592	1,18	0,199780772
BMEI1826	Hypothetical protein	341	626	0,54	0,046126098
BMEI1827	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	4755	5559	0,86	0,064272908
BMEI1828	Ribonuclease D	5644	4554	1,24	0,039298303
BMEI1829	25 kDa outer-membrane immunogenic protein precursor	24027	38425	0,63	0,007087478
BMEI1830	25 kDa outer-membrane immunogenic protein precursor	854	1532	0,56	0,007648068
BMEI1831	Penicillin-binding protein 1A	1907	1068	1,79	0,000360647
BMEI1832	FixR protein	2091	1696	1,23	0,123074618
BMEI1833	Fructokinase	946	859	1,1	0,120183227
BMEI1834	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE	1159	1141	1,02	0,920240481
BMEI1835	N-methyl-D-aspartate receptor	922	866	1,07	0,11435038
BMEI1836	Nicotinate phosphoribosyltransferase	305	325	0,94	0,141843309
BMEI1837	Cellobiose-phosphorylase	809	566	1,43	0,000367567
BMEI1838	Sulfate transport ATP-binding protein CysA	540	767	0,7	0,041715444
BMEI1839	Sulfate transport system permease protein CysW	308	394	0,78	0,003008864
BMEI1840	Sulfate transport system permease protein CysT	695	891	0,78	0,000384051
BMEI1841	Sulfate-binding protein precursor	2008	2391	0,84	0,486463098
BMEI1842	Putative membrane protein	23719	21587	1,1	0,364253761
BMEI1843	Hypothetical protein	2049	1818	1,13	0,23341468
BMEI1844	Hypothetical protein	4529	3512	1,29	0,10498449
BMEI1845	Transcriptional regulatory protein, AsnC family	1620	1511	1,07	0,391471053
BMEI1846	ExsF protein	3298	3124	1,06	0,167874781
BMEI1847	Hypothetical protein	1769	1422	1,24	0,034753208
BMEI1848	Dihydroxy-acid dehydratase	2104	2158	0,97	0,945966736
BMEI1849	Thiol:disulfide interchange protein CysY precursor	622	451	1,38	0,002211024
BMEI1850	Heme exporter protein D	1106	920	1,2	7,80E-05
BMEI1851	Heme exporter protein C	568	407	1,4	0,008375388
BMEI1852	Heme exporter protein B	645	520	1,24	0,001438029
BMEI1853	Heme exporter protein A	2427	1798	1,35	0,008975611
BMEI1854	Hypothetical protein	2826	2851	0,99	0,639995855

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1855	Aconitate hydratase	6190	4944	1,25	0,293114382
BMEI1856	Hypothetical protein	1742	1718	1,01	0,659467221
BMEI1857	Hypothetical cytosolic protein	446	490	0,91	0,453835126
BMEI1858	Phosphinothricin n-acetyltransferase	546	581	0,94	0,476194686
BMEI1859	Integral membrane protein	2195	2356	0,93	0,448156748
BMEI1860	Hypothetical transmembrane oxidoreductase	105	120	0,88	0,279767624
BMEI1861	Arylesterase precursor	13132	9365	1,4	0,001034237
BMEI1862	2'-5' RNA ligase	1306	1112	1,17	0,237919201
BMEI1863	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	1154	1131	1,02	0,946079584
BMEI1864	Pterin-4-alpha-carbinolaminé dehydratase	1177	1499	0,79	0,117685233
BMEI1865	Hypothetical protein	546	706	0,77	0,000462084
BMEI1866	Hypothetical protein	21486	16287	1,32	1,19E-05
BMEI1867	Florfenicol resistance protein	1014	615	1,65	9,74E-05
BMEI1868	Hypothetical protein	831	582	1,43	0,007082369
BMEI1869	Homoserine/homoserine lactone efflux protein	407	383	1,06	0,372521124
BMEI1870	Argininosuccinate synthase	4754	4059	1,17	0,057464024
BMEI1871	Hypothetical protein	444	409	1,09	0,388381522
BMEI1872	Cell surface protein	2751	2690	1,02	0,950194329
BMEI1873	Cell surface protein	7056	6493	1,09	0,779732629
BMEI1874	Hypothetical protein	66	64	1,03	0,366318289
BMEI1875	Hypothetical cytosolic protein	107	110	0,98	0,738815977
BMEI1876	DNA polymerase III, alpha chain	246	284	0,87	0,192727677
BMEI1877	Hemolysin III	1177	825	1,43	0,003260205
BMEI1878	Soluble lytic murein transglycosylase	603	588	1,02	0,744370105
BMEI1879	Hypothetical cytosolic protein	2533	2774	0,91	0,068836713
BMEI1880	Hypothetical membrane spanning protein	677	795	0,85	0,009766586
BMEI1881	Hypothetical protein	1227	1227	1	0,845215204
BMEI1882	Fumarylpyruvate hydrolase	428	440	0,97	0,942361395
BMEI1883	Pantothenate kinase	152	142	1,06	0,51538156
BMEI1884	Dienelactone hydrolase and related enzymes	1537	1914	0,8	0,311881263
BMEI1885	Transcriptional regulatory protein, LysR family	185	208	0,89	0,324243625
BMEI1886	Phosphoglucosylase	2255	2341	0,96	0,524777967
BMEI1887	MRP protein	570	541	1,05	0,495265152
BMEI1888	Lactoylglutathione lyase	209	203	1,03	0,525076959
BMEI1889	Hypothetical protein	428	324	1,32	0,006978179
BMEI1890	Transporter	1119	1103	1,01	0,912909695
BMEI1891	Hypothetical protein	503	383	1,31	0,006212646
BMEI1892	Hypothetical cytosolic protein (cysteine-rich)	587	579	1,01	0,972238763
BMEI1893	Protein YbiS precursor	760	642	1,18	0,108938706
BMEI1894	Gramicidin s biosynthesis GrsT protein	2071	1754	1,18	0,455443218
BMEI1895	Outer membrane protein	3015	2769	1,09	0,907705103
BMEI1896	Hypothetical membrane spanning protein	110	110	0,99	0,895595565
BMEI1897	Hypothetical protein	57	56	1,01	0,991178719
BMEI1898	Cytochrome o ubiquinol oxidase operon protein CyoD	2106	1294	1,63	0,004099519
BMEI1899	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	10253	7583	1,35	0,000246766
BMEI1900	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	26507	21957	1,21	1,59E-05
BMEI1901	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	6373	4322	1,47	0,000126332
BMEI1902	Molybdopterin biosynthesis enzyme	92	90	1,03	0,31083673
BMEI1903	Cytochrome C-552	1210	1368	0,88	0,161264005
BMEI1904	3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	613	494	1,24	0,050109976
BMEI1905	Prephenate dehydratase	1437	1345	1,07	0,390176146
BMEI1906	Phosphohydrolase (mutt/nudix family protein)	1042	1011	1,03	0,649119672

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1907	Hit1 protein	717	633	1,13	0,332344135
BMEI1908	DNA polymerase III subunits gamma and tau	904	652	1,39	0,011619171
BMEI1909	Hypothetical transcriptional regulatory protein	1846	1622	1,14	0,206880465
BMEI1910	Recombination protein RecR	2470	2234	1,11	0,132557661
BMEI1911	Membrane-bound lytic murein transglycosylase B	586	453	1,29	0,019671869
BMEI1912	Sugar transporter	393	251	1,57	0,017273911
BMEI1913	Transcriptional regulatory protein, lysr family	966	434	2,22	1,06E-07
BMEI1914	Hypothetical membrane spanning protein	164	181	0,91	0,394489911
BMEI1915	SSU ribosomal protein S1P	25115	27821	0,9	0,124917411
BMEI1916	Cytidylate kinase	2206	1800	1,23	0,16218733
BMEI1917	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	369	315	1,17	0,162589397
BMEI1918	Hypothetical cytosolic protein	741	629	1,18	0,314884609
BMEI1919	Acyltransferase	3256	2517	1,29	0,005725638
BMEI1920	Hypothetical protein	1776	1847	0,96	0,968332322
BMEI1921	Acetoacetyl-CoA synthetase	304	423	0,72	0,001265819
BMEI1922	Acetoacetyl-CoA synthetase	130	161	0,81	0,009183184
BMEI1923	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	775	975	0,8	0,018426743
BMEI1924	Methylcrotonyl-CoA carboxylase	389	492	0,79	0,048687175
BMEI1925	Acetyl-CoA carboxylase alpha chain / propionyl-CoA carboxylase alpha chain	707	593	1,19	0,184175635
BMEI1926	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	603	532	1,13	0,313215267
BMEI1927	Enoyl-CoA hydratase	1420	1205	1,18	0,187860255
BMEI1928	Enoyl-CoA hydratase	480	486	0,99	0,746057935
BMEI1929	Hypothetical protein	1363	2114	0,64	0,018911904
BMEI1930	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	2723	3142	0,87	0,248347814
BMEI1931	Hypothetical protein	1311	1023	1,28	0,154674291
BMEI1932	Hypothetical cytosolic protein	6615	5791	1,14	0,197067191
BMEI1933	Hypothetical protein	2562	2001	1,28	0,0461781
BMEI1934	Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor	4276	3864	1,11	0,596602087
BMEI1935	Oligopeptide-binding protein appa precursor	2667	2036	1,31	0,095924484
BMEI1936	Oligopeptide transport system permease protein OppB	7013	7478	0,94	0,505507288
BMEI1937	Oligopeptide transport system permease protein OppC	4592	5298	0,87	0,265663624
BMEI1938	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	1855	1837	1,01	0,913721697
BMEI1939	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	9769	13494	0,72	0,000761347
BMEI1940	Molybdopterin biosynthesis MoeB protein	1695	1824	0,93	0,547252877
BMEI1941	RecF protein	285	257	1,11	0,258437281
BMEI1942	DNA polymerase III, beta chain	2927	3347	0,87	0,112470141
BMEI1943	Chromosomal replication initiator protein DnaA	35755	40713	0,88	0,147967258
BMEI1944	SSU ribosomal protein S20P	1777	1756	1,01	0,770948103
BMEI1945	Probable enoyl-CoA hydratase	520	886	0,59	3,08E-05
BMEI1946	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	238	218	1,09	0,163124463
BMEI1947	Hypothetical cytosolic protein	301	667	0,45	0,040125425
BMEI1948	Cytosol aminopeptidase	429	277	1,55	0,01653647
BMEI1949	Transcriptional regulator, marr family	1039	937	1,11	0,399907596
BMEI1950	Gamma-d-glutamyl-L-diamino acid endopeptidase II	1901	1522	1,25	0,171048393
BMEI1951	Putative hydrolase	1057	911	1,16	0,227713699
BMEI1952	Gluconate 2-dehydrogenase	1020	837	1,22	0,011726884
BMEI1953	Aspartyl-tRNA synthetase	743	764	0,97	0,632491182
BMEI1954	ABC transporter substrate binding protein	1026	1176	0,87	0,013591416
BMEI1955	Ferric uptake regulation protein	753	500	1,51	0,017375043
BMEI1956	3-hydroxydecanoyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase	3625	4516	0,8	0,008945309
BMEI1957	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase I	6781	8477	0,8	0,248999652
BMEI1958	Enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase (NADH)	2013	2233	0,9	0,637365412

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEI1959	Methyltransferase	437	516	0,85	0,012806596
BMEI1960	Methyltransferase	424	481	0,88	0,160090784
BMEI1961	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	13227	13579	0,97	0,623560027
BMEI1962	Ssu ribosomal protein S15P	13877	15170	0,91	0,140171861
BMEI1963	TRNA pseudouridine synthase B	2006	1654	1,21	0,541464713
BMEI1964	Ribosome-binding factor A	882	852	1,04	0,613519886
BMEI1965	Bacterial protein translation initiation factor 2 (IF-2)	2837	2579	1,1	0,429038613
BMEI1966	Hypothetical cytosolic protein	1327	1024	1,3	0,025313642
BMEI1967	N utilization substance protein A	2974	3589	0,83	0,118202069
BMEI1968	Protein associated with nus operon	1654	1795	0,92	0,544107081
BMEI1969	Sam-dependent methyltransferase	537	443	1,21	0,085058457
BMEI1970	S-adenosylmethionine synthetase	9882	11767	0,84	0,038255346
BMEI1971	Transcriptional regulator	1951	1737	1,12	0,34393437
BMEI1972	Apolipoprotein n-acyltransferase	567	500	1,13	0,161260571
BMEI1973	Cbs domain containing protein	1760	1390	1,27	0,015413514
BMEI1974	Diacylglycerol kinase	3662	3507	1,04	0,511532182
BMEI1975	PhoH protein	2423	2202	1,1	0,363118637
BMEI1976	MiaB protein	777	848	0,92	0,102641942
BMEI1977	1-acyl-SN-glycerol-3-phosphate acyltransferase	308	521	0,59	0,128472179
BMEI1978	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	170	140	1,21	0,011286492
BMEI1979	O-sialoglycoprotein endopeptidase	215	352	0,61	0,025460142
BMEI1980	DNA protection during starvation protein	64853	64834	1	0,845284511
BMEI1981	Aminopeptidase T	1783	1792	1	0,880581317
BMEI1982	Hypothetical protein	2169	1937	1,12	0,25259836
BMEI1983	Spore-cortex-lytic enzyme prepeptide precursor	1764	1687	1,05	0,618074505
BMEI1984	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein phob	1546	1818	0,85	0,101104815
BMEI1985	Phosphate transport system protein PhoU	1187	1017	1,17	0,070190713
BMEI1986	Phosphate transport ATP-binding protein PstB	1482	1332	1,11	0,023778722
BMEI1987	Phosphate transport system permease protein PstA	519	382	1,36	0,000699159
BMEI1988	Phosphate transport system permease protein PstC	681	561	1,21	0,028806374
BMEI1989	Phosphate-binding periplasmic protein	910	616	1,48	0,01611379
BMEI1990	Hypothetical membrane spanning protein	236	473	0,5	0,073555367
BMEI1991	Hypothetical protein	709	1650	0,43	0,019517589
BMEI1992	Rare lipoprotein A	1603	1470	1,09	0,971189059
BMEI1993	Hypothetical protein	663	1406	0,47	0,00197587
BMEI1994	Mg(2+) chelatase family protein	113	171	0,66	0,001410403
BMEI1995	Mg(2+) chelatase family protein	1072	1280	0,84	0,032869887
BMEI1996	Glutathione synthetase	587	531	1,11	0,265177849
BMEI1997	Gluconolactonase	3301	4783	0,69	6,69E-05
BMEI1998	Hypothetical cytosolic protein	796	1254	0,63	4,15E-07
BMEI1999	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	443	527	0,84	0,004944639
BMEI2000	Phosphatidylethanolaminé n-methyltransferase / phosphatidyl-n-methylethanolaminé n-methyltransferase	3320	4581	0,72	0,002375879
BMEI2001	Chaperone protein DnaJ	1678	1566	1,07	0,303812313
BMEI2002	Dnak protein	2661	2800	0,95	0,534796331
BMEI2003	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase	1352	1298	1,04	0,376013858
BMEI2004	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	1136	976	1,16	0,09799393
BMEI2005	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	1346	1244	1,08	0,087318721
BMEI2006	Hypothetical cytosolic protein	450	342	1,32	0,071032688
BMEI2007	Lsu ribosomal protein L20P	10572	9402	1,12	0,157356812
BMEI2008	Lsu ribosomal protein L35P	29542	26543	1,11	0,192714337
BMEI2009	Nickel-cobalt-cadmium resistance protein NccN	1822	2994	0,61	0,000804804

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEI2010	Bacterial protein translation initiation factor 3 (IF-3)	7826	9902	0,79	0,095668525
BMEI2011	2-hydroxyuconic semialdehyde hydrolase	578	711	0,81	0,096052581
BMEI2012	Benzoate membrane transport protein	1092	1236	0,88	0,15868234
BMEI2013	Hypothetical protein	191	209	0,91	0,278048189
BMEI2014	Hypothetical cytosolic protein	119	129	0,93	0,314836081
BMEI2015	Zinc metallopeptidases	2414	3141	0,77	0,055334458
BMEI2016	Hypothetical protein	3399	5042	0,67	0,017245822
BMEI2017	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	1482	1456	1,02	0,941673349
BMEI2018	Tryptophan synthase beta chain	2071	2456	0,84	0,063518665
BMEI2019	Tryptophan synthase alpha chain	919	984	0,93	0,810644168
BMEI2020	Acetyl-coenzyme a carboxylase carboxyl transferase subunit beta	7163	6639	1,08	0,413691582
BMEI2021	Folypolyglutamate synthase / dihydrofolate synthase	1801	1531	1,18	0,338435061
BMEI2022	Thioredoxin C-1	3124	3308	0,94	0,207883478
BMEI2023	ATP-dependent nuclease subunit A	198	184	1,07	0,319016465
BMEI2024	Hypothetical cytosolic protein	286	247	1,16	0,042796636
BMEI2025	Mannose-1-phosphate guanylttransferase	1630	1435	1,14	0,10698373
BMEI2026	7.5 kda chlorosome protein	411	344	1,19	0,083189978
BMEI2027	Alkaline phosphatase synthesis sensor protein PhoR	592	501	1,18	0,139746431
BMEI2028	Hypothetical protein	615	662	0,93	0,957171468
BMEI2029	Adenosylhomocysteinase	15751	17897	0,88	0,11727495
BMEI2030	Hypothetical protein	223	366	0,61	0,006646576
BMEI2031	Phosphocarrier protein HPR	2064	2228	0,93	0,214556261
BMEI2032	Pts system, IIA component	3078	3184	0,97	0,64214583
BMEI2033	Hypothetical protein	2190	2122	1,03	0,670004463
BMEI2034	Sensor protein ChvG	578	546	1,06	0,347556333
BMEI2035	Sensor protein ChvG	645	444	1,45	0,000897634
BMEI2036	Transcriptional regulatory protein chvi	1947	1487	1,31	0,001814911
BMEI2037	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	378	408	0,93	0,348697927
BMEI2038	Peptidyl-tRNA hydrolase	474	436	1,09	0,308016804
BMEI2039	Pantothenate kinase	1000	952	1,05	0,393337492
BMEI2040	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	611	577	1,06	0,474670945
BMEI2041	Hisf protein	2497	2083	1,2	0,039459891
BMEI2042	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase	1107	882	1,26	0,01091273
BMEI2043	Amidotransferase hish	1708	1550	1,1	0,327086042
BMEI2044	Hypothetical membrane spanning protein	2281	2125	1,07	0,434939233
BMEI2045	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	2698	2695	1	0,956442636
BMEI2046	Hypothetical protein	97	123	0,79	0,088138785
BMEI2047	Heat shock protein HslV	389	602	0,65	0,000246302
BMEI2048	Heat shock protein HslU	379	583	0,65	0,001885645
BMEI2049	Hypothetical protein	1446	1891	0,76	0,013952598
BMEI2050	Transcriptional regulator	411	629	0,65	0,047916681
BMEI2051	Smr/muts family protein	173	155	1,11	0,255899358
BMEI2052	Membrane-bound lytic murein transglycosylase A	321	298	1,08	0,200517143
BMEI2053	Transporter	2123	2349	0,9	0,010164088
BMEI2054	FxsA protein	11707	11756	1	0,772241359
BMEI2055	Protein translocase subunit SecB	1456	1493	0,98	0,980554407
BMEI2056	DNA polymerase III, epsilon chain	472	394	1,2	0,019654239
BMEI2057	Dephospho-CoA kinase	1147	1159	0,99	0,735716878
BMEI2058	Shikimate 5-dehydrogenase	960	1134	0,85	0,145317006
BMEI2059	Maf protein	1952	2750	0,71	0,000510926
BMEI2060	ATP/GTP-binding protein	485	550	0,88	0,008882574
BMEI0001	Hypothetical protein	1266	1043	1,21	0,087280697

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0002	Ribosomal-protein-serine acetyltransferase	389	349	1,12	0,085267506
BMEII0003	Molybdenum transport ATP-binding protein modc	171	132	1,29	0,004217903
BMEII0004	Molybdenum transport system permease protein modb	1557	1074	1,45	0,000202253
BMEII0005	Molybdate-binding periplasmic protein	1243	759	1,64	1,71E-07
BMEII0006	Hypothetical protein	1216	705	1,73	1,03E-05
BMEII0007	Rhodanese-related sulfurtransferases	1558	898	1,73	9,10E-08
BMEII0008	Hypothetical protein	195	259	0,75	0,094356429
BMEII0009	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase / 2-dehydro-3- deoxyphosphogluconate aldolase	739	607	1,22	0,025268132
BMEII0010	Hypothetical membrane associated protein	2734	1315	2,08	1,36E-06
BMEII0011	Transcriptional regulatory protein HydG	215	189	1,14	0,142200479
BMEII0012	Oligoendopeptidase f	1881	1692	1,11	0,10124002
BMEII0013	Para-aminobenzoate synthase component I	387	307	1,26	0,03226243
BMEII0014	Para-aminobenzoate synthase component I	1938	1544	1,26	0,000429789
BMEII0015	Homospermidine synthase	7555	12309	0,61	0,010155852
BMEII0016	Homospermidine synthase	3909	5655	0,69	0,052962737
BMEII0017	Outer membrane lipoprotein	4795	5603	0,86	0,002019629
BMEII0018	Ferrochelataase	3722	4152	0,9	0,030087536
BMEII0019	Stomatin like protein	882	814	1,08	0,324616137
BMEII0020	Nodulation protein nfd, c-terminal only	583	658	0,89	0,055841427
BMEII0021	Polysialic acid capsule expression protein KpsF	526	484	1,09	0,410847923
BMEII0022	Hypothetical protein	521	493	1,06	0,550285478
BMEII0023	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	643	488	1,32	2,95E-05
BMEII0024	Membrane-bound lytic murein transglycosylase B	1097	860	1,28	0,010625787
BMEII0025	Attachment mediating protein VirB1 homolog	4752	5414	0,88	0,373941005
BMEII0026	Attachment mediating protein VirB2 homolog	5326	8887	0,6	0,058639076
BMEII0027	Channel protein VirB3 homolog	8614	14219	0,61	0,041512825
BMEII0028	ATPase VirB4 homolog	1750	3009	0,58	0,137950905
BMEII0029	Attachment mediating protein VirB5 homolog	1303	1689	0,77	0,682188408
BMEII0030	Channel protein VirB6 homolog	5720	8768	0,65	0,007455377
BMEII0031	Channel protein VirB7 homolog	193	258	0,75	0,503754506
BMEII0032	Channel protein VirB8 homolog	924	1520	0,61	0,295266305
BMEII0033	Channel protein VirB9 homolog	1091	1626	0,67	0,292044031
BMEII0034	Channel protein VirB10 homolog	1272	1469	0,87	0,704796562
BMEII0035	ATPase VirB11 homolog	1111	1224	0,91	0,979419917
BMEII0036	Outer membrane protein OprF	2690	2742	0,98	0,770934592
BMEII0037	Hypothetical cytosolic protein	1183	1608	0,74	0,002594589
BMEII0038	D-serine/D-alanine/glycine transporter	6098	10536	0,58	3,42E-08
BMEII0039	Glutamate synthase (NADPH) small chain	142	204	0,7	0,004814709
BMEII0040	Glutamate synthase [NADPH] large chain	282	482	0,58	0,005574912
BMEII0041	Low-specificity threonine aldolase	478	432	1,11	0,185496298
BMEII0042	Heat shock protein A	1006	717	1,4	0,000780547
BMEII0043	Hypothetical protein	174	246	0,71	0,121820271
BMEII0044	Hypothetical protein	647	409	1,58	0,000100309
BMEII0045	Hypothetical protein	332	223	1,49	3,83E-05
BMEII0046	Hypothetical protein	2243	2809	0,8	0,033621582
BMEII0047	Lysophospholipase I2	193	242	0,8	0,004756059
BMEII0048	Extragenic suppressor protein SuhB	621	725	0,86	0,012101715
BMEII0049	N-formylglutamate deformylase	939	949	0,99	0,913006125
BMEII0050	Sensory transduction histidine kinase	1414	1518	0,93	0,3617054
BMEII0051	Nodulation protein W	2013	1775	1,13	0,083095325
BMEII0052	Sensory transduction histidine kinase	808	629	1,28	0,032648677
BMEII0053	Mg(2+) transport ATPase protein C	370	386	0,96	0,839527268

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0054	Hypothetical protein	186	221	0,84	0,396797315
BMEII0055	Hypothetical protein	240	358	0,67	0,134650963
BMEII0056	Mg(2+) transport ATPase, P-type	324	290	1,12	0,494075897
BMEII0057	Hypothetical protein	602	277	2,17	0,003217815
BMEII0058	Hypothetical protein	284	133	2,13	0,001616418
BMEII0059	Aminoquinolate/shkimate dehydrogenase	128	137	0,93	0,138336846
BMEII0060	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	125	157	0,79	0,006660753
BMEII0061	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit	93	122	0,76	0,018095653
BMEII0062	Probable carbonyl reductase (NADPH)	186	290	0,64	0,024104661
BMEII0063	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase	121	147	0,82	0,131321231
BMEII0064	Lactoylglutathione lyase	94	165	0,57	0,015774772
BMEII0065	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livf	73	86	0,85	0,003453512
BMEII0066	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livg	122	158	0,77	0,031776741
BMEII0067	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livm	142	344	0,41	0,037265858
BMEII0068	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livh	105	438	0,24	0,016433884
BMEII0069	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	90	142	0,64	0,005343464
BMEII0070	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	102	122	0,84	0,009895507
BMEII0071	Transcriptional regulator, GntR family	158	151	1,04	0,455854091
BMEII0072	Extracytoplasmic function alternative sigma factor	288	247	1,17	0,010387443
BMEII0073	Hypothetical protein	19455	15314	1,27	0,018784045
BMEII0074	Hypothetical protein	5386	4404	1,22	0,025164145
BMEII0075	Nitrate reductase	5836	4609	1,27	0,000520289
BMEII0076	Enterobactin synthetase component F	621	661	0,94	0,704478085
BMEII0077	Isochorismate synthase Dhbc	1618	2314	0,7	0,474357148
BMEII0078	2,3-dihydroxybenzoate-amp ligase	553	537	1,03	0,903236443
BMEII0079	Isochorismatase	405	318	1,27	0,095499728
BMEII0080	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	302	272	1,11	0,816797947
BMEII0081	Enterobactin synthetase component D	117	121	0,97	0,674420942
BMEII0082	Hypothetical protein	233	261	0,89	0,5640557
BMEII0083	Basic membrane protein a precursor	626	851	0,74	0,073238036
BMEII0084	Basic membrane protein a precursor	324	406	0,8	0,226052526
BMEII0085	Galactoside transport ATP-binding protein MglA	131	141	0,92	0,184304634
BMEII0086	Galactoside transport system permease protein MglC	109	139	0,79	0,005510879
BMEII0087	Sugar ABC transporter, permease protein	156	224	0,7	0,003450862
BMEII0088	Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	1482	986	1,5	0,001000383
BMEII0089	Ribokinase	1201	898	1,34	0,003723568
BMEII0090	Hypothetical protein	3129	2857	1,1	0,332039994
BMEII0091	Replication protein C	1706	2217	0,77	0,001730245
BMEII0092	Replication protein B	903	931	0,97	0,580158045
BMEII0093	Replication protein A	709	749	0,95	0,541024261
BMEII0094	Hypothetical protein	119	207	0,57	0,071867756
BMEII0095	Hypothetical protein	844	1083	0,78	0,265772135
BMEII0096	Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	176	290	0,61	0,082821574
BMEII0097	Cation-transporting P-type ATPase B	143	263	0,55	0,034309637
BMEII0098	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livf	926	1002	0,92	0,246797437
BMEII0099	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livg	1251	1256	1	0,909955477
BMEII0100	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livg	2583	2691	0,96	0,500102453
BMEII0101	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livm	3650	4127	0,88	0,000766661
BMEII0102	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livh	4072	5317	0,77	6,34E-05
BMEII0103	Leu/ile/val-binding protein precursor	9741	12034	0,81	5,06E-05
BMEII0104	Transcriptional regulator, AraC family	801	1047	0,77	0,55424312
BMEII0105	Iron-regulated outer membrane protein FrpB	19300	22875	0,84	0,184832209

