Facultés Universitaires
Notre-Dame de la Paix
NAMUR

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes

Corrélation entre la réponse au stress et la virulence : implication des régulateurs PrlS/PrlR et MucR chez la bactérie pathogène *Brucella melitensis*

Dissertation présentée par
Aurélie Mirabella
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Pr Martine Raes (URBC, FUNDP, Namur, Belgique)
Dr Stephan Köhler (CPBS, Université de Montpellier, France)
Pr Jan Michiels (Centre of Microbial and Plant Genetics, KUL, Leuven, Belgique)
Pr Thierry Arnould (URBC, FUNDP, Namur, Belgique)
Pr Jean-Yves Matroule (URBM, FUNDP, Namur, Belgique)
Pr Xavier De Bolle (Co-Promoteur, FUNDP, Namur, Belgique)
Pr Jean-Jacques Letesson (Promoteur, FUNDP, Namur, Belgique)

« The pessimist complains about the wind;
the optimist expects it to change;
the realist adjusts the sails. »

William Arthur Ward

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes

Corrélation entre la réponse au stress et la virulence : implication des régulateurs PrlS/PrlR et MucR chez la bactérie pathogène *Brucella melitensis*

RESUME

L'adaptation ainsi que la réponse au stress dépendent de la coordination de différents acteurs moléculaires impliqués dans la réception de stimuli, l'intégration de signaux ou la mise en place de la réponse adaptative. Chez les bactéries pathogènes, les mécanismes de régulation sont essentiels pour assurer le bon déroulement du processus infectieux. Dans certaines conditions, la réponse mise en place par la bactérie mène à la formation de biofilms souvent associés à des mécanismes de résistance.

Sur son parcours, *B. melitensis* fait face à des conditions environnementales changeantes qui peuvent lui être néfastes. Des mutants altérés dans leur système Quorum Sensing forment des agrégats bactériens de structure similaire aux biofilms. L'étude de ces agrégats a révélé qu'ils étaient majoritairement composés d'un exopolysaccharide (EPS). Cependant, les conditions dans lesquelles cet EPS est produit par la bactérie sauvage, son rôle et les gènes encodant les enzymes responsables de sa biosynthèse restaient inconnus. Au cours de notre travail, nous avons mis en évidence la formation d'agrégats en réponse au stress salin par des souches *Brucella* spp sauvages. Nous avons montré que la formation de ces agrégats dépend de la présence d'un phosphorelay PrlS/PrlR et de la force ionique du milieu. Nos données ont cependant remis en cause la production d'un exopolysaccharide par *Brucella* spp. Enfin, nous avons étudié le rôle de deux régulateurs, le système PrlS/PrlR et le régulateur transcriptionnel MucR dans la formation d'agrégats en réponse au stress salin ainsi que dans la virulence de *B. melitensis*. Nos données indiquent que le système PrlS/PrlR, requis pour la persistance de l'infection *in vivo*, est impliqué dans la réponse au stress salin et régule probablement les acteurs nécessaires à l'agrégation. Par ailleurs, MucR est un régulateur clé de la réponse au stress et est impliqué dans la survie intracellulaire de la bactérie. Nous avons montré qu'il agit comme un répresseur de l'expression des gènes flagellaires et qu'il est requis pour la croissance de *B. melitensis* en conditions hypersalines. Si l'implication de MucR dans la régulation d'un EPS reste à démontrer chez *B. melitensis*, nos données montrent son rôle dans la régulation de la structure d'un autre composant majeur de la surface bactérienne, le lipopolysaccharide.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes

**Correlation between stress response and virulence :
involvement of regulators PrlS/PrlR and MucR
in the pathogenic bacterium *Brucella melitensis***

SUMMARY

Adaptation and stress response rely on the coordination of several molecular actors involved in stimuli perception, signal integration or the establishment of the adaptative response. In pathogenic bacteria, the regulatory mechanisms are essential to ensure an successful infectious process. Under certain conditons, the response of the bacteria leads to biofilm formation which are often associated with resistance mechanisms.

During its lifetime, *B. melitensis* might be facing changing environmental conditions sometimes harmful. Mutants altered in Quorum Sensing system form bacterial clusters structurally similar to biofilms. The study of these aggregates revealed that they were predominantly composed of exopolysaccharide (EPS). However, the conditions under which this EPS is produced by the wild type bacterium, its role and the genes encoding the enzymes responsible for its biosynthesis remained unknown. In this study, we demonstrated the formation of aggregates in response to salt stress by wild type *Brucella* spp. We showed that the formation of these bacterial clumps depends on the presence of a phosphorelay PrlS/PrlR and of the ionic strength of the growth medium. Our data, however, challenged the exitence of a production of an exopolysaccharide by *Brucella* spp. Finally, we studied the role of two regulators, the system PrlS/PrlR and the transcriptional regulator MucR in the formation of aggregates in response to salt stress and in the virulence of *B. melitensis*. Our data indicate that the system PrlS/PrlR, required for persistent infection *in vivo*, is involved in the response to salt stress and regulate actors probably required for aggregation. Moreover, MucR is a key regulator of stress response and is involved in intracellular survival of the bacteria. We showed that it acts as a repressor of flagellar gene expression and is required for growth of *B. melitensis* in hypersaline conditions. If MucR involvement in the regulation of EPS remains to be shown in *B. melitensis*, our data shows its role in the regulation of the structure of another major component of the bacterial surface, the lipopolysaccharide.

TABLE DES ABBREVIATIONS

AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AHL	N-Acyl homosérine lactone
AI	Autoinducteur
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNP	ARN polymérase
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ASP	« Acid Shock Protein »
ATP	Adénosine triphosphate
BCV	« *Brucella* containing vacuole »
CβG	β-glucan cyclique
c-di-GMP	« Colony forming unit »
CFU	Di-guanosine monophosphate cyclique
CL	Cardiolipine
ConA	Concanavaline A
CPS	« Capsular polysaccharide »
CS	« Cold Shock »
CSP	« Cold Shock Protein »
DGC	Diguanylate cyclase
DHBA	Acide 2,3-dihydroxybenzoique
DIC	« Differential interference contrast »
DO	Densité optique
ECF	« Extracytoplasmic factor »
EPS	Exopolysaccharide
ERES	« Endoplasmic reticulum exit site »
FACS	« Fluorescence-activated cell sorting »
FITC	« Fuorescein isothiocyanate »
FSC	« Forward scatter »
GDP	Guanosine diphophate
GMP	Guanosine monophosphate
GR	Globules rouges
GTP	Guanosine triphosphate
HK	Histidine kinase
HMW	« High molecular weight »
HPAE	« High Performance Anion Exchange »
HPLC	« High Performance Liquid Chromatography »

HS	« Heat Shock »
HSP	« Heat Shock Protein »
LMW	« Low Molecular weight »
LPS	Lipopolysaccharide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate
O.M.S.	Organisation Mondiale de la Santé
OMP	« Outer membrane Protein »
PAMP	« Pathogen-associated molecular patten »
PBP	« Penicillin binding protein »
PBS	« Phosphate buffer saline »
PCR	« Polymerase chain reaction »
PDE	Phosphodiestérase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PG	Phosphatidylglycérol
(p)ppGpp	Guanosine pentaphosphate ou tétraphosphate
PTS	Système phosphotranférase dépendant du PEP
QQ	« Quorum Quenching »
qRT-PCR	« Quantitative real time PCR »
QS	« Quorum Sensing »
RNI	« Reactive nitrogen intermediate »
ROS	« Reactive oxygen species »
RR	Régulateur de réponse
RS	Réponse de stringense
SAM	S-adénosylméthionine
SD	Shine-Dalgarno
SDC	Système à deux composants
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	« Scanning electron microscopy »
SSC	« Side scatter »
SSS	« Sodium solute symporter »
T4SS	Système de sécrétion de type IV
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques
TFA	Acide trifluoroacétique
TLC	« Thin layer chromatography »
TM	Transmembranaire
UDP	Uridine diphosphate
UTR	« Untranslated Region »
WT	« Wild type »

REMERCIEMENTS…

L'heure est venue de remercier tous ceux qui, par leur présence, ont permis, de près ou de loin, la concrétisation de ce travail.

Tout d'abord, je voudrais remercier mon promoteur, le Professeur Jean-Jacques Letesson, pour m'avoir guidée et encouragée depuis le début de cette aventure tout en me laissant toujours une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche. Merci de m'avoir transmis votre passion pour les « bizarries » du monde bactérien et de m'avoir fait confiance alors que je bousculais certaines idées établies. Je tiens tout spécialement à souligner vos qualités humaines et à vous remercier pour votre présence et votre soutien dans les moments les plus rudes. Un grand merci également au Professeur Xavier De Bolle pour sa disponibilité et les discussions constructives tout au long de mon parcours. Merci à nos collaborateurs de l'I.N.R.A. (Tours, France) : le Professeur Axel Cloeckart et le Professeur Michel Zygmunt.

Merci au F.R.I.A, au F.N.R.S et aux F.U.N.D.P pour les différents financements dont j'ai bénéficié au cours de ma thèse.

Je ne pourrais oublier ceux qui m'ont encadrée et aidée à mes débuts de scientifique en herbe : la QS team, Julien et Marie G. Merci pour le savoir que vous m'avez transmis ainsi que votre bonne humeur. Une dédicace particulière à Marie G pour les tous les bons moments passés ensemble, à mi-chemin entre délires et folies, notamment un certain défi Sangria et cet inoubliable voyage à Rome.

Je remercie également tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux que leurs suggestions qui ont grandement participé à l'avancement de mon travail. A tout les participants des « réunions cahier » de la JJL team : Matthieu, Marie G, Richard, Marie-Alice, Cécile, M-C, Thib, Delphine HM, Julien, Sophie, Katrin, Abir et Rosse-Mary. Je tiens également à remercier Mike et Jérôme pour les discussions et leur aide dans la compréhension des changements morphologiques bactériens. Merci à ma mémo Thérèse, qui, avec ses « petits bras », a participé à l'avancement de mon travail et grâce à qui j'aurais appris à repousser mes propres limites. Un grand merci particulier à Christian Didembourg et Pierre Cambier pour leur assistance technique mais surtout pour leur patience et leur disponibilité.

Je tiens à remercier les membres du jury : Pr Martine Raes, Dr Stephan Köhler, Pr Jan Michiels, Pr Thierry Arnould et Pr Jean-Yves Matroule. Merci du temps et de l'attention que vous avez consacrés à la lecture de mon travail, vos remarques et suggestions auront participé l'amélioration de ce manuscrit.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous les jeunes (et moins jeunes) gens que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années. Par leur encouragements et leur bonne humeur, ils m'ont permis de réaliser cette thèse dans une ambiance agréable.

A tous mes nombreux collègues de bureau qui se sont succéder durant ces années en commençant par la fin : France, ma collègue d'écriture pour ton optimisme irremplaçable, Anne-Michèle pour ton savoir d'ingénieur et ton oeil aguerri, tes sources d'informations dignes des services secrets et ta bonne humeur quotidienne, Isa pour ton soutien à toute épreuve, Matthieu pour les nombreuses discussions et tes bons conseils, M-C pour ta disponibilité et ton expérience, Thib (Tibilo) pour m'avoir grillé quelques neurones en écoutant en boucle notre ami Bob l'Eponge ou pire en essayant de m'initier aux flux métaboliques, Marie G (et les occupants de ce fameux bureau 4409) que de souvenirs et rigolades... sans oublier Aurore, Marie dB et Etienne. Merci à tous de m'avoir supporter sans broncher (ou presque !).

A l' « Edimburgh team » : Dédé (ma partenaire de dégustation « gâteau »), Caro (mon Mulinet adoré) et Aurore (because « Hamel's is you »), merci pour votre oreille attentive et les bons moments de détente passés ensemble tout aussi importants à mes yeux que votre soutien.

Une pensée pour tous les membres du laboratoire, permanents ou de passage, anciens et actuels, qui d'une façon ou d'une autre perpétuent au fil des générations de thésards l'ambiance si chaleureuse et particulière de l'URBM : Richard, Sophie L, Julien, Marie G, Aurore, Dédé, Johann, Caro, Matthieu, Mike, Marie-Alice, Cécile, Thib, M-C, Delphine HM, Abir, Christian, Fanélie, Anne-Michèle, France, Isa, Katrin, Emelyne, Lionel, Nayla, Safia, Régis, Franco, Charles, Marie dB, Philippe, Julie D, Sylvain, Anand, Gégé, Alex, Didier, Bernard, Jon, Sophie B, Rosse-Mary, Monique D, Maxou, Elise, Valérie, Monique C, Mathieu, Rose-Ma, Françoise, Aurélie M, Mike (Francis), Jacques, Amaia, Mapi, Céline D, Céline G, Thomas, Thérèse, Gauthier, Hubert et Noélie. Merci à tous pour l'ambiance qui aura fait de cette thèse une aventure inoubliable! A tous les derniers arrivants Francesco, Estelle, Frédéric, Arnaud, Jérôme, Séverin, Kenny, Julie C, Clément et à tous ceux qui suivront, je vous souhaite bonne chance et j'espère que vous profiterez autant que moi de l'univers de l'URBM.

Je terminerai en remerciant les incontournables : mon papa et ma maman, Frédéric et Sévrine, Michäel et Florence, sans oublier Stefano et AnSo qui, depuis leur île tropicale ont su me donner l'illusion de l'évasion. Un merci tout particulier à Sévrine pour son précieux talent de correctrice. Je voudrais également remercier ma marraine Ida et mon parrain qui ont toujours été là pour moi. Grazie Enzo per la tua pazienza e per l'amore che mi dai. A tous, merci de m'avoir soutenue et encouragée toutes ces années et d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

AVANT-PROPOS 1
I. L'ADAPTATION : UN SCHEMA UNIVERSEL 1
II. NOTION DE STRESS 2
III. REPONSE AUX STRESS 3
1. Stress nutritionnel 3
1.1. Système phosphotransférase (PTS) et répression catabolique 3
1.1.1. PTS, senseur de carbohydrates et de l'état métabolique de la cellule 4
1.1.2. PTS, acteur de la réponse 5
1.2. Réponse de stringence 7
1.2.1. Perception d'un stimulus et génération d'un signal 8
1.2.2. Mécanismes de réponse au signal (p)ppGpp 9
2. Stress osmotique 12
2.1. Perméabilité sélective des membranes cellulaires 12
2.2. Homéostasie et stress osmotique 14
2.2.1. Généralités 14
2.2.2. Réponse au choc hyperosmotique 15
2.2.2.A. Réponse primaire 15
2.2.2.B. Réponse secondaire 16
a) Les osmoprotectants 17
b) Synthèse de tréhalose 18
c) Altération de la composition phospholipidique de la membrane 18
2.2.3. Osmosensing 19
2.2.3.A. Osmosenseurs-transporteurs : MscL, ProP, OpuA et BetP 19
2.2.3.B. Osmosenseurs régulateurs 20
a) Le système à deux composants EnvZ/OmpR 22
b) Le système KdpD/KdpE 22
3. Stress oxydatif 24
3.1. Perception du stress oxydatif : les senseurs redox 25
3.2. Mécanismes effecteurs de la réponse au stress oxydatif 27
3.2.1. Détoxification des ROS 27
3.2.2. Contrôle de l'homéostasie en fer et manganèse 27
3.2.3. Système d'exclusion d'antibiotiques pro-oxydants 28
4. Stress acide et thermique 29
4.1. Stress acide 29
4.2. Stress thermique 30
4.2.1. Réponse « Heat Shock » 32
4.2.2. Réponse « Cold Shock » 33
5. Interférence entre différentes réponses au stress 33
IV. LE BIOFILM : UN MODE D'ADAPTATION AU STRESS 35
1. Définition 35

2. Composition et fonction de la matrice extracellulaire 35
3. Importance de l'exopolysaccharide 36
3.1. *S. meliloti*, un modèle d'étude pour la production d'EPS 37
3.1.1. Modèle de synthèse du succinoglycan.....38
4. Etapes de formation d'un biofilm 40
5. Formation de biofilms en réponse à des changements environnementaux 41
6. Un mode de protection contre le stress 41
7. Régulation 42
7.1. Quorum Sensing.....43
7.2. Cyclic-di-GMP 44
V. LE GENRE BRUCELLA 46
1. La brucellose 46
2. Taxonomie et nouveaux réservoirs.....46
3. Brucella, une bactérie discrète 48
4. Brucella, une bactérie intracellulaire.....48
5. Brucella et ses facteurs de virulence.....49
5.1. Système de sécrétion de type IV 49
5.2. L'enveloppe bactérienne 50
5.2.1. Le lipopolysaccharide (LPS).....50
5.2.2. Le β-glucan cyclique (cβG) 51
5.2.3. Le système à deux composants BvrS/BvrR 52
5.2.4. Le régulateur de Quorum Sensing VjbR.....52
6. Brucella et la réponse au stress 52
6.1. Réponse générale.....53
6.2. Réponse au stress oxydatif 53
6.2.1. Dégradation des ROS 53
6.2.2. Dégradation des RNI 54
6.2.3. Contrôle du fer et du manganèse.....54
6.3. Réponse au stress acide 55
6.4. Réponse au stress nutritionnel 55
6.5. Formation de biofilms et production d'EPS.....57
6.5.1. Agrégats dépendants de VjbR.....57
6.5.2. Agrégats dépendants du Quorum Quenching 57
OBJECTIFS.....60
RESULTATS 61
CHAPITRE I : REMISE EN CAUSE DE LA PRODUCTION D'UN EPS PAR *BRUCELLA* SPP.....61
1. Introduction 61
1.1. La formation d'agrégats chez des souches QS déficientes.....61
1.2. Recherche infructueuse de gènes de biosynthèse d'un EPS.....61
1.3. Formation d'agrégats chez les souches *B. melitensis* et *B. abortus* WT, un nouveau cadre de recherche.....62
2. Résultats 63

2.1. Etude de la composition de l'EPS produit par la souche WT en condition hypersaline 63
2.2. Remise en cause de la production d'EPS par *Brucella* spp. 63
2.2.1. Mise au point d'un test de dosage de l'EPS 63
2.2.2. Inhibition d'hémagglutination en présence d'EPS purifié de *Brucella* spp. 64
2.2.3. Inhibition d'hémagglutination en présence de surnageant de culture de *Brucella* spp. en milieu défini 65
2.2.4. Absence d'inhibition d'hémagglutination par les bactéries 66
2.2.5. *Brucella* spp. n'est pas à l'origine de la présence de sucres détectés par la concanavaline A dans les surnageants de culture 67
2.2.6. Analyse en HPLC du polysaccharide contenu dans le 2YT 67
3. Discussion 69
3.1. Un polysaccharide trop vite considéré comme un EPS 69
3.2. *Brucella* spp. produit-elle un EPS ? 69
3.3. Le phénotype d'agrégation, avec ou sans EPS 70
CHAPITRE II : LE SYSTEME A DEUX COMPOSANTS PRLS/PRLR REGULE LA PRODUCTION D'AGREGATS CHEZ *BRUCELLA* SPP. 72
1. Paper : The two component system PrlS/PrlR of Brucella melitensis is required for persistence in mice and appears to respond to ionic strength 73
2. Complementary information 93
CHAPITRE III : MUCR EST IMPLIQUE DANS LA REGULATION DE STRUCTURES DE SURFACE ET LA REPONSE AU STRESS CHEZ *B. MELITENSIS* 95
1. Paper : The ortholog of the Sinorizobium meliloti mucR is involved in cell surface modifications in the intracellular pathogen Brucella melitensis 96
2. Complementary Information 125
DISCUSSION, CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 129
I. FORMATION D'AGREGATS PAR *BRUCELLA* SPP. EN MILIEU HYPERSALIN 129
II. PRODUTION D'UN EPS PAR *BRUCELLA* SPP. ? 130
III. ALTERATION DE LA MORPHOLOGIE DE *BRUCELLA* SPP. EN MILIEU HYPERSALIN 131
IV. ROLES DES REGULATEURS PRLR ET MUCR DANS LA REPONSE AU STRESS ET LA VIRULENCE DE *B. MELITENSIS* 132
1. Le système PrlR/PrlS 132
1.1. Particularités du système PrlR/PrlS 132
1.2. Rôle dans la formation d'agrégats 134
1.3. Rôle dans la virulence 134
2. MucR 134
2.1. Un régulateur transcriptionnel conservé chez les α-protéobactéries 134
2.2. Régulation de l'expression des gènes flagellaires 135
2.3. Implication de MucR dans la formation d'agrégats 136
2.4. Recherche de cibles directes de MucR. 136

2.5. MucR, régulateur de l'enveloppe bactérienne et du LPS.....137
2.6. Implication de MucR dans la réponse au stress et la virulence 138
3. Comparaison des systèmes de régulation entre S. meliloti et B. melitensis.....139

MATERIEL ET METHODES..... 142

I. SOUCHES, PLASMIDES ET CONDITIONS DE CULTURE 142
II. CONSTRUCTION DES MUTANTS DE DELETION.....143
1. Obtention des plasmides 143
2. Conjugaison et sélection de mutants de délétion.....144
III. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES 145
1. Agarose PAD.....145
2. Marquage FM4-64.....145
3. Double marquage ConA-FITC/iodudre de propidium 145
IV. INFECTIONS CELLULAIRE ET EN SOURIS.....145
V. METHODES RELATIVES AU LPS.....146
1. Cristal violet.....146
2. Dot blot.....146
VI. PURIFICATION DE L'EPS 146
VII. DOSAGE A L'ANTHRONE DE L'EPS.....147
VIII. ANALYSE HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY).....147
IX. TEST D'INHIBITION D'HEMAGGLUTINATION 147
1. Isolement et conservation de globules rouges de moutons 147
2. Test d'inhibition d'hémagglutination.....148
2.1. Obtention des échantillons.....148
2.2. Mise en place du test d'inhibition d'hémagglutination 148

ANNEXE 149

RECHERCHE DE GENES DE BIOSYNTHESE D'UN EPS CHEZ *BRUCELLA* SPP. 149
1. Introduction 149
1.1. Recherche des gènes de biosynthèse chez *Brucella melitensis*.....149
1.1.1. Recherche *a priori* de gènes homologues aux gènes de biosynthèse de l'EPS chez *B. melitensis* 16M..... 149
1.1.2. Implication controversée du locus de 25 kb absent de la souche *B. abortus* dans la synthèse d'EPS chez une souche QS déficiente..... 152
1.1.3. Délétions de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'un EPS chez *B. melitensis aiiD+* 152
2. Résultats 154
2.1. La recherche des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'EPS chez la souche *B. abortus* 2308 155
2.1.1. Construction de mutants chez *B. abortus* 2308..... 155
2.1.2. Vérification du phénotype rugueux des mutants construits..... 155
2.1.3. Implication dans le phénotype d'agrégation..... 157
2.2. Le rôle des gènes *exoF* et *exoY* chez *B. melitensis* 158

2.2.1. La formation de chaînette par les souches *B. melitensis aiiD+ exoF* et *aiiD+ exoY* 158
2.2.2. Evaluation de la virulence des mutants *exoF* et *exoY* en modèle d'infection cellulaire et murin 158
3. Discussion 160
3.1. Distinction entre la formation d'agrégats et la production d'EPS 160
3.2. La formation d'agrégats, un phénotype en apparence identique 160
3.3. La formation de chaînettes... un phénotype spécifique 161
3.4. Production possible d'EPS chez *Brucella* spp. 162
3.5. Rôles envisageables de l'EPS chez *Brucella* spp. 163
BIBLIOGRAPHIE 164

INTRODUCTION

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

Chez les Eucaryotes supérieurs, on définit la valence écologique comme la capacité d'une espèce à tolérer des variations plus ou moins grandes des facteurs écologiques de son milieu. La valence définit ainsi un optimum écologique et une zone de tolérance qui varient en fonction de l'espèce considérée. Dans le monde bactérien, il est difficile de définir une valence écologique ; la définition même d'espèce bactérienne restant également floue. Depuis l'apparition de la vie sur Terre, les bactéries ont colonisé toutes les niches écologiques de notre planète même les plus surprenantes comme les sources hydrothermales des profondeurs océaniques (Jannasch & Mottl, 1985) ou la région aride du désert de l'Atacama au Chili (Drees *et al.*, 2006; Okoro *et al.*, 2009).