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0106	Xylose repressor	142	217	0,65	0,029258456
BMEII0107	Taurine transport system permease protein TauC	436	1180	0,37	0,026717716
BMEII0108	Taurine transport ATP-binding protein TauB	265	558	0,48	0,005145097
BMEII0109	Aliphatic sulfonates-binding lipoprotein	623	1288	0,48	1,70E-05
BMEII0110	Choline-sulfatase	1061	1816	0,58	0,000280872
BMEII0111	Icc protein	93	93	1	0,972788985
BMEII0112	Sn-glycerol-3-phosphate transport ATP-binding protein ugpc	124	133	0,94	0,621884748
BMEII0113	Sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein ugpa	246	418	0,59	0,191584223
BMEII0114	Sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein ugpe	400	620	0,65	0,097997991
BMEII0115	Glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein precursor	711	742	0,96	0,424766112
BMEII0116	Transcriptional regulator, GntR family	238	229	1,04	0,985480705
BMEII0117	Hypothetical membrane spanning protein	684	1044	0,66	0,179005911
BMEII0118	Hypothetical protein	274	520	0,53	0,109685089
BMEII0119	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livf	99	136	0,73	0,014566573
BMEII0120	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livm / high-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livg	92	112	0,82	0,013999878
BMEII0121	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livh	82	105	0,78	0,084473281
BMEII0122	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	134	228	0,59	0,008075636
BMEII0123	Exoenzymes regulatory protein aepa precursor	106	142	0,75	0,002188916
BMEII0124	Aldehyde dehydrogenase	85	107	0,8	0,085989234
BMEII0125	Aldehyde dehydrogenase	126	162	0,78	0,03656541
BMEII0126	Amino acid permease	141	356	0,4	0,014257782
BMEII0127	Acetate operon repressor	99	108	0,91	0,102864585
BMEII0128	Transcriptional regulator	102	128	0,79	0,024805324
BMEII0129	Hydrolase family protein	148	203	0,73	0,039935284
BMEII0130	Omega-amino acid-pyruvate aminotransferase	342	473	0,72	0,031191666
BMEII0131	4-aminobutyrate aminotransferase	248	348	0,71	0,005396168
BMEII0132	Homoserine kinase	202	232	0,87	0,107312165
BMEII0133	Homoprotocatechuate degradative operon repressor	812	965	0,84	0,012587444
BMEII0134	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase	176	587	0,3	0,01152047
BMEII0135	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase	148	228	0,65	0,020614663
BMEII0136	Homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase	202	336	0,6	0,014747505
BMEII0137	2-hydroxyhepta-2,4-diene-1,7-dioate isomerase / 5-carboxymethyl-2-oxo-hex-3-ene-1,7-dioate decarboxylase	263	442	0,6	0,057263556
BMEII0138	2-oxo-hepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase	165	201	0,82	0,011616921
BMEII0139	Phosphotyrosyl phosphatase activator (PtpA)	122	157	0,77	0,043824297
BMEII0140	Aldehyde dehydrogenase B	100	96	1,04	0,582886571
BMEII0141	Aldehyde dehydrogenase	97	176	0,55	0,000188224
BMEII0142	Probable aldehyde dehydrogenase	332	510	0,65	0,009820961
BMEII0143	Transcriptional regulator, AraC family	102	199	0,51	0,041433927
BMEII0144	Xylose transport system permease protein xylh	739	1460	0,51	1,96E-07
BMEII0145	D-xylose transport ATP-binding protein XylG	158	251	0,63	1,39E-05
BMEII0146	D-xylose-binding periplasmic protein precursor	256	507	0,51	0,000450633
BMEII0147	Putative integral membrane protein	449	483	0,93	0,893415413
BMEII0148	Extracellular serine protease	198	287	0,69	0,160209259
BMEII0149	Extracellular serine protease	119	197	0,6	0,043108375
BMEII0150	Flagellin	10161	5990	1,7	0,000741386
BMEII0151	Flagellar m-ring protein FlIF	1115	341	3,27	1,33E-10
BMEII0152	Flagellar m-ring protein FlIF	523	212	2,47	1,21E-09
BMEII0153	Hypothetical protein	237	131	1,81	1,75E-05
BMEII0154	Chemotaxis MotB protein	217	151	1,44	0,001061432
BMEII0155	Chemotaxis MotC protein precursor	223	149	1,5	0,00180733
BMEII0156	Chemotaxis MotD protein	593	379	1,56	0,029583669

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0157	Hypothetical protein	175	166	1,05	0,654718451
BMEII0158	Two component response regulator	1518	1028	1,48	0,000330924
BMEII0159	Flagellar hook protein FlgE	7510	4555	1,65	8,39E-06
BMEII0160	Flagellar hook-associated protein 1	848	366	2,32	2,20E-08
BMEII0161	Flagellar hook-associated protein 3	5279	2714	1,95	8,12E-06
BMEII0162	FlaF protein	2085	1036	2,01	0,000144088
BMEII0163	FliB protein	2371	1101	2,15	0,000145743
BMEII0164	Basal-body rod modification protein FlgD	6183	3811	1,62	0,000301773
BMEII0165	Flagellar biosynthetic protein FliQ	720	333	2,16	6,78E-06
BMEII0166	Flagellar biosynthetic protein FliH	2566	1104	2,32	2,60E-05
BMEII0167	Flagellar biosynthetic protein FliA	103	105	0,98	0,928754421
BMEII0168	Flagellar biosynthetic protein FliR	183	442	0,41	0,075654486
BMEII0169	Hypothetical protein	195	277	0,7	0,142783428
BMEII0170	Flagellar protein FlgJ	4134	1357	3,05	4,08E-09
BMEII0171	Hypothetical cytosolic protein	6210	2420	2,57	5,44E-06
BMEII0172	Hypothetical protein	9545	4637	2,06	3,05E-07
BMEII0173	Hypothetical protein	3759	1757	2,14	5,92E-08
BMEII0174	Hypothetical protein	1099	577	1,9	0,000116926
BMEII0175	Zinc uptake regulation protein	647	485	1,34	0,026721391
BMEII0176	High-affinity zinc uptake system membrane protein znuB	1004	1037	0,97	0,777296614
BMEII0177	High-affinity zinc uptake system ATP-binding protein znuC	562	586	0,96	0,632026793
BMEII0178	High-affinity zinc uptake system protein znuA	341	504	0,68	0,114784764
BMEII0179	Low affinity zinc transport membrane protein	219	204	1,07	0,250263563
BMEII0180	RRF2 family protein	1416	1041	1,36	0,001109434
BMEII0181	N-acetylglucosaminé kinase	236	240	0,99	0,957946242
BMEII0182	Hypothetical protein	230	561	0,41	0,019745313
BMEII0183	Transposase	10868	8407	1,29	0,07387078
BMEII0184	Transposase	2703	2073	1,3	0,451022236
BMEII0185	D-lactate dehydrogenase	598	1833	0,33	0,070817572
BMEII0186	PemK-like protein 1	465	492	0,95	0,612426407
BMEII0187	Hypothetical cytosolic protein	154	176	0,88	0,359377224
BMEII0188	Hypothetical cytosolic protein	198	260	0,76	0,065208698
BMEII0189	L-fucose phosphate aldolase	185	240	0,77	0,087488375
BMEII0190	Hypothetical protein	95	117	0,82	0,155766436
BMEII0191	Hypothetical protein	328	467	0,7	0,020312745
BMEII0192	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	331	350	0,95	0,613217176
BMEII0193	Spermidine/putrescine transport ATP-binding protein potA	288	378	0,76	0,117501071
BMEII0194	Spermidine/putrescine transport system permease protein potB	488	1094	0,45	0,139188793
BMEII0195	Spermidine/putrescine transport system permease protein potC	108	138	0,78	0,492154324
BMEII0196	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	146	232	0,63	0,15495793
BMEII0197	Glu/asp-tRNA amidotransferase subunit a	335	453	0,74	0,001808761
BMEII0198	Antibiotic-induced protein Drp35	1509	2112	0,71	0,000444082
BMEII0199	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF	1066	1577	0,68	0,000336303
BMEII0200	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	448	909	0,49	0,003436364
BMEII0201	Oligopeptide transport system permease protein OppC	205	228	0,9	0,056338024
BMEII0202	Oligopeptide transport system permease protein OppB	276	395	0,7	0,002128927
BMEII0203	Putative binding protein YddS precursor	469	830	0,56	0,000301065
BMEII0204	Transcriptional regulator, GntR family	1380	1726	0,8	0,316706332
BMEII0205	Dipeptide transport ATP-binding protein DppF	77	92	0,83	0,204628767
BMEII0206	Dipeptide transport ATP-binding protein DppD	166	159	1,05	0,692127705
BMEII0207	Dipeptide transport system permease protein DppC	103	100	1,04	0,546511909
BMEII0208	Dipeptide transport system permease protein DppB	201	239	0,84	0,572679777

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0209	Dipeptide transport system permease protein DppB	141	201	0,7	0,220761608
BMEII0210	Periplasmic dipeptide transport protein precursor	94	161	0,58	0,037320246
BMEII0211	Penicillin acylase	337	334	1,01	0,965398699
BMEII0212	Penicillin acylase	112	116	0,97	0,458894433
BMEII0213	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	182	183	0,99	0,940497377
BMEII0214	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	138	139	1	0,875175146
BMEII0215	Probable 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	162	182	0,89	0,275660465
BMEII0216	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit	199	203	0,98	0,722810358
BMEII0217	Periplasmic dipeptide transport protein precursor	354	414	0,85	0,060823875
BMEII0218	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of acetoin cleaving system	236	193	1,22	0,007739262
BMEII0219	Transcriptional regulator	230	226	1,02	0,774421453
BMEII0220	Oligopeptide transport system permease protein OppB	481	553	0,87	0,252346937
BMEII0221	Dipeptide transport system permease protein DppC	401	363	1,11	0,834555936
BMEII0222	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	135	107	1,27	0,023393432
BMEII0223	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF	275	220	1,25	0,437480681
BMEII0224	Formyl-coenzyme A transferase	667	712	0,94	0,455551611
BMEII0225	6-oxohexanoate dehydrogenase	1627	1271	1,28	0,232161266
BMEII0226	Nta operon transcriptional regulator	6432	4988	1,29	0,073679249
BMEII0227	Transposase	2614	2063	1,27	0,537840352
BMEII0228	Transposase	10567	7883	1,34	0,045671642
BMEII0229	Hypothetical protein	531	542	0,98	0,672518407
BMEII0230	Peptide methionine sulfoxide reductase	1668	1901	0,88	0,027482621
BMEII0231	SlyX protein	416	372	1,12	0,280735974
BMEII0232	Uracil phosphoribosyltransferase	3146	2870	1,1	0,031824797
BMEII0233	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubie	2069	1581	1,31	0,001668278
BMEII0234	Ubiquinone biosynthesis protein AarF	858	640	1,34	0,011858412
BMEII0235	Phosphopantothenate-cysteine ligase / phosphopantothenoylcysteine decarboxylase	492	345	1,43	4,79E-05
BMEII0236	Bacterial peptide chain release factor 3 (RF-3)	771	628	1,23	0,019085567
BMEII0237	Hypothetical protein	300	853	0,35	4,17E-07
BMEII0238	Hded protein	1635	2857	0,57	0,000111871
BMEII0239	Cardiolipin synthetase	1084	969	1,12	0,018848705
BMEII0240	Dioxygenase	2014	1660	1,21	0,005163434
BMEII0241	Coniferyl-aldehyde dehydrogenase	177	493	0,36	0,02971418
BMEII0242	Aldehyde dehydrogenase	313	348	0,9	0,51178593
BMEII0243	Hypothetical protein	200	234	0,85	0,069106609
BMEII0244	Hypothetical protein	204	184	1,11	0,457180745
BMEII0245	Universal stress protein family	662	717	0,92	0,426188524
BMEII0246	Nitroreductase	461	682	0,68	0,059567388
BMEII0247	Exoenzymes regulatory protein aepa precursor	2394	2784	0,86	0,233282176
BMEII0248	Phosphoglycerate mutase	3812	3382	1,13	0,057564596
BMEII0249	Dihydrodipicolinate reductase	990	804	1,23	0,005885542
BMEII0250	ABC transporter ATP-binding protein	1662	1289	1,29	2,19E-05
BMEII0251	Glucokinase	5741	6671	0,86	0,081030051
BMEII0252	Methylglyoxal synthase	1453	1183	1,23	0,03740191
BMEII0253	Murein endopeptidase	996	994	1	0,940566974
BMEII0254	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases	2006	1666	1,2	0,022707972
BMEII0255	Iron-sulfur cluster-binding protein	1366	1086	1,26	0,000657316
BMEII0256	Glutathione S-transferase	1774	1514	1,17	0,009519761
BMEII0257	Hypothetical protein	176	255	0,69	0,019331486
BMEII0258	Bacitracin resistance protein (putative undecaprenol kinase)	2414	2386	1,01	0,725611233
BMEII0259	NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kd subunit	2694	1876	1,44	0,100324389
BMEII0260	GTP-binding protein LepA	2328	2456	0,95	0,348981905

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0261	Hypothetical cytosolic protein	207	510	0,41	0,006982528
BMEII0262	Hypothetical protein	503	579	0,87	0,199295646
BMEII0263	Hypothetical protein	845	854	0,99	0,759653866
BMEII0264	Polypeptide deformylase	506	681	0,74	0,033793758
BMEII0265	Methionyl-tRNA formyltransferase	817	648	1,26	0,176861705
BMEII0266	tRNA pseudouridine synthase A	293	217	1,35	0,060515048
BMEII0267	Hypothetical membrane spanning protein	1156	1057	1,09	0,125375334
BMEII0268	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	7104	5418	1,31	0,000483221
BMEII0269	Hypothetical protein	1151	1396	0,82	0,001321864
BMEII0270	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	1514	1353	1,12	0,118146842
BMEII0271	3-isopropylmalate dehydrogenase	4237	4736	0,89	0,043751628
BMEII0272	Phosphoglycolate phosphatase	1253	1202	1,04	0,642858149
BMEII0273	Acetylglutamate kinase	3579	4215	0,85	0,016982342
BMEII0274	GTP-binding protein CgpA	431	436	0,99	0,9592706
BMEII0275	60 kda inner membrane protein YidC	7428	7535	0,99	0,800533372
BMEII0276	Ribonuclease P protein component	3553	4507	0,79	0,05734416
BMEII0277	Hypothetical protein	2334	2759	0,85	0,006087258
BMEII0278	Translation initiation inhibitor	1664	1817	0,92	0,396277798
BMEII0279	Hypothetical membrane spanning protein	1667	1485	1,12	0,181648143
BMEII0280	Multidrug resistance protein B	3435	2435	1,41	0,001836123
BMEII0281	Transcriptional regulator, gntr family	401	576	0,7	0,000980053
BMEII0282	Aldehyde dehydrogenase	448	859	0,52	0,000183104
BMEII0283	Toluenesulfonate zinc-independent alcohol dehydrogenase	798	1519	0,53	2,58E-05
BMEII0284	Periplasmic dipeptide transport protein precursor	593	853	0,69	0,002595533
BMEII0285	Dipeptide transport system permease protein DppB	228	251	0,91	0,125756207
BMEII0286	Dipeptide transport system permease protein DppC	165	234	0,71	0,029628926
BMEII0287	Dipeptide transport ATP-binding protein DppD	381	490	0,78	0,141455194
BMEII0288	Dipeptide transport ATP-binding protein DppF	212	335	0,63	0,044460669
BMEII0289	Glutamyl-tRNA(gln) amidotransferase subunit A	454	380	1,19	0,000299283
BMEII0290	DNA polymerase III, alpha chain	1460	985	1,48	0,006077761
BMEII0291	Aminobutyraldehyde dehydrogenase	343	547	0,63	0,04821852
BMEII0292	Response regulator protein	1386	1158	1,2	0,028017061
BMEII0293	Hypothetical protein	1069	589	1,82	1,02E-07
BMEII0294	Glutathione s-transferase	189	172	1,09	0,294971804
BMEII0295	Biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase III	1433	1208	1,19	0,181985018
BMEII0296	Hypothetical protein	119	121	0,99	0,94935511
BMEII0297	Outer membrane protein NosA precursor	414	658	0,63	0,03941981
BMEII0298	Hypothetical protein	471	821	0,57	0,077119644
BMEII0299	Transcriptional regulator, IclR family	458	547	0,84	0,009570675
BMEII0300	Ribose transport ATP-binding protein RbsA	117	191	0,61	0,036934037
BMEII0301	Ribose transport system permease protein RbsC	114	348	0,33	0,048798762
BMEII0302	Ribose transport system permease protein RbsC	344	950	0,36	0,04994794
BMEII0303	Translation initiation inhibitor	1162	2190	0,53	0,124073666
BMEII0304	Bicyclomycin resistance protein	2299	1279	1,8	0,00035654
BMEII0305	Nitrate reductase	8899	6351	1,4	0,004304501
BMEII0306	Carboxylesterase	2960	2093	1,41	0,002587211
BMEII0307	Vegetatible incompatibility protein HET-E-1	231	201	1,15	0,083168382
BMEII0308	Low affinity zinc transport membrane protein	1973	2024	0,97	0,79849436
BMEII0309	Creatininase	365	332	1,1	0,154686499
BMEII0310	Transcriptional regulator, MarR family	1428	1583	0,9	0,378696166
BMEII0311	Transcriptional regulator, MarR family	1053	1036	1,02	0,729805724

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpriR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpriR/WT	P value annova
BMEII0312	Ribose operon repressor	2670	2593	1,03	0,585695466
BMEII0313	Gluconate 2-dehydrogenase	960	813	1,18	0,050782297
BMEII0314	Anthranilate synthase component II	636	481	1,32	0,072791248
BMEII0315	Hypothetical protein	93	182	0,51	0,088595506
BMEII0316	2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	161	186	0,87	0,298944571
BMEII0317	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 2 (eal)	273	243	1,13	0,202779603
BMEII0318	6-aminohexanoate-dimer hydrolase	2856	3450	0,83	0,006618036
BMEII0319	6-aminohexanoate-dimer hydrolase	2066	3262	0,63	0,000866678
BMEII0320	Hypothetical protein	123	157	0,79	0,462891151
BMEII0321	Hypothetical protein	140	255	0,55	0,112902678
BMEII0322	Cytochrome c oxidase polypeptide IV	5093	7509	0,68	0,075572249
BMEII0323	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	2154	2840	0,76	0,01613074
BMEII0324	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	5053	7621	0,66	1,86E-05
BMEII0325	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	3540	4310	0,82	0,041751062
BMEII0326	Homoserine dehydrogenase	1077	776	1,39	0,024268764
BMEII0327	Phosphoglycolate phosphatase	190	143	1,32	0,009176151
BMEII0328	Nodulation protein N	2979	2487	1,2	0,027110388
BMEII0329	Hypothetical membrane spanning protein	209	342	0,61	0,14356842
BMEII0330	Hypothetical protein	579	465	1,24	0,085618049
BMEII0331	Hypothetical cytosolic protein	384	277	1,38	8,75E-05
BMEII0332	Ssu ribosomal protein S21P	10704	9237	1,16	0,000441685
BMEII0333	Hypothetical protein	4256	3543	1,2	0,43480877
BMEII0334	Tetratricopeptide repeat family protein	7760	7923	0,98	0,928175464
BMEII0335	Hypothetical protein	396	382	1,04	0,580259456
BMEII0336	ABC transporter permease protein	1173	918	1,28	0,000544361
BMEII0337	ABC transporter ATP-binding protein	1979	1953	1,01	0,760429806
BMEII0338	ABC transporter substrate binding protein	4091	4549	0,9	0,381178087
BMEII0339	Alcohol dehydrogenase (acceptor)	1047	2613	0,4	5,86E-05
BMEII0340	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livm	400	944	0,42	0,000136689
BMEII0341	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livh	632	1503	0,42	0,000130424
BMEII0342	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livf	260	768	0,34	9,64E-05
BMEII0343	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livg	187	406	0,46	3,64E-06
BMEII0344	Branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- binding protein	415	1486	0,28	4,97E-05
BMEII0345	Transcriptional regulatory protein, lysr family	722	561	1,29	0,03733772
BMEII0346	Transcriptional regulatory protein, asnc family	161	315	0,51	0,019409948
BMEII0347	Membrane protein related to metalloendopeptidase	15337	13469	1,14	0,000223208
BMEII0348	4-aminobutyrate aminotransferase	1579	1326	1,19	0,175938744
BMEII0349	General l-amino acid-binding periplasmic protein AapJ precursor	496	1095	0,45	0,000922395
BMEII0350	D-alanyl-d-alanine carboxypeptidase	455	440	1,03	0,610607438
BMEII0351	Acetolactate synthase large subunit	463	486	0,95	0,31497002
BMEII0352	Transcriptional regulator, GntR family	470	511	0,92	0,517770219
BMEII0353	Sugar transport system permease protein	96	173	0,56	0,025871612
BMEII0354	Sugar transporter	144	239	0,6	0,009054812
BMEII0355	D-galactose 1-dehydrogenase	111	148	0,75	0,005323655
BMEII0356	Galactonate dehydratase	176	270	0,65	0,031269573
BMEII0357	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	149	207	0,72	0,021525551
BMEII0358	2-dehydro-3-deoxyphosphogalactonate aldolase	70	78	0,9	0,126652142
BMEII0359	Multiple sugar-binding periplasmic receptor ChvE precursor	102	181	0,56	0,009859376
BMEII0360	Multiple sugar-binding periplasmic receptor ChvE precursor	160	146	1,1	0,170938751
BMEII0361	Sugar transport ATP-binding protein	246	358	0,69	0,005848209
BMEII0362	Xylose transport system permease protein XylH	763	859	0,89	0,602777822
BMEII0363	D-alanine aminotransferase	11615	8357	1,39	0,019863852

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEII0364	Hypothetical protein	143	207	0,69	0,000652956
BMEII0365	Urocanate hydratase	223	372	0,6	0,00093436
BMEII0366	N-formylglutamate deformylase	95	113	0,84	0,093935451
BMEII0367	Histidine ammonia-lyase	88	99	0,89	0,240088307
BMEII0368	Imidazolonepropionase / histidine ammonia-lyase	123	138	0,89	0,15265624
BMEII0369	Atrazine chlorohydrolase	235	376	0,63	0,006555204
BMEII0370	Histidine utilization repressor	216	413	0,52	0,008547124
BMEII0371	Omega-amino acid-pyruvate aminotransferase	480	629	0,76	1,82E-05
BMEII0372	Transcriptional regulator, merr family	522	556	0,94	0,747650141
BMEII0373	D-amino acid dehydrogenase small subunit	1381	881	1,57	0,003029471
BMEII0374	Alanine racemase, catabolic	495	285	1,74	0,000313379
BMEII0375	Transcriptional regulatory protein, AsnC family	1406	1932	0,73	0,002101633
BMEII0376	Heat resistant agglutinin 1 precursor	4987	5320	0,94	0,441335405
BMEII0377	L-lactate dehydrogenase (cytochrome)	290	309	0,94	0,327408702
BMEII0378	Formate dehydrogenase alpha chain	1013	922	1,1	0,474841338
BMEII0379	Hypothetical protein	1204	1262	0,95	0,708442293
BMEII0380	Acriflavin resistance protein A precursor	801	714	1,12	0,39151226
BMEII0381	Acriflavin resistance protein E	772	660	1,17	0,306327147
BMEII0382	Acriflavin resistance protein D	2419	2565	0,94	0,698153101
BMEII0383	Transcriptional regulator, GntR family	171	233	0,73	0,062761335
BMEII0384	Glucosaminé-6-phosphate isomerase	633	815	0,78	0,000402311
BMEII0385	N-acetylglucosaminé-6-phosphate deacetylase	217	204	1,06	0,372867683
BMEII0386	Hypothetical membrane associated protein	628	872	0,72	0,075417726
BMEII0387	Formyltetrahydrofolate deformylase	1260	1026	1,23	0,066971798
BMEII0388	Piperidine-6-carboxylate dehydrogenase	228	233	0,98	0,757623256
BMEII0389	Hypothetical protein	314	350	0,9	0,01418115
BMEII0390	Transcriptional regulatory protein, LysR family	4164	4378	0,95	0,565710714
BMEII0391	Sarcosine oxidase beta subunit	1110	1091	1,02	0,620620974
BMEII0392	Transcription accessory protein (S1 RNA binding domain)	135	146	0,93	0,206778099
BMEII0393	Transcriptional regulator, arsR family	526	723	0,73	0,322063778
BMEII0394	Glycerol trinitrate reductase	1436	1452	0,99	0,868515314
BMEII0395	Transcriptional regulatory protein, AsnC family	1408	1289	1,09	0,061082181
BMEII0396	Arginase	86	127	0,68	0,017637809
BMEII0397	Ornithine cyclodeaminase	167	133	1,25	0,000553876
BMEII0398	Sec-independent protein translocase protein TatC	2745	2307	1,19	0,040239733
BMEII0399	Hypothetical protein	77	87	0,88	0,196717479
BMEII0400	Putative DNA-binding protein	1712	1732	0,99	0,768151642
BMEII0401	Thioredoxin	1298	1303	1	0,795082368
BMEII0402	ATP-dependent protease LA 2	776	724	1,07	0,399474888
BMEII0403	Conserved cytosolic protein	508	392	1,29	0,095884951
BMEII0404	3-isopropylmalate dehydrogenase	1747	1451	1,2	0,120588018
BMEII0405	Ada regulatory protein / O-6-methylguanine-DNA-alkyltransferase	174	342	0,51	0,04075719
BMEII0406	Proline/betaine transporter	127	269	0,47	0,001341983
BMEII0407	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	4737	4451	1,06	0,280715426
BMEII0408	Transcriptional regulator, marr family	340	464	0,73	0,000300573
BMEII0409	Osmotically inducible protein c	336	328	1,02	0,712076945
BMEII0410	Acetylglutamate kinase	501	369	1,36	0,017939126
BMEII0411	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	575	460	1,25	0,054671328
BMEII0412	Hypothetical protein	154	360	0,43	0,03708617
BMEII0413	Citrate lyase beta chain / citryl-CoA lyase subunit	1617	1962	0,82	0,110191351
BMEII0414	Hypothetical protein	1687	1899	0,89	0,427190491
BMEII0415	Lactoylglutathione lyase	1661	2542	0,65	4,58E-05