Le monde bactérien se distingue donc par une grande diversité des conditions de vie quelques fois extrêmes qu'il peut supporter. Les bactéries adaptées à ces conditions extrêmes sont appelées extrémophiles (Pikuta *et al.*, 2007). Ce groupe contient des bactéries capables de supporter des températures très élevées (au-delà de 60 °C) (thermophiles) (Stetter, 1999) ou très faibles (psychrophiles) (D'Amico *et al.*, 2006; Feller & Gerday, 2003), des concentrations en sels très importantes (halophiles) (Russell, 1989), de très grandes pressions (piézophiles) (Simonato *et al.*, 2006) ou des valeurs de pH extrêmes (acidophiles (Ciaramella *et al.*, 2005; Schleper *et al.*, 1995) et alcalinophiles (Krulwich *et al.*, 1997)). A côté de ces exemples extrêmes, d'autres bactéries sont acclimatées aux conditions modérées. Ainsi, chaque « espèce » bactérienne possède une gamme de niche écologique naturelle qui lui est propre et à laquelle elle est adaptée. Néanmoins, comme tout être vivant, les bactéries sont capables, dans une certaine mesure, de s'adapter à des conditions changeantes et parfois défavorables de leur environnement.

I. L'ADAPTATION : UN SCHEMA UNIVERSEL

En condition naturelle, les fluctuations environnementales sont multiples et presque permanentes : carence en nutriments, changement de pH, conditions d'hyper- ou d'hypo-osmolalité, variation de température, présence d'antibiotiques, etc. Pour répondre de façon appropriée à un changement environnemental, les bactéries doivent donc en coordonner la perception et la mise en place d'une réponse adaptée à travers un réseau de régulation. Cette capacité d'adaptation fait de la bactérie une unité de vie « intelligente » capable d'homoéostasie et capable d'interagir avec son environnement (Marijuan *et al.*, 2010).

La réponse adaptative d'une cellule suit un schéma stimulus-réponse (Goudreau & Stock, 1998). Selon ce schéma universel **(figure 1)**, chaque stimulus est perçu par un senseur qui génère un signal. Ce signal, après transduction, va *in fine* modifier l'activité d'un régulateur qui contrôle la mise en place de la réponse adaptative. Enfin, le système comprend généralement un mécanisme de contrôle qui permet le retour à un nouvel équilibre. En réalité, ce système est beaucoup plus complexe puisqu'un même stimulus

peut être perçu par différents senseurs qui peuvent parallèlement activer des voies de signalisation identiques ou différentes. En outre, un changement d'environnement comprend une multitude de stimuli divers et simultanés qui vont être perçus par un grand nombre de senseurs. Ainsi, l'intégration de l'ensemble des signaux et la coordination des différents régulateurs permettent finalement la mise en place d'une réponse appropriée.

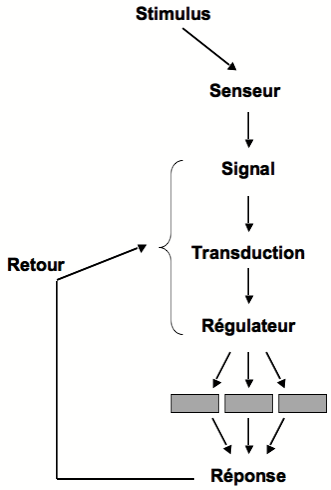


Figure 1. Schéma stimulus-réponse.
Adapté de (Neidhardt *et al.*, 1990).

Parce que les bactéries sont ubiquistes, la diversité des mécanismes senseurs est aussi variée que la nature des stimuli qu'ils perçoivent. Chez les bactéries, la réponse se fait principalement au niveau de la régulation transcriptionnelle de gènes dont les produits contribuent à l'adaptation physiologique des bactéries. Dans ce cadre, l'organisation en opéron de gènes impliqués dans une même voie (et donc sujets à une co-régulation transcriptionnelle) (Jacob *et al.*, 1960) constitue un premier avantage chez les bactéries. Cependant, ce système seul est insuffisant pour permettre une adaptation physiologique globale. La réponse mise en place est complexe et requiert un niveau d'organisation « supra-opéronique » qui englobe la coordination de l'expression de plusieurs opérons. A cette coordination transcriptionnelle, peuvent se superposer les régulations post-transcriptionnelle et traductionnelle ainsi que la modification d'activités enzymatiques.

II. Notion de stress

Certains changements environnementaux peuvent devenir préjudiciables pour la bactérie et mettre sa survie en péril. Même des conditions initialement très favorables, comme celles mises en place lors de monocultures en laboratoire, vont finir dans un système fermé par devenir impropres à la poursuite de la croissance (Navarro Llorens *et al.*, 2010). Toute variante qui tend à éloigner l'organisme de son optimum vital pourra être considérée comme un stress dont l'amplitude et la durée seront variables et pourra éventuellement mener à la mort. Lors d'un changement environnemental dommageable, il est fondamental pour la bactérie de percevoir ce changement et d'intégrer cette perception afin de mettre en place une réponse appropriée qui favorise sa survie. L'adaptation de la bactérie à ces fluctuations défavorables constitue la réponse au stress.

III. Reponse aux stress

Un stress n'est en définitive rien d'autre qu'un changement environnemental qui a la particularité d'être dommageable pour la cellule. La réponse au stress (quelle que soit sa nature) suivra donc le même schéma stimulus-réponse que celui présenté au point I. Dans la suite de ce point, nous détaillons quelques exemples de réponses au stress depuis les mécanismes de perception du stimulus à la mise en place d'une réponse adaptative globale.

1. Stress nutritionnel

En conditions naturelles comme en laboratoire, la nature et la quantité des nutriments (source de carbone et d'azote) à disposition des bactéries varient. Les bactéries doivent donc adapter leur métabolisme et leur physiologie à un nouvel environnement radicalement différent du précédent telle l'interaction avec un hôte animal ou végétal mais également en continu dans un milieu dont les ressources s'épuisent. Les mécanismes d'adaptation à un stress nutritionnel sont multiples et mettent en jeu à la fois la régulation de transporteurs, de voies métaboliques mais aussi plus globalement de toute la physiologie de la cellule. Comme toute réponse au stress, l'adaptation physiologique de la bactérie à son état métabolique répond à un schéma stimulus-réponse dans lequel 2 systèmes régulateurs jouent un rôle prépondérant : le système PTS et la réponse de stringence.

1.1. Système phosphotransférase (PTS) et répression catabolique

Les bactéries sont capables d'utiliser différentes sources de carbone mais métabolisent généralement une source de carbone préférentielle même dans un milieu contenant différents substrats carbonés. Chez la plupart des bactéries, le glucose est le substrat préféré qui permet une croissance rapide. En outre, l'utilisation du glucose empêche l'utilisation de sources de carbones alternatives. Ainsi, dans un milieu contenant à la fois du glucose et du lactose, *Escherichia coli* métabolise préférentiellement le glucose jusqu'à l'épuiser avant de reprendre sa croissance sur le lactose. L'utilisation hiérarchique de sources de carbone est à l'origine de la diauxie[1] observée chez *E. coli* (Monod, 1942).

L'utilisation préférentielle du glucose vis-à-vis de sources alternatives de carbone est appelée la répression catabolique. Chez les entérobactéries, la répression catabolique est le mécanisme par lequel les gènes nécessaires à l'utilisation d'une source alternative de carbone ne sont pas exprimés lorsque du glucose est disponible. Ce mécanisme repose sur le contrôle transcriptionnel de plusieurs dizaines de gènes et opérons nécessaires au métabolisme et transport de sources alternatives de carbone. Différents acteurs moléculaires sont responsables de ce phénomène parmi lesquels le système PTS ou système phosphotransférase dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP) a la particularité d'être à la fois le système senseur, le signal et le régulateur.

[1] Croissance biphasique. Après une première phase de croissance exponentielle, la croissance s'arrête puis reprend à nouveau de façon exponentielle. Le temps de latence entre les deux phases correspond à la levée de la répression catabolique.

Le PTS est constitué de plusieurs protéines qui forment une cascade de phosphorelay (pour revue voir (Deutscher *et al.*, 2006)). Le PTS est reconnu comme un système transporteur de carbohydrates qui couple la phosphorylation du substrat simultanément à son importation **(figure 2)**. En général, les protéines EI et Hpr sont communes tandis que les protéines EII varient en fonction du sucre importé. On nomme dès lors un système PTS selon le substrat transporté, par exemple D-Glucose PTS.

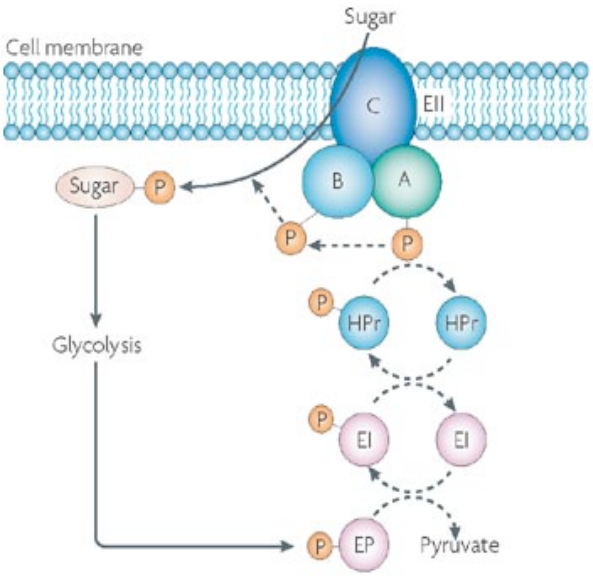


Figure 2 : Système PTS régulant l'importation de sucres. Ce système comprend plusieurs partenaires protéiques par lesquels un groupement phosphate est transféré du phosphoénolpyruvate (PEP) au sucre entrant. En présence de PEP, ce transfert s'effectue successivement par les protéines cytoplasmiques EI (Protein kinase Enzyme I) et HPr (Histidine Protein) puis les Enzymes II EIIA et EIIB ; ces 2 dernières formant le complexe perméase avec EIIC (et éventuellement EIID), spécifique du sucre importé. Finalement, le groupement phosphate est transféré du domaine EIIB au sucre importé. Image de (Gorke & Stulke, 2008).

1.1.1. PTS, senseur de carbohydrates et de l'état métabolique de la cellule

En plus de sa fonction de transporteur, le système PTS est un senseur de choix. En effet, l'état de phosphorylation des différents partenaires EI, Hpr, EIIA et EIIB dépend à la fois du PEP et de la présence de glucose dans le milieu. En tant qu'élément central (à l'interface entre glycolyse et cycle TCA) du métabolisme du carbone, le pyruvate représente un signal clé pour le système senseur. L'état de phosphorylation des protéines PTS dépend directement du ratio PEP/pyruvate et est donc indicateur de l'état métabolique de la cellule. Ainsi, lorsque les cellules sont privées de glucose, le ratio PEP/pyruvate augmente et favorise l'état phosphorylé du système PTS. A l'inverse, lorsque le ratio PEP/pyruvate diminue, c'est la forme déphosphorylée du système PTS qui est dominante. De plus, l'état de phosphorylation des protéines PTS dépend également de l'importation du glucose. Ainsi, en présence de glucose, les protéines PTS sont majoritairement déphosphorylées tandis qu'elles sont phosphorylées en absence de glucose ; le phosphate ne pouvant être transféré au sucre absent. L'état de phosphorylation dynamique du système PTS en réponse aux conditions nutritionnelles et à l'état métabolique de la cellule représente le signal qui permet son rôle régulateur.

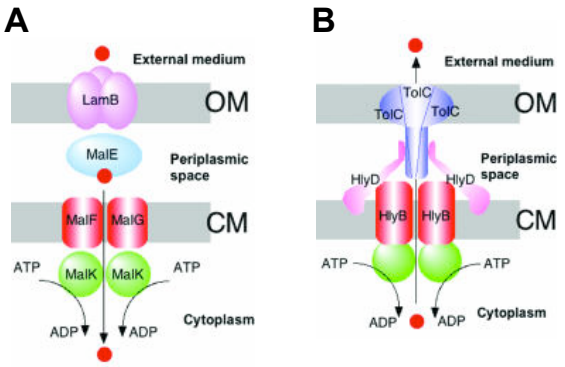
1.1.2. PTS, acteur de la réponse

Le système PTS régule la répression catabolique en agissant sur l'activité de l'adénylate cyclase (AC), enzyme responsable de la production d'AMPc (Harwood *et al.*, 1976). En effet, la forme phosphorylée de $EIIA^{Glc}$ ($EIIA^{Glc}$-P), dominante dans des cellules privées de glucose (lorsque le ratio PEP/pyruvate est élevé), stimule la production d'AMPc. L'activation de l'AC par $EIIA^{Glc}$-P requiert un facteur cellulaire inconnu[2] **(figure 3)** (Park *et al.*, 2006). L'AMPc produit forme un complexe avec le régulateur Crp et permet ainsi l'activation de gènes de voies cataboliques alternatives. A l'inverse, des conditions riches en substrats provoquent la déphosphorylation de $EIIA^{Glc}$ et une diminution de la concentration en AMPc. La répression catabolique correspond donc à une absence d'activation de la transcription.

En outre, le système PTS régule également le mécanisme dit « *inducer exclusion* » qui repose sur l'inhibition en présence d'une source de carbone préférentielle (comme le glucose) de plusieurs transporteurs de sources alternatives de carbone (perméase LacY (Osumi & Saier, 1982), ATPase de l'ABC transporteur (**cfr Box. 1**) au maltose MalK (Bluschke *et al.*, 2006)) ou de la glycérol kinase GlpK (responsable de la phosphorylation du glycérol importé via le transporteur GlpF) (de Boer *et al.*, 1986; Novotny *et al.*, 1985; Postma *et al.*, 1984) **(figure 3)**. Ce mécanisme repose sur l'inhibition directe par la forme déphosphorylée de la protéine $EIIA^{Glc}$ de ces protéines impliquées dans le transport de sources alternatives de carbone **(figure 3).** La forme déphosphorylée de la protéine $EIIA^{Glc}$ est majoritaire lorsqu'il y a du glucose puisque le phosphate est transféré successivement au transporteur EIIBC et au glucose importé.

Box 1. ABC (ATP-Binding cassette) transporteur

Présents chez toutes les espèces vivantes, les ABC transporteurs constituent une large famille de transporteurs actifs. Malgré leur grande diversité de substrats, ils partagent tous une architecture similaire. L'unité fonctionnelle est composée de 4 domaines : 2 domaines/sous-unités transmembranaires TM (MalF/MalG ; HlyB) par lesquel(e)s un substrat spécifique transite à travers la membrane et 2 domaines/sous-unités cytoplasmiques de liaison au nucléotide qui couplent le transport du substrat à l'hydrolyse d'ATP. La translocation du substrat au travers de la membrane se produit lors du changement de conformation des domaines TM suite à l'hydrolyse de l'ATP. Chez les bactéries, les ABC transporteurs sont principalement impliqués dans l'importation de nutriments comme le maltose (A) ou de solutés compatibles en cas de stress osmotique. Certains ABC transporteurs requièrent une protéine périplasmique (MalE, pour le maltose) qui lie le substrat. Enfin, certains permettent aussi l'export de toxines comme l'hémolysine (B). Image modifiée de (Davidson *et al.*, 2008).



[2] Une étude réalisée *in vitro* montre qu'aussi bien la forme phosphorylée que la forme déphosphorylée d'$EIIA^{Glc}$ est capable d'interagir avec l'AC. Cependant, seule la forme phosphorylée $EIIA^{Glc}$-P stimule l'activité de l'AC et ce, uniquement en présence d'un extrait cellulaire d'*E. coli* (Park et al., 2006).

Un troisième niveau de régulation dit « *glucose induction* » se superpose aux premiers. Ce mécanisme repose sur l'interaction spécifique entre la forme déphosphorylée du transporteur EIIBC^{Glc} et le répresseur transcriptionnel Mlc. Cette interaction a pour conséquence la séquestration du répresseur Mlc en membrane en présence de glucose et donc l'induction du régulon Mlc comprenant notamment le gène *mlc*, les gènes *pstIH* codant les protéines EI et Hpr et le gène *pstG* codant le transporteur EIIBC^{Glc} (Kimata *et al.*, 1998; Nam *et al.*, 2001; Nam *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2000). En absence de glucose, le régulateur Mlc est relâché et réprime la transcription de ces gènes cibles.

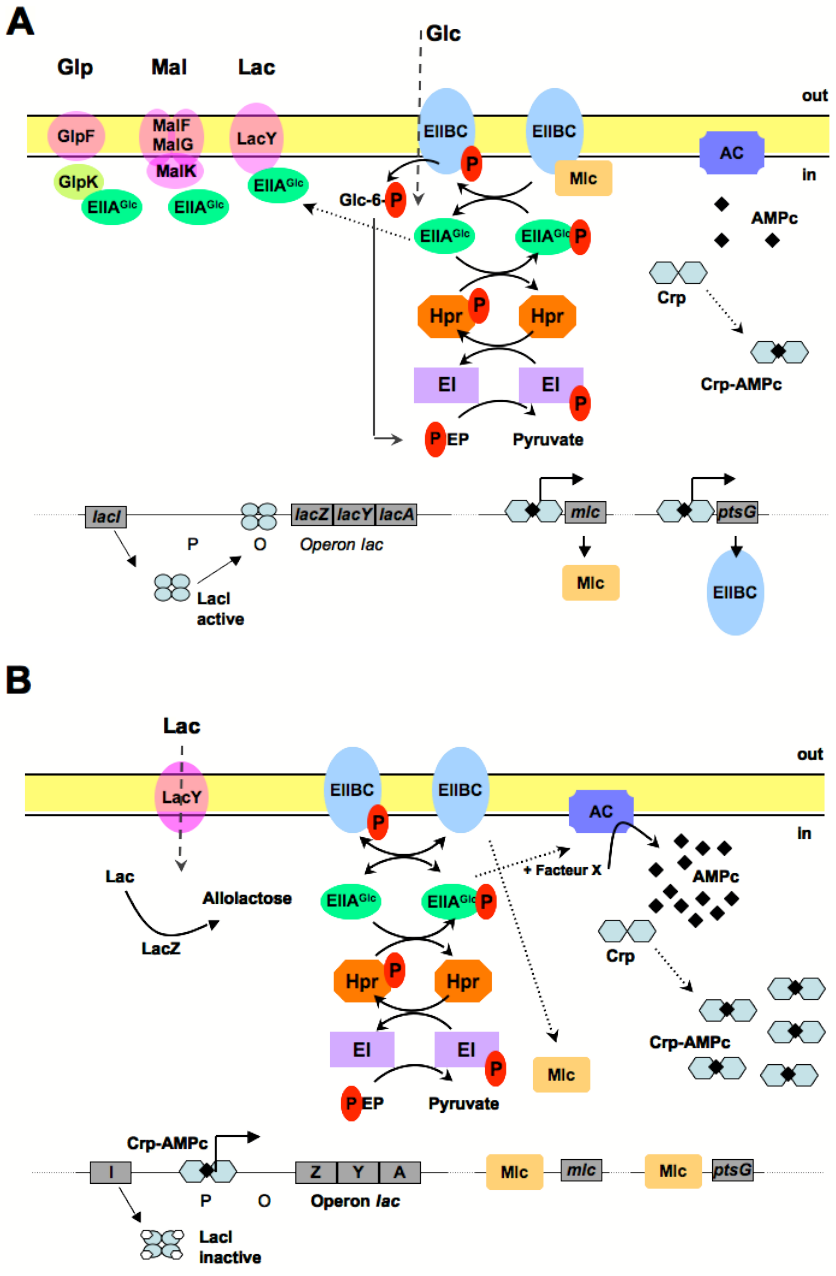


Figure 3. Mécanisme de répression catabolique chez les entérobactéries *E. coli* et *Salmonella thyphimurium*. (**A**) En présence de glucose (Glc), la forme non phosphorylée de EIIA^{Glc} majoritaire bloque l'importation de lactose (Lac) et de maltose (Mal) et la phosphorylation de glycérol (Glp). Le recrutement en membrane de Mlc par la forme non phosphorylée de EIIBC^{Glc} lève la répression des gènes *mlc* et *pstG* (encodant la protéine EIICB^{Glc}). Le répresseur LacI lie l'opérateur (O) de l'opéron lactose et réprime sa transcription. (**B**) En absence de glucose, la forme phosphorylée de EIIAGlc-P active l'adénylate cyclase (AC) probablement en présence d'un facteur inconnu (X) (Park *et al.*, 2006). L'AC produit l'AMPc qui en complexe avec Crp va réguler la transcription de gènes cibles. En présence de lactose, le répresseur LacI lie alors l'allolactose (β 1-6) et devient inactif. A l'inverse, Mlc lie les promoteurs des gènes *mlc* et *pstG* et réprime leur transcription. MalF, MalG et MalK forment l'ABC transporteur du maltose. LacY est la perméase du lactose. GlpF permet le transport du glycérol et GlpK est la kinase responsable de sa phosphorylation. Adapté de (Deutscher *et al.*, 2006).