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0416	Peptidyl-dipeptidase DCP	340	372	0,91	0,568278138
BMEII0417	Hypothetical protein	970	698	1,39	0,051385694
BMEII0418	Mg2+ transporter MgtE	218	178	1,22	0,002758788
BMEII0419	GTP-binding protein TypA/BipA	2363	1535	1,54	3,14E-05
BMEII0420	Thymidylate synthase	408	408	1	0,818320621
BMEII0421	Hypothetical protein	2970	2962	1	0,781089276
BMEII0422	Fructose-1,6-bisphosphatase	3428	3129	1,1	0,398298891
BMEII0423	Fructose-bisphosphate aldolase	2457	2492	0,99	0,744100677
BMEII0424	Ribose 5-phosphate isomerase	1470	761	1,93	9,65E-09
BMEII0425	Triosephosphate isomerase	652	332	1,96	2,59E-06
BMEII0426	Transcriptional regulator, DeoR family	552	383	1,44	8,25E-05
BMEII0427	Eri operon repressor	331	170	1,95	1,37E-07
BMEII0428	D-erythrulose 4-phosphate dehydrogenase	810	311	2,6	1,60E-09
BMEII0429	Erythritol-4-phosphate dehydrogenase	859	316	2,72	9,24E-08
BMEII0430	Erythritol kinase	319	173	1,84	5,12E-08
BMEII0431	Hypothetical protein	1559	1022	1,53	0,00396129
BMEII0432	Ribose transport ATP-binding protein RbsA	1127	538	2,1	7,15E-05
BMEII0433	Ribose transport system permease protein RbsC	2455	1057	2,32	3,20E-05
BMEII0434	Hypothetical protein	4252	2629	1,62	0,001737092
BMEII0435	D-ribose-binding periplasmic protein precursor	5426	2937	1,85	0,000186924
BMEII0436	Transcriptional regulator, DeoR family	550	267	2,06	1,68E-05
BMEII0437	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase	565	504	1,12	0,278033531
BMEII0438	L-gulonolactone oxidase	330	289	1,14	0,159769442
BMEII0439	Transporter, dme family	1489	1226	1,22	0,060859379
BMEII0440	Dtdp-glucose 4,6-dehydratase	470	326	1,44	9,69E-05
BMEII0441	Acetylornithine aminotransferase	824	613	1,34	2,67E-05
BMEII0442	Hypothetical membrane spanning protein	590	842	0,7	0,024324692
BMEII0443	Hypothetical protein	1977	2913	0,68	0,031227772
BMEII0444	Hypothetical protein	91	91	1	0,962239446
BMEII0445	Transposase	1210	1383	0,87	0,383371634
BMEII0446	Hypothetical protein	1051	920	1,14	0,328645793
BMEII0447	Transporter	654	432	1,52	0,036715646
BMEII0448	Zinc metalloproteases	499	288	1,73	0,018418986
BMEII0449	Type I restriction-modification system restriction subunit	247	188	1,32	0,09092203
BMEII0450	Type I restriction-modification system specificity subunit	348	243	1,43	0,043630981
BMEII0451	Type I restriction-modification system methylation subunit	745	551	1,35	0,032486827
BMEII0452	Type I restriction-modification enzyme, s subunit	1549	1371	1,13	0,07105803
BMEII0453	Transposase	285	207	1,38	0,008007813
BMEII0454	Hypothetical protein	302	230	1,31	0,004530288
BMEII0455	Hypothetical protein	205	207	0,99	0,893521881
BMEII0456	Hypothetical protein	535	391	1,37	0,002061193
BMEII0457	Hypothetical protein	4303	3688	1,17	0,254227505
BMEII0458	Hypothetical protein	2207	1491	1,48	0,167070617
BMEII0459	Hypothetical protein	108	243	0,44	0,104950601
BMEII0460	2-nitropropane dioxygenase	155	198	0,78	0,265681748
BMEII0461	Hypothetical protein	1397	1444	0,97	0,95253831
BMEII0462	ATP-dependent helicase	221	291	0,76	0,035170081
BMEII0463	Putative icc-like phosphoesterases	142	137	1,04	0,451419276
BMEII0464	Hypothetical membrane associated protein	447	466	0,96	0,785678262
BMEII0465	Permease	269	299	0,9	0,765575383
BMEII0466	Tetrapeptide repeat family protein	1653	1242	1,33	0,073413125
BMEII0467	Transcriptional regulator, merr family	1577	1089	1,45	0,006557349

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0468	Hypothetical protein	597	468	1,28	0,055225087
BMEII0469	Integral membrane protein	2565	2047	1,25	0,000572245
BMEII0470	Integral membrane protein	1364	856	1,59	1,93E-07
BMEII0471	Hypothetical protein	8265	4903	1,69	0,000704261
BMEII0472	Membrane fusion protein MtrC	3304	1897	1,74	0,000131162
BMEII0473	Acriflavin resistance protein F	491	463	1,06	0,160452457
BMEII0474	Mannonate dehydratase	949	1850	0,51	2,92E-08
BMEII0475	Transcriptional regulator, GntR family	152	169	0,9	0,050208598
BMEII0476	Uronate isomerase	307	825	0,37	0,035763623
BMEII0477	Uronate isomerase	260	948	0,27	0,050756926
BMEII0478	D-mannonate oxidoreductase	196	463	0,42	0,083714691
BMEII0479	ABC transporter substrate-binding protein	185	346	0,53	0,014027411
BMEII0480	Hypothetical protein	75	84	0,89	0,169905499
BMEII0481	ABC transporter ATP-binding protein	297	402	0,74	0,195854134
BMEII0482	Hypothetical protein	380	1044	0,36	0,116087456
BMEII0483	ABC transporter integral membrane protein	478	963	0,5	0,088508704
BMEII0484	ABC transporter integral membrane protein	250	635	0,39	0,214940096
BMEII0485	D-galactarate dehydratase	377	499	0,76	0,354970564
BMEII0486	Nickel-responsive regulator NikR	3641	4896	0,74	0,163893115
BMEII0487	Nickel-binding periplasmic protein precursor	57854	59463	0,97	0,350483402
BMEII0488	Nickel transport system permease protein NikB	2137	1857	1,15	0,29328017
BMEII0489	Nickel transport system permease protein NikC	6985	7158	0,98	0,624056207
BMEII0490	Nickel transport ATP-binding protein NikD	1334	1120	1,19	0,459689774
BMEII0491	Nickel transport ATP-binding protein NikE	680	496	1,37	0,051401421
BMEII0492	Acyl-CoA dehydrogenase	3903	3382	1,15	0,089891721
BMEII0493	Transcriptional regulatory protein, LysR family	589	928	0,63	0,378816265
BMEII0494	Hypothetical protein	191	224	0,85	0,216255513
BMEII0495	Acyl-CoA dehydrogenase	677	652	1,04	0,43108553
BMEII0496	3-ketoacyl-CoA thiolase	2050	1825	1,12	0,093054563
BMEII0497	Enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase	634	488	1,3	0,004221429
BMEII0498	DNA-binding protein RdgA	2662	3368	0,79	0,064710841
BMEII0499	Succinoglycan biosynthesis protein ExoI	614	541	1,13	0,108439328
BMEII0500	Lysyl-tRNA synthetase	1073	818	1,31	2,12E-08
BMEII0501	Hypothetical cytosolic protein	1336	1103	1,21	0,015810662
BMEII0502	Carbonic anhydrase	1298	1303	1	0,976704242
BMEII0503	Hypothetical protein	2795	3324	0,84	0,018419801
BMEII0504	Oligopeptide-binding protein appa precursor	915	863	1,06	0,255065995
BMEII0505	Oligopeptide transport system permease protein AppB	321	467	0,69	0,17215642
BMEII0506	Oligopeptide transport system permease protein OppC	136	168	0,81	0,431585604
BMEII0507	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	199	364	0,55	0,087817894
BMEII0508	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppF	111	129	0,86	0,134700761
BMEII0509	Pyrroline-5-carboxylate reductase	447	469	0,95	0,820714724
BMEII0510	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase / methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	294	240	1,23	0,016389821
BMEII0511	Phosphogluconate dehydratase	1976	1982	1	0,862051187
BMEII0512	6-phosphogluconolactonase	837	783	1,07	0,394799474
BMEII0513	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1468	1429	1,03	0,83183343
BMEII0514	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase	503	672	0,75	0,000384841
BMEII0515	Multidrug resistance protein 1	320	273	1,17	0,340394378
BMEII0516	Hypothetical protein	3353	3294	1,02	0,983373837
BMEII0517	Branched-chain amino acid transport protein AzlC	10456	10080	1,04	0,802295711
BMEII0518	Transcriptional regulator AzlB	2155	2945	0,73	0,005474697

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0519	Iron-regulated protein FrpC	226	359	0,63	0,012624574
BMEII0520	Transcriptional regulator, MarR family	788	797	0,99	0,895797127
BMEII0521	Oxidoreductase	1278	1115	1,15	0,16405284
BMEII0522	Hypothetical protein	5042	5167	0,98	0,744657018
BMEII0523	Glutaminé synthetase	17855	20545	0,87	0,193334705
BMEII0524	Hypothetical protein	1167	630	1,85	0,042933729
BMEII0525	Hypothetical protein	3062	2058	1,49	0,214546025
BMEII0526	Transcriptional regulatory protein, LysR family	209	210	1	0,817711996
BMEII0527	Exodeoxyribonuclease VII large subunit	258	215	1,2	0,010220705
BMEII0528	Glutamate-cysteine ligase	1355	751	1,8	4,82E-10
BMEII0529	Surface protein	478	463	1,03	0,839462355
BMEII0530	Transcriptional regulator, MarR family	78	86	0,91	0,052447509
BMEII0531	Fusaric acid resistance protein FusB / fusaric acid resistance protein FusC	133	217	0,61	0,086165422
BMEII0532	Hypothetical membrane associated protein	152	167	0,91	0,538656149
BMEII0533	Fusaric acid resistance protein FusE	193	272	0,71	0,040040397
BMEII0534	Hypothetical protein	341	289	1,18	0,011587834
BMEII0535	Iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein	1270	1583	0,8	0,02147999
BMEII0536	Iron(III) dicitrate transport system permease protein fecd	1016	1287	0,79	0,246913873
BMEII0537	Iron(III) dicitrate transport ATP-binding protein FecE	530	551	0,96	0,568919733
BMEII0538	Hypothetical protein	4699	4347	1,08	0,311510247
BMEII0539	Hypothetical cytosolic protein	1012	829	1,22	0,045957523
BMEII0540	Putative regulator of purine biosynthesis	1186	2280	0,52	1,39E-07
BMEII0541	Sugar transport system permease protein	306	526	0,58	0,001000564
BMEII0542	Sugar-binding protein	885	1429	0,62	4,73E-06
BMEII0543	Short-chain dehydrogenase	371	547	0,68	0,006618686
BMEII0544	Sn-glycerol-3-phosphate transport ATP-binding protein ugpc	184	300	0,61	0,022493644
BMEII0545	Transcriptional regulator, RpiR family	202	239	0,85	0,033513986
BMEII0546	Metal-activated pyridoxal enzyme	330	376	0,88	0,304833684
BMEII0547	Hypothetical cytosolic protein	635	799	0,79	0,000917654
BMEII0548	Glycine betaine/L-proline transport ATP-binding protein prov	3325	4267	0,78	0,066196435
BMEII0549	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein ProW	815	984	0,83	0,288596033
BMEII0550	Glycine betaine/L-proline-binding protein ProX	1547	2181	0,71	0,009621001
BMEII0551	Transporter, DME family	640	525	1,22	0,042164854
BMEII0552	Hypothetical protein	2990	3231	0,93	0,266044196
BMEII0553	Alcohol dehydrogenase	151	170	0,89	0,174860225
BMEII0554	Glutaminé synthetase	165	374	0,44	0,017433495
BMEII0555	Hypothetical cytosolic protein	239	415	0,58	0,012577969
BMEII0556	Transcriptional regulator, RpiR family	323	347	0,93	0,281261742
BMEII0557	Rhodocoxin reductase	1355	960	1,41	0,012336964
BMEII0558	Rhodocoxin reductase	5739	2823	2,03	0,000630994
BMEII0559	Aminomethyltransferase	1798	991	1,81	0,000233946
BMEII0560	Glycine cleavage system H protein	2262	1339	1,69	5,35E-07
BMEII0561	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	1971	1067	1,85	9,14E-08
BMEII0562	Hypothetical protein	199	181	1,1	0,662784369
BMEII0563	Proline dehydrogenase transcriptional activator	329	492	0,67	0,256082931
BMEII0564	Proline dehydrogenase / delta-1- pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	178	223	0,8	0,057360715
BMEII0565	Iron(III)-binding periplasmic protein precursor	305	474	0,64	0,000123443
BMEII0566	Iron(III)-transport system permease protein SfuB	186	291	0,64	0,029379804
BMEII0567	Iron(III)-transport ATP-binding protein SfuC	259	312	0,83	0,019228929
BMEII0568	Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase	296	370	0,8	0,269649147
BMEII0569	IolB protein	621	442	1,4	0,017241286
BMEII0570	IolE protein	905	944	0,96	0,569514692

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0571	IolD protein	403	476	0,85	0,026606341
BMEII0572	5-dehydro-2-deoxygluconokinase	149	259	0,58	0,013595099
BMEII0573	Transcriptional regulator, RpiR family	152	172	0,89	0,075408045
BMEII0574	Myo-inositol 2-dehydrogenase	130	221	0,59	0,004822982
BMEII0575	Hypothetical protein	111	109	1,02	0,878342948
BMEII0576	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	154	172	0,89	0,39282982
BMEII0577	Alkyl hydroperoxide reductase C22 protein	33061	19433	1,7	0,000346698
BMEII0578	AhpD	5755	3090	1,86	0,000124826
BMEII0579	Transporter, MFS superfamily	497	614	0,81	0,000206798
BMEII0580	Probable blue-copper protein YacK precursor	247	377	0,66	0,064173957
BMEII0581	Superoxide dismutase (cu-zn)	49749	57909	0,86	2,46E-05
BMEII0582	Sarcosine oxidase beta subunit	598	601	1	0,89464063
BMEII0583	Iron(III)-transport ATP-binding protein SfuC	136	143	0,96	0,665289665
BMEII0584	Iron(III)-binding periplasmic protein precursor	1523	1784	0,85	0,424667407
BMEII0585	Iron(III)-transport system permease protein SfuB	588	645	0,91	0,857937986
BMEII0586	Hypothetical protein	1221	1222	1	0,817161579
BMEII0587	Sulfide dehydrogenase (flavocytochrome c)	3353	3781	0,89	0,010403128
BMEII0588	FdhD protein	1253	1112	1,13	0,023564755
BMEII0589	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	19951	13174	1,51	0,003916827
BMEII0590	Sugar-binding protein	1370	5867	0,23	1,82E-05
BMEII0591	Sugar transport system permease protein	383	1426	0,27	2,14E-07
BMEII0592	Sugar transport system permease protein	688	2025	0,34	1,96E-06
BMEII0593	Glucose ABC transporter ATPase	261	537	0,49	2,69E-05
BMEII0594	Hypothetical protein	8524	9130	0,93	0,382067477
BMEII0595	Hypothetical protein	345	881	0,39	0,020210962
BMEII0596	Methylenomycin A resistance protein	357	439	0,81	0,190479232
BMEII0597	23s ribosomal RNA methyltransferase	955	965	0,99	0,687012251
BMEII0598	Exopolyphosphatase	790	760	1,04	0,92921234
BMEII0599	Cystine transport ATP-binding protein	922	1367	0,67	4,27E-06
BMEII0600	Cystine transport system permease protein	2580	4065	0,63	7,47E-08
BMEII0601	Cystine-binding periplasmic protein precursor	1881	2353	0,8	0,000163714
BMEII0602	N-methylhydantoinase (ATP-hydrolyzing) / 5-oxoprolinase (ec 3.5.2.9)	270	354	0,76	0,010845264
BMEII0603	Hypothetical protein	678	612	1,11	0,25217303
BMEII0604	Iron(III) dicitrate transport ATP-binding protein FecE	170	175	0,97	0,800995591
BMEII0605	Ferric anguibactin transport system permease protein FatC	181	171	1,05	0,473934966
BMEII0606	Ferric anguibactin transport system permease protein FatD	598	578	1,03	0,895150135
BMEII0607	Ferric anguibactin-binding protein	4189	4163	1,01	0,846137564
BMEII0608	Aldehyde dehydrogenase	1454	1005	1,45	1,45E-05
BMEII0609	Hypothetical protein	4837	3182	1,52	1,86E-05
BMEII0610	Fumarate/succinate/L-aspartate dehydrogenases	174	192	0,91	0,278598328
BMEII0611	Integral membrane protein	765	995	0,77	0,423954126
BMEII0612	Branched-chain amino acid aminotransferase	2271	1871	1,21	0,001764801
BMEII0613	Branched-chain amino acid aminotransferase	2978	2243	1,33	0,024693948
BMEII0614	Transporter, DME family	1559	829	1,88	0,001357512
BMEII0615	Hypothetical protein	110	154	0,72	0,16138389
BMEII0616	Hypothetical membrane spanning protein	6627	2922	2,27	0,001850438
BMEII0617	Xanthine/uracil permease	3463	3391	1,02	0,998777974
BMEII0618	Xanthine/uracil permease	1209	1249	0,97	0,674007214
BMEII0619	Deoxycytidylate deaminase	771	920	0,84	0,172117433
BMEII0620	Sulfur deprivation response regulator	574	648	0,89	0,05205686
BMEII0621	Sn-glycerol-3-phosphate transport ATP-binding protein ugpc	171	181	0,95	0,576889074
BMEII0622	Sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein ugpe	114	213	0,54	0,075607198

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0623	Sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein ugpe	102	172	0,59	0,05551513
BMEII0624	Sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein ugpa	138	198	0,7	0,080709859
BMEII0625	Glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein precursor	921	1290	0,71	0,000963717
BMEII0626	Membrane dipeptidase	1783	1544	1,15	0,019072766
BMEII0627	Probable adenine deaminase	140	180	0,78	0,053677555
BMEII0628	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livf	120	113	1,07	0,404679401
BMEII0629	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livg	112	126	0,89	0,042075776
BMEII0630	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livg	276	356	0,78	0,017722025
BMEII0631	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livm	348	499	0,7	0,015184517
BMEII0632	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livh	275	349	0,79	0,039175455
BMEII0633	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein precursor	382	457	0,83	0,17440792
BMEII0634	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	104	99	1,06	0,251953559
BMEII0635	Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain	104	133	0,78	0,014601741
BMEII0636	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain	150	171	0,88	0,005933755
BMEII0637	4-carboxymuconolactone decarboxylase	434	515	0,84	0,431349115
BMEII0638	3-oxoadipate enol-lactonase	683	764	0,89	0,676645502
BMEII0639	Transcriptional regulatory protein, LysR family	1493	1287	1,16	0,031468671
BMEII0640	P-hydroxybenzoate hydroxylase	220	258	0,85	0,169183522
BMEII0641	Transcriptional regulator, AraC family	293	470	0,62	0,469788938
BMEII0642	Pca regulon regulatory protein	136	174	0,78	0,0186041
BMEII0643	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A	107	133	0,8	0,012918267
BMEII0644	3-oxoadipate CoA-transferase subunit A	130	166	0,78	0,293076711
BMEII0645	3-oxoadipate CoA-transferase subunit B	85	113	0,75	0,103210172
BMEII0646	Acetyl-CoA acetyltransferase	271	255	1,06	0,386264009
BMEII0647	Hypothetical protein	177	228	0,77	0,035174941
BMEII0648	Transcriptional regulator, AraC family	677	443	1,53	1,16E-06
BMEII0649	Hypothetical protein	647	483	1,34	0,009204727
BMEII0650	DNA polymerase III, epsilon chain	1545	1889	0,82	0,121743984
BMEII0651	Hypothetical protein	2779	3748	0,74	0,000433483
BMEII0652	Hypothetical protein	1044	1343	0,78	0,005230928
BMEII0653	Endonuclease V	310	342	0,91	0,397249167
BMEII0654	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 1 (ggdef)	711	624	1,14	0,25643298
BMEII0655	Alkaline phosphatase	386	423	0,91	0,030236263
BMEII0656	DNA polymerase IV	787	721	1,09	0,213246473
BMEII0657	Regulator of nucleoside diphosphate kinase	183	199	0,92	0,122988429
BMEII0658	Hypothetical protein	414	441	0,94	0,595545903
BMEII0659	Two component response regulator	1560	1301	1,2	0,026747554
BMEII0660	Response regulator protein	568	562	1,01	0,834689786
BMEII0661	Lsu ribosomal protein L33P	1491	1416	1,05	0,590707186
BMEII0662	Transporter, MFS superfamily	232	205	1,13	0,243146999
BMEII0663	Phosphohydrolase (mutt/nudix family protein)	152	209	0,73	0,109594167
BMEII0664	Zinc-finger protein	1862	1770	1,05	0,631213089
BMEII0665	Ribonuclease R	327	293	1,12	0,336166687
BMEII0666	DNA topoisomerase I	1150	1220	0,94	0,303088827
BMEII0667	SMF protein	247	212	1,16	0,010758402
BMEII0668	Putative integral membrane protein	2821	2408	1,17	0,006047096
BMEII0669	Dihydroorotase	1242	818	1,52	7,36E-05
BMEII0670	Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain	615	424	1,45	0,000689592
BMEII0671	Acyl-CoA dehydrogenase	403	341	1,18	0,197942316
BMEII0672	DNA integration/recombination/inversion protein	448	511	0,88	0,163443542
BMEII0673	Metal dependent hydrolase	1032	1093	0,94	0,073700256
BMEII0674	Glutamyl-tRNA(gln) amidotransferase subunit C	3293	3006	1,1	0,00307779

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0675	Glutamyl-tRNA(gln) amidotransferase subunit A	1985	1907	1,04	0,471883559
BMEII0676	DNA gyrase subunit B	2624	2478	1,06	0,457704943
BMEII0677	Transporter, DME family	209	219	0,95	0,849763593
BMEII0678	Lipoate-protein ligase B	679	603	1,13	0,182778915
BMEII0679	Sensory transduction histidine kinase	1435	1251	1,15	0,098985104
BMEII0680	Hypothetical protein	696	446	1,56	1,83E-05
BMEII0681	Virulence protein	11152	5346	2,09	2,77E-10
BMEII0682	Oxacillin resistance-associated protein FmtC	4315	1926	2,24	5,70E-11
BMEII0683	Cytochrome c-type biogenesis protein CcdA	7040	8237	0,85	0,000614103
BMEII0684	Glucosaminé-1-phosphate acetyltransferase / UDP-N-acetylglucosaminé pyrophosphorylase	2140	2070	1,03	0,503886771
BMEII0685	Glucosaminé-fructose-6-phosphate aminotransferase (isomerizing)	947	728	1,3	0,040910866
BMEII0686	ATP-dependent DNA helicase RecG	312	288	1,08	0,673652105
BMEII0687	Hypothetical cytosolic protein	1713	1517	1,13	0,07297629
BMEII0688	Transcription-repair coupling factor	421	322	1,31	0,001696033
BMEII0689	Fosfomycin resistance protein	1764	2066	0,85	0,216058069
BMEII0690	FrnE	883	592	1,49	0,018196709
BMEII0691	Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor	12147	8798	1,38	0,001881698
BMEII0692	Hypothetical membrane associated protein	8346	6397	1,3	9,21E-06
BMEII0693	Hypothetical cytosolic protein	369	477	0,77	0,136727739
BMEII0694	2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase	540	480	1,13	0,051017529
BMEII0695	Phosphatidylcholine synthase	1889	1916	0,99	0,797518215
BMEII0696	Quinone oxidoreductase	1667	1468	1,14	0,033122389
BMEII0697	Quinone oxidoreductase	2219	1742	1,27	8,83E-05
BMEII0698	Sugar transport ATP-binding protein	718	539	1,33	0,009615963
BMEII0699	Galactoside transport system permease protein MglC	573	616	0,93	0,369499857
BMEII0700	Galactoside transport system permease protein MglC	682	847	0,81	0,167044213
BMEII0701	Ribose transport system permease protein RbsC	597	805	0,74	0,206701407
BMEII0702	ABC transporter periplasmic binding protein	6864	6906	0,99	0,864471656
BMEII0703	Fe-S oxidoreductase	2324	2638	0,88	0,322327264
BMEII0704	Bacterioferritin	13770	14464	0,95	0,455279687
BMEII0705	Hypothetical protein	772	654	1,18	0,222528804
BMEII0706	Hypothetical cytosolic protein	4537	4400	1,03	0,602243188
BMEII0707	Rrf2 family protein	8486	8305	1,02	0,736334569
BMEII0708	EbsC protein	1301	1173	1,11	0,144591034
BMEII0709	Hypothetical protein	255	202	1,26	0,237490206
BMEII0710	Transposase	476	328	1,45	0,01120375
BMEII0711	Transposase	65	63	1,02	0,474261684
BMEII0712	Transcriptional regulator	205	217	0,95	0,903728946
BMEII0713	Transposase	403	395	1,02	0,923529113
BMEII0714	Transposase	221	276	0,8	0,266817353
BMEII0715	Preprotein translocase subunit-like protein	201	226	0,89	0,375457798
BMEII0716	Transposase	5093	5407	0,94	0,955162935
BMEII0717	Hemagglutinin	1005	965	1,04	0,4287702
BMEII0718	Transposase	1274	1390	0,92	0,567242538
BMEII0719	Transposase	2429	2300	1,06	0,674614823
BMEII0720	Transcriptional regulator	638	435	1,47	0,019489621
BMEII0721	Transcriptional regulator, arac family	825	962	0,86	0,367097199
BMEII0722	Hypothetical protein	3481	4800	0,73	0,00035254
BMEII0723	Hypothetical protein	352	391	0,9	0,484830561
BMEII0724	Endoglucanase H	133	185	0,72	0,068381353
BMEII0725	Hypothetical protein	276	457	0,6	0,335872949

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0726	Hypothetical protein	174	322	0,54	0,169028867
BMEII0727	Udp-glucose 6-dehydrogenase	98	106	0,92	0,423691258
BMEII0728	Cellulose synthase catalytic subunit (UDP-forming)	113	205	0,55	0,098690481
BMEII0729	Cellulose synthase catalytic subunit (UDP-forming)	318	680	0,47	0,122027663
BMEII0730	UDP-glucose 4-epimerase	124	207	0,6	0,081841259
BMEII0731	DTDP-glucose 4-6-dehydratase	109	124	0,88	0,497835855
BMEII0732	Hypothetical protein	165	210	0,78	0,486563969
BMEII0733	Hypothetical protein	1227	1178	1,04	0,747572148
BMEII0734	Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor	11747	24591	0,48	1,85E-06
BMEII0735	Periplasmic oligopeptide-binding protein precursor	5295	11636	0,46	2,26E-08
BMEII0736	Oligopeptide transport system permease protein OppB	8931	19171	0,47	1,61E-06
BMEII0737	Oligopeptide transport system permease protein OppC	5710	11875	0,48	6,06E-05
BMEII0738	Oligopeptide transport ATP-binding protein OppD	1241	1963	0,63	0,009373931
BMEII0739	Alkylated DNA repair protein AlkB	766	1118	0,69	0,000197426
BMEII0740	Transporter, MFS superfamily	247	296	0,84	0,355471414
BMEII0741	D-aminopeptidase	265	276	0,96	0,423971793
BMEII0742	Cell division protein FtsK	4130	3258	1,27	0,024701561
BMEII0743	Surfeit locus protein 1	695	653	1,06	0,616145312
BMEII0744	Dihydrolipoamide dehydrogenase	137	159	0,86	0,018403186
BMEII0745	Dihydrolipoamide dehydrogenase	605	819	0,74	0,010882554
BMEII0746	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	1310	2297	0,57	0,000818317
BMEII0747	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit	924	1616	0,57	0,00368057
BMEII0748	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	1898	4387	0,43	8,36E-06
BMEII0749	Hypothetical protein	80	138	0,58	0,03768576
BMEII0750	Maltose/maltodextrin transport ATP-binding protein malk	489	1018	0,48	3,34E-08
BMEII0751	Oxidoreductase	790	1378	0,57	2,72E-06
BMEII0752	Maltose transport system permease protein MalG	955	1605	0,6	5,07E-06
BMEII0753	Sorbitol/mannitol transport inner membrane protein	922	1768	0,52	0,000428346
BMEII0754	Sugar-binding protein	1451	3591	0,4	7,30E-07
BMEII0755	Sugar-binding protein	3819	6267	0,61	1,60E-05
BMEII0756	N-acetylglucosaminé kinase	1072	1065	1,01	0,720564575
BMEII0757	Transcriptional regulator, gntr family	349	362	0,96	0,843438794
BMEII0758	Protein YbgT	518	578	0,9	0,105273664
BMEII0759	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	1118	1094	1,02	0,992251926
BMEII0760	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	3243	4015	0,81	0,057775913
BMEII0761	Transport ATP-binding protein CydC	157	173	0,91	0,082081437
BMEII0762	Transport ATP-binding protein CydD	161	154	1,05	0,493672989
BMEII0763	Transcriptional regulator, ArsR family	419	417	1	0,986053369
BMEII0764	Hypothetical protein	332	345	0,96	0,601126919
BMEII0765	Potassium efflux system protein PhaG	196	188	1,04	0,607666432
BMEII0766	Ph adaptation potassium efflux system protein F	1213	1147	1,06	0,440500793
BMEII0767	Potassium efflux system protein PhaE	952	891	1,07	0,527601181
BMEII0768	Potassium efflux system protein PhaD	1537	1672	0,92	0,201711676
BMEII0769	Potassium efflux system protein PhaC	1865	1814	1,03	0,90687213
BMEII0770	Potassium efflux system protein PhaA / potassium efflux system protein PhaB	2393	2136	1,12	0,599476415
BMEII0771	Hydroxyacylglutathione hydrolase	1653	1187	1,39	1,30E-05
BMEII0772	Hypothetical cytosolic protein	1483	788	1,88	0,001979294
BMEII0773	Molybdopterine biosynthesis MOG protein	1103	1235	0,89	0,097932287
BMEII0774	Hypothetical protein	2050	2161	0,95	0,834321789
BMEII0775	Biotin synthase	1039	1320	0,79	0,07322757
BMEII0776	8-amino-7-oxononanoate synthase	209	185	1,13	0,423362337