Comme nous l'avons vu dans les mécanismes de répression catabolique, d'« *inducer exclusion* » et du « *glucose induction* », l'état de phosphorylation de chacune des protéines du système PTS constitue un signal qui peut rapidement réguler de multiples cibles **(figure 4)**. En fonction de leur état de phosphorylation, la régulation peut affecter des réactions enzymatiques (Park *et al.*, 2006; Seok *et al.*, 2001), des interactions protéines-protéines (Nam *et al.*, 2001), l'activité de transporteurs (Bluschke *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007a; Osumi & Saier, 1982) ou la régulation transcriptionnelle (Bolshakova *et al.*, 1978). Le système PTS régule ainsi globalement des comportements cellulaires comme la chémotaxie[3] (Lux *et al.*, 1995), la virulence (Dozot *et al.*, 2010; Houot & Watnick, 2008) ou la formation de biofilms (Houot & Watnick, 2008) en fonction de l'état métabolique et de la présence de sources de carbone ainsi que de leur nature.

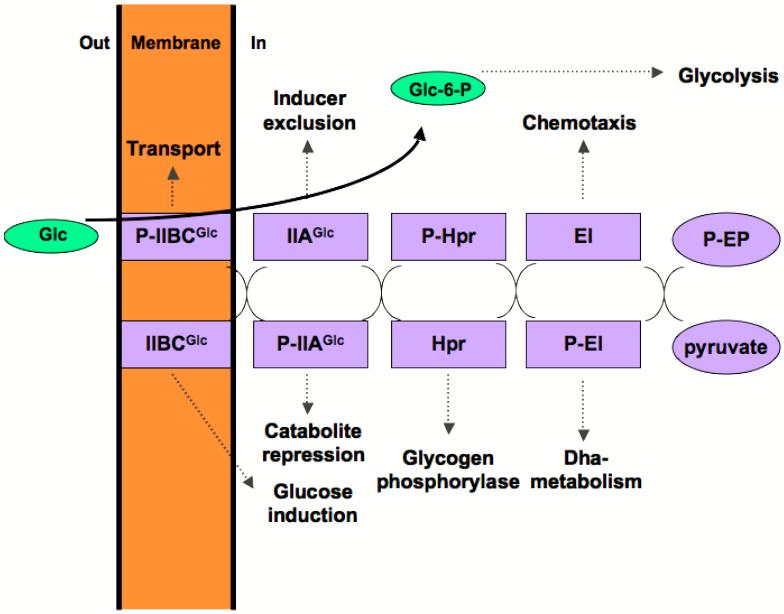


Figure 4. : Différentes cibles du système PTS chez les entérobactéries. L'enzyme EI contrôle l'activité de la kinase CheA impliquée dans la chémotaxie (Lux *et al.*, 1995). L'enzyme EIIA inhibe l'activité de transporteurs de sources alternatives de carbone (inducer exclusion) (Bluschke *et al.*, 2006; Osumi & Saier, 1982). P-EIIA régule l'activité de l'adénylate cyclase CyaA dont le produit active la transcription du régulon Crp (répression catabolique) (Park *et al.*, 2006). EIIBC en séquestrant le répresseur Mlc active la transcription de son propre gène (glucose induction) (Kimata *et al.*, 1998). Dans les cellules en famine, l'activité de la glycogène phosphorylase est activée par Hpr permettant ainsi la dégradation du glycogène (Seok *et al.*, 2001). La forme phosphorylée P-EI peut servir de donneur de phosphate pour les dihydroxyacétone (Dha) kinases (Gutknecht *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2011). Adapté d'après (Lengeler & Jahreis, 2009).

1.2. Réponse de stringence

La réponse de stringence (RS) est la réponse adaptative qui mène à un ajustement rapide et complexe de la physiologie de la cellule suite à un stress nutritionnel. La RS a été initialement caractérisée chez *E. coli* comme l'inhibition de la synthèse des ARNr et ARNt suite à une carence en acides aminés, menant à une inhibition de la synthèse des

[3] Mouvement d'un micro-organisme vers un gradient de nutriments. Le mécanisme moléculaire sous-jacent à la chémotaxie implique la détection d'un attractant ou répulsif à travers un senseur, l'intégration du signal et la réponse affectant la mobilité cellulaire.

protéines et un arrêt de croissance (Sands & Roberts, 1952; Stent & Brenner, 1961). En effet, lors d'un transfert d'un milieu riche à un milieu minimum, les cellules doivent faire face à une raréfaction des ARNt aminoacylés suite à la rapide consommation de ceux-ci par l'activité de traduction des ribosomes. Si le taux de synthèse protéique diminue globalement, certaines protéines impliquées notamment dans les voies de biosynthèse d'acides aminés vont être spécifiquement induites afin de restaurer la croissance. Les changements d'expression associés à la RS sont modulés par l'accumulation intracellulaire de deux nucléotides atypiques (Cashel & Gallant, 1969). Ces deux molécules (ou alarmones) ont été identifiées comme étant dérivées du GDP et GTP sur lesquels est greffé un résidu pyrophosphate, dès lors appelées guanosine tétra- et pentaphosphate ou communément (p)ppGpp (Cashel & Gallant, 1969).

Cependant, la réponse de stringence n'est pas exclusivement réservée à une carence en acides aminés mais aussi à d'autres stress nutritionnels suite par exemple à une déplétion en source de carbone ou d'azote (Murray & Bremer, 1996; Villadsen & Michelsen, 1977), des conditions limitantes en phosphate (Spira *et al.*, 1995), en acides gras (Seyfzadeh *et al.*, 1993) ou en fer (Vinella *et al.*, 2005). Si historiquement on appelait « réponse de stringence » la réponse spécifiquement induite lors d'une carence en acides aminés ; la réponse de stringence englobe maintenant toutes les réponses régulées par l'accumulation de (p)ppGpp (Potrykus & Cashel, 2008).

1.2.1. Perception d'un stimulus et génération d'un signal

Chez *E. coli*, lorsqu'un ribosome bloque sur un codon pour lequel l'ARNt correspondant est non aminoacylé, la protéine associée au ribosome RelA (ou (p)ppGpp synthétase I) est activée pour produire le (p)ppGpp. Cette enzyme catalyse le transfert d'un pyrophosphate de l'ATP sur un GDP ou GTP (en fonction du nucléotide prédominant) pour produire respectivement le ppGpp ou le pppGpp. Le ppGpp est également produit par hydrolyse du pppGpp via l'enzyme Gpp (pppGpp 5'phosphohydrolase). Le taux de (p)ppGpp intracellulaire est également influencé par la (p)ppGpp 3'pyrophosphohydrolase SpoT qui catalyse leur dégradation **(figure 5A)**. Cependant, lorsque la croissance est entravée par exemple par une déplétion en source de carbone, la réponse de stringence est activée par une voie indépendante de RelA **(figure 5B)**. Dans ce cas, la synthèse de (p)ppGpp se fait via l'action de SpoT (ou (p)ppGpp synthétase II) qui peut catalyser à la fois la synthèse et la dégradation de (p)ppGpp (Hernandez & Bremer, 1991; Laffler & Gallant, 1974; Xiao *et al.*, 1991). L'accumulation de (p)ppGpp résulte alors d'un déséquilibre entre l'activité de synthèse et de dégradation de SpoT. En fonction du stimulus, l'activation de la RS se fait soit par l'activation de l'activité synthétase (SpoT*) ou inhibition de l'activité hydrolase (SpoT). Cependant, excepté dans le cas des conditions de carence en acides gras, le mécanisme d'activation de SpoT n'est pas connu (Battesti & Bouveret, 2006).

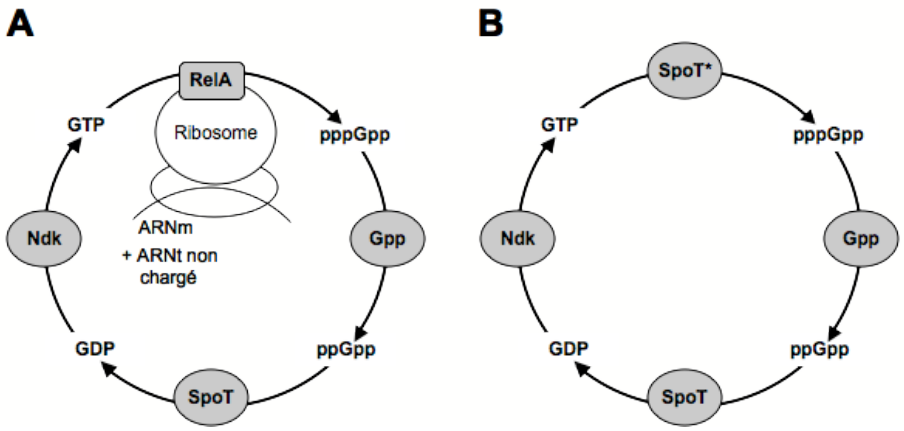


Figure 5. Voies de synthèse et de dégradation de l'alarmone pppGpp impliqué dans la réponse de stringence. (**A**) Voie ribosomique de synthèse du pppGpp par l'intermédiaire de RelA ((p)ppGpp synthétase I). (**B**) Voie de synthèse du pppGpp lors d'un stress nutritionnel (indépendant des acides aminés) par l'action bifonctionnnelle de SpoT. Ndk, nucléoside 5' diphosphate kinase. Adapté de (Neidhardt *et al.*, 1990).

En revanche, d'autres bactéries Gram négatives, comme les α-protéobactéries, possèdent un gène unique homologue à *relA/spoT* nommé *rsh* (pour *relA spoT* homologue) qui encode une enzyme bifonctionnelle possédant l'activité (p)ppGpp synthétase et hydrolase. Cette enzyme est notamment impliquée dans la réponse globale de *Caulobacter crescentus à* une carence nutritionnelle sévère (Boutte & Crosson, 2011).

1.2.2. Mécanismes de réponse au signal (p)ppGpp

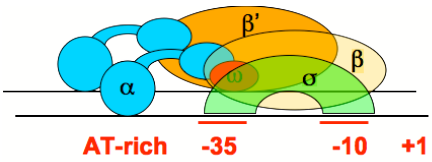
La RS passe par l'inhibition directe de la transcription des gènes codant les ARNt et ARNr et les protéines ribosomales (Lemke *et al.*, 2011) ainsi que l'activation de la transcription des opérons codant pour des voies de biosynthèse d'acides aminés. Globalement, chez *E. coli,* la RS régule plus de 500 gènes. L'accumulation de (p)ppGpp inhibe la transcription des gènes flagellaires et de chémotaxie, des gènes encodant des transporteurs et des enzymes de voies métaboliques, tandis qu'elle active de nombreux régulateurs (facteurs σ, *phoB*, *crp*) et protéines de stress (*usp*, chaperonnes) (Durfee *et al.*, 2008).

De nombreuses études ont été consacrées à la compréhension des mécanismes par lesquels le (p)ppGpp devient une molécule effectrice de la RS. Il a d'abord été montré que le ppGpp lie les sous-unités β et β' de l'ARN polymérase (ARNP) induisant de ce fait des changements transcriptionnels globaux (Chatterji *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1995; Toulokhonov *et al.*, 2001). Par la suite, le rôle du (p)ppGpp et de la protéine DksA sur la régulation positive ou négative de l'initiation de la transcription a été mis en évidence. Ceux-ci régulent la cinétique de formation d'un complexe ouvert d'initiation de la transcription (Barker *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2004; Paul *et al.*, 2005). Le (p)ppGpp régule aussi la transcription par un processus indirect en influençant la compétition de facteurs sigma σ (**cfr. Box. 2**) pour l'ARNP ou leurs activités (Jishage *et al.*, 2002).

En phase exponentielle de croissance, le facteur sigma σ^{70} dirige l'ARNP vers des opérons fondamentaux (*housekeeping*). Lorsque le (p)ppGpp alerte la bactérie d'un stress que ce soit par carence d'acides aminés, lors d'un transfert en milieu minimum ou le

passage en phase stationnaire, le facteur σ^S alternatif redirige l'ARNP vers la transcription de gènes spécifiques pour faire face à ces conditions. Bien qu'il est exprimé en phase de croissance exponentielle, la concentration en σ^S reste toutefois faible grâce à une protéine adaptatrice RssB qui dirige σ^S vers le protéasome ClpXP où il se fait dégrader **(figure 6A)** (Becker *et al.*, 1999; Muffler *et al.*, 1996a; Schweder *et al.*, 1996). Chez *E. coli*, lors d'une carence en phosphate, le (p)ppGpp induit l'expression de la protéine adaptatrice IraP qui lie RssB et bloque son activité **(figure 6B)** (Bougdour & Gottesman, 2007).

Box 2. Facteur sigma.



Un facteur sigma (σ) est une sous-unité amovible de l'ARN polymérase (ou ARNP) bactérienne essentielle à l'initiation de la transcription. Le core catalytique de l'ARNP est constitué d'un homodimère α_2, de deux grandes sous-unités β et β' et d'une sous-unité ω. Ensemble, ces 5 sous-unités sont capables de synthétiser de l'ARN à partir d'une matrice d'ADN et de nucléotides triphosphates. Cependant, l'initiation de la transcription requiert une sous-unité supplémentaire : le facteur (σ). Le facteur σ est une protéine qui s'associe de façon réversible à l'ARNP et qui intervient dans la reconnaissance spécifique de séquences promotrices en amont du site +1 (départ de la transcription). Il est libéré une fois le complexe stable d'élongation formé. Un moyen efficace pour la bactérie de modifier son profil transcriptionnel est de substituer son facteur σ par un facteur σ alternatif. Les bactéries possèdent plusieurs facteurs σ qui reconnaissent différentes séquences promotrices. On trouve notamment le facteur *housekeeping* σ^{70} responsable de la transcription de la plupart des gènes exprimés durant la phase exponentielle de croissance, σ^S spécifique de la phase stationnaire et conditions de stress, σ^E (ou ECF) spécifique d'un stress extracytoplasmique, σ^{32} impliqué dans la réponse au stress thermique ou encore σ^{28} nécessaire à l'expression des gènes flagellaires et de mobilité.

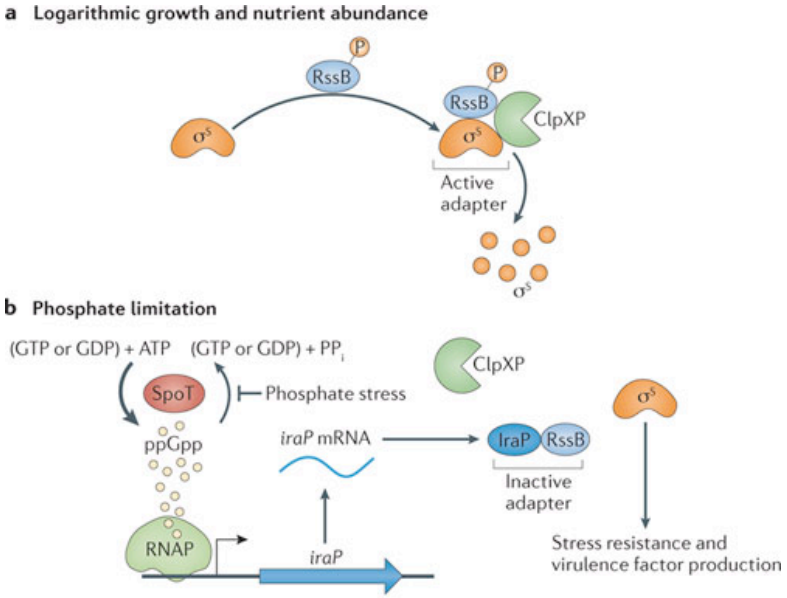


Figure 6. Contrôle indirect de la transcription par l'action du (p)ppGpp sur la stabilité de facteur σ^S. (**A**) En phase exponentielle de croissance, le facteur σ^S est dégradé par le complexe ClpXP sous la direction de RssB. (**B**) Lors d'une carence en phosphate, l'alarmone (p)ppGpp active la transcription de la protéine adaptatrice IraP. Ce dernier séquestre RssB et empêche ainsi la dégradation du facteur sigma σ^S. Image de (Dalebroux & Swanson, 2012).

Le (p)ppGpp régule également un autre facteur sigma, σ^E qui coordonne l'adaptation de la cellule en présence de protéines mal repliées dans le périplasme ou en membrane externe. Normalement, σ^E est séquestré en membrane par RseA et est libéré en réponse au stress extracytoplasmique suite à la dégradation de RseA (Ades *et al.*, 1999; De Las Penas *et al.*, 1997). Lors de l'entrée en phase stationnaire, l'activité du facteur σ^E augmente également avec l'accumulation intracellulaire de (p)ppGpp (Costanzo & Ades, 2006) bien que l'abondance de la protéine reste constante (Costanzo *et al.*, 2008). Le ppGpp régule donc l'activité du facteur σ^E et non pas son abondance dans la cellule.

En outre, le (p)ppGpp peut réguler l'activité de régulateurs transcriptionnels à la façon d'un ligand allostérique. Ainsi, le ppGpp lie et favorise la dimérisation du régulateur SlyA nécessaire à l'activation de gènes de virulence chez *S. thyphimurium* (Zhao *et al.*, 2008).

Enfin, le (p)ppGpp n'agit pas seulement au niveau de la transcription (revue par (Dalebroux & Swanson, 2012). Des effets (directs ou indirects) sur la régulation post-transcriptionnelle par l'intermédiaire de petits ARNs régulateurs (Edwards *et al.*, 2011), sur la stabilité des ARNm (Gatewood & Jones, 2010; Nadratowska-Wesolowska *et al.*, 2010), sur la traduction (en inhibant le facteur d'initiation de la traduction IF2) (Milon *et al.*, 2006) ou sur des activités enzymatiques (Gatewood & Jones, 2010; Kanjee *et al.*, 2011; Kuroda *et al.*, 1997) ont été rapportés.

Plus qu'un simple signal alertant la cellule d'une carence en acides aminés, le (p)ppGpp est aujourd'hui considéré comme un signal intracellulaire crucial qui agit comme un régulateur dynamique de l'adaptation physiologique globale de la bactérie à différents stress nutritionnels et environnementaux (Traxler *et al.*, 2011). La RS est en définitive la réponse de la bactérie lorsque son taux de croissance diminue et ce, quelle que soit la nature de la carence nutritionnelle. Son rôle (en synergie avec l'ensemble des mécanismes senseurs et régulateurs) a déjà été établi dans l'interaction de la bactérie avec un hôte eucaryotique (Calderon-Flores *et al.*, 2005; Dahl *et al.*, 2003; Dozot *et al.*, 2006; Moris *et al.*, 2005; Vogt *et al.*, 2011), la régulation du cycle cellulaire (Boutte *et al.*, 2012; Lesley & Shapiro, 2008) ainsi que dans la formation de biofilms et leur résistance aux antibiotiques (Boehm *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2011) **(figure 7).**

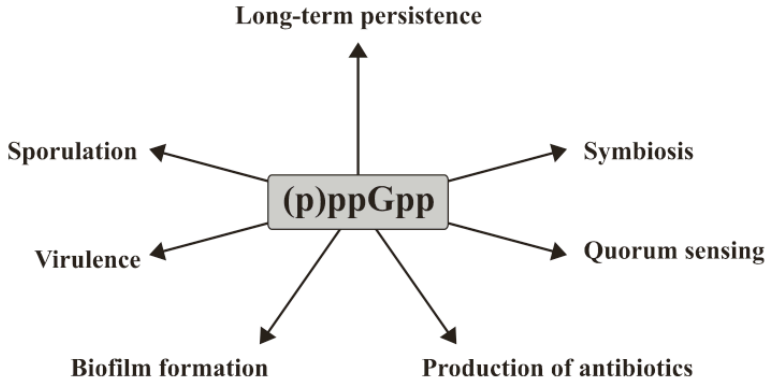


Figure 7 : Diagramme représentant les principaux processus régulés par l'alarmone (p)ppGpp. Image de (Jain *et al.*, 2006)

2. STRESS OSMOTIQUE

2.1. Perméabilité sélective des membranes cellulaires

La membrane plasmique d'une cellule, en plus de permettre la compartimentation nécessaire pour englober le contenu cellulaire doit également permettre les échanges indispensables entre la cellule et son environnement. Ces échanges sont possibles grâce à la perméabilité sélective de la membrane qui repose sur les propriétés physico-chimiques de la bicouche lipidique (McElhaney, 1975). Pour traverser passivement cette bicouche, un soluté doit être capable de passer soit directement à travers la bicouche soit à travers un pore aqueux qui traverse la membrane et empêche le contact entre le soluté et les molécules lipidiques. Deux facteurs interviennent dans le passage direct d'une substance à travers la bicouche lipidique : le coefficient de partition[4] (la pénétration sera d'autant plus importante que le soluté est soluble dans les lipides) et sa taille (à même coefficient de partition, la plus petite molécule traversera plus facilement la membrane) (Collander, 1937). Les membranes biologiques sont ainsi très perméables aux petites molécules non chargées comme l'O_2, le CO_2, le NO et l'H_2O tandis que les substances polaires plus grosses comme les sucres, acides aminés, intermédiaires phosphorylés pénètrent peu. En raison de cette pénétration différente de l'eau et des solutés, les membranes sont dites semi-perméables et obéissent au principe de l'osmose (**cfr. Box. 3**).

Ainsi, si l'on place une cellule dans un environnement hypertonique (ou hyperosmotique), le flux net des molécules d'eau vers l'extérieur résulte en une plasmolyse ou déshydratation. A l'inverse, dans un environnement hypotonique (ou hypoosmotique), les flux nets des molécules d'eau vers l'intérieur entraînent un gonflement (ou éclatement) de la cellule. Lorsque les concentrations interne et externe en solutés sont égales (isoosmotiques ou isotoniques), il n'y a pas de flux nets d'eau **(figure 8)**.