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0777	Dethiobiotin synthetase	139	106	1,31	0,035232369
BMEII0778	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	431	370	1,16	0,292482464
BMEII0779	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	152	121	1,25	0,03577318
BMEII0780	Hypothetical protein	1168	936	1,25	0,018784431
BMEII0781	Homoserine o-succinyltransferase	415	519	0,8	0,268378737
BMEII0782	Lysozyme m1 precursor	201	122	1,64	1,49E-05
BMEII0783	Na(+)-linked d-alanine glycine permease	15974	23397	0,68	0,053296184
BMEII0784	Putative hydroxylase	2086	2667	0,78	0,042092421
BMEII0785	Transcriptional regulator, MarR family	143	186	0,77	0,28760897
BMEII0786	NADH dehydrogenase	148	219	0,67	0,210200569
BMEII0787	Putative uroporphyrin-III C-methyltransferase	239	241	0,99	0,900400462
BMEII0788	Hypothetical protein	597	545	1,1	0,191101331
BMEII0789	Hypothetical protein	143	148	0,97	0,544008743
BMEII0790	Hypothetical protein	78	99	0,79	0,345928923
BMEII0791	Two component response regulator	335	301	1,11	0,288218247
BMEII0792	Sensory transduction histidine kinase	411	408	1,01	0,920136711
BMEII0793	Multidrug resistance efflux pump	268	238	1,12	0,066327019
BMEII0794	Multidrug resistance protein B	113	125	0,9	0,257287885
BMEII0795	Multidrug resistance protein B	462	1129	0,41	0,045130658
BMEII0796	Transcriptional regulator, MarR family	369	457	0,81	0,02406462
BMEII0797	ABC transporter substrate-binding protein	245	357	0,69	0,000128699
BMEII0798	Nitrate transport ATP-binding protein NrtC	216	297	0,73	0,002468589
BMEII0799	Nitrate transport permease protein NrtB	420	378	1,11	0,045385464
BMEII0800	Transcriptional regulator	574	586	0,98	0,990309245
BMEII0801	Daunorubicin resistance transmembrane protein	155	171	0,91	0,281723946
BMEII0802	Daunorubicin resistance ATP-binding protein DrrA	176	176	1	0,985322
BMEII0803	Multidrug resistance protein A	161	188	0,86	0,145358513
BMEII0804	Transcriptional regulator, TetR family	131	125	1,04	0,467190945
BMEII0805	Hypothetical protein	174	255	0,68	0,001026035
BMEII0806	Putative transmembrane protein	2234	2350	0,95	0,204858632
BMEII0807	Transcriptional regulator, GntR family	577	516	1,12	0,076576787
BMEII0808	Gene II and X proteins	503	425	1,18	0,022856405
BMEII0809	Hypothetical membrane spanning protein	524	939	0,56	0,0806409
BMEII0810	Transcriptional regulator, arsr family	286	410	0,7	0,184613443
BMEII0811	Hypothetical membrane spanning protein	720	974	0,74	0,135228717
BMEII0812	Polypeptide deformylase	917	997	0,92	0,397763209
BMEII0813	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	961	919	1,05	0,2538231
BMEII0814	Transcriptional regulator, AraC family	171	195	0,87	0,769787218
BMEII0815	Acetyl-coenzyme A synthetase	133	279	0,48	6,17E-07
BMEII0816	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase	107	178	0,6	0,00317773
BMEII0817	Acetyl-CoA acetyltransferase	265	539	0,49	8,79E-06
BMEII0818	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	130	134	0,97	0,952354525
BMEII0819	Transcriptional regulator	1066	1228	0,87	0,005805006
BMEII0820	Als operon regulatory protein	203	254	0,8	0,031593023
BMEII0821	Multidrug resistance protein	163	227	0,72	0,0446594
BMEII0822	Multidrug resistance protein	93	120	0,77	0,143718862
BMEII0823	Glycerol kinase	470	920	0,51	0,15485181
BMEII0824	Glycerol kinase	128	190	0,67	0,034033584
BMEII0825	Uracil permease	959	864	1,11	0,25437042
BMEII0826	Hypothetical cytosolic protein	203	247	0,82	0,301260153
BMEII0827	Glucose-1-phosphate cytidylyltransferase	177	462	0,38	0,077646479
BMEII0828	Possible s-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	276	456	0,61	0,099219675

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0829	Possible s-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	89	254	0,35	0,034932091
BMEII0830	DTDP-4-dehydrothiamine 3,5-epimerase / DTDP-4-dehydrothiamine reductase	90	115	0,78	0,02467506
BMEII0831	Hypothetical protein	149	386	0,39	0,02744011
BMEII0832	UDP-glucose 4-epimerase	133	243	0,55	0,038888993
BMEII0833	Hypothetical protein	149	278	0,54	0,027173166
BMEII0834	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	97	136	0,71	0,101846415
BMEII0835	Glycosyl transferase	99	138	0,72	0,002659606
BMEII0836	DTDP-4-dehydrothiamine 3,5-epimerase	118	168	0,7	0,065668227
BMEII0837	Glycosyl transferase	129	238	0,54	0,005156713
BMEII0838	Succinoglycan biosynthesis transport protein exoT	164	499	0,33	0,031095814
BMEII0839	Putative undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase	106	152	0,7	0,082708423
BMEII0840	Glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis	139	176	0,79	0,072421139
BMEII0841	Hypothetical protein	117	158	0,74	0,077415104
BMEII0842	Hypothetical protein	245	328	0,75	0,135597256
BMEII0843	Putative colanic acid biosynthesis acetyltransferase wcaf	286	273	1,05	0,674360346
BMEII0844	31 kda outer-membrane immunogenic protein precursor	51134	59741	0,86	0,012988097
BMEII0845	Lipopolysaccharide n-acetylglucosaminyltransferase	185	282	0,65	0,005500973
BMEII0846	Glycosyl transferase	91	133	0,69	0,008691216
BMEII0847	Glycosyl transferase	82	159	0,52	0,027368097
BMEII0848	Gdp-mannose 4,6-dehydratase	128	316	0,4	0,02636175
BMEII0849	Gdp-4-dehydro-d-rhamnose reductase	135	197	0,69	0,071135281
BMEII0850	Gdp-fucose synthetase	154	273	0,56	0,020031589
BMEII0851	Exopolysaccharide production protein exof precursor	173	238	0,73	0,020066587
BMEII0852	Succinoglycan biosynthesis transport protein ExoP	110	295	0,37	0,0258999
BMEII0853	Two component response regulator	142	519	0,27	0,022860858
BMEII0854	Transcription regulator, CRP family	381	855	0,45	0,004453932
BMEII0855	Hypothetical protein	243	597	0,41	1,80E-05
BMEII0856	Hypothetical protein	608	2291	0,27	1,07E-06
BMEII0857	N-acetylmannosaminé-6-phosphate 2-epimerase / N-acetylmannosaminé kinase	246	702	0,35	5,51E-06
BMEII0858	Transcriptional regulator, gntR family	833	1557	0,54	2,11E-06
BMEII0859	Oligopeptide-binding protein appa precursor	1240	2643	0,47	2,57E-06
BMEII0860	Oligopeptide transport system permease protein AppB	445	669	0,66	0,002084887
BMEII0861	Oligopeptide transport system permease protein AppC	922	1418	0,65	0,002299387
BMEII0862	Dihydrodipicolinate synthase	1417	2222	0,64	0,000193971
BMEII0863	Oligopeptide transport ATP-binding protein AppD	595	722	0,82	0,161527988
BMEII0864	Oligopeptide transport ATP-binding protein AppF	831	1175	0,71	0,005362891
BMEII0865	1-carboxy-3-chloro-3,4-dihydroxycyclo hexa-1,5-diene dehydrogenase	216	442	0,49	0,00013768
BMEII0866	Oxidoreductase	593	1294	0,46	0,002726987
BMEII0867	Alcohol dehydrogenase	227	212	1,07	0,11145085
BMEII0868	Leucine-specific binding protein precursor	415	441	0,94	0,702831808
BMEII0869	Succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+)	269	254	1,06	0,296809383
BMEII0870	Alcohol dehydrogenase (acceptor)	217	327	0,66	0,204475373
BMEII0871	Shikimate 5-dehydrogenase	218	213	1,02	0,635089301
BMEII0872	Short chain dehydrogenase	280	305	0,92	0,288151805
BMEII0873	High-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livf	469	754	0,62	0,047497631
BMEII0874	High-affinity branched-chain amino acid transport system permease protein livh / high-affinity branched-chain amino acid transport ATP-binding protein livg	439	806	0,55	0,018876674
BMEII0875	Leucine-specific binding protein precursor	162	285	0,57	0,001569916
BMEII0876	Quinone oxidoreductase	149	187	0,79	0,006537058
BMEII0877	Hypothetical protein	200	638	0,31	0,017996711
BMEII0878	Transcriptional regulator, gntR family	286	428	0,67	0,08369781
BMEII0879	Putative cytochrome p450 YjIB	170	315	0,54	0,124055351

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0880	Acetate kinase	297	319	0,93	0,577071197
BMEII0881	Transketolase	1850	2028	0,91	0,046079212
BMEII0882	Nitrogen fixation protein VnfA	1388	1028	1,35	0,000940355
BMEII0883	High-affinity iron permease	1968	1400	1,41	0,00034623
BMEII0884	Hypothetical protein	12605	10824	1,16	0,048863153
BMEII0885	19 kda periplasmic protein	25588	22733	1,13	0,032907234
BMEII0886	Hypothetical protein	148	226	0,65	0,034919898
BMEII0887	Gmp synthase (glutaminé-hydrolyzing)	1427	1173	1,22	0,000260395
BMEII0888	5'-methylthioadenosine nucleosidase / s-adenosylhomocysteine nucleosidase	1309	1120	1,17	0,00010245
BMEII0889	Phenylacetic acid degradation protein Paal	683	568	1,2	1,71E-06
BMEII0890	16s ribosomal RNA m(5)c 967 methyltransferase	342	224	1,53	1,90E-06
BMEII0891	Disulfide bond formation protein B	15377	16058	0,96	0,473011982
BMEII0892	Hypothetical protein	2279	2350	0,97	0,777033568
BMEII0893	Catalase	26348	23709	1,11	0,089601621
BMEII0894	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	1471	1343	1,1	0,236773073
BMEII0895	Hypothetical protein	461	455	1,02	0,80096668
BMEII0896	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	3982	2684	1,48	5,47E-06
BMEII0897	Chloride channel protein	735	518	1,42	1,40E-06
BMEII0898	Endo-type 6-aminohexanoate oligomer hydrolase	588	463	1,27	0,004610268
BMEII0899	Phosphomannomutase	931	808	1,15	0,006175386
BMEII0900	Mannose-6-phosphate isomerase / mannose-1-phosphate guanylyl transferase (gdp)	611	522	1,17	0,215848704
BMEII0901	Transcriptional regulatory protein, lysr family	636	657	0,97	0,801497841
BMEII0902	Transcriptional regulatory protein, lysr family	2289	2493	0,92	0,88594968
BMEII0903	Hypothetical protein	261	228	1,15	0,039327158
BMEII0904	Rtn protein	2280	2048	1,11	0,234900682
BMEII0905	Hypothetical protein	6228	9834	0,63	6,83E-06
BMEII0906	Protein hdea precursor	3479	5883	0,59	9,57E-06
BMEII0907	Glutaminase	2470	3922	0,63	0,00048422
BMEII0908	Glutaminase	4283	5935	0,72	0,000348029
BMEII0909	Glutamate/gamma-aminobutyrate antiporter	14941	19577	0,76	0,003455987
BMEII0910	Glutamate decarboxylase beta	13217	10563	1,25	0,003805552
BMEII0911	Glutamate decarboxylase alpha	7814	8656	0,9	0,624723917
BMEII0912	Hypothetical protein	173	452	0,38	0,079467979
BMEII0913	Hypothetical protein	562	994	0,57	0,055056465
BMEII0914	Acriflavin resistance protein A precursor	350	416	0,84	0,220566123
BMEII0915	Acriflavin resistance protein F	166	158	1,05	0,310365282
BMEII0916	Acriflavin resistance protein D	189	184	1,03	0,413411702
BMEII0917	Hypothetical protein	267	281	0,95	0,790169304
BMEII0918	Hypothetical protein	1437	1505	0,95	0,892393262
BMEII0919	Hypothetical protein	117	102	1,14	0,066639484
BMEII0920	Spermidine/putrescine transport system permease protein potc	506	579	0,87	0,091143822
BMEII0921	Spermidine/putrescine transport system permease protein potb	225	432	0,52	0,000556239
BMEII0922	Spermidine/putrescine transport ATP-binding protein pota	157	260	0,6	0,000201122
BMEII0923	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	704	1419	0,5	0,001219585
BMEII0924	Hypothetical protein	155	176	0,88	0,020893012
BMEII0925	Cell division inhibitor mine	5087	4294	1,18	0,011320598
BMEII0926	Cell division inhibitor mind	4971	4115	1,21	0,016793821
BMEII0927	Cell division inhibitor minc	2566	1623	1,58	0,000373363
BMEII0928	Hypothetical protein	178	167	1,07	0,686158911
BMEII0929	Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	3901	5650	0,69	0,002134816
BMEII0930	Ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain	6834	12447	0,55	0,000535656
BMEII0931	Nrdi protein	3244	5822	0,56	0,001539001

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0932	Glutaredoxin	2151	3835	0,56	6,80E-05
BMEII0933	Hypothetical protein	119	178	0,67	0,034636416
BMEII0934	Nickel resistance protein	91	101	0,9	0,247877297
BMEII0935	Nickel resistance protein	167	286	0,58	0,195585251
BMEII0936	Hypothetical protein	309	408	0,76	0,239528023
BMEII0937	Hypothetical protein	118	140	0,84	0,029558738
BMEII0938	Myo-inositol 2-dehydrogenase	344	249	1,38	0,003422732
BMEII0939	Thua	1432	1265	1,13	0,231318435
BMEII0940	Maltose/maltodextrin transport ATP-binding protein malk	453	310	1,46	0,00034642
BMEII0941	Maltose/maltodextrin transport ATP-binding protein malk	89	103	0,87	0,134225569
BMEII0942	Maltose transport system permease protein MalG	250	774	0,32	0,073071082
BMEII0943	Maltose transport system permease protein MalF	114	188	0,61	0,050470102
BMEII0944	Maltose transport system permease protein MalF	94	130	0,72	0,006977993
BMEII0945	Maltose-binding periplasmic protein	310	341	0,91	0,036292699
BMEII0946	Laci-family transcription regulator	394	380	1,04	0,291394708
BMEII0947	Transcription regulator, CRP family	986	1107	0,89	0,220002169
BMEII0948	Nitrite extrusion protein	4556	3857	1,18	0,654175326
BMEII0949	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	1491	1686	0,88	0,494320339
BMEII0950	Nitrate reductase alpha chain	2107	2092	1,01	0,765506022
BMEII0951	Nitrate reductase beta chain	4875	5189	0,94	0,570667055
BMEII0952	Nitrate reductase delta chain	2339	2025	1,16	0,186013929
BMEII0953	Respiratory nitrate reductase 2 gamma chain	3851	3300	1,17	0,0624453
BMEII0954	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	129	120	1,08	0,206505709
BMEII0955	Hypothetical protein	71	93	0,76	0,027196162
BMEII0956	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase	111	157	0,71	0,047717979
BMEII0957	VdcC protein	198	315	0,63	0,032315509
BMEII0958	Sterol binding protein	900	654	1,38	0,162866946
BMEII0959	Protease	211	177	1,19	0,263478712
BMEII0960	Protease	157	152	1,03	0,890128708
BMEII0961	Taurine transport ATP-binding protein TauB	177	260	0,68	2,87E-07
BMEII0962	Taurine transport permease protein TauC	148	263	0,56	0,000118776
BMEII0963	Taurine-binding periplasmic protein precursor	255	352	0,72	5,60E-05
BMEII0964	Asparagine synthetase B (glutaminé-hydrolyzing)	147	152	0,97	0,65769963
BMEII0965	Pseudoazurin	172	258	0,67	0,049772551
BMEII0966	Transcription regulator, CRP family	602	924	0,65	0,074921568
BMEII0967	NosX	96	108	0,89	0,023690947
BMEII0968	NosX	96	112	0,86	0,1012945
BMEII0969	Outer-membrane lipoprotein NosL	134	171	0,78	0,110595167
BMEII0970	Membrane protein NosY precursor	104	121	0,86	0,096999365
BMEII0971	Copper transport ATP-binding protein NosF	104	135	0,77	0,019608131
BMEII0972	Copper-binding periplasmic protein precursor	114	132	0,87	0,097355363
BMEII0973	Nitrous-oxide reductase	134	183	0,73	0,094091833
BMEII0974	Nitrous-oxide reductase	93	112	0,83	0,060894039
BMEII0975	Regulatory protein nosr	110	294	0,37	0,033738543
BMEII0976	ABC transporter ATP-binding protein	304	543	0,56	0,000463623
BMEII0977	Hypothetical protein	337	340	0,99	0,991121149
BMEII0978	Hypothetical protein	509	579	0,88	0,109414031
BMEII0979	D-ribulokinase	658	987	0,67	0,004165931
BMEII0980	Ribitol 2-dehydrogenase	177	188	0,94	0,298145788
BMEII0981	Xylose transport system permease protein XylH	372	804	0,46	0,039593408
BMEII0982	Galactoside transport ATP-binding protein MglA	259	393	0,66	0,079698298
BMEII0983	D-galactose-binding periplasmic protein precursor	394	675	0,58	6,32E-05

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII0984	Hypothetical protein	341	554	0,62	4,58E-05
BMEII0985	Ribitol operon repressor	445	750	0,59	0,031530463
BMEII0986	Transcription regulator, CRP family	289	212	1,36	0,031448125
BMEII0987	NirV precursor	82	101	0,82	0,110538739
BMEII0988	Copper-containing nitrite reductase precursor	714	560	1,27	0,618432552
BMEII0989	Hypothetical protein	201	190	1,06	0,499461859
BMEII0990	Farnesyl cysteine carboxyl-methyltransferase	2124	2254	0,94	0,702361379
BMEII0991	Hypothetical membrane spanning protein	1017	1201	0,85	0,370079623
BMEII0992	Mrp protein homolog A	384	609	0,63	2,31E-05
BMEII0993	Hypothetical protein	485	736	0,66	1,32E-05
BMEII0994	Hypothetical protein	104	159	0,65	0,012771976
BMEII0995	Hypothetical protein	171	329	0,52	0,028421072
BMEII0996	NorD protein	96	91	1,06	0,611591019
BMEII0997	NorQ protein	167	304	0,55	0,028469411
BMEII0998	Nitric-oxide reductase subunit B	288	691	0,42	0,010882102
BMEII0999	Nitric-oxide reductase cytochrome c chain	119	202	0,59	0,01894243
BMEII1000	NorF	94	135	0,69	0,120360252
BMEII1001	Nore protein	86	363	0,24	0,022005015
BMEII1002	Calcium or iron-binding protein	225	499	0,45	0,047277717
BMEII1003	Putative o-antigen transporter	253	302	0,84	0,3464757
BMEII1004	Hypothetical protein	133	123	1,08	0,646721135
BMEII1005	Malate dehydrogenase	182	207	0,88	0,066985432
BMEII1006	Dihydrodipicolinate synthase	148	191	0,78	8,20E-06
BMEII1007	Transcriptional regulator, gntr family	541	897	0,6	0,017006497
BMEII1008	Integral membrane protein	450	357	1,26	0,03291582
BMEII1009	C-di-gmp phosphodiesterase A	2056	2426	0,85	0,594204332
BMEII1010	Thiaminé biosynthesis lipoprotein apbe precursor	208	219	0,95	0,272096132
BMEII1011	Sulfite reductase (NADPH) flavoprotein alpha-component	334	305	1,1	0,452420195
BMEII1012	Hypothetical protein	552	445	1,24	0,061028178
BMEII1013	Hypothetical cytosolic protein	1847	884	2,09	1,69E-05
BMEII1014	Two component response regulator	472	308	1,53	8,92E-10
BMEII1015	Two-component system sensor	251	178	1,41	2,54E-06
BMEII1016	Protease I	449	705	0,64	0,024151085
BMEII1017	Mercuric resistance operon regulatory protein	96	124	0,78	0,032800176
BMEII1018	NADH oxidase	128	132	0,97	0,406198682
BMEII1019	Alpha-methylacyl-CoA racemase	598	504	1,19	0,237803495
BMEII1020	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	1110	1073	1,03	0,974095093
BMEII1021	Enoyl-CoA hydratase	1716	1210	1,42	0,003985616
BMEII1022	Transcriptional regulator	1271	1298	0,98	0,669955091
BMEII1023	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	480	548	0,88	0,266469522
BMEII1024	Cis,cis-muconate transport protein	190	284	0,67	0,011136179
BMEII1025	Hypothetical protein	75	106	0,7	0,006267231
BMEII1026	DNA mismatch repair protein MutL	1275	878	1,45	0,025421705
BMEII1027	Hypothetical protein	3854	2764	1,39	0,013105282
BMEII1028	Tetraacyl/disaccharide 4'-kinase	417	310	1,34	0,000831314
BMEII1029	3-deoxy-d-manno-octulosonic-acid transferase	1246	787	1,58	0,000373475
BMEII1030	Putative lipoprotein	1398	790	1,77	0,000251038
BMEII1031	Hypothetical cytosolic protein	18800	12222	1,54	0,00318375
BMEII1032	Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase	13517	7542	1,79	6,36E-05
BMEII1033	Pmba protein	432	321	1,35	0,000359313
BMEII1034	Glutathione-regulated potassium-efflux system protein	3739	2384	1,57	8,02E-07
BMEII1035	Serine protease	483	375	1,29	0,000104796

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpIR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpIR/WT	P value annova
BMEII1036	Zinc protease	413	303	1,36	0,00845099
BMEII1037	Zinc protease	1385	1005	1,38	0,000749241
BMEII1038	Methyltransferase	2623	2533	1,04	0,456975897
BMEII1039	TRNA pseudouridine synthase A	1903	1471	1,29	0,069137277
BMEII1040	Cytosine deaminase	1138	1557	0,73	0,133556299
BMEII1041	Cytochrome B561	3343	4265	0,78	0,01703286
BMEII1042	Hypothetical protein	7287	6501	1,12	0,004103232
BMEII1043	Isoleucyl-tRNA synthetase	1925	1179	1,63	0,000278156
BMEII1044	Riboflavin kinase / fmn adenylyltransferase	604	598	1,01	0,768448212
BMEII1045	Had superfamily protein involved in n-acetyl-glucosaminé catabolism	1125	1158	0,97	0,513267232
BMEII1046	Hypothetical protein	72	96	0,75	0,017411508
BMEII1047	10 kda chaperonin groeS	6105	28782	0,21	1,22E-07
BMEII1048	60 kda chaperonin groEL	6287	22175	0,28	1,50E-06
BMEII1049	Hypothetical protein	66	255	0,26	0,005492257
BMEII1050	Hypothetical protein	517	753	0,69	0,001241421
BMEII1051	Fumarate hydratase C	2625	2862	0,92	0,386715833
BMEII1052	Transporter	5901	5172	1,14	0,194046807
BMEII1053	Glucose/galactose transporter	17926	17378	1,03	0,587953071
BMEII1054	ATP phosphoribosyltransferase	1084	828	1,31	0,015627839
BMEII1055	Histidyl-tRNA synthetase	391	254	1,54	9,43E-06
BMEII1056	Histidyl-tRNA synthetase	980	764	1,28	5,01E-05
BMEII1057	Transporter, lyse family	1209	1133	1,07	0,68241086
BMEII1058	DNA-3-methyladenine glycosylase i	190	399	0,48	0,078804174
BMEII1059	Protein ybis precursor	415	479	0,87	0,076526499
BMEII1060	2,5-diketo-d-gluconic acid reductase	14878	18798	0,79	0,109488484
BMEII1061	(s)-2-hydroxy-acid oxidase subunit GlcF	130	134	0,97	0,605053128
BMEII1062	(s)-2-hydroxy-acid oxidase subunit GlcE	98	119	0,82	0,039048506
BMEII1063	Glycolate oxidase subunit GlcE	143	274	0,52	0,038860777
BMEII1064	(s)-2-hydroxy-acid oxidase chain D	164	213	0,77	0,075360974
BMEII1065	Transcriptional regulatory protein, LysR family	486	390	1,25	0,000339008
BMEII1066	Pyruvate dehydrogenase complex repressor	489	412	1,19	0,129899524
BMEII1067	Hypothetical cytosolic protein	19627	17004	1,15	0,714881137
BMEII1068	Cytochrome C2 precursor	3335	2586	1,29	0,365317466
BMEII1069	Adhesin Aida-I	124	268	0,46	0,076216474
BMEII1070	Adhesin AidA-I	393	603	0,65	0,245254649
BMEII1071	Hypothetical protein	78	101	0,77	0,110808531
BMEII1072	Hypothetical protein	388	1054	0,37	0,12776668
BMEII1073	Cytochrome B561	1774	1820	0,97	0,756207644
BMEII1074	Citrate lyase beta chain	878	654	1,34	6,55E-05
BMEII1075	Hypothetical cytosolic protein	3241	2980	1,09	0,013892043
BMEII1076	Alpha-methylacyl-CoA racemase	2420	2272	1,07	0,452143244
BMEII1077	Transcriptional regulatory protein, LysR family	191	155	1,24	0,010161749
BMEII1078	Hypothetical protein	503	360	1,4	0,000185696
BMEII1079	Hypothetical protein	2675	2866	0,93	0,526267706
BMEII1080	Flagellar biosynthetic protein FliP	599	349	1,72	9,69E-05
BMEII1081	Flagellar protein FliL	380	213	1,78	0,003498862
BMEII1082	Flagellar L-ring protein FlgH	639	330	1,94	3,61E-05
BMEII1083	Hypothetical protein	838	481	1,74	2,75E-05
BMEII1084	Flagellar P-ring protein FlgI	925	418	2,21	4,90E-06
BMEII1085	Flagella basal body P ring formation protein FlgA	2325	985	2,36	1,69E-06
BMEII1086	Flagellar basal-body rod protein FlgG	2704	1167	2,32	3,98E-08
BMEII1087	Flagellar hook-basal body complex protein FlgE	7026	2976	2,36	2,03E-07