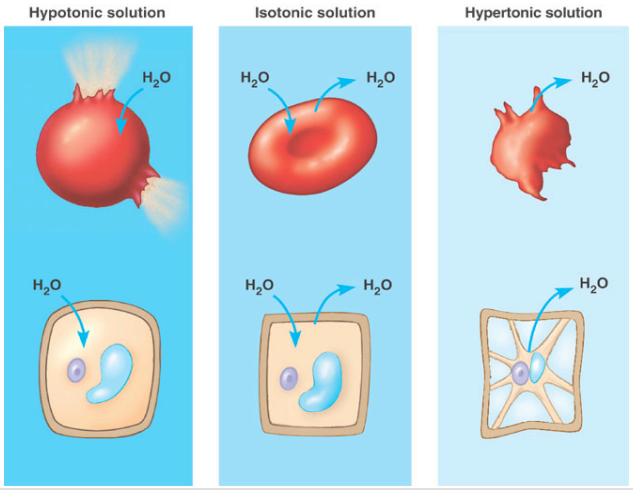


Figure 8. Effet de l'osmose sur les cellules vivantes : globule rouge (en haut) et cellule végétale (en bas). Une cellule placée dans un milieu hypotonique (par rapport au cytoplasme) gonfle suite au gain net d'eau. Dans une solution hypertonique (par rapport au cytoplasme), la cellule subit une perte nette d'eau et se contracte. Dans une solution isotonique, le flux d'eau s'équilibre et la cellule garde un volume constant. Chez les cellules végétales, on parle de pression de turgescence lorsque la cellule est gonflée et de plasmolyse lorsque le cytoplasme entouré de la membrane plasmique se contracte et se désolidarise de la paroi végétale. Image de http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/water_balance.jpg

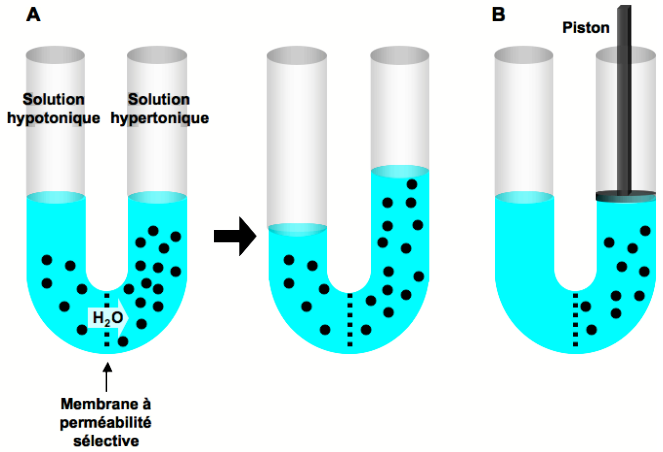
[4] Le coefficient de partition est défini comme le rapport entre la solubilité d'un soluté dans un solvant non polaire (comme l'octanol ou l'huile végétale) et sa solubilité dans l'eau. Cette valeur permet de définir le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une substance.

Box 3. Principe d'osmose et mesure de pression osmotique.

Le principe d'osmose repose sur la diffusion c'est-à-dire la tendance d'une substance à se répartir uniformément dans un milieu. Si on considère deux compartiments l'un contenant de l'eau et l'autre contenant un soluté en solution séparés par une membrane perméable à ce soluté, le soluté se répartira de part et d'autre de la membrane jusqu'à atteindre une concentration égale dans les deux compartiments. La diffusion s'effectue donc toujours selon un gradient de concentration, du compartiment le plus concentré vers celui le moins concentré.

(A) Principe d'osmose.

L'osmose est le cas particulier de la diffusion de molécules d'eau à travers une membrane à perméabilité sélective. Imaginons maintenant deux solutions (de concentration différente) séparées par une membrane perméable au solvant (l'eau) mais imperméable au soluté (perméabilité sélective). Dans ce cas, ce sont les molécules d'eau qui diffusent de la solution hypotonique (peu concentrée en solutés) à la solution hypertonique (très concentrée en solutés). Ainsi, on observe une diminution de volume de la solution au départ hypotonique au profit d'une augmentation de volume de la solution au départ hypertonique. La concentration en soluté tend ainsi à s'égaliser de part et d'autre de la membrane.



Adapté d'après (Campbell, 1995).

(B) Mesure de pression osmotique.

Une solution est séparée de l'eau pure par une membrane perméable au solvant (l'eau) mais imperméable au soluté. En condition normale, l'osmose entraînera un flux net de l'eau faisant augmenter le volume de la solution. On peut cependant contrer cette tendance en appliquant à la solution une pression à l'aide d'un piston. La pression qu'il faut appliquer à la solution du compartiment de droite pour garder un volume identique correspond à la pression osmotique. Dans une cellule bactérienne, la pression osmotique ou pression de turgescence s'exerce contre la paroi.

Les mouvements d'eau se réalisent donc par simple diffusion à travers la membrane. Cependant, la perméabilité à l'eau des membranes ne provient pas uniquement de la simple diffusion au travers de la bicouche de phospholipides. L'eau peut également traverser rapidement la membrane par l'intermédiaire de canaux spécifiques appelés aquaporines. L'aquaporine modèle AqpZ de *E. coli* est ainsi responsable de flux d'eau rapides à travers la membrane en réponse à une augmentation ou diminution d'osmolalité[5] (Calamita *et al.*, 1998; Delamarche *et al.*, 1999).

2.2. Homéostasie et stress osmotique

La disponibilité en eau est un facteur vital qui affecte la vie de tous les organismes. En conditions naturelles, l'environnement aqueux subit des changements d'osmolalité (suite aux variations de la composition et de la concentration en solutés mais aussi à la disponibilité en eau) qui, en cas de changements abrupts, sont néfastes. Cependant, les cellules vivantes sont capables d'homéostasie pour maintenir un équilibre interne en dépit des changements extérieurs. Grâce à leur paroi cellulaire de peptidoglycane, les bactéries maintiennent ainsi en permanence une pression osmotique (ou pression de turgescence) interne supérieure à leur environnement. Cette pression de turgescence (0,8-5 atm chez les bactéries Gram négatives ; 15-20 atm chez les bactéries Gram positives) est importante pour l'expansion de la paroi cellulaire (Harold, 1990; Neidhardt *et al.*, 1990). Etant donné que la composition du cytosol est critique pour la structure et les fonctions des macromolécules, les mécanismes de régulations qui assurent l'homéostasie sont essentiels (Csonka, 1989).

2.2.1. Généralités

De façon générale, les bactéries sont capables d'osmoadaptation afin d'adapter leur physiologie à un changement d'osmolalité externe. La réponse à un changement hyperosmotique externe est un ajustement (par le transport ou la synthèse) de la concentration intracytoplasmique en solutés ou osmolytes. A l'inverse, les composés qui protègent la cellule contre un environnement hyperosmotique menacent la survie cellulaire dans un environnement hypotonique. Afin de réduire l'entrée d'eau, la cellule extrude rapidement et de manière aspécifique (excepté par la taille) des solutés au travers de canaux mécanosensitifs. *E. coli* possède 3 types de canaux mécanosensitifs : MscL (large conductance), MscS (small conductance) and MscM (mini conductance). Ces protéines s'ouvrent proportionnellement en réponse à une tension de membrane (Berrier *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2002; Sukharev *et al.*, 1994).

Dans les points suivants, nous nous focaliserons sur la réponse à un stress hypersosmotique.

[5] Mesure du nombre d'osmoles de solutés par kilogramme de solvant. L'osmole correspond à une mole de particule effectivement en solution. Il convient de ne pas confondre l'osmolalité avec l'osmolarité définie comme le nombre d'osmoles de solutés par litre de solvant. Néanmoins, lorsque le solvant est l'eau et pour des solutions diluées, l'osmolarité est équivalente à l'osmolalité ; la masse volumique de l'eau étant égale à 1Kg/l.

2.2.2. Réponse au choc hyperosmotique

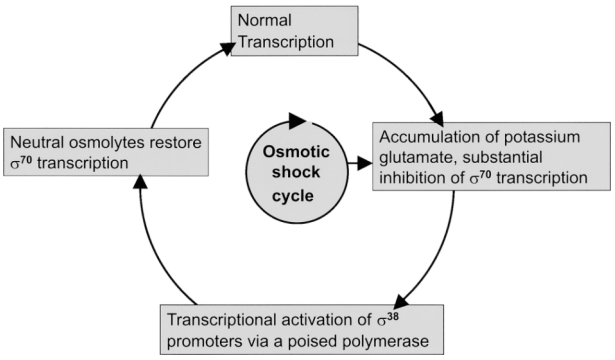
Suite à un choc hyperosmotique, la croissance bactérienne cesse immédiatement en parallèle avec la respiration (Meury, 1994) et l'activité de nombreux transporteurs de sources de carbone (Roth *et al.*, 1985). La croissance ne reprendra qu'une fois que la cellule aura mené à bien une réponse d'adaptation efficace (Jovanovich *et al.*, 1988). Cette réponse est organisée en plusieurs phases : une réponse immédiate et temporaire suivie d'une réponse adaptative durable. Dans un premier temps, la cellule augmente rapidement sa concentration intracellulaire en K^+ et glutamate qu'elle remplacera ensuite par des osmolytes électriquement neutres ou compatibles pour une protection à long terme et une reprise de la croissance (Dinnbier *et al.*, 1988).

2.2.2.A. Réponse primaire

Les ions K^+ jouent un rôle particulier dans la réponse primaire à une augmentation d'osmolalité. Abondants dans le cytosol, les ions K^+ sont responsables en grande partie du maintien de la pression de turgescence. Lors d'un choc hyperosmotique, ils sont accumulés rapidement dans le cytoplasme (Epstein & Schultz, 1965) via l'action de deux systèmes transporteurs Trk et Kdp **(figure 10)**. Trk est un transporteur constitutif de K^+ de faible affinité qui fonctionne grâce à la force protomotrice mais nécessite également de l'ATP (Harms *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 1985). Le système Kdp est un ABC transporteur (**cfr Box. 1**) de haute affinité spécifiquement induit en réponse à une augmentation de l'osmolalité du milieu externe ou un milieu appauvri en K^+ (Epstein *et al.*, 1978; Laimins *et al.*, 1978; Laimins *et al.*, 1981; Walderhaug *et al.*, 1992). Après un rapide transport, les ions K^+ s'accumulent dans le cytoplasme et agissent comme messagers secondaires (**cfr. Box. 4**) pour activer la réponse adaptative (Csonka, 1989). Rapidement, du glutamate nouvellement synthétisé s'accumule comme contre-ion pour préserver la neutralité électrique du cytoplasme et empêche une dépolarisation membranaire (McLaggan *et al.*, 1994; Measures, 1975; Tempest *et al.*, 1970).

Box 4. Le potassium K^+, un messager secondaire

Suite à un stress hyperosmotique, la phase d'accumulation de K^+ est accompagnée d'une reprogrammation de l'appareil de transcription entraînant un changement global de l'expression des gènes (Jovanovich *et al.*, 1988; Weber & Jung, 2002). Immédiatement après un choc osmotique, une diminution rapide de l'expression des ARNr et autres gènes du métabolisme central (dépendants du facteur σ^{70}) est observée. Dans le cas de la diminution d'expression des ARNr, il a été montré qu'elle est la conséquence directe de l'accumulation de K^+ glutamate qui semble bloquer la liaison spécifique du complexe ARN polymérase-σ^{70} aux promoteurs des gènes codant les ARN ribosomaux (Gralla & Vargas, 2006). A l'inverse, le K^+ glutamate active l'expression de certains gènes (dont les gènes encodant le facteur sigma σ^S, les transporteurs d'osmoprotectants ProU et ProP ainsi que les enzymes de synthèse du tréhalose) (Cheung *et al.*, 2003; Weber & Jung, 2002). Certains semblent directement affectés par le K^+ glutamate tandis que d'autres dépendent également du facteur sigma σ^S (Lee & Gralla, 2004) dont la transcription (Weber & Jung, 2002) mais aussi la traduction et la stabilité (Muffler *et al.*, 1996b) sont augmentées en réponse à un stress osmotique. Enfin, l'accumulation de solutés compatibles restaure la transcription nécessaire à la reprise de la croissance (Gralla & Vargas, 2006).



Modèle représentant les différentes phases d'adaptation d'*E. coli* à un choc osmotique. Le K^+ glutamate agit comme un messager secondaire qui contrôle le remaniement d'expression de gènes qui mène à un transport plus efficace des osmoprotectants disponibles ou à la synthèse de solutés compatibles en vue d'une adaptation à long terme pour restaurer la croissance. Image de (Lee & Gralla, 2004).

En outre, l'accumulation intracellulaire de potassium K^+ inhibe certaines activités enzymatiques. Il a ainsi été montré que le K^+ inhibe à la fois la transcription et l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide synthétase (AHAS) qui catalyse la première étape de synthèse des acides aminés branchés (leucine, isoleucine, valine) (Lee *et al.*, 2007a).

2.2.2.B. Réponse secondaire

Dans un second temps, le couple K^+/glutamate est progressivement remplacé par des solutés compatibles, c'est-à-dire qui peuvent être accumulés sans impact toxique sur les fonctions cellulaires. Il s'agit d'osmolytes organiques de charge nette nulle à pH physiologique qui en plus de restaurer l'hydratation de façon efficace agissent comme agents stabilisants des protéines (Arakawa & Timasheff, 1985; Bolen, 2001; Lippert & Galinski, 1992). Les principaux solutés compatibles sont la glycine bétaine, la proline, proline bétaine, l'ectoine et le tréhalose. Certains de ces solutés sont accumulés dans le cytoplasme depuis le milieu externe via l'activité de transporteurs spécifiques : ce sont des osmoprotectants.

a) Les osmoprotectants

La plupart des bactéries dépendent de transporteurs pour l'accumulation de glycine bétaine. Chez des bactéries comme *E. coli*, *Bacillus subtilis* ou *Sinorhizobium meliloti*, la synthèse de glycine bétaine peut néanmoins se faire à partir d'un précurseur choline (Andresen *et al.*, 1988; Boch *et al.*, 1994; Pocard *et al.*, 1997) importé dans le cytoplasme par BetT, un transporteur utilisant la force protomotrice. L'action de BetA (choline dehydrogénase) et de BetB (glycine betaine aldehyde dehydrogénase) permet la synthèse de glycine bétaine. L'expression de ces gènes est induite en présence de choline par le régulateur BetI (Lamark *et al.*, 1996; Rkenes *et al.*, 1996).

Par ailleurs, les osmoprotectants (proline, glycine bétaine, proline bétaine, ectoine) **(figure 9)** peuvent être accumulés directement via des transporteurs de haute affinité comme les très étudiés ProP et ProU (Cairney *et al.*, 1985a; Cairney *et al.*, 1985b; Haardt *et al.*, 1995; Jebbar *et al.*, 1992).

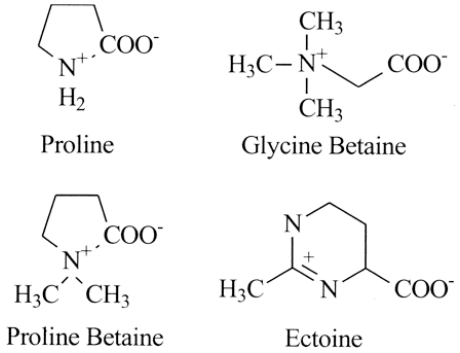


Figure 9. Structures chimiques des osmoprotectants : proline, glycine bétaine, proline bétaine et ectoine. Image de (Ly *et al.*, 2004).

ProP est un symporteur à protons **(figure 10)** dont la transcription mais aussi l'activité sont activées par un choc osmotique (Culham *et al.*, 2008; Mellies *et al.*, 1995; Racher *et al.*, 1999; Weber & Jung, 2002). ProP est aussi régulé au niveau post-transcriptionnel par la protéine ProQ, une ARN chaperonne (Chaulk *et al.*, 2011). Egalement induit par un choc osmotique, ProU constitue un ABC transporteur (**cfr. Box. 1**) (Ramirez *et al.*, 1989; Stirling *et al.*, 1989; Weber & Jung, 2002). Récemment, un nouvel ABC transporteur OsmU impliqué dans l'importation de glycine bétaine suite à un choc osmotique a été mis en évidence chez *Salmonella enterica* (Frossard *et al.*, 2012). Enfin, la proline peut être synthétisée à partir de glutamate et protège les bactéries d'un stress osmotique (Csonka, 1981). Elle peut également être transportée par les transporteurs ProP, ProU mais également par le transporteur PutP. PutP est un symporteur Na^+/proline qui permet l'importation de proline en tant que nutriments mais aussi en tant qu'osmoprotectant lors d'un choc osmotique (Jung *et al.*, 2012). Chez *Staphylococcus aureus*, le gène *putP* est induit en présence de proline et d'un environnement hyperosmotique (Schwan *et al.*, 2006).

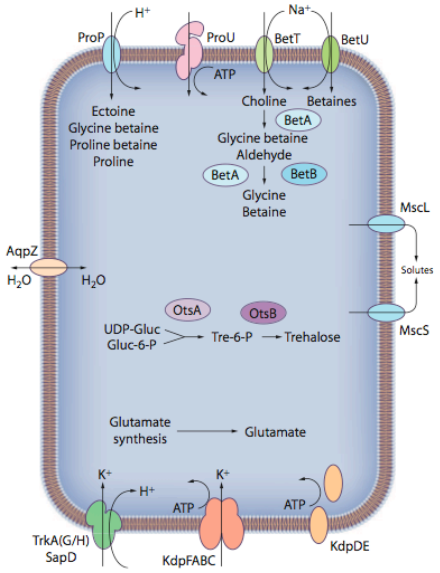


Figure 10. Représentation schématique des systèmes d'osmorégulation chez *E. coli*. L'aquaporine AqpZ facilite les flux hydriques à travers la membrane. Le transporteur TrK permet l'accumulation de K^+ en réponse à un stress hyperosmotique de même que le transporteur KdpFABC. KdpDE est un système à deux composants qui contrôle la transcription de l'opéron *kdpFABC* en réponse au stress osmotique ou à une carence en K^+. La synthèse de glutamate permet son accumulation comme contre-ion. Les transporteurs ProP, ProU, BetT et BetU permettent l'accumulation de composés organiques en conditions hyperosmotiques. ProU est un orthologue de OpuA de *Lactococcus lactis* tandis que BetT et BetU sont des orthologues de BetP de *Coryebacterium glutaminium*. Les enzymes BetA et BetB catalysent la synthèse de glycine bétaine à partir de choline. Les enzymes OstA et OstB permettent la synthèse de tréhalose à partir de glucose. Les canaux mécanosensitifs MscL et MscS extrudent des solutés en réponse à une augmentation de pression de turgescence. Image de (Wood, 2006).

b) Synthèse de tréhalose

Enfin, l'accumulation de tréhalose se fait par synthèse *de novo* grâce à l'action de deux enzymes encodées par l'opéron *otsAB* **(figure 10).** OstA réalise d'abord la condensation de glucose-6-phosphate et d'UDP-glucose ; s'ensuit la déphosphorylation du tréhalose-6-P par OstB (Giaever *et al.*, 1988). La transcription de cet opéron est induite lors d'un choc osmotique mais aussi lors de l'entrée en phase stationnaire par l'intermédiaire du facteur sigma σ^S (**cfr. Box. 2**) suggérant pour le tréhalose un rôle de protection dans la réponse générale de stress (Hengge-Aronis *et al.*, 1993). L'apport de glycine bétaine dans le milieu conduit à une suppression de l'accumulation de tréhalose (Dinnbier *et al.*, 1988).

c) Altération de la composition phospholipidique de la membrane

La composition en phospholipides des membranes varie également lors de changement osmotique et/ou de salinité du milieu (Brown *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 2005). Ainsi, chez *E. coli,* la proportion de phospholipides anioniques (phosphatidylglycérol (PG), cardiolipine (CL)) par rapport aux phospholipides zwitterioniques (phosphoethalonamine) augmente avec la salinité (Romantsov *et al.*, 2007). Cette variation est amenuisée par l'ajout de glycine bétaine exogène. Les charges négatives contribueraient à l'adaptation en maintenant une hydratation à l'interface (Sleator & Hill, 2001). La CL est majoritairement synthétisée à partir de deux molécules de PG par une cardiolipine synthétase (Cls) (Nishijima *et al.*, 1988; Tropp, 1997), celle-ci étant responsable de l'augmentation de CL lors d'un choc salin (Romantsov *et al.*, 2007). En outre, la composition en phospholipides et en particulier la CL influence l'activation des mécanismes osmosenseurs et participe ainsi à la réponse secondaire (Romantsov *et al.*, 2008; van der Heide *et al.*, 2001). Ainsi, il a été montré que la CL contrôle la fonction et la localisation au pôle de ProP chez *E. coli* (Romantsov *et al.*, 2007; Romantsov *et al.*, 2008; Tsatskis *et al.*, 2005). Toutefois, le mécanisme sous-jacent à l'augmentation de

l'activité cardiolipine synthétase en réponse à un choc osmotique est inconnu.

2.2.3. Osmosensing

Contrairement aux chemosenseurs qui perçoivent un ligand spécifique, les osmosenseurs sont plutôt des macromolécules qui subissent des changements de conformation et/ou d'état d'oligomérisation en réponse aux changements osmotiques. Il est difficile d'identifier les stimuli directement perçus par ces osmosenseurs. Il peut s'agir d'un changement de pression de turgescence ou de volume cellulaire, d'une altération de la membrane et de l'état d'hydratation de protéines membranaires ou plus probablement d'un changement en solutés ioniques intracellulaires (Poolman *et al.*, 2002).

Afin de s'assurer une réponse rapide, la cellule requiert des transporteurs-osmosenseurs dont l'activité est directement contrôlée par les conditions osmotiques. D'autres osmosenseurs initient une voie de transduction du signal pour réguler l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans la réponse adaptative. L'utilisation de systèmes reconstitués « liposomes-osmosenseur purifié » (permettant de s'affranchir des autres constituants cellulaires) a facilité l'étude des mécanismes d'osmosensing (Kramer *et al.*, 2010; Wood, 1999). Les plus connus d'entre eux sont brièvement décrits ci-après.

2.2.3.A. Osmosenseurs-transporteurs : MscL, ProP, OpuA et BetP

Une activité d'*osmosensing* a été montrée en protéoliposomes pour les canaux mécanosensitifs et les transporteurs ProP d'*E. coli* (Racher *et al.*, 1999), OpuA de *Lactococcus lactis* (van der Heide & Poolman, 2000) et BetP de *Corynebacterium glutamicum* (Rubenhagen *et al.*, 2001). Ces osmosenseurs-transporteurs permettent le transport de solutés (pour les canaux mécanosensitifs) ou d'osmoprotectants (pour ProP, OpuA et BetP) à travers la membrane en réponse à la perception d'un changement d'osmolalité.

Les canaux mécanosensitifs comme leurs noms l'indiquent répondent à un stimulus mécanique d'étirement de la membrane mais également à une dépolarisation membranaire (Sukharev, 1999). Lors d'un choc hypoosmotique, la pression de turgescence entraînerait un étirement et une diminution d'épaisseur de la membrane qui activerait l'ouverture du canal et donc l'extrusion d'eau et de solutés (Poolman *et al.*, 2002). Des études concernant les transporteurs de solutés compatibles ProP, OpuA et BetP (Peter *et al.*, 1998) suggèrent également une perception indirecte dépendant de la pression osmotique.

L'activité osmosenseur de ProP dépend du potentiel de membrane (Racher *et al.*, 2001) et de son domaine N-terminal (Keates *et al.*, 2010; Wood *et al.*, 2005). Le domaine C-terminal *coiled coil* (*cc*) de ProP et le contenu en phospholipides anioniques de la membrane déterminent en revanche le seuil osmotique requis pour l'activation (Romantsov *et al.*, 2008). Ainsi, en l'absence de CL ou du domaine *cc*, ProP s'active à plus faible osmolalité (Romantsov *et al.*, 2008). Chez *L. lactis,* OpuA est un senseur de force ionique dont l'activité dépend également de la composition en phospholipides de la membrane (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006; van der Heide *et al.*, 2001). Enfin, BetP est décrit comme un senseur spécifique des ions K^+ via son domaine C-terminal cytoplasmique (Rubenhagen *et al.*, 2001; Schiller *et al.*, 2004).

2.2.3.B. Osmosenseurs régulateurs

Les osmosenseurs régulateurs font partie des systèmes de transduction du signal appelés systèmes à deux composants (**cfr. Box. 5**).

Box 5. Système à deux composants et phosphorelay

Présents chez presque toutes les bactéries, les systèmes à deux composants (SDC) représentent un mécanisme primaire permettant l'adaptation d'un organisme à un stimulus interne ou externe. Le prototype du SDC se compose d'une histidine kinase (HK) membranaire qui répond le plus souvent à un signal extracytoplasmique et d'un régulateur de réponse (RR) associé qui, dans la plupart des cas, est un régulateur transcriptionnel.

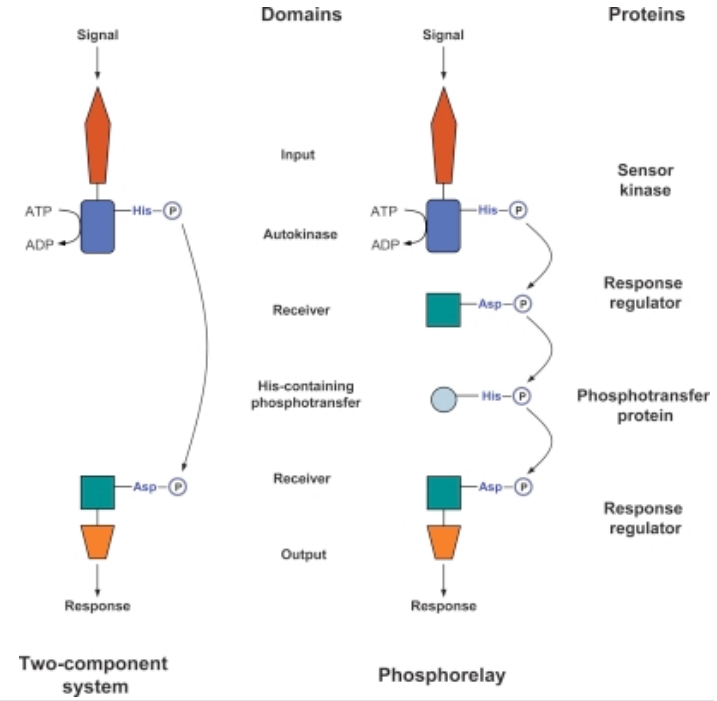
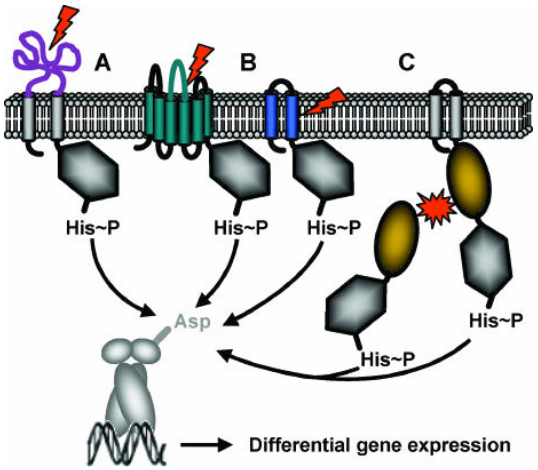


Schéma des partenaires constituant un système à deux composants (gauche) et un phosphorelay (droite). Un SDC est composé d'une histidine kinase (HK) et d'un régulateur de réponse (RR). Le domaine « input » ou senseur de l'HK perçoit un signal ; s'ensuit la phosphorylation ATP dépendante d'un résidu histidine (His) du domaine autokinase. Le groupement phosphate est alors transféré au régulateur de réponse sur un aspartate (Asp). De par sa phosphorylation, ce dernier va voir l'activité de son domaine « output » ou effecteur modifiée. Un phosphorelay implique de multiples transferts de phosphate en alternance entre résidus His-Asp. Le phosphorelay est composé (en plus d'un senseur kinase et d'un régulateur de réponse) d'un régulateur de réponse intermédiaire dépourvu de domaine effecteur et d'une protéine Hpt intermédiaire qui relaie le groupement phosphate au RR. Dans certains phosphorelays, le régulateur de réponse intermédiaire et/ou la protéine Hpt sont fusionnés à la protéine kinase et forment alors un système hybride. Image de (Mitrophanov & Groisman, 2008).

Box 3. Système à deux composants et phosphorelay (suite)

Perception du signal

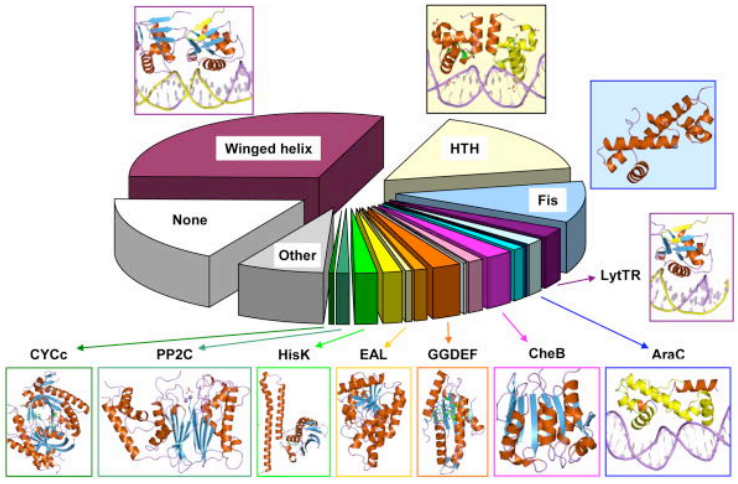
Pouvant être interne ou externe, le signal ou ligand perçu par le senseur HK est dans la grande majorité des cas inconnu. Par ailleurs, la localisation membranaire de l'HK n'implique pas forcément un signal extracellulaire soluble (Leonardo & Forst, 1996; Ostrander & Gorman, 1999; Wang *et al.*, 2012). Trois groupes de protéines HK ont été définis selon le domaine impliqué dans la perception du stimulus : les HK à perception périplasmique, les HK à perception membranaire et le HK à perception cytosolique (**figure ci-dessous**) (Mascher *et al.*, 2006).



Représentation schématique des trois mécanismes de perception d'un stimulus par une protéine histine kinase. (A) Histidine kinase à perception périplasmique (B) Histidine kinase dont la perception est liée aux régions transmembranaires (soit directement par les hélices transmembranaires soit grâce à la combinaison des hélices et d'une petite boucle extracellulaire) (C) Histidine kinase à perception cytoplasmique. Le stimulus est représenté par une flèche ou une étoile rouge. Les parties colorées reflètent l'implication dans la perception du stimulus. Image de (Mascher *et al.*, 2006).

Diversité des régulateurs de réponse

Les régulateurs de réponse (RR) présentent une grande diversité de domaines effecteurs (Galperin, 2006; Galperin, 2010). Bien que la majorité agisse comme régulateurs transcriptionnels (familles OmpR/PhoB (*winged helix*), NarL/FixJ (*HTH*), LytTR, AraC, et Fis (pas de structure connue)), le domaine effecteur peut être impliqué dans des activités enzymatiques (synthèse (GGDEF) (Aldridge *et al.*, 2003; Guvener & Harwood, 2007; Rogers *et al.*, 2009) ou dégradation (EAL, HD-GYP) (Mikkelsen *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2006b) du messager secondaire di-GMP cyclique ; méthylestérase (CheB) (Djordjevic *et al.*, 1998)) ainsi que dans des interactions protéine-protéine (Francez-Charlot *et al.*, 2009) ou protéine-ARN (ANTAR, CsrA) (O'Hara *et al.*, 1999; Shu & Zhulin, 2002). Quelle que soit la fonction effectrice du RR d'un SDC, celle-ci est modifiée par son état de phosphorylation. En conséquence, l'activité du RR ne dépendra donc pas uniquement d'un stimulus perçu par sa kinase associée mais également d'autres facteurs auxiliaires stimulant ou inhibant son état de phosphorylation et/ou son activité effectrice (pour revue voir (Mitrophanov & Groisman, 2008).



Distribution des domaines effecteurs de régulateur de réponse bactériens. Les sections non annotées correspondent à SpoOA (bleu foncé), ANTAR (cyan), CheW (rose), CheW (blanc), EAL+GGDEF (orange) et HD-GYP (jaune). Image de (Galperin, 2010).

a) Le système à deux composants EnvZ/OmpR

Le système EnvZ/OmpR est un système à deux composants qui répond à un changement osmotique et régule l'expression des porines OmpF et OmpC (Aiba & Mizuno, 1990; Mizuno & Mizushima, 1990). Ces protéines de membranes externes constituent des canaux pour le passage de composés de faible poids moléculaires (Neidhardt *et al.*, 1990). A faible osmolalité, OmpF est la porine majoritaire de la membrane externe tandis qu'à osmolalité élevée, elle est réprimée au profit d'OmpC (Jovanovich *et al.*, 1988). Une interprétation est qu'OmpC serait synthétisée préférentiellement lorsque la bactérie se trouve dans le tractus intestinal d'un hôte. Dans cet environnement, le petit pore d'OmpC réduirait l'entrée de molécules toxiques comme les sels biliaires tout en permettant l'entrée de nutriments. En revanche, OmpF dont le pore est plus large (Nikaido & Rosenberg, 1983) serait exprimée en dehors de l'hôte quand l'osmolalité est réduite et les nutriments plus dilués (Sleator & Hill, 2001). Le système EnvZ/OmpR régule de nombreux autres gènes chez *E. coli* (Oshima *et al.*, 2002) et ses orthologues sont associés à la virulence de nombreux pathogènes (Bernardini *et al.*, 1990; Dorman *et al.*, 1989; Dorrell *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000; Schwan, 2009). Parmi les gènes régulés par EnvZ/OmpR se trouvent notamment des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés cystéine et leucine, de l'entérocheline et des gènes flagellaires (Oshima *et al.*, 2002).

EnvZ est une HK membranaire constituée d'un petit domaine N-terminal cytoplasmique, de deux régions transmembranaires, d'une boucle périplasmique et d'un grand domaine C-terminal cytoplasmique (Forst *et al.*, 1987). Dans un premier temps, il a été mis en évidence que le domaine périplasmique de la kinase membranaire EnvZ n'était pas requis pour l'*osmosensing* (Leonardo & Forst, 1996). Ce n'est que récemment que le mécanisme d'*osmosensing* a été mis au jour. Ainsi, le domaine C-terminal cytoplasmique de l'HK à lui seul est suffisant pour la perception du stimulus (probablement une augmentation en K^+ (Jung *et al.*, 2001)) et l'activation de la cascade de transduction ; la localisation en membrane n'étant pas non plus requise (Wang *et al.*, 2012).

b) Le système KdpD/KdpE

Le système à deux composants KdpD/KdpE active l'expression de l'opéron *kdpFABC* qui code pour l'ABC transporteur de K^+ Kdp-ATPase de haute affinité (Altendorf *et al.*, 1994; Nakashima *et al.*, 1992). Ce système répond à une augmentation d'osmolalité ainsi qu'à une diminution de la concentration K^+ externe (Voelkner *et al.*, 1993). Le mécanisme senseur réside dans l'altération des interactions électrostatiques entre les domaines N-terminal et C-terminal de la kinase en réponse à différents stimuli de façon indépendante de la pression de turgescence (Hamann *et al.*, 2008; Heermann *et al.*, 2009a) **(figure 11)**. La kinase semble ainsi répondre à une diminution de la concentration intracellulaire en K^+ **(figure 11A)** ou à une augmentation de la force ionique lors d'un choc osmotique **(figure 11)**. Par ailleurs, en condition externe limitante en K^+, l'ajustement de la composition de la membrane en faveur des lipides anioniques favorise l'activité kinase de KdpD (Schniederberend *et al.*, 2009).

Enfin, deux protéines accessoires UspC (*Universal Stress Protein*) (Heermann *et al.*, 2009b) et EIIA^{Ntr} (constituant d'un système PTS) (Luttmann *et al.*, 2009) interagissent avec KdpD pour réguler l'homéostasie en K^+ dans certaines conditions physiologiques (Heermann & Jung, 2010). La liaison spécifique de la protéine UspC au domaine N-terminal de KdpD permet la phosphorylation de la kinase lorsque la concentration élevée en K^+ est inhibitrice (Jung *et al.*, 2000) et par conséquent l'induction du transporteur de K^+ Kdp-ATPase lors d'un choc osmotique **(figure 11B)**. La protéine EIIA^{Ntr} est un autre acteur qui influence le système KdpD/KdpE. Constituant du système PTS^{Ntr} régulateur, la forme non phosphorylée de EIIA^{Ntr} inhibe le transporteur de faible affinité TrkA (Lee *et al.*, 2007a) et active le système KdpD/KdpE (Luttmann *et al.*, 2009). Cette interaction entre le système PTS et le transport de K^+ est à l'origine de la « pseudo-auxotrophie » pour l'isoleucine rapporté pour le mutant *ptsN* (EIIA^{Ntr}) chez certaines souches[6] d' *E. coli* (Reaves & Rabinowitz, 2011). En effet, un mutant *ptsN* accumule du potassium K^+ intracellulaire. Cette accumulation de K^+ inhibe l'activité enzymatique de l'acétohydroxyacide synthétase (AHAS) qui catalyse la première étape de synthèse des acides aminés branchés (Lee *et al.*, 2007a).

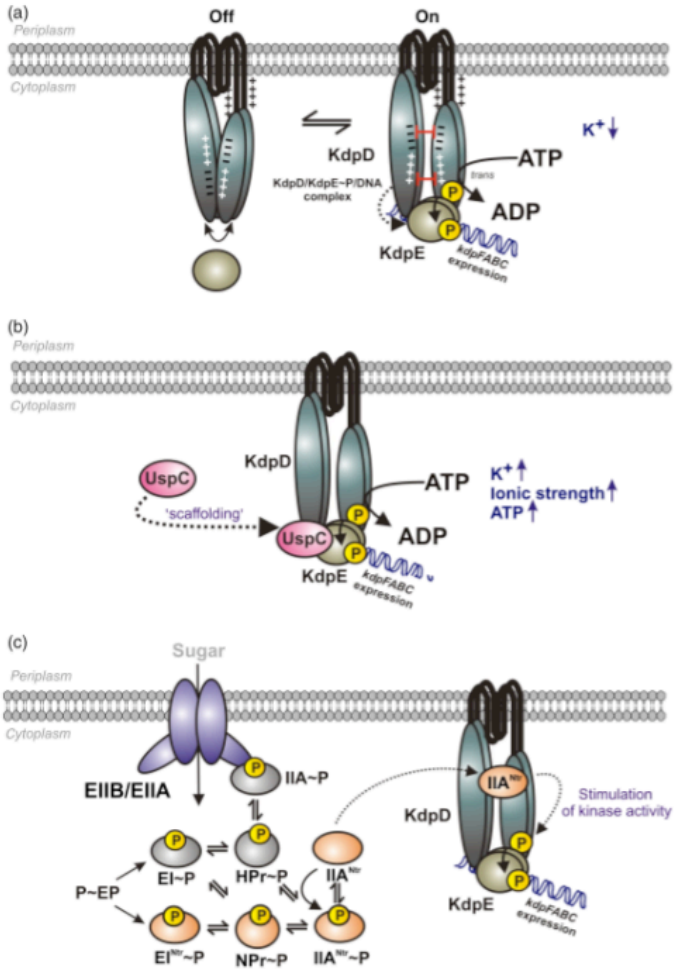


Figure 11 : Modèle de perception et de transduction du signal KpdD/KpdE. KdpD forme un dimère et la phosphorylation s'opère *en trans.* Le phosphate est transféré sur le régulateur de réponse KdpE qui dimérise et lie la région promotrice du promoteur *kdpFABC.* (a) mécanisme d'activation en condition de carence en K^+. (b) mécanisme d'activation par la protéine UspC en cas de stress salin. UspC interagit avec le domaine Usp de KdpD et stabilise le complexe KdpD/KdpE-P/DNA lorsque la concentration en K^+ est élevée (c) mécanisme d'activation via le système PTS^{Ntr}. La protéine EII^{Ntr} non phosphorylée interagit avec KdpD et stimule l'activité autokinase de KdpD. Image de (Heermann & Jung, 2010).

[6] Ce phénotype est absent chez les souches (*ilvG*$^+$ Δ*pstN*) possédant une copie fonctionnelle du gène *ilvG.* Ce gène code pour une isoenzyme d'AHAS (AHASII) insensible aux ions K^+. Les souches *E. coli* MG1655,W3110 et MC4100 possèdent une isozyme AHASII inactive en raison d'une mutation dans le gène *ilvG*.

La réponse au stress hyperosmotique est une réponse complexe et phasique qui est cruciale pour maintenir la survie et la croissance de la bactérie (Dinnbier *et al.*, 1988) (Jovanovich *et al.*, 1988). La réponse adaptative à un stress osmotique implique un remaniement de l'expression de gènes, un ajustement de la concentration en osmolytes (faisant intervenir différentes voies de biosynthèse et des transporteurs), l'altération de la composition phospholipidique membranaire ainsi que des systèmes régulateurs globaux (facteurs sigma, système à deux composants). L'implication de ces régulateurs témoigne d'une adaptation globale de la cellule au stress. Certains acteurs de la réponse sont impliqués dans la virulence de pathogènes qui, au cours de leur cycle, sont amenés à rencontrer des conditions d'osmolalité changeantes (Bernardini *et al.*, 1990; Dorman *et al.*, 1989; Dorrell *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000; Schwan, 2009; Su *et al.*, 2009). Enfin, il convient de noter que la dynamique et les mécanismes de la réponse diffèrent selon qu'il s'agit d'un stress osmotique (osmotolerance) ou salin (halotolerance) (Han *et al.*, 2005; Shabala *et al.*, 2009).

3. Stress oxydatif

Depuis l'apparition des premières cellules photosynthétiques, l'oxygène présent dans l'atmosphère a contraint les organismes à s'adapter aux nouvelles conditions de vie sur Terre. Ainsi, le Vivant a développé des voies métaboliques aérobies pour exploiter au mieux cette molécule mais également des mécanismes de protection au stress qu'elle peut engendrer. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) sont des espèces oxygénées chimiquement très réactives telles que les radicaux libres, superoxydes et les peroxydes. Les ROS peuvent être d'origine exogène ou endogène (métabolisme aérobie). Ils sont principalement produits à partir de la chaîne respiratoire de transfert d'électrons lorsque des électrons s'échappent et réagissent un à un avec l'oxygène O_2 (Gonzalez-Flecha & Demple, 1995). Il se forme alors un superoxyde $O_2^{\cdot-}$, celui-ci peut successivement à son tour se faire réduire en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 puis en radical hydroxyl $^{\cdot}OH$. La production de ce dernier résulte de la réaction de Fenton où un métal comme le fer Fe^{2+} se fait oxyder par l'H_2O_2 **(figure 12)**.

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

$$\text{Net reaction :}\quad O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow {}^{\cdot}OH + OH^- + O_2$$

Figure 12 : Réaction de Fenton. D'après (Cornelis *et al.*, 2011)

Les ROS et surtout les radicaux libres sont capables d'altérer de nombreuses molécules comme les protéines (oxydation de cystéines/méthionines, de centres Fe-S et de métalloenzymes, carbonylation par oxydation d'acides aminés), les acides nucléiques et les lipides (pour revue voir (Imlay, 2003)). De par leurs propriétés dommageables pour le Vivant, les ROS constituent des composants essentiels de la réponse immunitaire innée contre les pathogènes. Ainsi, l'un des mécanismes bactéricides des cellules phagocytaires consiste en la production de ROS par une NADPH oxydase (NOX) phagosomale durant l'explosion respiratoire liée à la phagocytose (Babior *et al.*, 2002; Lambeth, 2004; West *et*

al., 2011). La production de ROS joue également un rôle crucial dans les interactions plantes-pathogènes. Chez les plantes, les ROS agissent non seulement envers le pathogène mais aussi comme un signal activant la réponse hypersensible (Levine *et al.*, 1994; Tenhaken *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2005) et des modifications de parois cellulaires (Denness *et al.*, 2011). Le rôle de signal des ROS et RNI (*reactive nitrogen intermediate*) est connu chez les eucaryotes (Ray *et al.*, 2012) et, depuis peu, le rôle des RNI en tant que signal émerge également chez les bactéries ainsi que dans leur relation à l'hôte (Mocca & Wang, 2012; Plate & Marletta, 2012; Schreiber *et al.*, 2011).