ANNEXES

Locus Tag	Protéine	ΔpR moyenne	wt moyenne	Rapport ΔpR/WT	P value annova
BMEII1088	Flagellar basal-body rod protein FlgC	1856	624	2,97	3,67E-11
BMEII1089	Flagellar basal-body rod protein FlgB	6191	2653	2,33	2,16E-06
BMEII1090	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	401	275	1,46	0,004482942
BMEII1091	Hypothetical pyridoxal phosphate biosynthesis protein	504	335	1,5	0,00160101
BMEII1092	Hydroxypyruvate isomerase	1357	709	1,91	4,93E-05
BMEII1093	Glycerol-3-phosphate regulon repressor	2990	1664	1,8	0,001446931
BMEII1094	4-hydroxybutyrate dehydrogenase	2013	1091	1,85	0,003385477
BMEII1095	L-fucose phosphate aldolase	1232	642	1,92	0,000162836
BMEII1096	Putative tartrate transporter	4626	2758	1,68	0,002719438
BMEII1097	Probable transcriptional regulator SyrB	3422	2703	1,27	0,030083588
BMEII1098	Transcriptional regulator, AraC family	4611	3017	1,53	0,000317506
BMEII1099	Melittin resistance protein PqAB	5410	3359	1,61	0,002576971
BMEII1100	Cellobiose phosphotransferase system CelC	2429	1205	2,02	0,000964995
BMEII1101	Bactoprenol glucosyl transferase / bactoprenol apolipoprotein n-acyltransferase	7019	4217	1,66	3,90E-05
BMEII1102	Hypothetical protein	35090	27158	1,29	0,007677562
BMEII1103	Phosphatidylglycerophosphatase B	9465	9682	0,98	0,919336901
BMEII1104	Hypothetical protein	2651	2599	1,02	0,799184943
BMEII1105	Flagellum-specific ATP synthase	517	371	1,39	0,030123254
BMEII1106	Hypothetical protein	243	118	2,07	3,39E-06
BMEII1107	Flagellar basal-body rod protein FlgF	1083	442	2,45	1,23E-07
BMEII1108	Flagellar basal-body rod protein FlgF	2103	992	2,12	4,45E-07
BMEII1109	Chemotaxis MotA protein	4968	2303	2,16	4,17E-07
BMEII1110	Flagellar motor switch protein FlhM	2200	992	2,22	1,68E-06
BMEII1111	Hypothetical protein	3955	1847	2,14	2,34E-05
BMEII1112	Flagellar motor switch protein FlhN	6075	3075	1,98	2,55E-05
BMEII1113	Flagellar motor switch protein FlhG	6554	3221	2,03	0,000591022
BMEII1114	Flagellar biosynthetic protein FlhB	1491	998	1,49	0,008316648
BMEII1115	Hypothetical protein	8584	6833	1,26	0,135757662
BMEII1116	Transcriptional activator, LuxR family	25852	23902	1,08	0,325394397
BMEII1117	Transcriptional regulator, TetR family	128	112	1,14	0,018779483
BMEII1118	Multidrug resistance protein A	675	678	1	0,982693661
BMEII1119	Multidrug resistance protein B	280	275	1,02	0,72280969
BMEII1120	Iron(III)-binding periplasmic protein precursor	1454	2020	0,72	0,001682679
BMEII1121	Iron(III)-transport system permease protein SfuB	281	427	0,66	0,024690356
BMEII1122	Iron(III)-transport system permease protein SfuB	801	1341	0,6	0,000272038
BMEII1123	Iron(III)-transport ATP-binding protein SfuC	2196	2021	1,09	0,176242796
BMEII1124	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	4193	3734	1,12	0,286833481
BMEII1125	Dimeric dihydrodiol dehydrogenase	199	188	1,06	0,355929307
BMEII1126	Oxidoreductase	347	361	0,96	0,496191198
BMEII1127	Exopolysaccharide production protein ExoQ	336	415	0,81	0,235785861
BMEII1128	Succinoglycan biosynthesis protein ExoM	272	282	0,96	0,970314945
BMEII1129	Glycosyl transferase	535	598	0,9	0,766055782
BMEII1130	Probable udp-n-acetyl-d-mannosaminuronic acid transferase	547	567	0,96	0,846241716
BMEII1131	Hypothetical protein	1248	1197	1,04	0,691145082
BMEII1132	Succinoglycan biosynthesis transport protein ExoP	1494	1429	1,05	0,542632766
BMEII1133	Ornithine decarboxylase	273	205	1,33	0,007126892
BMEII1134	Amidase	1168	909	1,28	0,00217751
BMEII1135	Transcriptional regulatory protein, LysR family	1387	1028	1,35	0,019874176
BMEII1136	Hypothetical protein	5576	3777	1,48	9,92E-05
BMEII1137	Putative membrane protein	2643	1807	1,46	0,00720754
BMEII1138	Hypothetical protein	2140	1568	1,37	0,05286237
BMEII1139	Lsu ribosomal protein L34p	289424	135	1,8	0,00475236

Annexe III

Alignement multiple de séquences par CLUSTAL 2.0.11

Alignement multiple de séquences protéiques de *B. melitensis*16M prls

```

ATU0527-A.tumefaciens      --MLPGWIIIFG-SAFAYILLFFAVASYGDRKSRDHPAPKKGRPFVYALS 47
SMC02249S.meliloti        --MLSGSVIFA-SAFAYLLLLFAVASYGDRRARNEIAAKGRPLVYALS 47
BRUAB1_0342B.abortus      MPAMQGWGIIG-FAFLYLLLLFAVASIGDRRT-ARWSS-TPRPYIYALS 47
GBOORF0343B.ovis         -----
BAB10346B.abortus        MPAMQGWGIIG-FAFLYLLLLFAVASIGDRRT-ARWSS-TPRPYIYALS 47
BR_0316B.suis            MPAMQGWGIIG-FAFLYLLLLFAVASIGDRRT-ARWSS-TPRPYIYALS 47
BMEI1606B.melitensis     ---MQGWGIIG-FAFLYLLLLFAVASIGDRRT-ARWSS-TPRPYIYALS 44
MLL5691M.lot            ---MQGLFIVI-IAIAYVTLFAIASLGDRRS-AVSGPGRARPFYIYALS 45
RPE_4786R.palustris     --MLHWDGVIA-AAFGYIGFLVLVASYGDRLS--QEQRERYGTLLIYPLSM 45
AHA_0976A.hydrophila    --MHQGWLLIG-LSLSYLGFLIAYVADKNK--R-RRLKGQPLLYSLSL 44
PA3271P.aeruginosa      --MSLSIGLIAVVALVYMAILFAIAFYGDRRR--TPLSPRLRAWVYSLSL 46

ATU0527-A.tumefaciens      AIYCTSWTYFGGVGLAADKGLEFLGIYTGPILAFTLGMPPIRRIVDLAKT 97
SMC02249S.meliloti        AIYCTSWTYFGGVGLAERGLEFTGIYIGPILMFTLGMPPIRRIVRLAKT 97
BRUAB1_0342B.abortus      AVYCTSWTFFGSGVGLSAQRELEFLGIYIGPILVFTLGNRLLRHIVRLAKS 97
GBOORF0343B.ovis         -----
BAB10346B.abortus        AVYCTSWTFFGSGVGLSAQRELEFLGIYIGPILVFTLGNRLLRHIVRLAKS 97
BR_0316B.suis            AVYCTSWTFFGSGVGLSAQRELEFLGIYIGPILVFTLGNRLLRHIVRLAKS 97
BMEI1606B.melitensis     AVYCTSWTFFGSGVGLSAQRELEFLGIYIGPILVFTLGNRLLRHIVRLAKS 94
MLL5691M.lot            AIYCTSWTFFGSGVGLSSERGLEFLGIYTGPIVLFVFGFPLNRRIVRLAKT 95
RPE_4786R.palustris     AIYCTSWTFFGSGVGFASRTSYDFLAIYIGPILMVALCTPLLRRVIALAKS 95
AHA_0976A.hydrophila    AVYCTSWTFFGSGVGFASRTSPSPVPPIYLGPMVLFVFGWRLLARLILVAKR 94
PA3271P.aeruginosa      AVYCTSWTFFGSGVGFASRTSPSPVPPIYLGPMVLFVFGWRLLARLILVAKR 96

ATU0527-A.tumefaciens      EKLTSVADFIAARYGKNSTVAMIVAIIALVGAIPYIALQLKAVSSSVATM 147
SMC02249S.meliloti        EKLTSVADFVAAARYGKNPAVAAIIVALISLVGAIPYIALQLKAVSSSVATM 147
BRUAB1_0342B.abortus      EHITSIAADFLAARYGKSGFVASLATCIAAVGSIPYIALQLKAVSGSVGLV 147
GBOORF0343B.ovis         -----
BAB10346B.abortus        EHITSIAADFLAARYGKSGFVASLATCIAAVGSIPYIALQLKAVSGSVGLV 147
BR_0316B.suis            EHITSIAADFLAARYGKSGFVASLATCIAAVGSIPYIALQLKAVSGSVGLV 147
BMEI1606B.melitensis     EHITSIAADFLAARYGKSGFVASLATCIAAVGSIPYIALQLKAVSGSVGLV 144
MLL5691M.lot            EKITSIAADFLAARYGKSGFTVAATLIATIGAVPYIALQLKAVSGSVGLV 145
RPE_4786R.palustris     QNITSIAADFLAARYGKSQTVAATVALIAIVGSVPYIALQLKAVASSLQTI 145
AHA_0976A.hydrophila    EHITSIAADFLAARYGKSQRLAMVIALIAIMGILPYLVQLKAIIVTGLDLL 144
PA3271P.aeruginosa      ENITSIAADFLAARYGKSQALAVVVALICMVGVLPYIALQLKGIVLGVNLL 146

ATU0527-A.tumefaciens      VDPGDYIGISGNLYFLDLPLVVTLMAGFAVMFGTRHTDATEHQDGLILA 197
SMC02249S.meliloti        IDTSDYIGISG-ENFVDLPLLVTFLACFAIVFGTRHTDATEHQDGLILA 196
BRUAB1_0342B.abortus      MDYYGAADVPAVFVFGDISLPVA AVLATFAILFGTRHTDATEHQNGLILA 197
GBOORF0343B.ovis         -----
BAB10346B.abortus        MDYYGAADVPAVFVFGDISLPVA AVLATFAILFGTRHTDATEHQNGLILA 197
BR_0316B.suis            MDYYGAADVPAVFVFGDISLPVA AVLATFAILFGTRHTDATEHQNGLILA 197
BMEI1606B.melitensis     MDYYGAADVPAVFVFGDISLPVA AVLATFAILFGTRHTDATEHQNGLILA 194
MLL5691M.lot            VEHYTGSPPSDFPFVSDISLVVAMLLALFAVLFGTRHADATEHQDGLVLA 195
RPE_4786R.palustris     LN--GDEAIPTISMVADVPLIVALALALFAVLFGTRQTNATEHQHGLMLA 193
AHA_0976A.hydrophila    MA--NSVPAGPTGNTAGLALGALLLALFSILFGTRHLDATEHHHGMVVA 192
PA3271P.aeruginosa      IG--SGADSTGTR-AQDTALIVSLVLALFTIVFGTRSLDVTBHHHGMVLA 193

ATU0527-A.tumefaciens      ISMESLVKLVAMCTVGFYVLFVLFDPGPAHLWQLATDNEQAMRAISYHTPI 247

```

SMC02249S.meliloti	IAMESVVKLVAMLTVGVIYIVFVLFGGPANLWAEAAQQSVTVIAALEYQTPV	246
BRUAB1_0342B.abortus	VALESVIKLC AFLTVGLACAFFLFGAPSQ LIRQISQSPEALEAFHYETSI	247
GBOORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	VALESVIKLC AFLTVGLACAFFLFGAPSQ LIRQISQSPEALEAFHYETSI	247
BR_0316B.suis	VALESVIKLC AFLTVGLACAFFLFGAPSQ LIRQISQSPEALEAFHYETSI	247
BMEI1606B.melitensis	VALESVIKLC AFLTVGLACAFFLFGAPSQ LIRQISQSPEALEAFHYETSI	244
MLL5691M.lot1	VAVETVVKLA AFLAIGLMVTF LIFGGPGDMFAKLAENAQVRQAMGYNTSL	245
RPE_4786R.palustris	VATESIIKLVAF LAAGFFVTFIMFT-PHELI ERAMTMPEAVRALDSTSSS	242
AHA_0976A.hydrophila	IAFESVVKLLAFMAVGGFALWLILSKPSQARTLVASDFLDVAVVTPGSL	242
PA3271P.aeruginosa	IAFESLVKLT AFLAVGIFATFGLYDGFADLF SQARAAPQLADYWEETVHW	243
ATU0527-A.tumefaciens	SRWIVMTLLSGFAIILLPRQFHVTVVENRTPEELMAGFLLPLYLIAINI	297
SMC02249S.meliloti	ARWILMIALSAFGIIMLPRQFHVTVVENRTDNELRTAGILFPLYLIAINA	296
BRUAB1_0342B.abortus	GTWLVTALSAAAVIMLPRQFHVTVVESRSEKELRTASWLFPLYLILINI	297
GBOORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	GTWLVTALSAAAVIMLPRQFHVTVVESRSEKELRTASWLFPLYLILINI	297
BR_0316B.suis	GTWLVTALSAAAVIMLPRQFHVTVVESRSEKELRTASWLFPLYLILINI	297
BMEI1606B.melitensis	GTWLVTALSAAAVIMLPRQFHVTVVESRSEKELRTASWLFPLYLILINI	294
MLL5691M.lot1	ATWLVLTCISGFAIIMLPRQFVVTIVENRGEAELRTATWVFPLYLVAINL	295
RPE_4786R.palustris	GNFLTMVLLSFCAIMLLPRQFHVSVVENSSAAEVDRARWLFPLYLVAINL	292
AHA_0976A.hydrophila	LELAIYTLVAMCAVICLPRQFHVTVVENNQGD LHWARWLFPLYLFVMGL	292
PA3271P.aeruginosa	PAMLLQTGVAMTAIMCLPRQFHVTVVENIEPRDLNLARWVFPIYLVLAAL	293
ATU0527-A.tumefaciens	FVLPIALAGILTGA-NGDADLYVLQPLNHQMPVVS LITFIGGFSAATA	346
SMC02249S.meliloti	FVLP IAIAGILTFSG-SGNADLYLLALPLAGDVPLVTLFTTIGGFSAATA	345
BRUAB1_0342B.abortus	FVFPIALIGVMTLGN-SVNGDLYVLALPLSAGAHWLALIAFLGGLSAATA	346
GBOORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	FVFPIALIGVMTLGN-SVNGDLYVLALPLSAGAHWLALIAFLGGLSAATA	346
BR_0316B.suis	FVFPIALIGVMTLGN-SVNGDLYVLALPLSAGAHWLALIAFLGGLSAATA	346
BMEI1606B.melitensis	FVFPIALIGVMTLGN-SVNGDLYVLALPLSAGAHWLALIAFLGGLSAATA	343
MLL5691M.lot1	FVLP IAFAGLSLVGT-GTSSDLYVLSLPLFSGHLLAMA AFI GGLSAATA	344
RPE_4786R.palustris	FV IPIALAGLVTFPF GAVEPDMFVLALPIE ARQSWLSVIVFTIGGLSAATA	342
AHA_0976A.hydrophila	FIWPLALAGKQWVGA-GMASDTYVISLPM SLGFDGMALLAFLGGTSAATG	341
PA3271P.aeruginosa	FVVP IALAGQLHLPA-GVMPDSFVISLPLAEAH PALALLAFI GGA SAATG	342
ATU0527-A.tumefaciens	MVIVASVALSIMISNDIVMPIFLQKLLNRSPHDDFAKTL LNIRRTAIF	396
SMC02249S.meliloti	MVIVASVALSIMVSN DIVMPVFLRRRLGTRGSLQEDMAGTLLNIRRTAIF	395
BRUAB1_0342B.abortus	MVIVACVALSIMISNHLVLP LISSFAKRHLAEQGLTKIILNTRITII	396
GBOORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	MVIVACVALSIMISNHLVLP LISSFAKRHLAEQGLTKIILNTRITII	396
BR_0316B.suis	MVIVACVALSIMISNHLVLP LISSFAKRHLAEQGLTKIILNTRITII	396
BMEI1606B.melitensis	MVIVACVALSIMISNHLVLP LISSFAKRHLAEQGLTKIILNTRITII	393
MLL5691M.lot1	MVIVESVALSIMISNDLVIPLFVRRLK TSTSENEDWSTLIINVRRG AIF	394
RPE_4786R.palustris	MVIVESVALAVMVSNDLVMPVLVKRGSAPQSNER-HFGGGLLIVRRVAIF	391
AHA_0976A.hydrophila	MVIVCTIALAIMVSN DLVLPVLLRRFWQQGRD--ERLVRLLQLVRRGAIL	389
PA3271P.aeruginosa	MVIVASVALSTMVSN DMLLPWLLRRREK DTERPFEAFRHWLLTVRRVSIA	392
ATU0527-A.tumefaciens	AVMLLGYYGYYRAADSATGLASIGLLAFAAIAQMAPALFGGLFWRRANARG	446
SMC02249S.meliloti	VVLFLGYGYYRAADISAGLASLGLLSFAAIAQMAPALLGGLVWRQANARG	445
BRUAB1_0342B.abortus	VILALAFSYYRLTSNNIHLASIGFVSFAAVAQFAPALIGGLFWRNANGRG	446
GBOORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	VILALAFSYYRLTSNNIHLASIGFVSFAAVAQFAPALIGGLFWRNANGRG	446
BR_0316B.suis	VILALAFSYYRLTSNNIHLASIGFVSFAAVAQFAPALIGGLFWRNANGRG	446
BMEI1606B.melitensis	VILALAFSYYRLTSNNIHLASIGFVSFAAVAQFAPALIGGLFWRNANGRG	443
MLL5691M.lot1	ILLFIAFLYYRESTNSARLSSIGLMSFAAIAQFAPALIGGLIWRGANGRG	444
RPE_4786R.palustris	VILLMAYLYFRELGN-TQLAAIGLLSFAAIAQFAPSFFGGLVWRRATALG	440
AHA_0976A.hydrophila	LILLAAGWGLYLWLGDLTSLSRIGYLSFGAVAQFAPALLGLYWRHGNRKG	439
PA3271P.aeruginosa	VILLLAYVAYRLLGSSASLATIGQIAFAAIAQLGPAMIGALYWKQANRRG	442
ATU0527-A.tumefaciens	AIAGLSSGFFVWAYLLFLPSFGGPDNS---EVAANILGFLFSGSTVFNGP	493
SMC02249S.meliloti	AIAGMVSGFLVWAYVLF LPSLGGPDNS---HIASTVLSFLLPFTDLFSGA	492
BRUAB1_0342B.abortus	AMLGLSAGFVWCYTLLLP TVAPENAA---SLRDGFLGFTALRPEALFGT	493

GBORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	AMLGLSAGFIVWCYTLTLLPTVAPENAA---SLRDGFLGFTALRPEALFGT	493
BR_0316B.suis	AMLGLSAGFIVWCYTLTLLPTVAPENAA---ILRDGFLGFTALRPEALFGT	493
BMEI1606B.melitensis	AMLGLSAGFIVWCYTLTLLPTVAPENAA---SLRDGFLGFTALRPEALFGT	490
MLL5691M.lot1	AALGMVAGILVWSYTLTLLPSLVAPDTD---IVVHGLFGFEALRPFQALFGT	491
RPE_4786R.palustris	AIGGMAIGFVTWAYTLFLPSFLDGNTAGMLFLQHGPFGIEALRPFALFGA	490
AHA_0976A.hydrophila	VYLGLALGVSLWFATLLAESGLLAGSP-----LAALLAPPDWPAPFRDLSL	484
PA3271P.aeruginosa	VFAGLAAGSLLWAYTLVLPVVAKGLGW-----PLERIPGLTWLASNPFGL	487
ATU0527-A.tumefaciens	EADPFVNAVILSLLVNSLAFVLGSLSRNRPVERIQSGIFVKRHSKSQFA	543
SMC02249S.meliloti	QSDPLVNATALSMLVNVAAYIVGSLTRAPKPLERFQAGVFITRRSTERT	542
BRUAB1_0342B.abortus	NALPLTNGVAWSIAANTLFYILGSLSRASTPLERIQASIFLPRFTFIGAPT	543
GBORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	NALPLTNGVAWSIAANTLFYILGSLSRASTPLERIQASIFLPRFTFIGAPT	543
BR_0316B.suis	NALPLTNGVAWSIAANTLFYILGSLSRASTPLERIQASIFLPRFTFIGAPT	543
BMEI1606B.melitensis	NALPLTNGVAWSIAANTLFYILGSLSRASTPLERIQASIFLPRFTFIGAPT	540
MLL5691M.lot1	VAEPLNHGVLWSLSINTLFFVLGSLSRASVPLERIQASIFVPRDAGMPMS	541
RPE_4786R.palustris	DLPLLLHGVLSLSLNMLAYVGLSLLRRPSAIERLQAEVFVPAQLTTIAP	540
AHA_0976A.hydrophila	GAWCIFLSLLNLIG-----YVAGSLLSQAASERLQAAANFVGKPF--SRDT	528
PA3271P.aeruginosa	PIEPLTQGVLLISLVGNFALFGLVSVLSRTRVSEHWQASRFIGQEI--SQRQ	536
ATU0527-A.tumefaciens	TRGWKTRVSVGDLKSAIARYLGEERMLRSLATYKTAGRKLNDQPADMA	593
SMC02249S.meliloti	FRGRKTKVTRDLKTTIGRYMGEERMQRSFHTYEQQSGRWLDDNASADMA	592
BRUAB1_0342B.abortus	LKRFRTTVTVAELKATMARYLGAERVERAFLRFEGREQRRLDPGMTVDTP	593
GBORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	LKRFRTTVTVAELKATMARYLGAERVERAFLRFEGREQRRLDPGMTVDTP	593
BR_0316B.suis	LKRFRTTVTVAELKATMARYLGAERVERAFLRFEGREQRRLDPGMTVDTP	593
BMEI1606B.melitensis	LKRFRTTVTVAELKATMARYLGAERVERAFLRFEGREQRRLDPGMTVDTP	590
MLL5691M.lot1	LRRFRTAITVNDLKDTIARYLGVVERTERSFQSFEKTNGASLHGKEQASMD	591
RPE_4786R.palustris	PFR-RSTVTVDILGAVAQYLGPERAKEAFRAFAANRRVNIEPASPADFE	589
AHA_0976A.hydrophila	TALYQARVSVKELEMLAARFVGSSRVKRAFGRFAGERGGTLAPQMQASAE	578
PA3271P.aeruginosa	NSRFMLAVQVEDLLMLAARFVGEERARQSFRFAYRQKGFTPNQTANNE	586
ATU0527-A.tumefaciens	LIHFSEQLLGSAGSSSARLVLSIILQKAEDTSADTAWLLDQASEALQYN	643
SMC02249S.meliloti	LVHFSEQLLGSAGSSSARLVLSLVLQRMDDTSSDTAWLLDQASEALQYN	642
BRUAB1_0342B.abortus	LIRYAEQLLGTAVGSSSARLVLSLLLQRNDASPRDARQLLDDASAALQQN	643
GBORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	LIRYAEQLLGTAVGSSSARLVLSLLLQRNDASPRDARQLLDDASAALQQN	643
BR_0316B.suis	LIRYAEQLLGTAVGSSSARLVLSLLLQRNDASPRDARQLLDDASAALQQN	643
BMEI1606B.melitensis	LIRYAEQLLGTAVGSSSARLVLSLLLQRNDASPRDARQLLDDASAALQQN	640
MLL5691M.lot1	VIRFSEQLLASAVGSSSARLILSLLFRRHDESRDAFRLLDDATEALQHN	641
RPE_4786R.palustris	LLQHAHHLIASSIGSASSRLVLSLLLRRRTVSAEALKLLDDSHAALHFN	639
AHA_0976A.hydrophila	LIAHTERLLAGVFGTSSARLVLASALQGRNMQLLEIATIVDEASDVFRFN	628
PA3271P.aeruginosa	WIAHTERLLAGVLGASSARAVVKAAIEGREMQVEDVVRIDAEASEVLQFN	636
ATU0527-A.tumefaciens	QDMLQTALAQMDQGIAVFDSSQQLTIWNRRFRTLDDLPQFGQVGVPLTE	693
SMC02249S.meliloti	QDMLHTALSQMDQGIAVFDNANNLIWNRRFRELMDLPEAQGVGFPLAD	692
BRUAB1_0342B.abortus	RDLLQIALDQMDQGITVLDKDLRLTCWNRQFRKLFDLDPDEVMQVGPISE	693
GBORF0343B.ovis	-----MMQVGPISE	10
BAB10346B.abortus	RDLLQIALDQMDQGITVLDKDLRLTCWNRQFRKLFDLDPDEVMQVGPISE	693
BR_0316B.suis	RDLLQIALDQMDQGITVLDKDLRLTCWNRQFRKLFDLDPDEVMQVGPISE	693
BMEI1606B.melitensis	RDLLQIALDQMDQGITVLDKDLRLTCWNRQFRKLFDLDPDEVMQVGPISE	690
MLL5691M.lot1	RDLLQIALDQMEQGITVDFDRFLICWNRQYRALFDLPDEMGOVGVSLDQ	691
RPE_4786R.palustris	REILQTALNHVQGGIAVFNPKLQLICSNRQFGEILGLPPHIVQIGVPLLE	689
AHA_0976A.hydrophila	RGLLQGAIEHMGQGISVVDRELKLVAWNRRYIELFHYPPGLIQVGRPIEE	678
PA3271P.aeruginosa	RALLQGAIENTITQGISVVDQSLRLVAWNHRYLELFEPDGLIYVGRPIAD	686
	:* .: :	
ATU0527-A.tumefaciens	IVTMLQERGDMF---PGDTDELITSFLTMDLPFS--LVLAGGERIIEVRSN	739
SMC02249S.meliloti	IVAILARRGDVR---KDEEKALIANFLTLDKPFL--LELAGGARIVEVRSN	738
BRUAB1_0342B.abortus	IVEHLSQRGDIA---LNARNSAIRSLGTVRRPWR--MTMKSTGKILEINSN	739
GBORF0343B.ovis	IVEHLSQRGDIA---LNARNSAIRSLGTVRRPWR--MTMKSTGKILEINSN	56
BAB10346B.abortus	IVEHLSQRGDIA---LNARNSAIRSLGTVRRPWR--MTMKSTGKILEINSN	739

BR_0316B.suis	IVEHLSQRGDIA---LNARNSAIRSLGTVRRPWR-MTMKSTGKILEINSN	739
BMEI1606B.melitensis	IVEHLSQRGDIA---LNA ~~NSAIRSLGTVRRPWR-MTMKSTGKILEINSN~~	736
MLL5691M.lot1	ILRHLAERGDI ~~P---ADQRV~~ TMLNRLTSFVSPWQ-MELKTSGRILELRSN	737
RPE_4786R.palustris	ILDY ~~LALN~~ APAIGDHEAQ ~~TQ~~ MLAAYTTEGAPFI-ERIPDRHLVIEVRAN	738
AHA_0976A.hydrophila	IIRYNAEQGLCGPGDVEAHVARRVAFMQ ~~RG~~ SGQHISARERPDGRVIEMQGN	728
PA3271P.aeruginosa	IIRYNADRGLCGPGDPMHVAKRLYWMRQGT ~~PHTSERLFPNGRVIELIGN~~	736
	: . . ::.*	
ATU0527-A.tumefaciens	TMPDKGIVATFTDITQ ~~RVASDQALKQANETLEQ~~ RVEER-----TVELT	782
SMC02249S.meliloti	AMPDKGIVT ~~TTT~~ TDITQ ~~RVAADMALKQANETLELR~~ V ~~AE~~ R-----TGELT	781
BRUAB1_0342B.abortus	PMPDGS ~~LV~~ TFTDITAAVEADLMRQKASEMLEQ ~~RVIDR~~ -----TAELM	782
GBORF0343B.ovis	PMPDGS ~~LV~~ TFTDITAAVEADLMRQKASEMLEQ ~~RVIDR~~ -----TAELM	99
BAB10346B.abortus	PMPDGS ~~LV~~ TFTDITAAVEADLMRQKASEMLEQ ~~RVIDR~~ -----TAELM	782
BR_0316B.suis	PMPDGS ~~LV~~ TFTDITAAVEADLMRQKASEMLEQ ~~RVIDR~~ -----TAELM	782
BMEI1606B.melitensis	PMPDGS ~~LV~~ TFTDITAAVEADLMRQKASEMLEQ ~~RVIDR~~ -----TAELM	779
MLL5691M.lot1	PMPDGGIVATYADISGRVEQDLALKRANESLEQ ~~RVKTRTIELTSVNEELT~~	787
RPE_4786R.palustris	RMPDGS ~~LV~~ TFTSDVTPSFEAAEALERANATLEK ~~RVRDR~~ -----TEELM	781
AHA_0976A.hydrophila	PMPAGGFVMTFTDITPFRDAERVLREANEHLEA ~~RV~~ AE-----THELS	771
PA3271P.aeruginosa	PMPGGGFVMSFTDITAYREAEQGLKGANESLEQ ~~RVQER~~ -----TQELS	779
	** .:* :*:.* . * . ** ** *	
ATU0527-A.tumefaciens	RVN ~~RALAE~~ ARASADEANIGKTRFFAAAGHDILQPLN ~~AARLYSSSLVERLG~~	832
SMC02249S.meliloti	RVNRELGEARAA ~~EE~~ ANIGKTRFFAAAGHDILQPLN ~~AARLYSSSLVERLG~~	831
BRUAB1_0342B.abortus	HVNDELARAQAA ~~EE~~ ANLGKTRFLAAAGHDILQPLN ~~AARLYSTALAEKLG~~	832
GBORF0343B.ovis	HVNDELARAQAA ~~EE~~ ANLGKTRFLAAAGHDILQPLN ~~AARLYSTALAEKLG~~	149
BAB10346B.abortus	HVNDELARAQAA ~~EE~~ ANLGKTRFLAAAGHDILQPLN ~~AARLYSTALAEKLG~~	832
BR_0316B.suis	HVNDELARAQAA ~~EE~~ ANLGKTRFLAAAGHDILQPLN ~~AARLYSTALAEKLG~~	832
BMEI1606B.melitensis	HVNDELARAQAA ~~EE~~ ADLG ~~TRFLAAAGHDILQPLN~~ AARLYSTALAEKLG	829
MLL5691M.lot1	RVNEELAQ ~~Q~~ MLAEANLGKTRFLAAAGHDILQPLN ~~AARLYCSSLIEKAG~~	837
RPE_4786R.palustris	RLNSALALAKSTAEANISKTRFLAAASHDILQPLN ~~AARLYVTSLVEKQG~~	831
AHA_0976A.hydrophila	ELNRQ ~~LLLV~~ NQQVERANHSKSRFLAAVSHDLTQPLN ~~AAKLF~~ TSSLLEMLP	821
PA3271P.aeruginosa	QLNQELSEAKSNAE ~~EA~~ ANQSKTRFLAAVSHDL ~~MQPLN~~ AARLFS ~~AALAHQDA~~	829
	.* * . . .: * .*:*:*.**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*	
ATU0527-A.tumefaciens	-ASGESDLVHNIDSALESVETILGAVLDISR ~~LD~~ TGSMKARMTSVPLNELL	881
SMC02249S.meliloti	-DSDNRALVQNI ~~DS~~ SLESVEAILGAVLDISR ~~LD~~ TGAMKPRLOSVP ~~LD~~ ELL	880
BRUAB1_0342B.abortus	-RSETSEFARNIDSSLEAVEAILGMVLDISR ~~LD~~ TGSLKPETS ~~V~~ FR ~~LD~~ KLL	881
GBORF0343B.ovis	-RSETSEFARNIDSSLEAVEAILGMVLDISR ~~LD~~ TGSLKPETS ~~V~~ FR ~~LD~~ KLL	198
BAB10346B.abortus	-RSETSEFARNIDSSLEAVEAILGMVLDISR ~~LD~~ TGSLKPETS ~~V~~ FR ~~LD~~ KLL	881
BR_0316B.suis	-RSETSEFARNIDSSLEAVEAILGMVLDISR ~~LD~~ TGSLKPETS ~~V~~ FR ~~LD~~ KLL	881
BMEI1606B.melitensis	-RSETSEFARNIDSSLEAVEAILGMVLDISR ~~LD~~ TGSLKPETS ~~V~~ FR ~~LD~~ KLL	878
MLL5691M.lot1	-KGPAGKAAVNI ~~ES~~ SLESVETILGAVLDISR ~~LD~~ DAGAMKPD ~~DTAF~~ NLDGLL	886
RPE_4786R.palustris	-AGQDGKLVENID ~~S~~ LEAIEDIIGALLDISR ~~LD~~ DAGAMTPSLSGFVIGDLM	880
AHA_0976A.hydrophila	PMDEPARIARID ~~DA~~ LGLTEADLITD ~~LD~~ ISRLEAGKFKAKKLD ~~FALRD~~ VF	871
PA3271P.aeruginosa	LPGEVRDLVQHLDSSLRSAEDLITD ~~LD~~ ISRLESGRVSAERNPFPLNNLY	879
	. . :*:.* : * : : :*:*:*:*:*. . . . : :	
ATU0527-A.tumefaciens	KRIETDFAPMAQEKNLDLVMP ~~TS~~ SLTVRS ~~DPN~~ LLRRLIQNLVSN ~~AIKY~~ TL	931
SMC02249S.meliloti	RRITDFAPMARAK ~~DI~~ ELVIMPTSLAARS ~~DPN~~ LLRRLVQNLVSN ~~AIKY~~ TL	930
BRUAB1_0342B.abortus	SQIATDFTPLAVKKGLKLRVVPSSIVVK ~~TD~~ RNMLRRLIQNLVSN ~~SIKY~~ SR	931
GBORF0343B.ovis	SQIATDFTPLAVKKGLKLRVVPSSIVVK ~~TD~~ RNMLRRLIQNLVSN ~~SIKY~~ SR	248
BAB10346B.abortus	SQIATDFTPLAVKKGLKLRVVPSSIVVK ~~TD~~ RNMLRRLIQNLVSN ~~SIKY~~ SR	931
BR_0316B.suis	SQIATDFTPLAVKKGLKLRVVPSSIVVK ~~TD~~ RNMLRRLIQNLVSN ~~SIKY~~ SR	931
BMEI1606B.melitensis	SQIATDFTPLAVKKGLKLRVVPSSIVVK ~~TD~~ RNMLRRLIQNLVSN ~~SIKY~~ SR	928
MLL5691M.lot1	RQIGNDFRPM ~~AAE~~ KKLGLT ~~IMP~~ SSLTVVTD ~~RN~~ LLRRLIQNLVSN ~~AIKY~~ TR	936
RPE_4786R.palustris	RSLEIEFAP ~~IA~~ RAKGLKLCFVPSQLAVESD ~~R~~ LLLRLLQNLISN ~~AIKY~~ TP	930
AHA_0976A.hydrophila	DNLKAEFGVLAQAGGIQFSV ~~ES~~ GVAVYSDVRLLRVLQNLFTNA ~~FR~~ YNP	921
PA3271P.aeruginosa	DALGVEFKALAQEQGLHFR ~~LR~~ GSQ ~~LR~~ VDSIKLLRRLIQNLFTNA ~~FR~~ YAK	929
	: :* :* : : . : : . :* :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*	
ATU0527-A.tumefaciens	EGKVVVGARRRGGEVVIQV ~~TD~~ SGIGIPASKFR ~~TV~~ FKEFARLDEG-AKTAS	980
SMC02249S.meliloti	RGKVLVGRRHGQATIEV ~~LD~~ SGIGIPSSKFR ~~T~~ IFKEFARLEEG-ARTAS	979
BRUAB1_0342B.abortus	KGGILLG ~~VRRR~~ GNFVDLQVLD ~~TG~~ IGIAPQK ~~KL~~ VFREFTRLNEG-MREAE	980
GBORF0343B.ovis	KGGILLG ~~VRRR~~ GNFVDLQVLD ~~TG~~ IGIAPQK ~~KL~~ VFREFTRLNEG-MREAE	297
BAB10346B.abortus	KGGILLG ~~VRRR~~ GNFVDLQVLD ~~TG~~ IGIAPQK ~~KL~~ VFREFTRLNEG-MREAE	980
BR_0316B.suis	KGGILLG ~~VRRR~~ GNFVDLQVLD ~~TG~~ IGIAPQK ~~KL~~ VFREFTRLNEG-MREAE	980
BMEI1606B.melitensis	KGGILLG ~~VRRR~~ GNFVDLQVLD ~~TG~~ IGIAPQK ~~KL~~ VFREFTRLNEG-MREAE	977

MLL5691M.lot1	RGRILVGVRRRGELAEIQVIDTGIGIAGEKLNTVFHEFTRLDEG-AREAE	985
RPE_4786R.palustris	QGVVLIGCRRRGQTLQIGIYDTGVGIPVLKRGEIFKEFHRLEQG-ARIAR	979
AHA_0976A.hydrophila	GGRVLLGCRRLGDKVRIEVDNGPGIPADKQEAIFDEFSLDHSHTAREQ	971
PA3271P.aeruginosa	G-HVLLGVRRREDGYLRLEVDQGPPIPDKQKVIFEEFKRLDSHQTRAEK	978
	::: * ** . : : * * ** . * : * ** ** :	
ATU0527-A.tumefaciens	GLGLGLSIVDRLSRMLHHPVQLISTPGKGTTFRIHLPREADRLAPAKTEG	1030
SMC02249S.meliloti	GLGLGLSIVDRISRVLNHPVGLQSKPGKGTGFKVTVPDKSAGGRLLKPQS	1029
BRUAB1_0342B.abortus	GLGLGLSIVDRIARVLSLPLSLASTPGKGTVFSLRIPVSGEAPPAAEEVK	1030
GBOORF0343B.ovis	GLGLGLSIVDRIARVLSLPLSLASTPGKGTVFSLRIPVSGEAPPAAEEVK	347
BAB10346B.abortus	GLGLGLSIVDRIARVLSLPLSLASTPGKGTVFSLRIPVSGEAPPAAEEVK	1030
BR_0316B.suis	GLGLGLSIVDRIARVLSLPLSLASTPGKGTVFSLRIPVSGEAPPAAEEVK	1030
BMEI1606B.melitensis	GLGLGLSIVDRIARVLSLPLSLASTPGKGTVFSLRIPVSGEAPPAAEEVK	1027
MLL5691M.lot1	GLGLGLSIVDRIARVLRLEIRIFSNPGKGTRESVILPVAAVQEPREVE	1035
RPE_4786R.palustris	GLGLGLSIVERLARVLNHGIALDSNKSNGSVFVSVTLQIASQVNHAAVTS	1029
AHA_0976A.hydrophila	GLGLGLAIARGIALVLGHNLTLRSWPGAGSVFAITLNLATRPVATTQVAA	1021
PA3271P.aeruginosa	GLGLGLAIADRLCKVLGHPLVRSWPGKGSVFSVRVPLARQAPPALANGH	1028
	*****: . : . : * : : * . * : * : :	
ATU0527-A.tumefaciens	GTTSPAASDRLHGIRVLCIDNEPKILEGMTLLLTGWGCDVLPAGSVAALE	1080
SMC02249S.meliloti	-VAAAKTSEALAGLNVICIDNEPKILEGMALLLGGWGCSTTAESLAGCT	1078
BRUAB1_0342B.abortus	-RRGPQRASELDGLGVLCIDNDVNILCGMETLLSGWGCNVTTLRSGAELK	1079
GBOORF0343B.ovis	-RRGPQRASELDGLGVLCIDNDVNILCGMETLLSGWGCNVTTLRSGAELK	396
BAB10346B.abortus	-RRGPQRASELDGLGVLCIDNDVNILCGMETLLSGWGCNVTTLRSGAELK	1079
BR_0316B.suis	-RRGPQRASELDGLGVLCIDNDVNILCGMETLLSGWGCNVTTLRSGAELK	1079
BMEI1606B.melitensis	-RRGPQRASELDGLGVLCIDNDVNILCGMETLLSGWGCNVTTLRSGAELK	1075
MLL5691M.lot1	-KAPARAVASLAGLHVLCIDNDARILEGMRLLEGGWGCCKVDTVSGSRDLE	1084
RPE_4786R.palustris	--ATPLSRASMSGILVTCIENDPAILDGMETLLTTWGAKVIAVADPEAAI	1077
AHA_0976A.hydrophila	---PTQRDSQLEGIHVLCIDNESDILIAMHSLLRGWGCEVVCQAQSLAQAE	1068
PA3271P.aeruginosa	---KAEPQAALNGAQVLCVDNEDSILAGMNSLLSRWGCQVWTAARSRECA	1075
	. : * * * : : * : * * * * *	
ATU0527-A.tumefaciens	EPFLT-LAAAPDVIIADYHLDDG-DGISAIRLIRTFYKGTIPALLVTADR	1128
SMC02249S.meliloti	EMAPGRLGVRPDAIIADYHLGDG-TGVEAIAAIRGLWQESIPALMVTADR	1127
BRUAB1_0342B.abortus	N-FCATGTAAPAVIIADYHLIHE-NGLDMIGFARESFKTEIPAILLTADR	1127
GBOORF0343B.ovis	N-FCATGTAAPAVIIADYHLIHE-NGLDMIGFARESFKTEIPAILLTADR	444
BAB10346B.abortus	N-FCATGTAAPAVIIADYHLIHE-NGLDMIGFARESFKTEIPAILLTADR	1127
BR_0316B.suis	N-FCATGTAAPAVIIADYHLIHE-NGLDMIGFARESFKTEIPAILLTADR	1127
BMEI1606B.melitensis	N-LLNRAAAPAVIIADYHLIHE-NGLDMIGFAETFKTEIPAILLTADR	1123
MLL5691M.lot1	N-AALHR---PDIVLADYHLDDG-TGLDIIARLRATHGDDLAALVLTADR	1129
RPE_4786R.palustris	E-AIGAAEGPIITGLLVYDYLDDG-NGIAAIRDIRRRFGDHPAILITADR	1125
AHA_0976A.hydrophila	D--LIAGGFLPQLVLSYHLDDGKTGLQALHMLRLAHGNDIGGIIISADR	1116
PA3271P.aeruginosa	T--LLDSEMRPQLALIDYHLDDGETGTQLMAWLRTRLGEPVPGVVISADA	1123
	: * * * * * : * : : : : *	
ATU0527-A.tumefaciens	SPEVRS-----DAEKYGISVQHKKPV	1148
SMC02249S.meliloti	SPEVRG-----AAERDGVSLQHKKPV	1147
BRUAB1_0342B.abortus	SKEVRQ-----RAEDENVTVLHKPL	1147
GBOORF0343B.ovis	SKEVRQ-----RAEDENVTVLHKPL	464
BAB10346B.abortus	SKEVRQ-----RAEDENVTVLHKPL	1147
BR_0316B.suis	SKEVRQ-----RAEDENVTVLHKPL	1147
BMEI1606B.melitensis	SKEVPXQMRTPCCTSPCGRRRCARCSRFFITHARTGHRRAVHDKRQ	1173
MLL5691M.lot1	SNEVRA-----AAAGLDIAVINKPL	1149
RPE_4786R.palustris	SPRVRA-----AAREDNIAVLNKPV	1145
AHA_0976A.hydrophila	KSELQA-----QIREHGYGYSKPV	1136
PA3271P.aeruginosa	RPELVA-----EIHAGLDYLSKPV	1143
	. :	
ATU0527-A.tumefaciens	KP-----AALRAYINQISGTARAAAE-----	1169
SMC02249S.meliloti	RP-----AALRAWLTQLAAAGRAAAE-----	1168
BRUAB1_0342B.abortus	RP-----AALRSMLSIFHHARQDGASTQGSTR	1174
GBOORF0343B.ovis	RP-----AALRSMLSIFHHARQDGASTQGSTR	491
BAB10346B.abortus	RP-----AALRSMLSIFHHARQDGASTQGSTR	1174
BR_0316B.suis	RP-----AALRSMLSIFHHARQDGASTQGSTR	1174
BMEI1606B.melitensis	RPTAPIAEALQTPRTSLPIRERRMTACVRLSTPSCSTAEATCALTVASET	1223
MLL5691M.lot1	KP-----AVLRSMMARVRPLASAAE-----	1169
RPE_4786R.palustris	KA-----ASLRALLGQWRTQQIVAAE-----	1166

AHA_0976A.hydrophila	KP-----LKLRLMNSILRPAKLDDDHETGNS	1163
PA3271P.aeruginosa	KP-----AALRALLSHLSLR-----	1159
	: .	: *
ATU0527-A.tumefaciens	-----	
SMC02249S.meliloti	-----	
BRUAB1_0342B.abortus	-----	
GBOORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	-----	
BR_0316B.suis	-----	
BMEI1606B.melitensis	PSSKAICLLRSPSASMVTRVCCGVVRVSRAMSDSISGSFGWSRSISSGV	1273
MLL5691M.lot	-----	
RPE_4786R.palustris	-----	
AHA_0976A.hydrophila	SEF-----	1166
PA3271P.aeruginosa	-----	
ATU0527-A.tumefaciens	-----	
SMC02249S.meliloti	-----	
BRUAB1_0342B.abortus	-----	
GBOORF0343B.ovis	-----	
BAB10346B.abortus	-----	
BR_0316B.suis	-----	
BMEI1606B.melitensis	HISPASTAPTASPMVSMLEADLEMKPEAPSSSA	1305
MLL5691M.lot	-----	
RPE_4786R.palustris	-----	
AHA_0976A.hydrophila	-----	
PA3271P.aeruginosa	-----	

Figure A9 : Alignements multiples de séquences protéiques de PrlS avec ses homologues *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Shinorizobium meliloti*, *Rodoseudomona palustris*, *Pseudomona aureginosa*, *Aeronona hydrophila* et *mesorizobiun loti*. Le domaine PutP est souligné en gris clair. Le domaine HisKA souligné en gris fronce et le domaine REC est souligné en vert clair.

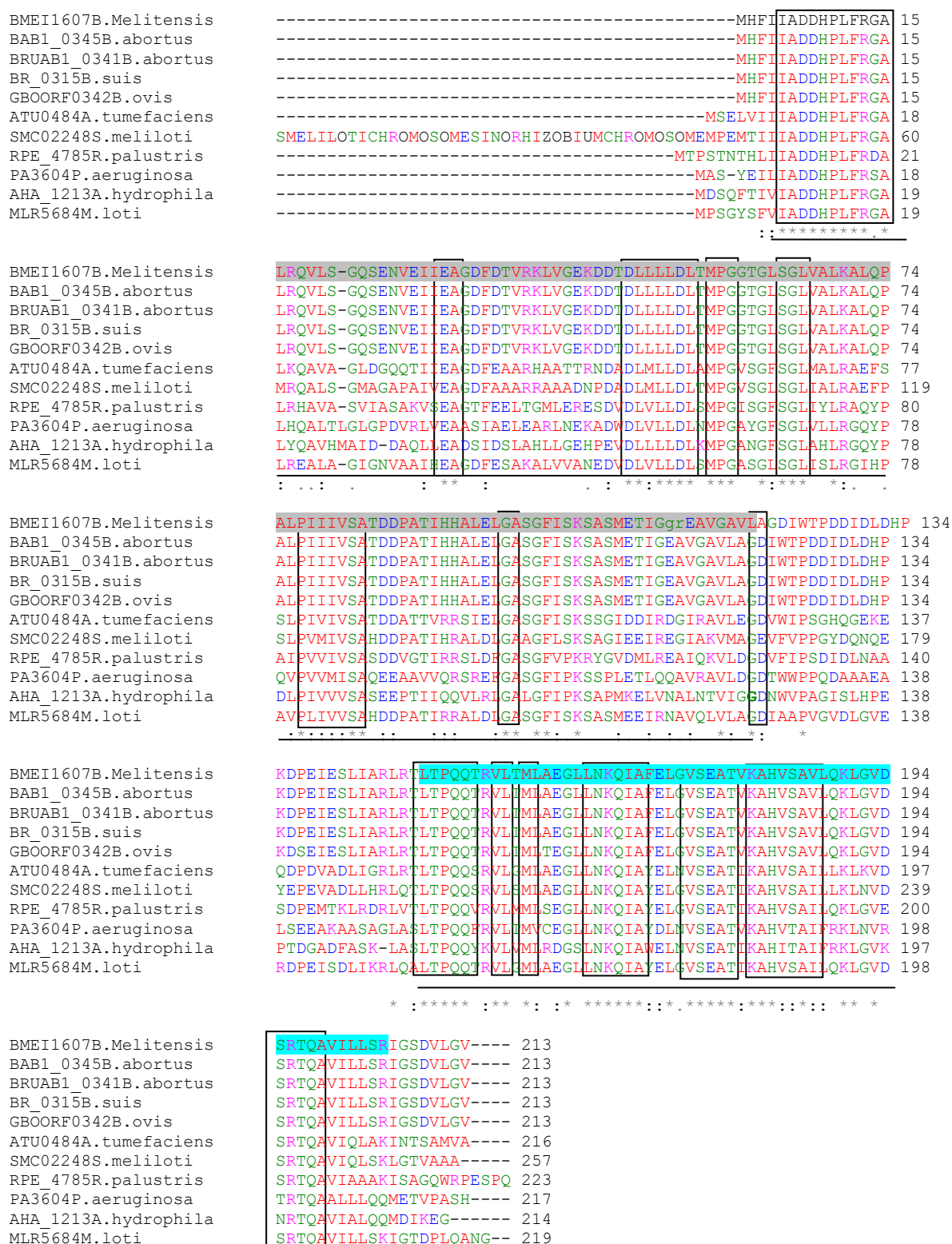


Figure A10 : Alignements multiples de séquences protéiques de PrIR avec ses homologues *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Shinorizobium meliloti*, *Rodoseudomona palustris*, *Pseudomona aureginosa*, *Aeronona hydrophila* et *mesorizobium loti*. Les résidus marqués dans le carré noir sont bien conservés dans toutes les espèces. Le domaine REC est souligné en gris et le domaine HTH en vert clair.

PARTIE VIII

BIBLIOGRAPHIE

VIII. BIBLIOGRAPHIE

- Aiba, H., Mizuno, T. and Mizushima, S., (1989). 'Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the ompF and ompC genes in Escherichia coli'. *J Biol Chem*, **264** (15):8563-8567.
- Albright, L.M., Huala, E. and Ausubel, F.M., (1989). 'Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs'. *Annu Rev Genet*, **23**:311-336.
- Alex, L.A. and Simon, M.I., (1994). 'Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes'. *Trends Genet*, **10** (4):133-138.
- Altschul, S.F., Gertz, E.M., Agarwala, R., Schaffer, A.A. and Yu, Y.K., (2009). 'PSI-BLAST pseudocounts and the minimum description length principle'. *Nucleic Acids Res*, **37** (3):815-824.
- Anand, G.S., Goudreau, P.N. and Stock, A.M., (1998). 'Activation of methylesterase CheB: evidence of a dual role for the regulatory domain'. *Biochemistry*, **37** (40):14038-14047.
- Anderson, E.S., Paulley, J.T. and Roop, R.M., 2nd, (2008). 'The AraC-like transcriptional regulator DhbR is required for maximum expression of the 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis genes in Brucella abortus 2308 in response to iron deprivation'. *J Bacteriol*, **190** (5):1838-1842.
- Anthony, R.S. and Spector, L.B., (1972). 'Phosphorylated acetate kinase. Its isolation and reactivity'. *J Biol Chem*, **247** (7):2120-2125.
- Aravind, L., Galperin, M.Y. and Koonin, E.V., (1998). 'The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold'. *Trends Biochem Sci*, **23** (4):127-129.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I. and Gorvel, J.P., (2005). 'Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival'. *Nat Immunol*, **6** (6):618-625.
- Astete, S.G. and Leigh, J.A., (1996). 'mucS, a gene involved in activation of galactoglucan (EPS II) synthesis gene expression in Rhizobium meliloti'. *Mol Plant Microbe Interact*, **9** (5):395-400.
- Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E. and Becker, A., (2008). 'Sinorhizobium meliloti regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility'. *Mol Plant Microbe Interact*, **21** (11):1498-1509.
- Bakal, C.J. and Davies, J.E., (2000). 'No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria'. *Trends Cell Biol*, **10** (1):32-38.
- Bandara, A.B., Contreras, A., Contreras-Rodriguez, A., Martins, A.M., Dobrea, V., Poff-Reichow, S., Rajasekaran, P., Sriranganathan, N., Schurig, G.G. and Boyle, S.M., (2007). 'Brucella suis urease encoded by ure1 but not ure2 is necessary for intestinal infection of BALB/c mice'. *BMC Microbiol*, **7**:57.
- Barabote, R.D. and Saier, M.H., Jr., (2005). 'Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system'. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69** (4):608-634.
- Barnett, M.J., Hung, D.Y., Reisenauer, A., Shapiro, L. and Long, S.R., (2001). 'A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in Sinorhizobium meliloti'. *J Bacteriol*, **183** (10):3204-3210.
- Baron, C., D, O.C. and Lanka, E., (2002). 'Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes'. *Mol Microbiol*, **43** (5):1359-1365.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D.S., Guzman-Verri, C., Chacon-Diaz, C., Rucavado, A., Moriyon, I. and Moreno, E., (2007). 'Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection'. *PLoS One*, **2** (7):e631.

- Batey, R.T., (2006). 'Structures of regulatory elements in mRNAs'. *Curr Opin Struct Biol*, **16** (3):299-306.
- Battesti, A. and Bouveret, E., (2009). 'Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the acyl carrier protein-SpoT interaction'. *J Bacteriol*, **191** (2):616-624.
- Becker, A., Kuster, H., Niehaus, K. and Puhler, A., (1995). 'Extension of the Rhizobium meliloti succinoglycan biosynthesis gene cluster: identification of the exsA gene encoding an ABC transporter protein, and the exsB gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis'. *Mol Gen Genet*, **249** (5):487-497.
- Bellefontaine, A.F., Pierreux, C.E., Mertens, P., Vandenhoute, J., Letesson, J.J. and De Bolle, X., (2002). 'Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in Brucella abortus'. *Mol Microbiol*, **43** (4):945-960.
- Bertram-Drogatz, P.A., Quester, I., Becker, A. and Puhler, A., (1998). 'The Sinorhizobium meliloti MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglycan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of exoH and exoY'. *Mol Gen Genet*, **257** (4):433-441.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R. and Simon, M.I., (1999). 'Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase'. *Cell*, **96** (1):131-141.
- Biondi, E.G., Skerker, J.M., Arif, M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S. and Laub, M.T., (2006). 'A phosphorelay system controls stalk biogenesis during cell cycle progression in Caulobacter crescentus'. *Mol Microbiol*, **59** (2):386-401.
- Blat, Y. and Eisenbach, M., (1994). 'Phosphorylation-dependent binding of the chemotaxis signal molecule CheY to its phosphatase, CheZ'. *Biochemistry*, **33** (4):902-906.
- Bodenmiller, D., Toh, E. and Brun, Y.V., (2004). 'Development of surface adhesion in Caulobacter crescentus'. *J Bacteriol*, **186** (5):1438-1447.
- Boel, G., Mijakovic, I., Maze, A., Poncet, S., Taha, M.K., Larribe, M., Darbon, E., Khemiri, A., Galinier, A. and Deutscher, J., (2003). 'Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria'. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **5** (4):206-215.
- Boes, T. and Neuhauser, M., (2005). 'Normalization for Affymetrix GeneChips'. *Methods Inf Med*, **44** (3):414-417.
- Bohin, J.P., (2000). 'Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria'. *FEMS Microbiol Lett*, **186** (1):11-19.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M. and Speed, T.P., (2003). 'A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias'. *Bioinformatics*, **19** (2):185-193.
- Borkovich, K.A., Kaplan, N., Hess, J.F. and Simon, M.I., (1989). 'Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent activation of phosphate group transfer'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86** (4):1208-1212.
- Boschiroli, M.L., Foulongne, V. and O'Callaghan, D., (2001). 'Brucellosis: a worldwide zoonosis'. *Curr Opin Microbiol*, **4** (1):58-64.
- Boschiroli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevielle, C., Liautard, J.P., Ramuz, M. and O'Callaghan, D., (2002). 'The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (3):1544-1549.
- Bradford, M.M., (1976). 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding'. *Anal Biochem*, **72**:248-254.