Quelle que soit leur origine, au-delà d'une concentration critique, les ROS représentent une menace qui doit être rapidement contrôlée. Toutes les cellules vivantes disposent notamment d'enzymes capables de détoxifier ces produits mais aussi de faire face aux dommages causés par un stress oxydatif (pour revue voir (Imlay, 2008)). Ainsi, les cellules possèdent des enzymes telles que les superoxyde dismutases, catalases et peroxydases qui sont capables de dégrader le O_2^- et l'H_2O_2 en composés inertes **(figure 13)**.

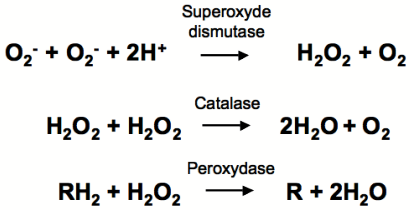


Figure 13. Réaction de détoxification enzymatique du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène.
Adapté de (Imlay, 2008)

Normalement, les défenses basales de la cellule contre les ROS suffisent à les maintenir sous contrôle (Seaver & Imlay, 2001). Cependant, les bactéries mettent en place une réponse adaptative au stress oxydatif lors d'une augmentation significative de la concentration en ROS. Cette augmentation peut être imposée artificiellement en laboratoire mais aussi de façon endogène suite à un stress nutritionnel lorsque la culture présente un arrêt de croissance ou suite à l'action d'antibiotiques bactéricides[7] (Dwyer *et al.*, 2007; Goswami *et al.*, 2006; Kohanski *et al.*, 2007; Kohanski *et al.*, 2008; Wang & Zhao, 2009). Lors d'un stress nutritionnel, la synthèse des macromolécules est fortement réduite cependant la respiration cellulaire et la production de ROS ne diminuent pas aussi drastiquement (Gonzalez-Flecha & Demple, 1995; Nystrom *et al.*, 1996). Un stress oxydatif endogène résulte donc du déséquilibre entre la production et l'élimination/dilution des ROS (Dukan & Nystrom, 1999).

3.1. Perception du stress oxydatif : les senseurs redox

Les senseurs redox sont des protéines sensibles aux ROS qui subissent un changement de structure et/ou de fonction suite à leur oxydation (Green & Paget, 2004). Suivant les cas, le senseur sera directement un régulateur transcriptionnel (SoxR

[7] En dépit de leurs différentes cibles (réplication de l'ADN, synthèse protéique ou paroi bactérienne), les antibiotiques bactéricides génèrent un stress oxydatif par la production endogène de ROS menant *in fine* à la mort de la bactérie.

(Kobayashi *et al.*, 2011), PerR (Lee & Helmann, 2006), OxyR (Zheng *et al.*, 1998), OhrR (Lee *et al.*, 2007b) et PqrR (Rungrassamee *et al.*, 2009)) ou une histidine kinase d'un système à deux composants (NtrY (Carrica *et al.*, 2012), FixL (Monson *et al.*, 1995)) qui contrôlera l'activité d'un régulateur. En fonction de la protéine considérée, l'oxydation peut s'effectuer sur des centres [Fe-S], des ions métalliques complexés directement ou par un groupement hème au sein de la protéine ou encore sur des résidus cystéines ou méthionines.

SoxR forme ainsi un homodimère dont chaque unité contient un centre $[2Fe\text{-}2S]^{+}$. L'oxydation directe de ce centre par des drogues pro-oxydantes cause un changement de conformation de la protéine induisant ainsi la transcription des gènes cibles (Gu & Imlay, 2011; Kobayashi *et al.*, 2011). Chez *B. subtilis*, la protéine PerR retient un atome de fer Fe^{2+} complexé entre des résidus histidines et agit comme un répresseur transcriptionnel. L'H_2O_2 entraîne une oxydation de l'atome métallique en Fe^{3+} suivant la réaction de Fenton et libère un hydroxyl. Ce dernier réagit aussitôt sur un résidu histidine complexant le métal (Lee & Helmann, 2006). Cette modification libère l'atome de fer et empêche un nouvel ion de se complexer. La protéine, dépourvue de son ion, perd sa capacité de liaison à l'ADN et permet ainsi la transcription des gènes cibles. La protéine OxyR est aussi un régulateur transcriptionel, activé par une oxydation cette fois au niveau de résidus cystéine par l'H_2O_2 (Christman *et al.*, 1989). La formation de ponts disulfures entraîne un changement de structure et la formation d'un tétramère qui active la transcription des gènes cibles.

Les histidines kinases FixL et NtrY sont des senseurs à perception cytoplasmique qui possèdent une molécule hème qui peut fixer l'oxygène O_2 associée à leur domaine PAS. Chez les symbiontes *Bradyrhizobium japonicum et S. meliloti*, FixL permet de réguler via son RR FixJ la transcription des gènes de fixation d'azote en fonction de la disponibilité en oxygène O_2. Le système permet ainsi l'activation de l'activité kinase en condition d'hypoxie lorsque la bactérie se trouve dans un nodule **(figure 14)** (Gilles-Gonzalez et al., 1991). Chez *Brucella* spp., NtrY affecte la survie intracellulaire (Foulongne *et al.*, 2000) et active la transcription des gènes de dénitrification en conditions de microaérobiose (Carrica *et al.*, 2012).

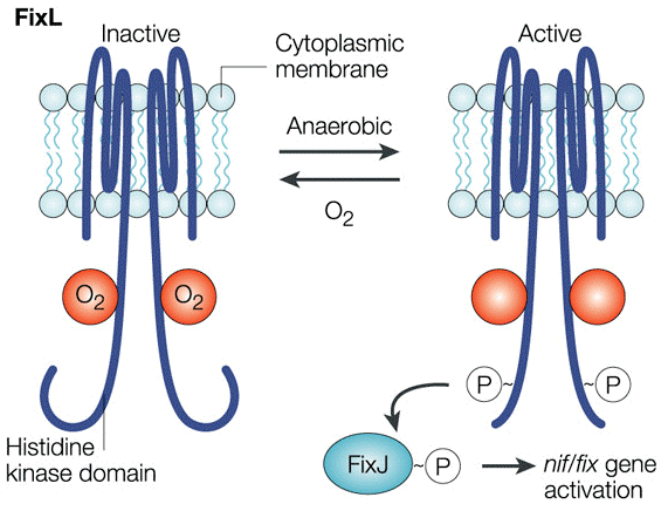


Figure 14. Modèle du système à deux composants FixL/FixJ chez *S. meliloti*. FixJ est une HK membranaire à perception cytosolique. En condition aérobie, l'oxygène O_2 lie le groupement hème (en rouge) du domaine PAS cytoplasmique. En condition anaérobie, l'absence d'oxygène provoque l'activation de l'activité kinase de FixL et la phosphorylation de FixJ, un régulateur transcriptionnel. Celui-ci dans son état phosphorylé active alors l'expression des gènes *nif* et *fix* permettant la fixation d'azote. Image de (Green & Paget, 2004).

3.2. Mécanismes effecteurs de la réponse au stress oxydatif

Un stress oxydatif agit comme un inhibiteur de la croissance des bactéries aussi bien Gram positives que Gram négatives (Brudzynski *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2005) et engendre un changement global d'expression de gènes et de protéines (Chang *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2005; Donati *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2011). Parmi eux, les gènes codant pour les protéines de défenses spécifiques (détoxification des ROS) et de réparation de l'ADN sont induits tandis que les gènes codant pour des transporteurs sont réprimés. La régulation des transporteurs de fer et sidérophores est un facteur clé dans la réponse au stress oxydatif.

3.2.1. Détoxification des ROS

Le stress oxydatif perçu par la cellule induit la transcription de gènes codant des enzymes de détoxification (superoxyde dismutase, catalase, alkylhydroxyperoxydase, peroxyredoxine glutathion réductase, glutarédoxine I) afin de réduire la concentration des ROS (Horsburgh *et al.*, 2001; Pomposiello *et al.*, 2001; Tartaglia *et al.*, 1989). Par ailleurs, la réponse comprend aussi des mécanismes de résistance (déshydratases résistantes à l'oxydation, substitution du fer par le manganèse) (Anjem *et al.*, 2009; Jang & Imlay, 2010; Pomposiello *et al.*, 2001) ou de réparation pour faire face aux dommages (réparation des centres [Fe-S], de l'ADN) (Pomposiello *et al.*, 2003).

3.2.2. Contrôle de l'homéostasie en fer et manganèse

Au vu de l'implication du fer dans la génération des radicaux hydroxyls (via la réaction de Fenton), la réponse au stress oxydatif implique généralement la cross-régulation de l'homéostasie en fer (Cornelis *et al.*, 2011; Faulkner & Helmann). La cellule va ainsi mettre en place en parallèle plusieurs mécanismes dans le but de réduire la quantité de fer libre **(figure 15)**. Des études ont notamment montré que les régulateurs OxyR et SoxR activent la transcription de gènes encodant une protéine de séquestration du fer (Dps) et une protéine impliquée dans la synthèse de groupements hème (HemH) et du gène *fur* (ferric uptake regulator) chez *E. coli* (Zheng *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2001). Le régulateur Fur régule l'importation de fer en réprimant la synthèse de sidérophores et des transporteurs de fer lorsque la concentration en fer intracellulaire est suffisante (Lee & Helmann, 2007). Enfin, OxyR contrôle également la transcription du gène *mntH* qui code pour un transporteur de manganèse Mn. Le manganèse en substituant le fer par compétition, cofacteur des métalloenzymes, a un effet protecteur face au stress oxydatif (Anjem *et al.*, 2009).

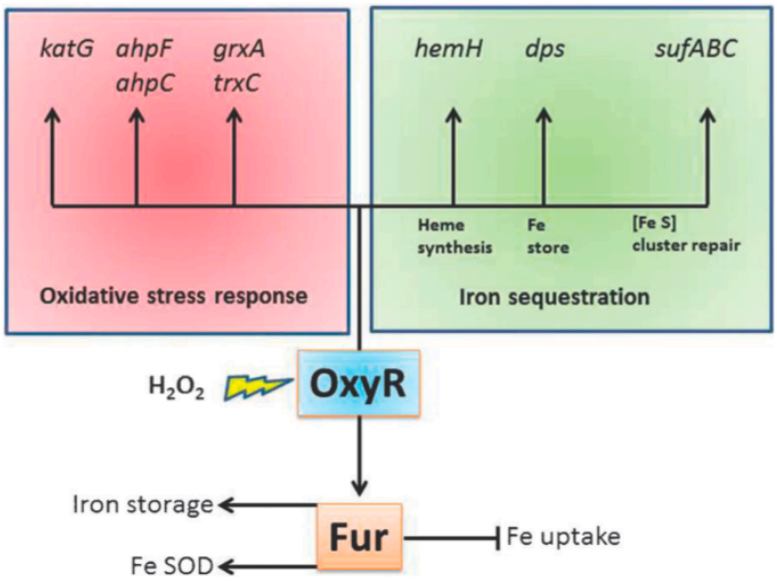


Figure 15 . Cross-régulation de la réponse au stress oxydatif et de l'homéostasie en fer chez *E. coli.* Le régulon OxyR comprend notamment les gènes codant une catalase (*katG*) et les alkylhydroxyperoxydases (*ahpF, ahpC*), une protéine de stockage du fer (Dps, ferritin-like protein), une protéine de synthèse de groupement hème (*hemH*), le transporteur de manganèse (*mntH*) et une machinerie de synthèse des centres [Fe-S] alternative (*sufABC*) mais aussi le régulateur Fur (Zheng *et al.*, 2001). Le système Isc a pour fonction l'assemblage et l'incorporation de centre [Fe-S] dans les protéines. En condition de stress oxydatif ou de carence en fer, l'induction du système Suf permet de substituer Isc (*Iron –sulfur cluster assembly system*) lorsque le fer devient limitant (Jang & Imlay, 2010). Le régulateur transcriptionnel Fur est capable de séquestrer du fer directement mais aussi de réprimer la transcription de gènes impliqués dans l'importation du fer et d'activer la transcription de gènes codant des protéines séquestrant du fer (comme la Fe-superoxyde dismutase FeSOD et la bactérioferritine). Image de (Cornelis *et al.*, 2011).

3.2.3. Système d'exclusion d'antibiotiques pro-oxydants

Le système SoxRS, spécifiquement induit par une drogue pro-oxydante (générant des radicaux superoxydes) (Gu & Imlay, 2011) en plus d'induire des mécanismes de résistance aux ROS permet l'induction de pompe à efflux[8] (Pomposiello *et al.*, 2001) qui réduisent ainsi l'entrée de ces antibiotiques pro-oxydants (Dietrich & Kiley, 2011). Ainsi, SoxS active l'expression de la pompe à efflux AcrAB (White *et al.*, 1997) ainsi que de l'ARN régulateur *micF* qui inhibe, post-transcriptionnellement, l'expression de la porine OmpF (Chou *et al.*, 1993). L'induction de SoxS permet donc de réduire simultanément la perméabilité membranaire et d'augmenter l'activité des pompes à efflux. Certaines mutations du gène *soxR* rendant la protéine SoxR constitutivement active participent ainsi à la résistance intrinsèque aux antibiotiques (Koutsolioutsou *et al.*, 2005).

[8] Les pompes à efflux sont des complexes protéiques constitués d'une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe.

4. Stress acide et thermique

Nous avons choisi de rassembler ces deux types de réponse car ces réponses sont en grande partie comparables et font intervenir essentiellement deux types d'acteurs : des chaperonnes et des protéases. Les chaperonnes sont des protéines qui favorisent le bon repliement des polypeptides en formation et maintiennent une conformation stable de protéines pré-existantes **(figure 16)**. Les protéases sont, entre autres, des enzymes qui dégradent les protéines mal repliées que les chaperonnes ne peuvent corriger.

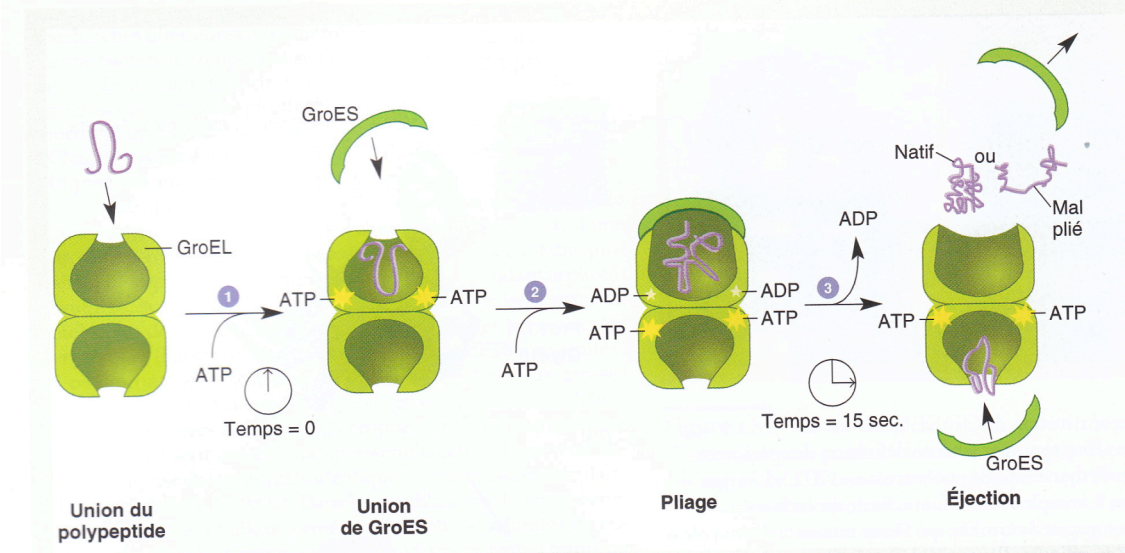


Figure 16 : Représentation du mécanisme de repliement d'un polypeptide avec l'aide des chaperonnes GroEL et GroES. GroEL forme un complexe de 2 disques (schématisé ici) qui forment chacun une chambre travaillant en alternance. Le polypeptide non natif pénètre dans une des 2 chambres formées par GroEL et s'unit aux sites hydrophobes de la paroi de la chambre (étape 1). L'union de la coiffe GroES provoque un changement de conformation agrandissant la chambre et par dissimulation des résidus hydrophobes libère le polypeptide dans la chambre. L'hydrolyse d'ATP fournit l'énergie nécessaire (étape 2). La liaison d'ATP sur le disque opposé de GroEL induit la libération de GroES, d'ADP et du polypeptide natif (ou mal replié) (étape 3). Si le polypeptide n'est que partiellement plié ou mal plié, il entre à nouveau dans la chambre pour recommencer un cycle. Image de (Karp, 2004).

4.1. Stress acide

Au cours de leur vie, les bactéries sont amenées à rencontrer des conditions acides par exemple dans l'estomac d'un hôte ou dans un compartiment intracellulaire. Pour y faire face, elles ont développé des systèmes inductibles qui permettent d'augmenter le pH interne. La bactérie *Helicobacter pylori* représente un des meilleurs exemples d'adaptation aux conditions acides (pour revue voir (Zanotti & Cendron, 2010)). En effet, elle est capable de résister et même de se développer en surface des muqueuses de l'estomac humain pendant de longues périodes. L'un des mécanismes utilisés pour tamponner le pH acide est l'enzyme uréase qui catalyse la conversion de l'urée en ammoniac (NH_3) et dioxyde de carbone (CO_2) **(figure 17)**. Ce dernier est ensuite converti en HCO_3^- par une anhydrase carbonique périplasmique tandis que l'ammoniac neutralise des protons (Marcus *et al.*, 2005). La transcription des gènes de ce système (uréase et α-carbonic anhydrase) est sous le contrôle d'un SDC ArsS/ArsR dont la kinase perçoit une diminution de pH dans le périplasme (Loh *et al.*, 2010; Pflock *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2007).

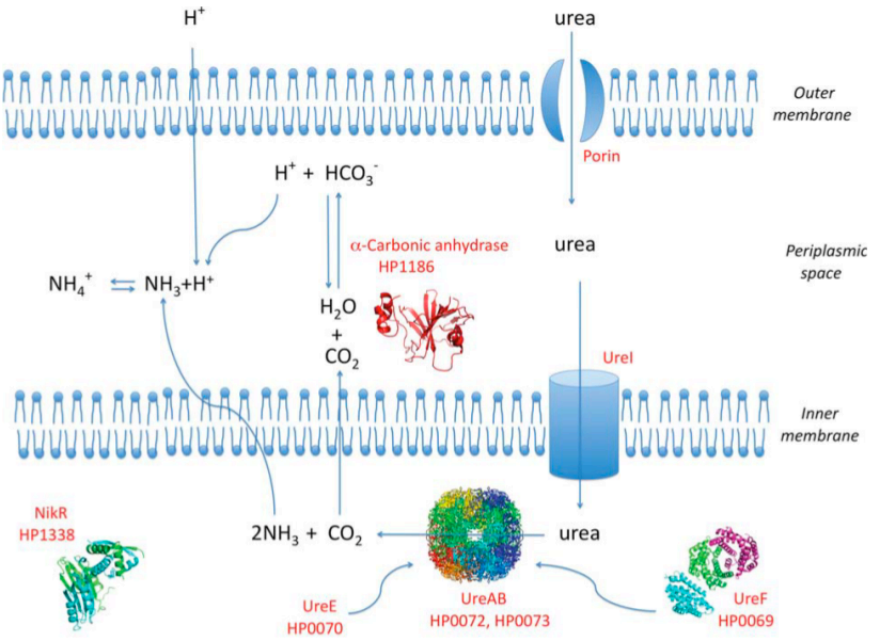


Figure 17 : Représentation de l'uréase et des facteurs impliqués dans les mécanismes de résistance au stress acide d'*Helicobacter pylori*. L'urée présente dans l'estomac entre via une porine hypothétique dans l'espace périplasmique. La protéine UreI permet ensuite le transport de l'urée du périplasme dans le cytoplasme. L'enzyme arginase (non représenté) qui catalyse la conversion de L-arginine en L-ornithine et urée constitue une source d'urée endogène. Le complexe UreAB forme le complexe enzymatique de l'uréase dont le site actif contient un ion nickel et qui catalyse la conversion d'urée en ammoniaque NH_3 et dioxyde de carbone CO_2 tandis que les protéines UreE (délivre du Ni^{2+} au complexe UreAB) et UreF, sont accessoires. Le CO_2 produit est ensuite converti par l'anhydrase carbonique périplasmique en HCO_3^-. Le pH de l'espace périplasmique est neutralisé grâce à l'action combinée du NH_3 produit par l'uréase dans le cytoplasme et par l'HCO_3^- produit par l'anhydrase carbonique périplasmique. Le régulateur NikR active l'expression de l'opéron uréase en présence de Ni^{2+}. Image de (Zanotti & Cendron, 2010).

La réponse au stress acide est une réponse complexe et globale dont la plus commune est la production de protéines ASP (*Acid shock protein*) (Foster, 1993) principalement des chaperonnes et des protéases. Elle confère à la cellule une protection sans pour autant altérer le pH cellulaire (Heyde & Portalier, 1990). Enfin, pour certaines bactéries pathogènes une diminution de pH constitue non seulement un stress auquel elles doivent s'adapter mais aussi un signal indiquant qu'elles se trouvent dans un hôte (Ramos-Morales, 2012). La réponse au stress acide englobe ainsi également l'expression de facteurs de virulence (House *et al.*, 2009).

4.2. Stress thermique

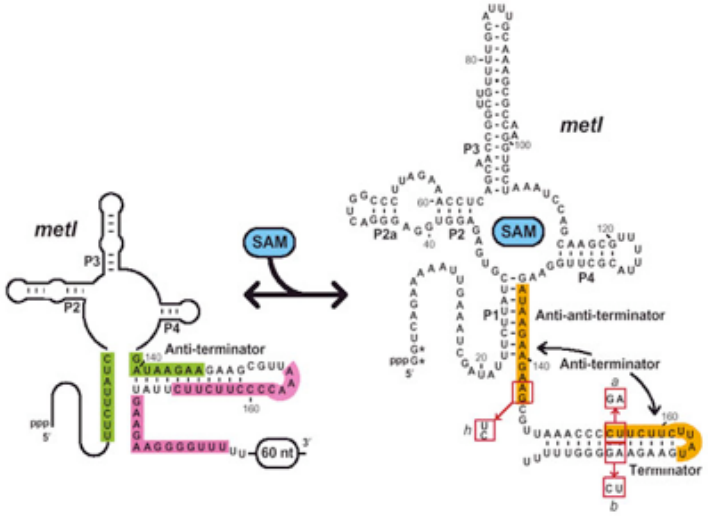
Un changement de température peut théoriquement affecter la conformation de toute biomolécule (ADN, ARN, protéine). Ce changement de conformation est à l'origine du *thermosensing*. La perception d'une variation de température peut se faire soit indirectement par la détection de protéines dénaturées ou d'un changement de la fluidité membranaire, soit directement par l'altération d'activité enzymatique (de Mendoza *et al.*, 1983; Garwin *et al.*, 1980) ou encore par l'intermédiaire d'ARN thermosenseurs appelés *riboswitches.* Les *riboswitches* sont des ARN senseurs qui influencent l'expression du messager sur lequel il se trouve en fonction de leur structure tridimensionnelle (**cfr. Box. 6**) (Klinkert & Narberhaus, 2009). Certains *riboswitches* perçoivent une variation de

température et sont impliqués dans l'induction rapide de la réponse au choc thermique (Morita *et al.*, 1999; Waldminghaus *et al.*, 2007). Ces ARN thermosensibles, appelés ARN thermomètres, contrôlent la traduction d'ARN messagers préexistants (Giuliodori *et al.*, 2010; Johansson *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 1999; Waldminghaus *et al.*, 2007).

Le stress thermique est généralement subdivisé en deux classes : « heat shock » (HS) et « cold shock » (CS).

Box 6. Les riboswitches

Comme les protéines, les molécules d'ARN sont d'une complexité suffisante pour permettre une régulation allostérique. Certaines régions hautement structurées de l'ARNm non codant (5' UTR) sont ainsi à la base d'un contrôle d'expression en réponse à des métabolites. Les *riboswitches* sont des ARN senseurs dont la structure tridimensionnelle peut changer suite à la liaison spécifique de petites molécules comme le flavine mononucléotide (FMN) (Winkler *et al.*, 2002), la guanine (Mandal *et al.*, 2003), l'adénine (Mandal & Breaker, 2004), le S-adénosylmethionine (Winkler *et al.*, 2003) ou le glucosamine-6-phosphate (Winkler *et al.*, 2004). Ils contrôlent généralement l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse, le transport ou l'utilisation du métabolite cible. Un *riboswitch* est généralement composé de deux domaines fonctionnels : un aptamer, domaine de liaison spécifique d'un métabolite, et une « plateforme d'expression » qui influence de façon dynamique la réponse en fonction de la liaison au métabolite.
Ces changements de structure peuvent aussi survenir lors d'une variation de température (Johansson *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 1999; Waldminghaus *et al.*, 2007). Les riboswitches pouvant percevoir une variation de température (ou ARN thermomètres) sont eux impliqués dans l'induction de la réponse au choc thermique (Morita *et al.*, 1999; Waldminghaus *et al.*, 2007) ou de certains gènes de virulence (Johansson *et al.*, 2002). Leur action se manifeste par une réponse rapide en modulant (positivement (Mandal & Breaker, 2004) ou négativement (Mandal *et al.*, 2003; Winkler *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2003)) la terminaison de la transcription, l'initiation de la traduction de l'ARNm (Johansson *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 1999; Waldminghaus *et al.*, 2007; Winkler *et al.*, 2002) ou la stabilité de l'ARNm (Collins *et al.*, 2007; Winkler *et al.*, 2004).



Modèle du changement de structure d'un riboswitch suite à la liaison de S-adénosylméthionine (SAM) chez *B. subtilis.* La liaison du SAM dans la région 5'UTR du gène *metI* provoque un changement de structure (formation d'une *hairpin* alternative) et la formation d'un signal terminateur de transcription. A l'inverse, en absence de SAM, une structure anti-terminatrice permet la transcription complète de l'ARNm. Image de (Mandal et al., 2003).

4.2.1. Réponse « Heat Shock »

Les *riboswitches* impliqués dans la réponse HS comprennent généralement une structure en *hairpin* dans la région 5'UTR qui, à faible température, retient la séquence Shine-Dalgarno (SD) de liaison au ribosome **(figure 18)**. L'augmentation de température déstabilise cette structure et rend accessible la séquence SD pour la traduction. Ces ARN messagers encodent souvent des protéines cruciales pour l'adaptation à un changement de température comme le facteur sigma σ^{32} (Nagai *et al.*, 1991) ou autres *heat shock* protéines (Hsp) dont la transcription dépend du facteur σ^{32} (Chowdhury *et al.*, 2006; Waldminghaus *et al.*, 2005). Enfin, pour les bactéries pathogènes, parce qu'une augmentation de température est synonyme d'entrée dans l'hôte, certains ARN thermomètres contrôlent l'expression de facteurs de virulence (Hoe & Goguen, 1993; Johansson *et al.*, 2002).

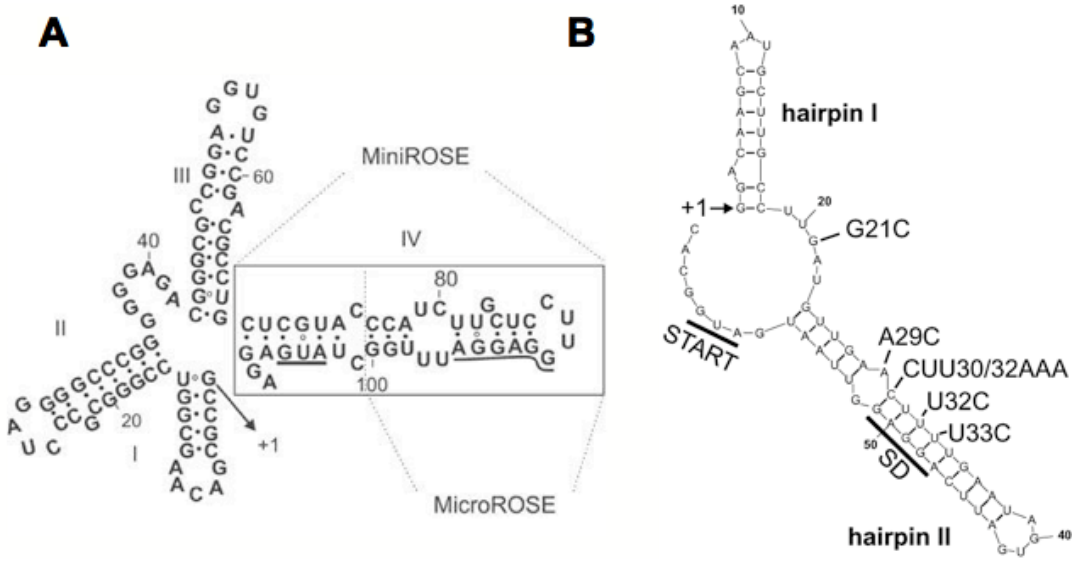


Figure 18. Exemple de structure des ARN thermomètres. (**A**) Elément ROSE (*repression of heat shock gene*) présent dans la région 5'UTR de l'ARNm de *hspA* de *Bradyrhizobium japonicum*. Les structures ROSE sont composées de plusieurs *hairpins* individuelles mais seule l'*hairpin* masquant la séquence SD en 3' (Mini-ROSE) est thermosensible. La région Micro-ROSE comprend les 4 éléments indispensables au *thermosensing* : la paire de base G83-G94, une région contenant un appariement triple (U96 forme un pont H avec C80 et U91), un appariement atypique U79-U97 et une faible association du codon AUG (Start) avec le triplet CGU. (**B**) Elément FourU présent dans l'ARNm de *agsA* (*aggregation suppressing* A) de *Salmonella enterica*. L'ARN forme deux hairpins (I et II) ; l'hairpin II contenant la structure thermolabile. La séquence « fourU » est exclusivement composée d'appariements de bases classiques et d'un unique *mismatch* A-G. Les séquences Shine-Dalgarno (SD) et codon START (AUG) sont soulignées. Image adaptée de (Chowdhury *et al.*, 2006) et de (Waldminghaus *et al.*, 2007).

La réponse à une augmentation de température est comparable à la réponse au stress acide. Ainsi, les protéines dites *heat shock proteins* (HSP) protègent de la chaleur sans modifier la température de la cellule. En effet, la chaleur, au même titre que le pH, peut altérer la structure des protéines et provoquer leur dénaturation. L'exposition des résidus hydrophobes de la forme dénaturée des protéines force celles-ci à se rassembler en amas. De même que pour les ASP, il existe deux types d'HSP : les chaperones et les protéases.

4.2.2. Réponse « Cold Shock »

Une diminution drastique de température se manifeste immédiatement par un arrêt de la croissance bactérienne, résultat d'une diminution globale d'activités cellulaires. Durant cette phase d'acclimatation, certaines protéines dites « *cold shock proteins* » (CSP) sont néanmoins induites. Après cette phase, la croissance peut alors reprendre à basse température bien qu'à plus faible taux.

L'expression de certaines CSP dépend également de *riboswitches* où la traduction est cette fois favorisée à faible température (Yamanaka *et al.*, 1999). Les protéines CSP sont principalement des chaperonnes à ARN et à ADN (Phadtare & Severinov, 2010).

Comme mentionné précédemment, la membrane cellulaire joue un rôle clé dans la perception de la température. En effet, la température affecte de façon drastique la fluidité membranaire (Mansilla *et al.*, 2004). Lorsque la température décroît, la fluidité membranaire est maintenue grâce aux acides gras insaturés qui sont synthétisés *de novo* ou par l'action de désaturases qui introduisent des doubles liaisons dans les chaînes d'acides gras saturés déjà présents. Chez *B. subtillis*, un système à deux composants DesKR perçoit l'altération de fluidité membranaire et permet l'induction du gène *des* (codant une désaturase d'acides gras) (Aguilar *et al.*, 2001).

5. Interférence entre différentes réponses au stress

Comme nous l'avons vu, la perception d'un stress implique différentes voies de signalisation et de transduction qui sont intégrées et mènent à l'activation d'une réponse physiologique globale. Cette réponse comprend un changement de l'expression de gènes et/ou d'activités protéiques pour favoriser la survie de la bactérie face aux stress souvent multiples que son environnement lui impose. Ainsi, certains senseurs ou régulateurs interviennent dans l'adaptation à différents stress. La réponse globale d'adaptation est responsable de la cross-protection contre différents stress (Jenkins *et al.*, 1990). Nous évoquerons ici trois exemples concrets qui reflètent le fait que des stimuli différents mènent *in fine* à l'activation d'un même régulateur.

Longtemps associé aux stress rencontrés lors de l'entrée en phase stationnaire, le facteur σ^S intervient dans diverses réponses au stress (nutritionnel, oxydatif, osmotique) **(figure 19)**.

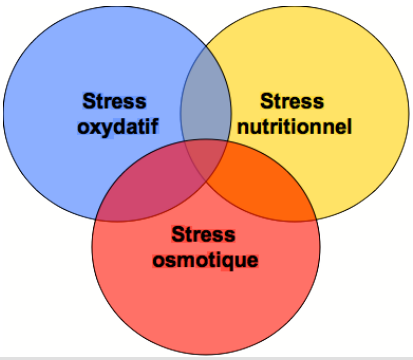


Figure 19 : Diagramme illustrant l'interférence entre différentes réponses aux stress. Le facteur sigma σ^S se trouve à l'intersection des réponses aux stress oxydatif, nutritionnel et osmotique (Bougdour & Gottesman, 2007; Hengge-Aronis *et al.*, 1993; Jishage *et al.*, 2002; Weber & Jung, 2002). Entre stress nutritionnel et stress osmotique, le système PTS^{Ntr} régule l'activité et l'expression des transporteurs de K^+ Trk et Kdp, respectivement (Luttmann *et al.*, 2009; Reaves & Rabinowitz, 2011). A l'inverse le K^+ inhibe l'activité de certaines enzymes du métabolisme (Lee *et al.*, 2007a). Entre stress osmotique et oxydatif, l'expression de l'ARN régulateur *micF* (régulant l'expression de la porine OmpF) permet de réduire la perméabilité membranaire en cas de stress hyperosmotique ou oxydatif (Aiba & Mizuno, 1990; Chou *et al.*, 1993; Jovanovich *et al.*, 1988). Par ailleurs, la réponse de stringence participe activement à la résistance au stress oxydatif et aux antibiotiques (Nguyen *et al.*, 2011).

De même, le facteur sigma alternatif σ^E est activé en réponse au stress d'enveloppe par la présence de protéines membranaires dénaturées. L'activation du σ^E résulte de sa libération par protéolyse du facteur anti-σ, RseA qui le séquestrait en membrane. La protéolyse de RseA peut se faire par l'intermédiaire de DegP (suite à un stress thermique) ou RseP (suite à un stress acide) (Muller *et al.*, 2009).

Enfin, le SDC CpxA/CpxR en partenariat avec d'autres protéines accessoires répond à une large gamme de stimuli (pH, sels, métaux, lipides, protéines mal repliées) qui engendrent une perturbation de l'enveloppe **(figure 20)** (Hunke *et al.*, 2012; Vogt & Raivio, 2012). Au moins deux protéines interfèrent avec le système Cpx : la protéine de membrane externe NlpE (intervient dans l'adhérence à une surface) (Otto & Silhavy, 2002) et la protéine périplasmique CpxP (inactivée en présence de protéines mal repliées) (DiGiuseppe & Silhavy, 2003; Raivio *et al.*, 1999). Par ailleurs, le régulateur CpxR peut être activé d'une façon indépendante de la kinase CpxA en présence d'un excès de source de carbone, probablement par l'intermédiaire d'acétyl phosphate (Wolfe *et al.*, 2008). Le système Cpx active l'expression de protéines impliquées dans le repliement et la dégradation de protéines d'enveloppe et inhibe l'expression de structure pariétale comme les pili ou le flagelle **(figure 20)**.

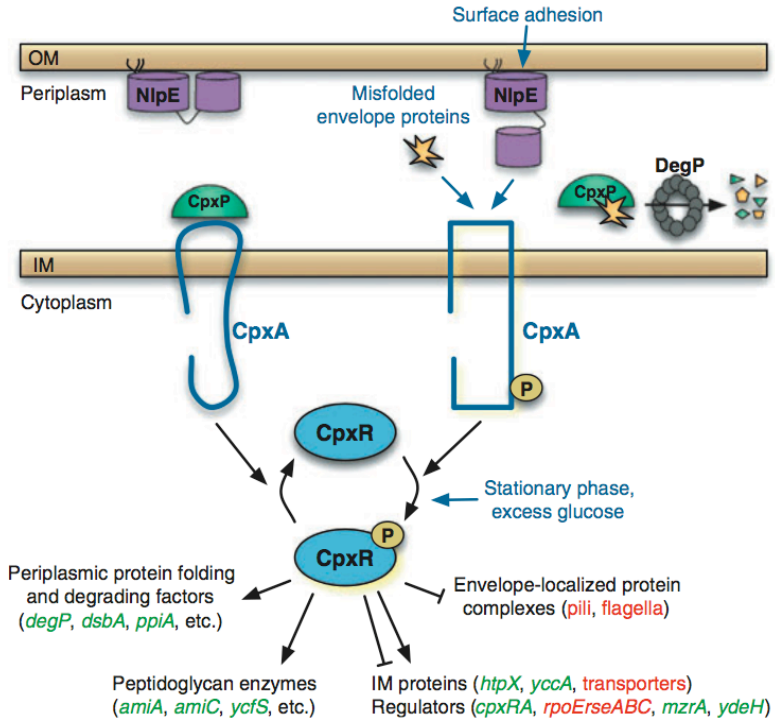


Figure 20. Aperçu de l'intégration des signaux perçus par le système CpxA/CpxR chez *E. coli*. En l'absence de stimulus, la protéine périplasmique CpxP inhibe la kinase CpxA. CpxP est impliqué dans la détection de protéines mal repliées, de sels et d'une augmentation de pH. L'adhérence à une surface est perçue par la protéine NlpE. L'activation de CpxA mène à la phosphorylation de son partenaire CpxR. Une voie de phosphorylation alternative est possible via l'acetyl-CoA. CpxR est un régulateur transcriptionnel qui régule l'expression de gènes impliqués dans le repliement protéique et le remaniement d'enveloppe. Les gènes dont la transcription est activée sont en vert et ceux dont la transcription est inhibée sont en rouge. Image de (Vogt & Raivio, 2012).

IV. Le biofilm : un mode d'adaptation au stress

1. Définition

Comme illustré précédemment, les bactéries perçoivent et s'adaptent aux changements de l'environnement. Dans certains cas, cette transition se traduit par la formation de biofilms. Un biofilm est une communauté de microorganismes qui adhèrent naturellement à une surface (ou interface) et sécrètent une matrice extracellulaire adhésive et protectrice (Costerton *et al.*, 1995). De structure hautement organisée, le biofilm possède généralement des canaux aqueux qui favoriseraient la distribution des nutriments et l'évacuation des déchets **(figure 21)** (Costerton *et al.*, 1995; Watnick & Kolter, 1999).

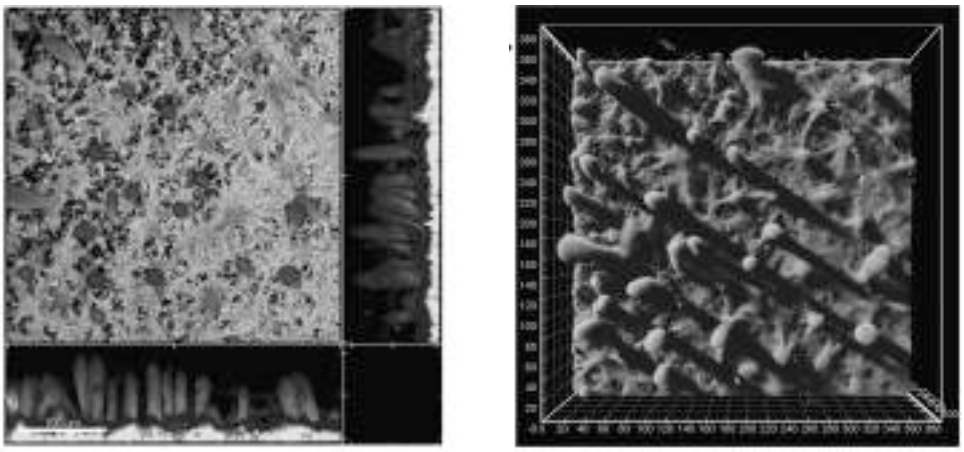


Figure 21: Architecture des biofilms formés par *Pseudomonas aeruginosa* après 4 jours de culture en chambre de flux. Image de microscopie confocale (gauche) et projection tridimensionnelle (à droite). *P. aeruginosa* forme des biofilms de structure en forme de doigts. Image de (Hay *et al.*, 2009).

En conditions naturelles, les biofilms englobant des bactéries d'une même espèce (biofilms monospécifiques) sont rares ; la majorité étant composés d'un mélange d'espèces diverses (biofilms mixtes). Néanmoins, certains biofilms monospécifiques interviennent dans la persistance infectieuse à l'exemple des bactéries *P. aeruginosa* qui forment des biofilms dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose (Costerton *et al.*, 1999; Drenkard & Ausubel, 2002).

2. Composition et fonction de la matrice extracellulaire

La matrice du biofilm est constituée de l'agglomération de substances polymériques (majoritairement des polysaccharides, des protéines, de l'ADN extracellulaire et des lipides) et de vésicules de membrane externe (Karatan & Watnick, 2009). Contenant jusqu'à 97 % d'eau, la matrice du biofilm est une structure très hydratée. Responsable de l'adhérence et de la cohésion des cellules entre elles, ses fonctions sont multiples **(table 1)** (Flemming & Wingender, 2010).

Function	Relevance for biofilms	EPS components involved
Adhesion	Allows the initial steps in the colonization of abiotic and biotic surfaces by planktonic cells, and the long-term attachment of whole biofilms to surfaces	Polysaccharides, proteins, DNA and amphiphilic molecules
Aggregation of bacterial cells	Enables bridging between cells, the temporary immobilization of bacterial populations, the development of high cell densities and cell–cell recognition	Polysaccharides, proteins and DNA
Cohesion of biofilms	Forms a hydrated polymer network (the biofilm matrix), mediating the mechanical stability of biofilms (often in conjunction with multivalent cations) and, through the EPS structure (capsule, slime or sheath), determining biofilm architecture, as well as allowing cell–cell communication	Neutral and charged polysaccharides, proteins (such as amyloids and lectins), and DNA
Retention of water	Maintains a highly hydrated microenvironment around biofilm organisms, leading to their tolerance of dessication in water-deficient environments	Hydrophilic polysaccharides and, possibly, proteins
Protective barrier	Confers resistance to nonspecific and specific host defences during infection, and confers tolerance to various antimicrobial agents (for example, disinfectants and antibiotics), as well as protecting cyanobacterial nitrogenase from the harmful effects of oxygen and protecting against some grazing protoza	Polysaccharides and proteins
Sorption of organic compounds	Allows the accumulation of nutrients from the environment and the sorption of xenobiotics (thus contributing to environmental detoxification)	Charged or hydrophobic polysaccharides and proteins
Sorption of inorganic ions	Promotes polysaccharide gel formation, ion exchange, mineral formation and the accumulation of toxic metal ions (thus contributing to environmental detoxification)	Charged polysaccharides and proteins, including inorganic substituents such as phosphate and sulphate
Enzymatic activity	Enables the digestion of exogenous macromolecules for nutrient acquisition and the degradation of structural EPS, allowing the release of cells from biofilms	Proteins
Nutrient source	Provides a source of carbon-, nitrogen- and phosphorus-containing compounds for utilization by the biofilm community	Potentially all EPS components
Exchange of genetic information	Faciliates horizontal gene transfer between biofilm cells	DNA
Electron donor or acceptor	Permits redox activity in the biofilm matrix	Proteins (for example, those forming pili and nanowires) and, possibly, humic substances
Export of cell components	Releases cellular material as a result of metabolic turnover	Membrane vesicles containing nucleic acids, enzymes, lipopolysaccharides and phospholipids
Sink for excess energy	Stores excess carbon under unbalanced carbon to nitrogen ratios	Polysaccharides
Binding of enzymes	Results in the accumulation, retention and stabilization of enzymes through their interaction with polysaccharides	Polysaccharides and enzymes

EPS, extracellular polymeric substances.

Table 1. Fonctions associées aux constituants de la matrice des biofilms (Flemming & Wingender, 2010).