- Briggs, W.R., (2007). 'The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors'. *J Biomed Sci*, **14** (4):499-504.
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P.S. and Ugalde, R.A., (2001). 'Brucella abortus cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells'. *Infect Immun*, **69** (7):4528-4535.
- Bruckner, R. and Titgemeyer, F., (2002). 'Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization'. *FEMS Microbiol Lett*, **209** (2):141-148.
- Burbulys, D., Trach, K.A. and Hoch, J.A., (1991). 'Initiation of sporulation in B. subtilis is controlled by a multicomponent phosphorelay'. *Cell*, **64** (3):545-552.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B. and Okon, Y., (1999). 'Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of Azospirillum brasilense'. *Microbiology*, **145** (Pt 5):1145-1152.
- Burton, G.J., Hecht, G.B. and Newton, A., (1997). 'Roles of the histidine protein kinase pleC in Caulobacter crescentus motility and chemotaxis'. *J Bacteriol*, **179** (18):5849-5853.
- Caiazza, N.C., Merritt, J.H., Brothers, K.M. and O'Toole, G.A., (2007). 'Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by Pseudomonas aeruginosa PA14'. *J Bacteriol*, **189** (9):3603-3612.
- Castaneda-Roldan, E.I., Avelino-Flores, F., Dall'Agnol, M., Freer, E., Cedillo, L., Dornand, J. and Giron, J.A., (2004). 'Adherence of Brucella to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues'. *Cell Microbiol*, **6** (5):435-445.
- Castaneda-Roldan, E.I., Ouahrani-Bettache, S., Saldana, Z., Avelino, F., Rendon, M.A., Dornand, J. and Giron, J.A., (2006). 'Characterization of SP41, a surface protein of Brucella associated with adherence and invasion of host epithelial cells'. *Cell Microbiol*, **8** (12):1877-1887.
- Celli, J., (2006). 'Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella'. *Res Microbiol*, **157** (2):93-98.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. and Gorvel, J.P., (2003). 'Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum'. *J Exp Med*, **198** (4):545-556.
- Celli, J., Salcedo, S.P. and Gorvel, J.P., (2005). 'Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102** (5):1673-1678.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U. and Schirmer, T., (2004). 'Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101** (49):17084-17089.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. and Meyerowitz, E.M., (1993). 'Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators'. *Science*, **262** (5133):539-544.
- Chang, C.H., Zhu, J. and Winans, S.C., (1996). 'Pleiotropic phenotypes caused by genetic ablation of the receiver module of the Agrobacterium tumefaciens VirA protein'. *J Bacteriol*, **178** (15):4710-4716.
- Charles, T.C. and Nester, E.W., (1993). 'A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of Agrobacterium tumefaciens'. *J Bacteriol*, **175** (20):6614-6625.
- Chen, E.J., Sabio, E.A. and Long, S.R., (2008). 'The periplasmic regulator ExoR inhibits ExoS/ChvI two-component signalling in Sinorhizobium meliloti'. *Mol Microbiol*, **69** (5):1290-1303.
- Cheng, H.P. and Walker, G.C., (1998). 'Succinoglycan production by Rhizobium meliloti is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system'. *J Bacteriol*, **180** (1):20-26.

- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. and Jenal, U., (2005). 'Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP'. *J Biol Chem*, **280** (35):30829-30837.
- Cloeckaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G. and Limet, J.N., (1990). 'Identification of seven surface-exposed Brucella outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay'. *Infect Immun*, **58** (12):3980-3987.
- Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S., Nicolle, J.C., Dubray, G. and Limet, J.N., (1992). 'O-chain expression in the rough Brucella melitensis strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy'. *J Gen Microbiol*, **138** (6):1211-1219.
- Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P. and Ugalde, R.A., (2001). 'Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole'. *Cell Microbiol*, **3** (3):159-168.
- Corbel, M.J., (1997). 'Brucellosis: an overview'. *Emerg Infect Dis*, **3** (2):213-221.
- Corbel, M.J. and Hendry, D.M., (1985). 'Urease activity of Brucella species'. *Res Vet Sci*, **38** (2):252-253.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P., (1999). 'Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections'. *Science*, **284** (5418):1318-1322.
- Dahl, M.K., Msadek, T., Kunst, F. and Rapoport, G., (1992). 'The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in Bacillus subtilis'. *J Biol Chem*, **267** (20):14509-14514.
- de Jong, M.F., Sun, Y.H., den Hartigh, A.B., van Dijk, J.M. and Tsolis, R.M., (2008). 'Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system'. *Mol Microbiol*, **70** (6):1378-1396.
- Delory, M., Hallez, R., Letesson, J.J. and De Bolle, X., (2006). 'An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in Brucella melitensis 16M'. *J Bacteriol*, **188** (21):7707-7710.
- Delrue, R.M., Deschamps, C., Leonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J.M., Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor, A., De Bolle, X. and Letesson, J.J., (2005). 'A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of Brucella melitensis'. *Cell Microbiol*, **7** (8):1151-1161.
- Delrue, R.M., Lestrade, P., Tibor, A., Letesson, J.J. and De Bolle, X., (2004). 'Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens'. *FEMS Microbiol Lett*, **231** (1):1-12.
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P. and Letesson, J.J., (2001). 'Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking'. *Cell Microbiol*, **3** (7):487-497.
- DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. and Mijer, C.V., (2002). 'The genome of Brucella melitensis'. *Vet Microbiol*, **90** (1-4):587-592.
- Detilleux, P.G., Deyoe, B.L. and Cheville, N.F., (1990). 'Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro'. *Infect Immun*, **58** (7):2320-2328.
- Deutscher, J., Francke, C. and Postma, P.W., (2006). 'How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria'. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70** (4):939-1031.
- Dorrell, N., Guigue-Talet, P., Spencer, S., Foulonge, V., O'Callaghan, D. and Wren, B.W., (1999). 'Investigation into the role of the response regulator NtrC in the metabolism and virulence of Brucella suis'. *Microb Pathog*, **27** (1):1-11.

- Dorrell, N., Spencer, S., Foulonge, V., Guigue-Talet, P., O'Callaghan, D. and Wren, B.W., (1998). 'Identification, cloning and initial characterisation of FeuPQ in *Brucella suis*: a new sub-family of two-component regulatory systems'. *FEMS Microbiol Lett*, **162** (1):143-150.
- Dozot, M., (2007). 'On the role of two global regulation systems, stringent response and PTS, in *Brucella melitensis* 16M'. *Biologie*. Namur: FUNDP.
- Dozot, M., Boigegrain, R.A., Delrue, R.M., Hallez, R., Ouahrani-Bettache, S., Danese, I., Letesson, J.J., De Bolle, X. and Kohler, S., (2006). 'The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB'. *Cell Microbiol*, **8** (11):1791-1802.
- Dricot, A., Rual, J.F., Lamesch, P., Bertin, N., Dupuy, D., Hao, T., Lambert, C., Hallez, R., Delroisse, J.M., Vandenhoute, J., Lopez-Goni, I., Moriyon, I., Garcia-Lobo, J.M., Sangari, F.J., Macmillan, A.P., Cutler, S.J., Whatmore, A.M., Bozak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Vidal, M., Hill, D.E., Letesson, J.J. and De Bolle, X., (2004). 'Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1'. *Genome Res*, **14** (10B):2201-2206.
- Dubey, A.K., Baker, C.S., Suzuki, K., Jones, A.D., Pandit, P., Romeo, T. and 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** (15):4450-4460.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B. and Jenal, U., (2009). 'Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression'. *Genes Dev*, **23** (1):93-104.
- Eggenhofer, E., Rachel, R., Haslbeck, M. and Scharf, B., (2006). 'MotD of *Sinorhizobium meliloti* and related alpha-proteobacteria is the flagellar-hook-length regulator and therefore reassigned as FliK'. *J Bacteriol*, **188** (6):2144-2153.
- Ekaza, E., Guilloteau, L., Teyssier, J., Liautard, J.P. and Kohler, S., (2000). 'Functional analysis of the ClpATPase ClpA of *Brucella suis*, and persistence of a knockout mutant in BALB/c mice'. *Microbiology*, **146** (Pt 7):1605-1616.
- Ekaza, E., Teyssier, J., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P. and Kohler, S., (2001). 'Characterization of *Brucella suis* clpB and clpAB mutants and participation of the genes in stress responses'. *J Bacteriol*, **183** (8):2677-2681.
- Elzer, P.H., Phillips, R.W., Kovach, M.E., Peterson, K.M. and Roop, R.M., 2nd, (1994). 'Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant'. *Infect Immun*, **62** (10):4135-4139.
- Endley, S., McMurray, D. and Ficht, T.A., (2001). 'Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection'. *J Bacteriol*, **183** (8):2454-2462.
- Enright, F.M., Araya, L.N., Elzer, P.H., Rowe, G.E. and Winter, A.J., (1990). 'Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*'. *Vet Immunol Immunopathol*, **26** (2):171-182.
- Essenberg, R.C., Seshadri, R., Nelson, K. and Paulsen, I., (2002). 'Sugar metabolism by *Brucellae*'. *Vet Microbiol*, **90** (1-4):249-261.
- Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Martin, B.M., Cummins, D.R. and Miller, W.G., (1994). 'Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)'. *J Vet Diagn Invest*, **6** (4):448-452.
- Fabret, C., Feher, V.A. and Hoch, J.A., (1999). 'Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world'. *J Bacteriol*, **181** (7):1975-1983.

- Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J. and Guiney, D.G., (1992). 'The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates Salmonella virulence'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** (24):11978-11982.
- Ficht, T.A., (2002). 'Discovery of Brucella virulence mechanisms using mutational analysis'. *Vet Microbiol*, **90** (1-4):311-315.
- Ficht, T.A., (2003). 'Intracellular survival of Brucella: defining the link with persistence'. *Vet Microbiol*, **92** (3):213-223.
- Fiedler, U. and Weiss, V., (1995). 'A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules'. *Embo J*, **14** (15):3696-3705.
- Fontes, P., Alvarez-Martinez, M.T., Gross, A., Carnaud, C., Kohler, S. and Liautard, J.P., (2005). 'Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with Brucella suis'. *Infect Immun*, **73** (10):6229-6236.
- Foster, J.T., Beckstrom-Sternberg, S.M., Pearson, T., Beckstrom-Sternberg, J.S., Chain, P.S., Roberto, F.F., Hnath, J., Brettin, T. and Keim, P., (2009). 'Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus Brucella'. *J Bacteriol*, **191** (8):2864-2870.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieuille, C., Michaux-Charachon, S. and O'Callaghan, D., (2000). 'Identification of Brucella suis genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis'. *Infect Immun*, **68** (3):1297-1303.
- Fretin, D., (2003). 'Etude de gènes apparentés au système flagellaire chez brucella sp.' *Biology*. Namur: FUNDP.
- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Vandenhoute, J., Tibor, A., DeBolle, X. and Letesson, J.J., (2005). 'The sheathed flagellum of Brucella melitensis is involved in persistence in a murine model of infection'. *Cell Microbiol*, **7** (5):687-698.
- Fuqua, C., Parsek, M.R. and Greenberg, E.P., (2001). 'Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing'. *Annu Rev Genet*, **35**:439-468.
- Garrett, E.S., Perlegas, D. and Wozniak, D.J., (1999). 'Negative control of flagellum synthesis in Pseudomonas aeruginosa is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU)'. *J Bacteriol*, **181** (23):7401-7404.
- Gegner, J.A., Graham, D.R., Roth, A.F. and Dahlquist, F.W., (1992). 'Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway'. *Cell*, **70** (6):975-982.
- Godfroid, J., (2002). 'Brucellosis in wildlife'. *Rev Sci Tech*, **21** (2):277-286.
- Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B. and Letesson, J.J., (2005). 'From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis'. *Vet Res*, **36** (3):313-326.
- Godfroid, J. and Kasbohrer, A., (2002). 'Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century'. *Vet Microbiol*, **90** (1-4):135-145.
- Goller, C., Wang, X., Itoh, Y. and Romeo, T., (2006). 'The cation-responsive protein NhaR of Escherichia coli activates pgaABCD transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine'. *J Bacteriol*, **188** (23):8022-8032.
- Gonzalez, J.E. and Keshavan, N.D., (2006). 'Messing with bacterial quorum sensing'. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70** (4):859-875.

- Gorvel, J.P., (2008). 'Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll'. *Microbes Infect*, **10** (9):1010-1013.
- Gorvel, J.P. and Moreno, E., (2002). 'Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication'. *Vet Microbiol*, **90** (1-4):281-297.
- Gottesman, S., (2003). 'Proteolysis in bacterial regulatory circuits'. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**:565-587.
- Greaves, D.R. and Gordon, S., (2005). 'Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors'. *J Lipid Res*, **46** (1):11-20.
- Grimsley, J.K., Tjalkens, R.B., Strauch, M.A., Bird, T.H., Spiegelman, G.B., Hostomsky, Z., Whiteley, J.M. and Hoch, J.A., (1994). 'Subunit composition and domain structure of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*'. *J Biol Chem*, **269** (24):16977-16982.
- Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P. and Dornand, J., (2000). 'In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells'. *Infect Immun*, **68** (1):342-351.
- Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E., von Eichel-Streiber, C., Lopez-Goni, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.P. and Moreno, E., (2001). 'GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42'. *J Biol Chem*, **276** (48):44435-44443.
- Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckert, A., Garin, J., Gorvel, J.P., Moriyon, I., Moreno, E. and Lopez-Goni, I., (2002). 'The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (19):12375-12380.
- Haine, V., Sinon, A., Van Steen, F., Rousseau, S., Dozot, M., Lestrade, P., Lambert, C., Letesson, J.J. and De Bolle, X., (2005). 'Systematic targeted mutagenesis of *Brucella melitensis* 16M reveals a major role for GntR regulators in the control of virulence'. *Infect Immun*, **73** (9):5578-5586.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P., (2002). 'Developmental regulation of microbial biofilms'. *Curr Opin Biotechnol*, **13** (3):228-233.
- Hallez, R., Bellefontaine, A.F., Letesson, J.J. and De Bolle, X., (2004). 'Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria'. *Trends Microbiol*, **12** (8):361-365.
- Hallez, R., Mignolet, J., Van Mullem, V., Wery, M., Vandenhaute, J., Letesson, J.J., Jacobs-Wagner, C. and De Bolle, X., (2007). 'The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*'. *Embo J*, **26** (5):1444-1455.
- Halling, S.M., Peterson-Burch, B.D., Bricker, B.J., Zuerner, R.L., Qing, Z., Li, L.L., Kapur, V., Alt, D.P. and Olsen, S.C., (2005). 'Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*'. *J Bacteriol*, **187** (8):2715-2726.
- Harbison, C.T., Gordon, D.B., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D., Danford, T.W., Hannett, N.M., Tagne, J.B., Reynolds, D.B., Yoo, J., Jennings, E.G., Zeitlinger, J., Pokholok, D.K., Kellis, M., Rolfe, P.A., Takusagawa, K.T., Lander, E.S., Gifford, D.K., Fraenkel, E. and Young, R.A., (2004). 'Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome'. *Nature*, **431** (7004):99-104.
- Hengge, R., (2009). 'Principles of c-di-GMP signalling in bacteria'. *Nat Rev Microbiol*, **7** (4):263-273.
- Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N. and Simon, M.I., (1988). 'Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis'. *Cell*, **53** (1):79-87.
- Hoch JA, S.T., (1995). 'Two-Component Signal Transduction'.p.488.

- Hong, P.C., Tsois, R.M. and Ficht, T.A., (2000). 'Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice'. *Infect Immun*, **68** (7):4102-4107.
- Hu, K.Y. and Saier, M.H., Jr., (2002). 'Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system'. *Res Microbiol*, **153** (7):405-415.
- Hua, J., Chang, C., Sun, Q. and Meyerowitz, E.M., (1995). 'Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene'. *Science*, **269** (5231):1712-1714.
- Huang, J., Carney, B.F., Denny, T.P., Weissinger, A.K. and Schell, M.A., (1995). 'A complex network regulates expression of *eps* and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*'. *J Bacteriol*, **177** (5):1259-1267.
- Huang, J. and Schell, M., (1995). 'Molecular characterization of the *eps* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum* and its transcriptional regulation at a single promoter'. *Mol Microbiol*, **16** (5):977-989.
- Hurley, J.H., Dean, A.M., Sohl, J.L., Koshland, D.E., Jr. and Stroud, R.M., (1990). 'Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site'. *Science*, **249** (4972):1012-1016.
- Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B. and Speed, T.P., (2003a). 'Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data'. *Nucleic Acids Res*, **31** (4):e15.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. and Speed, T.P., (2003b). 'Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data'. *Biostatistics*, **4** (2):249-264.
- Ishida, M.L., Assumpcao, M.C., Machado, H.B., Benelli, E.M., Souza, E.M. and Pedrosa, F.O., (2002). 'Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*'. *Braz J Med Biol Res*, **35** (6):651-661.
- Island, M.D., Wei, B.Y. and Kadner, R.J., (1992). 'Structure and function of the *uhp* genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*'. *J Bacteriol*, **174** (9):2754-2762.
- Jacob, J., Hort, G.M., Overhoff, P. and Mielke, M.E., (2006). 'In vitro and in vivo characterization of smooth small colony variants of *Brucella abortus* S19'. *Microbes Infect*, **8** (2):363-371.
- Jacobs, C., Ausmees, N., Cordwell, S.J., Shapiro, L. and Laub, M.T., (2003). 'Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control'. *Mol Microbiol*, **47** (5):1279-1290.
- Jacobs, C., Domian, I.J., Maddock, J.R. and Shapiro, L., (1999). 'Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division'. *Cell*, **97** (1):111-120.
- Jenal, U., (2004). 'Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria?' *Curr Opin Microbiol*, **7** (2):185-191.
- Jencks, W.P., (1980). 'The utilization of binding energy in coupled vectorial processes'. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **51**:75-106.
- Jiang, X., Leonard, B., Benson, R. and Baldwin, C.L., (1993). 'Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide'. *Cell Immunol*, **151** (2):309-319.
- John G, T.D.C.L., (2007). 'Biofilms: architects of disease.' In: In: Connie R.M., D.C.L., George M., editors (ed). *Textbook of diagnostic microbiology*: Saunders.
- Johnson, L.N. and O'Reilly, M., (1996). 'Control by phosphorylation'. *Curr Opin Struct Biol*, **6** (6):762-769.
- Jonas, K., Melefors, O. and Romling, U., (2009). 'Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms'. *Future Microbiol*, **4**:341-358.
- Jones, S.E., Ferguson, N.L. and Alley, M.R., (2001). 'New members of the *ctrA* regulon: the major chemotaxis operon in *Caulobacter* is CtrA dependent'. *Microbiology*, **147** (Pt 4):949-958.

- Jourlin, C., Bengrine, A., Chippaux, M. and Mejean, V., (1996). 'An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N-oxide in *Escherichia coli*'. *Mol Microbiol*, **20** (6):1297-1306.
- Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J.M., Lazzaroni, J.C., Lejeune, P. and Dorel, C., (2005). 'CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*'. *J Bacteriol*, **187** (6):2038-2049.
- Jubier-Maurin, V., Rodrigue, A., Ouahrani-Bettache, S., Layssac, M., Mandrand-Berthelot, M.A., Kohler, S. and Liautard, J.P., (2001). 'Identification of the nik gene cluster of *Brucella suis*: regulation and contribution to urease activity'. *J Bacteriol*, **183** (2):426-434.
- Jung, H., (2001). 'Towards the molecular mechanism of Na(+)/solute symport in prokaryotes'. *Biochim Biophys Acta*, **1505** (1):131-143.
- Jung, K. and Altendorf, K., (1998). 'Individual substitutions of clustered arginine residues of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* modulate the ratio of kinase to phosphatase activity'. *J Biol Chem*, **273** (41):26415-26420.
- Kahn, D. and Ditta, G., (1991). 'Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors'. *Mol Microbiol*, **5** (4):987-997.
- Kamberov, E.S., Atkinson, M.R., Chandran, P. and Ninfa, A.J., (1994a). 'Effect of mutations in *Escherichia coli* glnL (ntrB), encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation'. *J Biol Chem*, **269** (45):28294-28299.
- Kamberov, E.S., Atkinson, M.R., Feng, J., Chandran, P. and Ninfa, A.J., (1994b). 'Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation'. *Cell Mol Biol Res*, **40** (3):175-191.
- Kapfhammer, D., Karatan, E., Pflughoeft, K.J. and Watnick, P.I., (2005). 'Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities'. *Appl Environ Microbiol*, **71** (7):3840-3847.
- Karatan, E. and Watnick, P., (2009). 'Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms'. *Microbiol Mol Biol Rev*, **73** (2):310-347.
- Karmirantzou, M. and Hamodrakas, S.J., (2001). 'A Web-based classification system of DNA-binding protein families'. *Protein Eng*, **14** (7):465-472.
- Kato, M., Mizuno, T., Shimizu, T. and Hakoshima, T., (1997). 'Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPT domain of ArcB'. *Cell*, **88** (5):717-723.
- Keener, J. and Kustu, S., (1988). 'Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85** (14):4976-4980.
- Kelly, A.J., Sackett, M.J., Din, N., Quardokus, E. and Brun, Y.V., (1998). 'Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*'. *Genes Dev*, **12** (6):880-893.
- Kim, H.M., Ryou, S.M., Song, W.S., Sim, S.H., Cha, C.J., Han, S.H., Ha, N.C., Kim, J.H., Bae, J., Cunningham, P.R. and Lee, K., (2009). 'Genetic analysis of the invariant residue G791 in *Escherichia coli* 16S rRNA implicates RelA in ribosome function'. *J Bacteriol*, **191** (7):2042-2050.
- Kim, J.A., Sha, Z. and Mayfield, J.E., (2000). 'Regulation of *Brucella abortus* catalase'. *Infect Immun*, **68** (7):3861-3866.
- Kim, S., Watarai, M., Kondo, Y., Erdenebaatar, J., Makino, S. and Shirahata, T., (2003). 'Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells'. *Infect Immun*, **71** (6):3020-3027.
- Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T. and Shirahata, T., (2004). 'Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*'. *Microb Pathog*, **37** (1):11-19.

- Kim, T.J., Young, B.M. and Young, G.M., (2008). 'Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation'. *Appl Environ Microbiol*, **74** (17):5466-5474.
- Kirov, S.M., (1974). 'An anti-theta sensitive hapten-carrier response in nude mice'. *Eur J Immunol*, **4** (11):739-745.
- Kirov, S.M., (2003). 'Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis'. *FEMS Microbiol Lett*, **224** (2):151-159.
- Kohler, S., Ekaza, E., Paquet, J.Y., Walravens, K., Teyssier, J., Godfroid, J. and Liautard, J.P., (2002a). 'Induction of *dnaK* through its native heat shock promoter is necessary for intramacrophagic replication of *Brucella suis*'. *Infect Immun*, **70** (3):1631-1634.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M. and Liautard, J.P., (2002b). 'The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (24):15711-15716.
- Kohler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M. and Liautard, J.P., (2003). 'What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*?' *Trends Microbiol*, **11** (5):215-219.
- Kohler, S., Porte, F., Jubier-Maurin, V., Ouahrani-Bettache, S., Teyssier, J. and Liautard, J.P., (2002c). 'The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response'. *Vet Microbiol*, **90** (1-4):299-309.
- Korber, D.R., Lawrence, J.R. and Caldwell, D.E., (1994). 'Effect of Motility on Surface Colonization and Reproductive Success of *Pseudomonas fluorescens* in Dual-Dilution Continuous Culture and Batch Culture Systems'. *Appl Environ Microbiol*, **60** (5):1421-1429.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M., 2nd and Peterson, K.M., (1994). 'pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector'. *Biotechniques*, **16** (5):800-802.
- Kuchma, S.L., Brothers, K.M., Merritt, J.H., Liberati, N.T., Ausubel, F.M. and O'Toole, G.A., (2007). 'BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14'. *J Bacteriol*, **189** (22):8165-8178.
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L., Chelsky, D., Moriyon, I., Moreno, E. and Paramithiotis, E., (2007). 'Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*'. *J Proteome Res*, **6** (4):1519-1529.
- Lamontagne, J., Forest, A., Marazzo, E., Denis, F., Butler, H., Michaud, J.F., Boucher, L., Pedro, I., Villeneuve, A., Sitnikov, D., Trudel, K., Nassif, N., Boudjelti, D., Tomaki, F., Chaves-Olarte, E., Guzman-Verri, C., Brunet, S., Cote-Martin, A., Hunter, J., Moreno, E. and Paramithiotis, E., (2009). 'Intracellular adaptation of *Brucella abortus*'. *J Proteome Res*, **8** (3):1594-1609.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P., (2005). '*Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor'. *Curr Opin Microbiol*, **8** (1):60-66.
- Laub, M.T., Biondi, E.G. and Skerker, J.M., (2007). 'Phosphotransfer profiling: systematic mapping of two-component signal transduction pathways and phosphorelays'. *Methods Enzymol*, **423**:531-548.
- Lauriano, C.M., Ghosh, C., Correa, N.E. and Klose, K.E., (2004). 'The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*'. *J Bacteriol*, **186** (15):4864-4874.
- Lazazzera, B.A., (2000). 'Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase'. *Curr Opin Microbiol*, **3** (2):177-182.
- Lee, C.R., Koo, B.M., Cho, S.H., Kim, Y.J., Yoon, M.J., Peterkofsky, A. and Seok, Y.J., (2005). 'Requirement of the dephospho-form of enzyme IANtr for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression'. *Mol Microbiol*, **58** (1):334-344.

- Leonard, S., Ferooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X. and Letesson, J.J., (2007). 'FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in Rhizobiaceae'. *J Bacteriol*, **189** (1):131-141.
- Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Didembourg, C., Taminiau, B., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Tang, C.M. and Letesson, J.J., (2000). 'Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*'. *Mol Microbiol*, **38** (3):543-551.
- Lestrade, P., Dricot, A., Delrue, R.M., Lambert, C., Martinelli, V., De Bolle, X., Letesson, J.J. and Tibor, A., (2003). 'Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice'. *Infect Immun*, **71** (12):7053-7060.
- Letesson, X.D.B.a.J.J., (2004). ' *Brucella* Virulence: A Matter of Control *Brucella Moleculaire and Cellular Biology*'. In: Ignacio López-Goñi and Ignacio Moryón Universidad de Navarra, P., Spain (ed): Horizon Boiscience.
- Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A. and Booth, I.R., (1999). 'Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity'. *Embo J*, **18** (7):1730-1737.
- Li, H., Xu, L., Wang, J., Wen, Y., Vuong, C., Otto, M. and Gao, Q., (2005). 'Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the *ica* locus encoding production of biofilm exopolysaccharide'. *Infect Immun*, **73** (5):3188-3191.
- Li, J., Swanson, R.V., Simon, M.I. and Weis, R.M., (1995). 'The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA'. *Biochemistry*, **34** (45):14626-14636.
- Lies, M. and Maurizi, M.R., (2008). 'Turnover of endogenous SsrA-tagged proteins mediated by ATP-dependent proteases in *Escherichia coli*'. *J Biol Chem*, **283** (34):22918-22929.
- Lloret, J., Martin, M., Oruezabal, R.I., Bonilla, I. and Rivilla, R., (2002). 'MucR and mucS activate *exp* genes transcription and galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1'. *Mol Plant Microbe Interact*, **15** (1):54-59.
- Loewen, P.C. and Hengge-Aronis, R., (1994). 'The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation'. *Annu Rev Microbiol*, **48**:53-80.
- Loh, J., Garcia, M. and Stacey, G., (1997). 'NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*'. *J Bacteriol*, **179** (9):3013-3020.
- Lois, A.F., Ditta, G.S. and Helinski, D.R., (1993a). 'The oxygen sensor FixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments'. *J Bacteriol*, **175** (4):1103-1109.
- Lois, A.F., Weinstein, M., Ditta, G.S. and Helinski, D.R., (1993b). 'Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen'. *J Biol Chem*, **268** (6):4370-4375.
- Lopez-Goni, I., Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyon, I. and Moreno, E., (2002). 'Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS'. *Vet Microbiol*, **90** (1-4):329-339.
- Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M. and Stock, J.B., (1992). 'Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** (2):718-722.
- Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M. and Thornton, J.M., (2000). 'An overview of the structures of protein-DNA complexes'. *Genome Biol*, **1** (1):REVIEWS001.
- Ly, A., Henderson, J., Lu, A., Culham, D.E. and Wood, J.M., (2004). 'Osmoregulatory systems of *Escherichia coli*: identification of betaine-carnitine-choline transporter family member BetU

- and distributions of betU and trkG among pathogenic and nonpathogenic isolates'. *J Bacteriol*, **186** (2):296-306.
- MacFarlane, S.A. and Merrick, M., (1985). 'The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene ntrB and the glnA-ntrBC intergenic region of Klebsiella pneumoniae'. *Nucleic Acids Res*, **13** (21):7591-7606.
- Magnusson, L.U., Farewell, A. and Nystrom, T., (2005). 'ppGpp: a global regulator in Escherichia coli'. *Trends Microbiol*, **13** (5):236-242.
- Mahmood, N.A., Biemans-Oldehinkel, E., Patzlaff, J.S., Schuurman-Wolters, G.K. and Poolman, B., (2006). 'Ion specificity and ionic strength dependence of the osmoregulatory ABC transporter OpuA'. *J Biol Chem*, **281** (40):29830-29839.
- Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D.S., Koch, M.H., Howe, J., Brandenburg, K. and Lopez-Goni, I., (2005). 'The lipopolysaccharide of Brucella abortus BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides'. *J Bacteriol*, **187** (16):5631-5639.
- Matsukawa, M. and Greenberg, E.P., (2004). 'Putative exopolysaccharide synthesis genes influence Pseudomonas aeruginosa biofilm development'. *J Bacteriol*, **186** (14):4449-4456.
- Maurin, M., (2005). '[Brucellosis at the dawn of the 21st century]'. *Med Mal Infect*, **35** (1):6-16.
- McAdams, H.H., Srinivasan, B. and Arkin, A.P., (2004). 'The evolution of genetic regulatory systems in bacteria'. *Nat Rev Genet*, **5** (3):169-178.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T. and Epstein, W., (1994). 'Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of Escherichia coli'. *J Biol Chem*, **269** (3):1911-1917.
- Mendez-Ortiz, M.M., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Membrillo-Hernandez, J., (2006). 'Genome-wide transcriptional profile of Escherichia coli in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid'. *J Biol Chem*, **281** (12):8090-8099.
- Merritt, J.H., Brothers, K.M., Kuchma, S.L. and O'Toole, G.A., (2007). 'SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function'. *J Bacteriol*, **189** (22):8154-8164.
- Miller, J.H., (1972). 'Assay of beta-galactosidase'. In: New York: Cold Spring Harbor, N.Y. (ed).
- Milner, J.L., McClellan, D.J. and Wood, J.M., (1987). 'Factors reducing and promoting the effectiveness of proline as an osmoprotectant in Escherichia coli K12'. *J Gen Microbiol*, **133** (7):1851-1860.
- Minton, A.P., (2006). 'How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes?' *J Cell Sci*, **119** (Pt 14):2863-2869.
- Mizuno, T., (1997). 'Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of Escherichia coli'. *DNA Res*, **4** (2):161-168.
- Mizuno, T., (1998). 'His-Asp phosphotransfer signal transduction'. *J Biochem*, **123** (4):555-563.
- Mizuno, T., Kaneko, T. and Tabata, S., (1996). 'Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, Synechocystis sp. strain PCC 6803'. *DNA Res*, **3** (6):407-414.
- Moorthy, S. and Watnick, P.I., (2004). 'Genetic evidence that the Vibrio cholerae monolayer is a distinct stage in biofilm development'. *Mol Microbiol*, **52** (2):573-587.
- Moorthy, S. and Watnick, P.I., (2005). 'Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of Vibrio cholerae biofilm development'. *Mol Microbiol*, **57** (6):1623-1635.
- Moreno, E. and Moriyon, I., (2002). 'Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (1):1-3.

- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. and Mayer, H., (1990). 'Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria'. *J Bacteriol*, **172** (7):3569-3576.
- Moreno, E.M., I (2001). 'The genus Brucella. In The Procaryotes'. In: Doworkin, M.F., S., Rosemberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E., (Eds) (ed): Springer, New York.
- Moreno, E.M., I (2006). 'The genus Brucella. In The Procaryotes '. In: Doworkin, M.F., S., Rosemberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E., (ed): Springer, New York.
- Morera, S., Chiadmi, M., LeBras, G., Lascu, I. and Janin, J., (1995). 'Mechanism of phosphate transfer by nucleoside diphosphate kinase: X-ray structures of the phosphohistidine intermediate of the enzymes from Drosophila and Dictyostelium'. *Biochemistry*, **34** (35):11062-11070.
- Munro, A.W., Ritchie, G.Y., Lamb, A.J., Douglas, R.M. and Booth, I.R., (1991). 'The cloning and DNA sequence of the gene for the glutathione-regulated potassium-efflux system KefC of Escherichia coli'. *Mol Microbiol*, **5** (3):607-616.
- Nadon, C.A., Bowen, B.M., Wiedmann, M. and Boor, K.J., (2002). 'Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in Listeria monocytogenes'. *Infect Immun*, **70** (7):3948-3952.
- Naismith, J.H. and Field, R.A., (1996). 'Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A'. *J Biol Chem*, **271** (2):972-976.
- Nambu, T. and Kutsukake, K., (2000). 'The Salmonella FlgA protein, a putativeve periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation'. *Microbiology*, **146** (Pt 5):1171-1178.
- Naroeni, A. and Porte, F., (2002). 'Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of Brucella suis in murine macrophages'. *Infect Immun*, **70** (3):1640-1644.
- Nather, D.J., Rachel, R., Wanner, G. and Wirth, R., (2006). 'Flagella of Pyrococcus furiosus: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts'. *J Bacteriol*, **188** (19):6915-6923.
- Ninfa, A.J. and Magasanik, B., (1986). 'Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83** (16):5909-5913.
- Ninfa, E.G., Stock, A., Mowbray, S. and Stock, J., (1991). 'Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components'. *J Biol Chem*, **266** (15):9764-9770.
- Nixon, B.T., Ronson, C.W. and Ausubel, F.M., (1986). 'Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83** (20):7850-7854.
- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. and Ramuz, M., (1999). 'A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis'. *Mol Microbiol*, **33** (6):1210-1220.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R., (1998a). 'Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development'. *Mol Microbiol*, **30** (2):295-304.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R., (1998b). 'Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis'. *Mol Microbiol*, **28** (3):449-461.
- Ohlsen, K.L., Grimsley, J.K. and Hoch, J.A., (1994). 'Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91** (5):1756-1760.
- Oliveira, S.C., de Oliveira, F.S., Macedo, G.C., de Almeida, L.A. and Carvalho, N.B., (2008). 'The role of innate immune receptors in the control of Brucella abortus infection: toll-like receptors and beyond'. *Microbes Infect*, **10** (9):1005-1009.

- Osada, Y., Saito, R. and Tomita, M., (1999). 'Analysis of base-pairing potentials between 16S rRNA and 5' UTR for translation initiation in various prokaryotes'. *Bioinformatics*, **15** (7-8):578-581.
- Osteras, M. and Jenal, U., (2000). 'Regulatory circuits in *Caulobacter*'. *Curr Opin Microbiol*, **3** (2):171-176.
- Pan, S.Q., Charles, T., Jin, S., Wu, Z.L. and Nester, E.W., (1993). 'Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant--*Agrobacterium* signal transduction'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90** (21):9939-9943.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M. and Tsianos, E., (2005). 'Brucellosis'. *N Engl J Med*, **352** (22):2325-2336.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. and Tsianos, E.V., (2006). 'The new global map of human brucellosis'. *Lancet Infect Dis*, **6** (2):91-99.
- Park, H. and Inouye, M., (1997). 'Mutational analysis of the linker region of EnvZ, an osmosensor in *Escherichia coli*'. *J Bacteriol*, **179** (13):4382-4390.
- Parkinson, J.S. and Kofoed, E.C., (1992). 'Communication modules in bacterial signaling proteins'. *Annu Rev Genet*, **26**:71-112.
- Parks, R.E., Jr., Brown, P.R., Cheng, Y.C., Agarwal, K.C., Kong, C.M., Agarwal, R.P. and Parks, C.C., (1973). 'Purine metabolism in primitive erythrocytes'. *Comp Biochem Physiol B*, **45** (2):355-364.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M. and Fraser, C.M., (2002). 'The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (20):13148-13153.
- Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K.M., Djavakhishvili, T., Glaser, P. and Hoch, J.A., (1994). 'Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*'. *Cell*, **79** (6):1047-1055.
- Perez-Rueda, E. and Collado-Vides, J., (2000). 'The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12'. *Nucleic Acids Res*, **28** (8):1838-1847.
- Pesavento, C. and Hengge, R., (2009). 'Bacterial nucleotide-based second messengers'. *Curr Opin Microbiol*, **12** (2):170-176.
- Petsko, D.R.a.G.A., (2007). 'Protein Structure and Funtion'. In: Ltd, N.S.P. (ed). *Sequence an Funtion*
- Phillips, R.W., Elzer, P.H., Robertson, G.T., Hagius, S.D., Walker, J.V., Fatemi, M.B., Enright, F.M. and Roop, R.M., 2nd, (1997). 'A *Brucella melitensis* high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant is attenuated in goats and protects against abortion'. *Res Vet Sci*, **63** (2):165-167.
- Phillips, R.W., Elzer, P.H. and Roop, R.M., II, (1995). 'A *Brucella melitensis* high temperature requirement A (htrA) deletion mutant demonstrates a stress response defective phenotype in vitro and transient attenuation in the BALB/c mouse model'. *Microb Pathog*, **19** (5):227-284.
- Phillips, R.W. and Roop, R.M., 2nd, (2001). 'Brucella abortus HtrA functions as an authentic stress response protease but is not required for wild-type virulence in BALB/c mice'. *Infect Immun*, **69** (9):5911-5913.
- Picard, F., Dressaire, C., Girbal, L. and Coccagn-Bousquet, M., (2009). 'Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology'. *C R Biol*, **332** (11):958-973.

- Pichon, C. and Felden, B., (2007). 'Proteins that interact with bacterial small RNA regulators'. *FEMS Microbiol Rev*, **31** (5):614-625.
- Pickart, C.M. and Jencks, W.P., (1984). 'Energetics of the calcium-transporting ATPase'. *J Biol Chem*, **259** (3):1629-1643.
- Pizarro-Cerda, J., Desjardins, M., Moreno, E., Akira, S. and Gorvel, J.P., (1999). 'Modulation of endocytosis in nuclear factor IL-6(-/-) macrophages is responsible for a high susceptibility to intracellular bacterial infection'. *J Immunol*, **162** (6):3519-3526.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P., (1998a). 'Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes'. *Infect Immun*, **66** (12):5711-5724.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.L. and Gorvel, J.P., (1998b). 'Virulent Brucella abortus prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments'. *Infect Immun*, **66** (5):2387-2392.
- Porte, F., Liautard, J.P. and Kohler, S., (1999). 'Early acidification of phagosomes containing Brucella suis is essential for intracellular survival in murine macrophages'. *Infect Immun*, **67** (8):4041-4047.
- Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. and Liautard, J.P., (2003). 'Role of the Brucella suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages'. *Infect Immun*, **71** (3):1481-1490.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R., (1993). 'Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria'. *Microbiol Rev*, **57** (3):543-594.
- Powell, B.S., Court, D.L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M.H., Jr. and Reizer, J., (1995). 'Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of Escherichia coli. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant'. *J Biol Chem*, **270** (9):4822-4839.
- Pratt, L.A. and Silhavy, T.J., (1995). 'Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction'. *Mol Microbiol*, **17** (3):565-573.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. and Lejeune, P., (1999). 'Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in Escherichia coli'. *J Bacteriol*, **181** (19):5993-6002.
- Prost, L.R., Daley, M.E., Bader, M.W., Klevit, R.E. and Miller, S.I., (2008). 'The PhoQ histidine kinases of Salmonella and Pseudomonas spp. are structurally and functionally different: evidence that pH and antimicrobial peptide sensing contribute to mammalian pathogenesis'. *Mol Microbiol*, **69** (2):503-519.
- Puttick, J., Baker, E.N. and Delbaere, L.T., (2008). 'Histidine phosphorylation in biological systems'. *Biochim Biophys Acta*, **1784** (1):100-105.
- Quon, K.C., Marczyński, G.T. and Shapiro, L., (1996). 'Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein'. *Cell*, **84** (1):83-93.
- Quon, K.C., Yang, B., Domian, I.J., Shapiro, L. and Marczyński, G.T., (1998). 'Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95** (1):120-125.
- Rabin, R.S. and Stewart, V., (1993). 'Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in Escherichia coli K-12'. *J Bacteriol*, **175** (11):3259-3268.
- Radhakrishnan, G.K., Yu, Q., Harms, J.S. and Splitter, G.A., (2009). 'Brucella TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP'. *J Biol Chem*, **284** (15):9892-9898.

- Rafie-Kolpin, M., Essenberg, R.C. and Wyckoff, J.H., 3rd, (1996). 'Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus*'. *Infect Immun*, **64** (12):5274-5283.
- Raivio, T.L. and Silhavy, T.J., (2001). 'Periplasmic stress and ECF sigma factors'. *Annu Rev Microbiol*, **55**:591-624.
- Rambow-Larsen, A.A., Rajashekara, G., Petersen, E. and Splitter, G., (2008). 'Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella'. *J Bacteriol*, **190** (9):3274-3282.
- Reed, J.W., Glazebrook, J. and Walker, G.C., (1991). 'The *exoR* gene of *Rhizobium meliloti* affects RNA levels of other *exo* genes but lacks homology to known transcriptional regulators'. *J Bacteriol*, **173** (12):3789-3794.
- Reisinger, S.J., Huntwork, S., Viollier, P.H. and Ryan, K.R., (2007). 'DivL performs critical cell cycle functions in *Caulobacter crescentus* independent of kinase activity'. *J Bacteriol*, **189** (22):8308-8320.
- Reizer, J., Reizer, A., Merrick, M.J., Plunkett, G., 3rd, Rose, D.J. and Saier, M.H., Jr., (1996). 'Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: a chimeric gene encoding an Enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain'. *Gene*, **181** (1-2):103-108.
- Reizer, J. and Saier, M.H., Jr., (1997). 'Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria'. *Curr Opin Struct Biol*, **7** (3):407-415.
- Robertson, G.T., Kovach, M.E., Allen, C.A., Ficht, T.A. and Roop, R.M., 2nd, (2000). 'The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice'. *Mol Microbiol*, **35** (3):577-588.
- Robertson, G.T. and Roop, R.M., Jr., (1999). 'The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice'. *Mol Microbiol*, **34** (4):690-700.
- Rocha, E.P., Danchin, A. and Viari, A., (1999). 'Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis'. *Nucleic Acids Res*, **27** (17):3567-3576.
- Romling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K. and Normark, S., (1998). 'Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter'. *Mol Microbiol*, **28** (2):249-264.
- Roop, R.M., 2nd, Bellaire, B.H., Valderas, M.W. and Cardelli, J.A., (2004). 'Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche'. *Mol Microbiol*, **52** (3):621-630.
- Roop, R.M., 2nd, Gee, J.M., Robertson, G.T., Richardson, J.M., Ng, W.L. and Winkler, M.E., (2003). 'Brucella stationary-phase gene expression and virulence'. *Annu Rev Microbiol*, **57**:57-76.
- Ross, H.M., Jahans, K.L., MacMillan, A.P., Reid, R.J., Thompson, P.M. and Foster, G., (1996). 'Brucella species infection in North Sea seal and cetacean populations'. *Vet Rec*, **138** (26):647-648.
- Rotter, C., Muhlbacher, S., Salamon, D., Schmitt, R. and Scharf, B., (2006). 'Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*'. *J Bacteriol*, **188** (19):6932-6942.
- Roy, C.R., (2005). 'Trimming the fat: a *Brucella abortus* survival strategy'. *Nat Immunol*, **6** (6):546-548.
- Salcedo, S.P., Marchesini, M.I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Commerci, D.J., Ugalde, R.A., Pierre, P. and Gorvel, J.P., (2008). 'Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1'. *PLoS Pathog*, **4** (2):e21.

- Sanders, D.A., Gillece-Castro, B.L., Stock, A.M., Burlingame, A.L. and Koshland, D.E., Jr., (1989). 'Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY'. *J Biol Chem*, **264** (36):21770-21778.
- Sangari, F.J., Aguero, J. and Garcia-Lobo, J.M., (2000). 'The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*'. *Microbiology*, **146** (Pt 2):487-495.
- Sangari, F.J., Seoane, A., Rodriguez, M.C., Aguero, J. and Garcia Lobo, J.M., (2007). 'Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium'. *Infect Immun*, **75** (2):774-780.
- Schleyer, M., Schmid, R. and Bakker, E.P., (1993). 'Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock'. *Arch Microbiol*, **160** (6):424-431.
- Schmidt, R.a.P., J.M. , (2001). 'Hybrid two component proline sensor PrlS of *aeromonas hydrophila* regulates motility'. *Microbiology and parasitology*.
- Scholz, H.C., Hofer, E., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S., Pfeffer, M., Kruger, M., Cloeckert, A. and Tomaso, H., (2009). 'Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria'. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **9** (2):153-156.
- Schurig, G.G., Sriranganathan, N. and Corbel, M.J., (2002). 'Brucellosis vaccines: past, present and future'. *Vet Microbiol*, **90** (1-4):479-496.
- Sherlock, O., Vejborg, R.M. and Klemm, P., (2005). 'The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation'. *Infect Immun*, **73** (4):1954-1963.
- Sieira, R., Comerc, D.J., Sanchez, D.O. and Ugalde, R.A., (2000). 'A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication'. *J Bacteriol*, **182** (17):4849-4855.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. and Romling, U., (2004). 'GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility'. *Mol Microbiol*, **53** (4):1123-1134.
- Simms, S.A., Keane, M.G. and Stock, J., (1985). 'Multiple forms of the CheB methyltransferase in bacterial chemosensing'. *J Biol Chem*, **260** (18):10161-10168.
- Singh, M., Berger, B., Kim, P.S., Berger, J.M. and Cochran, A.G., (1998). 'Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95** (6):2738-2743.
- Skarphol, K., Waukau, J. and Forst, S.A., (1997). 'Role of His243 in the phosphatase activity of EnvZ in *Escherichia coli*'. *J Bacteriol*, **179** (4):1413-1416.
- Skerker, J.M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G. and Laub, M.T., (2005). 'Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis'. *PLoS Biol*, **3** (10):e334.
- Skerker, J.M. and Shapiro, L., (2000). 'Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*'. *Embo J*, **19** (13):3223-3234.
- Sleator, R.D. and Hill, C., (2002). 'Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence'. *FEMS Microbiol Rev*, **26** (1):49-71.
- Smith, L.D. and Ficht, T.A., (1990). 'Pathogenesis of *Brucella*'. *Crit Rev Microbiol*, **17** (3):209-230.
- Sohn, A.H., Probert, W.S., Glaser, C.A., Gupta, N., Bollen, A.W., Wong, J.D., Grace, E.M. and McDonald, W.C., (2003). 'Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp'. *Emerg Infect Dis*, **9** (4):485-488.

- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M.J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P. and Lopez-Goni, I., (1998). 'A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence'. *Mol Microbiol*, **29** (1):125-138.
- Soncini, F.C., Vescovi, E.G. and Groisman, E.A., (1995). 'Transcriptional autoregulation of the *Salmonella typhimurium* phoPQ operon'. *J Bacteriol*, **177** (15):4364-4371.
- Spoering, A.L. and Gilmore, M.S., (2006). 'Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms'. *Curr Opin Microbiol*, **9** (2):133-137.
- Spronk, A.M., Yoshida, H. and Wood, H.G., (1976). 'Isolation of 3-phosphohistidine from phosphorylated pyruvate, phosphate dikinase'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73** (12):4415-4419.
- Stabel, T.J., Sha, Z. and Mayfield, J.E., (1994). 'Periplasmic location of *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase'. *Vet Microbiol*, **38** (4):307-314.
- Starr, T., Ng, T.W., Wehrly, T.D., Knodler, L.A. and Celli, J., (2008). 'Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment'. *Traffic*, **9** (5):678-694.
- Stewart, V.R.R., (1995). 'See Ref. Hotch and Silhavy'. pp 233-252.
- Stock, A., Chen, T., Welsh, D. and Stock, J., (1988). 'CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85** (5):1403-1407.
- Stock, A.M., Mottonen, J.M., Stock, J.B. and Schutt, C.E., (1989a). 'Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis'. *Nature*, **337** (6209):745-749.
- Stock, A.M., Robinson, V.L. and Goudreau, P.N., (2000). 'Two-component signal transduction'. *Annu Rev Biochem*, **69**:183-215.
- Stock, J., (1999). 'Signal transduction: Gyrate protein kinases'. *Curr Biol*, **9** (10):R364-367.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. and Stock, A.M., (1989b). 'Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria'. *Microbiol Rev*, **53** (4):450-490.
- Stock, J.B., Stock, A.M. and Mottonen, J.M., (1990). 'Signal transduction in bacteria'. *Nature*, **344** (6265):395-400.
- Storz, G., Altuvia, S. and Wassarman, K.M., (2005). 'An abundance of RNA regulators'. *Annu Rev Biochem*, **74**:199-217.
- Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F.R. and Kung, C., (1994). 'A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone'. *Nature*, **368** (6468):265-268.
- Surette, M.G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E.G., Ninfa, A. and Stock, J.B., (1996). 'Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis'. *J Biol Chem*, **271** (2):939-945.
- Swanson, R.V., Bourret, R.B. and Simon, M.I., (1993). 'Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA'. *Mol Microbiol*, **8** (3):435-441.
- Swartz, T.E., Tseng, T.S., Frederickson, M.A., Paris, G., Commerci, D.J., Rajashekara, G., Kim, J.G., Mudgett, M.B., Splitter, G.A., Ugalde, R.A., Goldbaum, F.A., Briggs, W.R. and Bogomolni, R.A., (2007). 'Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria'. *Science*, **317** (5841):1090-1093.
- Taminiau, B., (2003). 'Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*'. *J Bacteriol*. Namur, 6035-6047.
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschirol, M.L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P. and Letesson, J.J., (2002). 'Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*'. *Infect Immun*, **70** (6):3004-3011.

- Tanaka, T., Saha, S.K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yamazaki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M. and Ikura, M., (1998). 'NMR structure of the histidine kinase domain of the E. coli osmosensor EnvZ'. *Nature*, **396** (6706):88-92.
- Tanford, C., (1984). 'Twenty questions concerning the reaction cycle of the sarcoplasmic reticulum calcium pump'. *CRC Crit Rev Biochem*, **17** (2):123-151.
- Tatum, F.M., Detilleux, P.G., Sacks, J.M. and Halling, S.M., (1992). 'Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice'. *Infect Immun*, **60** (7):2863-2869.
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B. and Johnson, M.S., (1999). 'Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria'. *Annu Rev Microbiol*, **53**:103-128.
- Teixeira-Gomes, A.P., Cloeckaert, A. and Zygmunt, M.S., (2000). 'Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*'. *Infect Immun*, **68** (5):2954-2961.
- Toutain, C.M., Caizza, N.C., Zegans, M.E. and O'Toole, G.A., (2007). 'Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*'. *Res Microbiol*, **158** (5):471-477.
- Trchounian, A., (1997). 'Ion exchange in facultative anaerobes: does a proton-potassium pump exist in anaerobic *Escherichia coli*?'. *Anaerobe*, **3** (6):355-371.
- Trchounian, A. and Kobayashi, H., (1999). 'Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH'. *FEBS Lett*, **447** (2-3):144-148.
- Tsolis, R.M., (2002). 'Comparative genome analysis of the alpha -proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (20):12503-12505.
- Tsolis, R.M., Seshadri, R., Santos, R.L., Sangari, F.J., Lobo, J.M., de Jong, M.F., Ren, Q., Myers, G., Brinkac, L.M., Nelson, W.C., Deboy, R.T., Angiuoli, S., Khouri, H., Dimitrov, G., Robinson, J.R., Mulligan, S., Walker, R.L., Elzer, P.E., Hassan, K.A. and Paulsen, I.T., (2009). 'Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism'. *PLoS One*, **4** (5):e5519.
- Tsuzuki, M., Ishige, K. and Mizuno, T., (1995). 'Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: in vitro studies with mutants'. *Mol Microbiol*, **18** (5):953-962.
- Ueno-Nishio, S., Mango, S., Reitzer, L.J. and Magasanik, B., (1984). 'Identification and regulation of the glnL operator-promoter of the complex glnALG operon of *Escherichia coli*'. *J Bacteriol*, **160** (1):379-384.
- Uhl, M.A. and Miller, J.F., (1995). 'BvgAS is sufficient for activation of the *Bordetella pertussis* ptx locus in *Escherichia coli*'. *J Bacteriol*, **177** (22):6477-6485.
- Uzureau, S., (2007). 'Quorum Sensing chez *Brucella melitensis* : caractérisation du régulateur transcriptomique VjvR et de son régulon'. *Biologie*. Namur: FUNDP.
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. and Letesson, J.J., (2007). 'Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*'. *J Bacteriol*, **189** (16):6035-6047.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. and Udesen, C., (2004). 'The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions'. *Mol Microbiol*, **51** (6):1525-1533.
- Varughese, K.I., Madhusudan, Zhou, X.Z., Whiteley, J.M. and Hoch, J.A., (1998). 'Formation of a novel four-helix bundle and molecular recognition sites by dimerization of a response regulator phosphotransferase'. *Mol Cell*, **2** (4):485-493.
- Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A. and Gelfand, M.S., (2004). 'Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression?'. *Trends Genet*, **20** (1):44-50.

- Vizcaino, N., Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S. and Fernandez-Lago, L., (2001). 'Characterization of a Brucella species 25-kilobase DNA fragment deleted from Brucella abortus reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide'. *Infect Immun*, **69** (11):6738-6748.
- Volz, K., (1993). 'Structural conservation in the CheY superfamily'. *Biochemistry*, **32** (44):11741-11753.
- Volz, K. and Matsumura, P., (1991). 'Crystal structure of Escherichia coli CheY refined at 1.7-Å resolution'. *J Biol Chem*, **266** (23):15511-15519.
- Wai, S.N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S.I. and Yoshida, S.I., (1998). 'Vibrio cholerae O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation'. *Appl Environ Microbiol*, **64** (10):3648-3655.
- Wang, Y., Chen, Z., Qiao, F., Ying, T., Yuan, J., Zhong, Z., Zhou, L., Du, X., Wang, Z., Zhao, J., Dong, S., Jia, L., Yuan, X., Yang, R., Sun, Y. and Huang, L., (2009). 'Comparative proteomics analyses reveal the virB of B. melitensis affects expression of intracellular survival related proteins'. *PLoS One*, **4** (4):e5368.
- Watanabe, K., Tachibana, M., Tanaka, S., Furuoka, H., Horiuchi, M., Suzuki, H. and Watarai, M., (2008). 'Heat shock cognate protein 70 contributes to Brucella invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion'. *BMC Microbiol*, **8**:212.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S. and Katamine, S., (2003). 'Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages'. *J Exp Med*, **198** (1):5-17.
- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K. and Shirahata, T., (2002). 'Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication'. *Cell Microbiol*, **4** (6):341-355.
- Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L. and Kolter, R., (2001). 'The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in Vibrio cholerae O139'. *Mol Microbiol*, **39** (2):223-235.
- Webber, C.A. and Kadner, R.J., (1997). 'Involvement of the amino-terminal phosphorylation module of UhpA in activation of uhpT transcription in Escherichia coli'. *Mol Microbiol*, **24** (5):1039-1048.
- Weiss, V., Kramer, G., Dunnebier, T. and Flotho, A., (2002). 'Mechanism of regulation of the bifunctional histidine kinase NtrB in Escherichia coli'. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **4** (3):229-233.
- Weiss, V. and Magasanik, B., (1988). 'Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of Escherichia coli'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85** (23):8919-8923.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S.I. and Eisenbach, M., (1994). 'Effects of phosphorylation, Mg²⁺, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM'. *Biochemistry*, **33** (34):10470-10476.
- Whatmore, A.M., Chudek, J.A. and Reed, R.H., (1990). 'The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of Bacillus subtilis'. *J Gen Microbiol*, **136** (12):2527-2535.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J. and Klee, H.J., (1995). 'An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe'. *Science*, **270** (5243):1807-1809.
- Winkler, W.C. and Breaker, R.R., (2005). 'Regulation of bacterial gene expression by riboswitches'. *Annu Rev Microbiol*, **59**:487-517.
- Wolfe, A.J. and Visick, K.L., (2008). 'Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility'. *J Bacteriol*, **190** (2):463-475.

- Wolodko, W.T., Fraser, M.E., James, M.N. and Bridger, W.A., (1994). 'The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution'. *J Biol Chem*, **269** (14):10883-10890.
- Wu, J., Ohta, N. and Newton, A., (1998). 'An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95** (4):1443-1448.
- Wu, J., Ohta, N., Zhao, J.L. and Newton, A., (1999). 'A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (23):13068-13073.
- Wu, Q., Pei, J., Turse, C. and Ficht, T.A., (2006). 'Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival'. *BMC Microbiol*, **6**:102.
- Yao, S.Y., Luo, L., Har, K.J., Becker, A., Ruberg, S., Yu, G.Q., Zhu, J.B. and Cheng, H.P., (2004). 'Sinorhizobium meliloti ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production'. *J Bacteriol*, **186** (18):6042-6049.
- Zhou, H., McEvoy, M.M., Lowry, D.F., Swanson, R.V., Simon, M.I. and Dahlquist, F.W., (1996). 'Phosphotransfer and CheY-binding domains of the histidine autokinase CheA are joined by a flexible linker'. *Biochemistry*, **35** (2):433-443.
- Zygmunt, M.S., Hagius, S.D., Walker, J.V. and Elzer, P.H., (2006). 'Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host'. *Microbes Infect*, **8** (14-15):2849-2854.