3. Importance de l'exopolysaccharide

Constituants majeurs de la matrice, les polysaccharides sont représentés par les polysaccharides capsulaires (CPS) et les exopolysaccharides (EPS). Les CPS sont associés à la surface cellulaire tandis que les EPS sont excrétés dans le milieu extracellulaire et ne sont pas ou très faiblement associés à la surface cellulaire. Chez la plupart des bactéries, l'EPS est indispensable à la formation de biofilms matures (Danese *et al.*, 2000; Matsukawa & Greenberg, 2004; Watnick & Kolter, 1999). En plus de son rôle dans la formation des biofilms, l'EPS participe activement à l'établissement de la symbiose chez les Rhizobiales (Reuber & Walker, 1993) ou la virulence de bactéries pathogènes (Fong *et al.*, 2010).

Un EPS est un polymère d'unités répétées, elles-mêmes constituées de plusieurs monosaccharides sur lesquels peuvent être greffés des groupements non-saccharidiques (acétyl, pyruvyl, succinyl). La nature des monosaccharides, les liens qui unissent les unités répétées ainsi que la présence de groupements additionnels diffèrent d'un EPS à l'autre (Reeves *et al.*, 1996). La nature de l'EPS produit sera déterminante pour les propriétés du

biofilm. Ainsi, la nature des liens qui unissent les monomères participe à la rigidité de la matrice du biofilm. En effet, certains EPS possèdent une structure où les monosaccharides sont liés en β-1,3 ou β-1,4 comme la cellulose. Ce type de lien est caractéristique des polymères très rigides. Inversement, les liens de type α-1,2 ou α- 1,6, caractéristiques des dextrans confèrent une certaine flexibilité à la matrice (Sutherland, 2001).

3.1. *S. meliloti*, un modèle d'étude pour la production d'EPS

La bactérie modèle *S. meliloti* produit au moins deux EPS différents: le succinoglycan (EPSI) et le galactoglucan (EPSII) (González *et al.*, 1996). La production de ces EPS est fortement régulée et dépend essentiellement des conditions environnementales (Doherty *et al.*, 1988; Keating, 2007; Lloret *et al.*, 1998; Mendrygal & Gonzalez, 2000; Pellock *et al.*, 2002; Rüberg *et al.*, 1999; Zhan *et al.*, 1991).

Le succinoglycan (ou EPSI) est un polymère formé d'une répétition d'octosaccharides **(figure 22)**. Chaque octosaccharide est constitué d'un galactose et de sept glucoses liés par des liaisons β-glucosidiques. Trois groupements non-saccharidiques acétyl, succinyl et pyruvyl sont ajoutés par des enzymes de modifications sur des résidus glucose (Reuber & Walker, 1993). En revanche, le galactoglucan (ou EPSII) est composé d'unités disaccharidiques de glucose et de galactose modifiés par deux groupements : un acétyl et un pyruvyl **(figure 22)** (González *et al.*, 1996). Quel que soit l'EPS considéré, il peut être produit sous deux formes : une forme de haut poids moléculaire (HMW) et une forme de faible poids moléculaire (LMW) (Battisti *et al.*, 1992). Cependant, seule la forme LMW (3 unités pour EPSI ou 15-20 unités pour EPSII) permet l'invasion efficace des nodules pour l'établissement de la symbiose (Battisti *et al.*, 1992; González *et al.*, 1996). La forme sous laquelle est produit l'EPS dépend à la fois d'enzymes de polymérisation et de dépolymérisation (González *et al.*, 1998; Niemeyer & Becker, 2001).

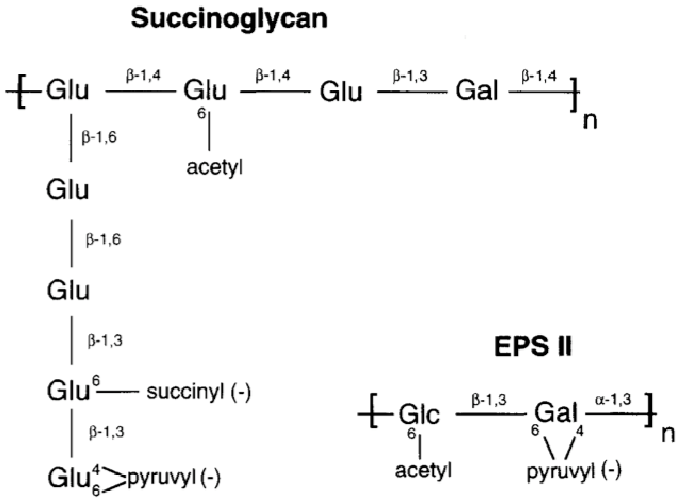


Figure 22 : Structures chimiques des monomères constituant l'EPSI (succinoglycan) et l'EPSII (galactoglucan) chez *Sinorhizobium meliloti.* Gal : galactose ; Glu ou Glc : glucose. D'après (González *et al.*, 1996).

La biosynthèse d'un EPS est un processus complexe qui requiert l'activité coordonnée de plusieurs enzymes. Hormis quelques exceptions, la majorité des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse d'EPS sont regroupés en *cluster* (Becker *et al.*, 1997; Leigh *et al.*, 1985). Ces protéines peuvent être impliquées dans la synthèse de précurseurs activés, dans l'assemblage et les modifications éventuelles du monomère ainsi que dans la polymérisation de ces monomères et le transport du polymère à travers la paroi bactérienne. Chez *S. meliloti*, les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse du succinoglycan (EPSI) sont localisés dans le cluster *exo/exs* (Leigh *et al.*, 1985) tandis que la production de galactoglucan (EPSII) dépend de protéines encodées dans le cluster de gènes *exp* (Becker *et al.*, 1997). Une description des différentes étapes de la biosynthèse d'un EPS est décrite ci-dessous en prenant comme exemple la synthèse du succinoglycan chez la bactérie modèle *S. meliloti*.

3.1.1. Modèle de synthèse du succinoglycan

S. meliloti constitue un modèle pour l'étude de la biosynthèse de l'EPSI (ou succinoglycan) dont presque tous les acteurs sont connus.

La première étape de cette biosynthèse est l'activation des sucres et implique les enzymes ExoC, ExoN et ExoB **(figure 23)**. ExoC est une phosphoglucomutase qui convertit le glucose-6-phosphate en glucose-1-phosphate. ExoN présente une activité UDP-glucose pyrophosphorylase (ou glucose-1-phosphate uridylyltransférase) qui permet la synthèse d'UDP-glucose. Enfin, ExoB est une UDP-glucose-4 epimérase qui convertit l'UDP-glucose en UDP-galactose (Dickstein *et al.*, 1988; Leigh & Lee, 1988; Reuhs *et al.*, 1995).

L'assemblage de l'octasaccharide est initié par l'addition d'un résidu galactose sur un « undecaprenyl lipid carrier » en membrane interne **(figure 23)**. Cette étape est effectuée par les enzymes ExoY et ExoF (Muller *et al.*, 1993; Reuber & Walker, 1993). Les étapes suivantes font intervenir successivement les glycosyltransférases ExoA, ExoL, ExoM, ExoO, ExoU et ExoW qui ajoutent les résidus glucoses sur le résidu galactose **(figure 23)** (Becker *et al.*, 1993; Reuber & Walker, 1993). Cependant, l'enzyme responsable de l'addition du dernier glucose n'a pas été identifiée à ce jour.

Les enzymes ExoZ, ExoH et ExoV sont requises pour l'ajout des groupements acétyl, succinyl et pyruvyl respectivement **(figure 23)** (Reuber & Walker, 1993). Il est important de noter que la présence de la substitution pyruvyl est cruciale pour la polymérisation et l'export de l'EPS (Becker *et al.*, 1993). Par ailleurs l'ajout du succinyl détermine le degré de polymérisation du polymère en influençant l'activité des glycanases. Ainsi, un mutant *exoH* secrète un EPSI HMW non succinylé inefficace pour la symbiose (Leigh *et al.*, 1987; Leigh & Lee, 1988).

Enfin, la polymérisation des monomères octosaccharidiques et l'exportation du polymère sont effectuées par les enzymes ExoP, ExoQ et ExoT **(figure 23)** (González *et al.*, 1998; Reuber & Walker, 1993). ExoP joue un rôle déterminant dans ce processus en catalysant la formation des liaisons entre monomères mais aussi en formant un complexe avec ExoQ et ExoT qui participent à la sécrétion du succinoglycan. La polymérisation de l'EPS peut se faire par deux voies alternatives : le mécanisme ExoP/ExoQ requis pour la production de succinoglycan HMW et le mécanisme ExoP/ExoT pour la sécrétion de succinoglycan LMW (González *et al.*, 1998). Par ailleurs, la polymerisation de l'EPSI est aussi fonction du domaine C-terminal cytoplasmique de la protéine ExoP qui possède une

activité ATPase et peut être phosphorylé sur des résidus tyrosines. C'est précisément l'état de phosphorylation de ces tyrosines qui détermine le degré de polymérisation de l'EPS. Une diminution de la quantité de EPSI HMW a ainsi été montrée en l'absence de phosphorylation d'ExoP (Niemeyer & Becker, 2001).

Par ailleurs, l'EPS LMW peut être produit à partir d'une fraction HMW grâce à l'action de deux endoglycanases ExoK et ExsH (York & Walker, 1997; York & Walker, 1998b). L'activité de ces endoglycanases dépend notamment des modifications acétyl et succinyl (York & Walker, 1998a).

Enfin, ExsA est une protéine appartenant à un ABC transporteur important pour la sécrétion d'EPSI HMW(Becker *et al.*, 1995).

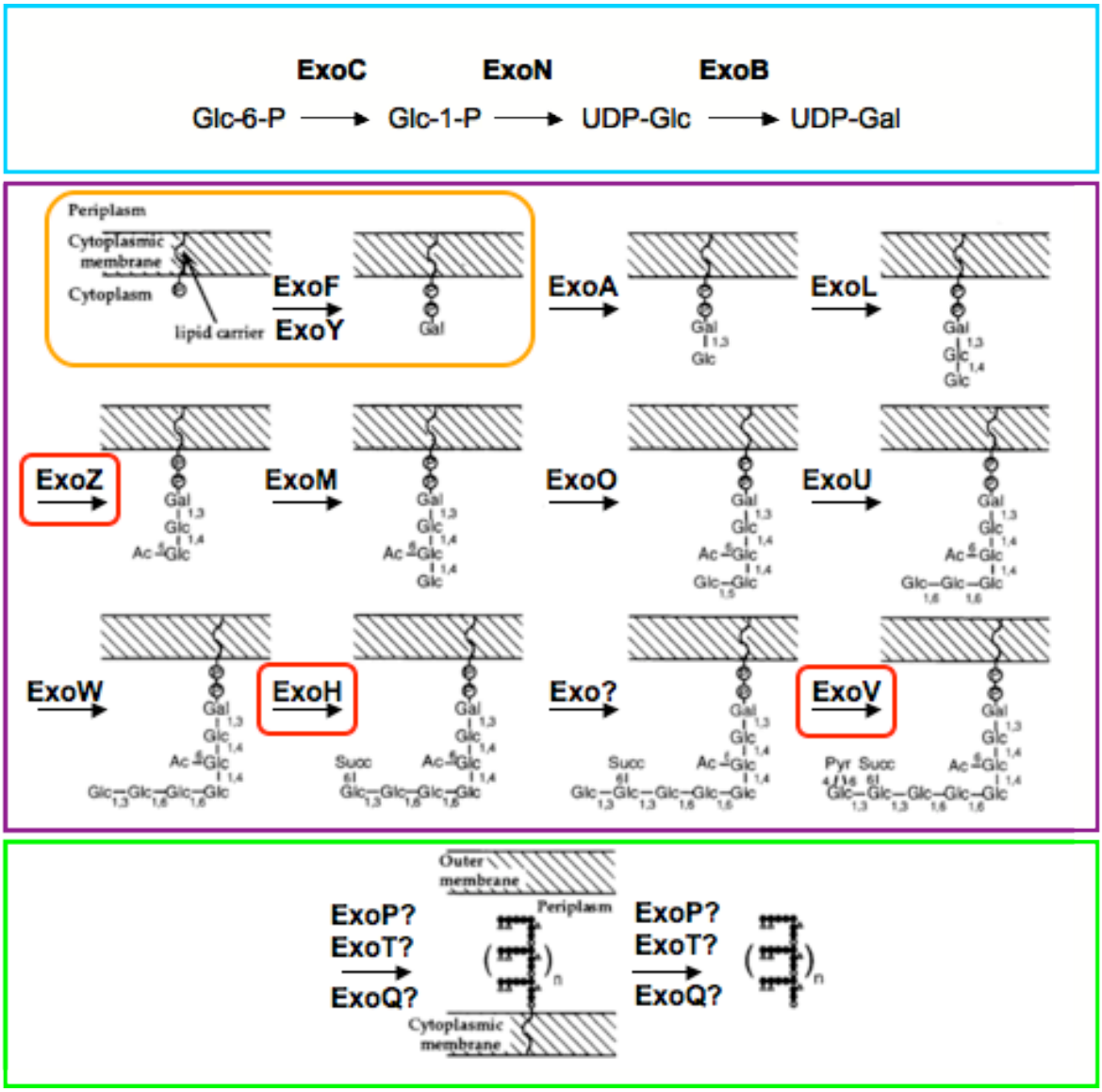


Figure 23 : Modèle de la biosynthèse du succinoglycan chez *S. meliloti*.
La biosynthèse de l'EPS se fait en plusieurs étapes. Activation des sucres (en **Bleu**). Assemblage d'une sous-unité (octasaccharide) (en **Violet**). Transfert du premier résidu galactose sur le *lipid carrier* (en **Orange**) et enzymes de modifications (en **Rouge**). Polymérisation du monomère et transport (en **Vert**). Gal : galactose; Glu : glucose, P : phosphate, Ac : acetyl, Succ : succinyl, Pyr : pyruvyl. Inspiré de Gonzalez *et al*., (1996).

4. Etapes de formation d'un biofilm

La formation de biofilms se déroule classiquement en 3 étapes. La première étape est l'attachement des bactéries à une surface. Si les bactéries sont attachées uniquement à la surface, on parle alors d'un biofilm monocouche. L'attachement est suivi de l'étape de maturation avec la formation de microcolonies accompagnée de la production des constituants matriciels. Lorsque les bactéries adhérentes à la surface mais aussi entre elles forment des amas, on parle de biofilms multicouches. Ce processus de maturation précède l'étape de dispersion qui consiste en la rupture du biofilm et conduit à la libération de cellules planctoniques libres de se mouvoir qui peuvent alors coloniser une nouvelle surface. Chez *P. aeruginosa*, on distingue l'attachement réversible de l'irréversible et l'étape de maturation est également subdivisée en maturation 1 et 2, ce qui porte à cinq le nombre d'étapes de formation des biofilms (Sauer *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 2002) **(figure 24)**.

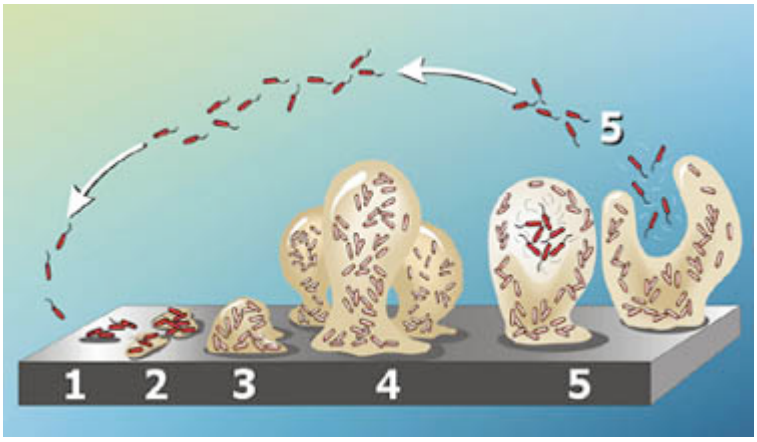


Figure 24 : Etapes de formation du biofilm chez *P. aeruginosa*. (**1**) Attachement réversible (0 min) (**2**) Attachement irréversible (2 h) (**3**) Développement d'une microcolonie (1-3 jours) (**4**) Biofilm mature (6 jours) (**5**) Etape de dispersion (9-12jours). Image de (Stoodley *et al.*, 2002)

Le développement d'un biofilm doit être considéré comme un processus au cours duquel les bactéries changent totalement leur physiologie (Sauer *et al.*, 2002; Southey-Pillig *et al.*, 2005). Les bactéries sessiles vivant dans un biofilm présentent un profil d'expression génique et protéique très différent de celui des bactéries planctoniques (Allegrucci *et al.*, 2006; Moorthy & Watnick, 2004; Sauer, 2003). En outre, les conditions environnementales et la réponse des bactéries à leur environnement local ne sont pas homogènes dans un biofilm.

En effet, le biofilm est caractérisé par une grande hétérogénéité structurale, chimique et biologique (revue par (Stewart & Franklin, 2008)). De par sa structure physique et l'activité métabolique de ses habitants, le biofilm est constitué de divers gradients de concentration (en nutriments, oxygène et produits métaboliques). L'hétérogénéité chimique existant dans les biofilms génère ainsi des microenvironnements **(figure 25)** colonisés par des bactéries physiologiquement distinctes bien que génétiquement identiques. D'autres mécanismes contribuent à l'hétérogénéité phénotypique des bactéries au sein d'un biofilm comme la variation génétique (Kirisits *et al.*, 2005; Yildiz & Schoolnik, 1999) et l'expression stochastique de gènes (Baty *et al.*, 2000).

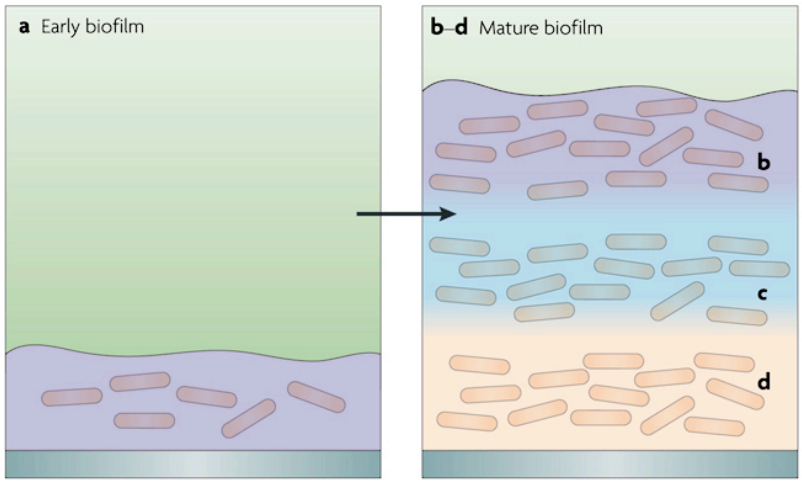


Figure 25. Hétérogénéité physiologique au sein d'un biofilm. (**a**) Au début du développement, la fine couche du biofilm est alimentée en suffisance par les nutriments et l'oxygène. (**b-d**) Dans un biofilm mature, une stratification de la concentration en substrat et en oxygène est observée. La couche superficielle (**b**) en contact avec le milieu extérieur dispose d'oxygène et de substrat en abondance. La couche intermédiaire (**c**) est appauvrie en oxygène mais le substrat y est encore en suffisance et la couche profonde (**d**) est appauvrie en oxygène et en substrat. Image modifiée de (Stewart & Franklin, 2008).

5. Formation de biofilms en réponse à des changements environnementaux

La formation de biofilms, et plus précisément la production d'EPS, est souvent induite en réponse à des facteurs environnementaux comme la disponibilité en nutriments (Houot & Watnick, 2008; Wells & Long, 2002), en oxygène (Bayer *et al.*, 1990) en molécules inorganiques (phosphate (Zhan *et al.*, 1991), NH_4^+ (Doherty *et al.*, 1988), fer (Banin *et al.*, 2005), Mg^{2+} (Mulcahy & Lewenza, 2011)) ou divers stress (stress osmotique (Ionescu & Belkin, 2009), dessiccation (Chang *et al.*, 2007), présence d'antibiotiques (Boehm et al., 2009)) bien que ces facteurs diffèrent selon l'espèce bactérienne considérée.

Au vu de l'implication des biofilms dans les mécanismes de résistance, il est communément admis que la formation de biofilms représente une stratégie de survie face à un environnement inhospitalier. Cette idée est appuyée par la découverte de biofilms fossiles filamenteux datant de 3,2 milliards d'années issus d'un environnement hydrothermal (Rasmussen, 2000). Cette donnée témoigne également du caractère ancestral de la formation des biofilms chez les Procaryotes. Au niveau évolutif, il est vraisemblable de penser que les biofilms ont participé à l'adaptation de la vie dans les conditions (température, pH, exposition UV) extrêmement difficiles de la Terre primitive.

6. Un mode de protection contre le stress

La matrice des biofilms offre une protection contre une grande variété de stress environnementaux tels que la toxicité des métaux (Teitzel & Parsek, 2003), l'acidité (McNeill & Hamilton, 2003), la déshydratation (Iibuchi *et al.*, 2010) ou la présence d'antibiotiques (Mah & O'Toole, 2001; Nguyen *et al.*, 2011; Stewart & Costerton, 2001). Dans le cadre d'une relation hôte-pathogène, la matrice du biofilm permet également de

protéger la bactérie contre les défenses du système immunitaire (Leid *et al.*, 2005).

Différents mécanismes de résistance existent au sein d'un biofilm. D'abord, la matrice du biofilm permet de retenir l'eau et constitue de ce fait une protection contre la déshydratation (Roberson & Firestone, 1992). Par ailleurs, la matrice offre une barrière protectrice passive en réduisant la diffusion des substances toxiques. Cependant, la diffusion ralentie au sein de la matrice n'est pas suffisante pour expliquer la grande tolérance aux traitements antimicrobiens (Stewart, 2003). Un autre mécanisme de résistance repose sur l'arrêt de croissance des bactéries localisées dans la couche profonde du biofilm fortement carencée en nutriments (Gilbert *et al.*, 1997). Récemment, la participation active de la réponse de stringence dans la résistance aux antibiotiques ainsi qu'au stress oxydatif a été démontrée (Nguyen *et al.*, 2011). En outre, l'émergence de cellules en dormance (*persister cells*) (Lewis, 2007) ou l'activation de mécanismes de pompe à efflux (Zhang & Mah, 2008) participe également à la résistance aux antibiotiques.

Enfin, le biofilm est propice aux transferts horizontaux de gènes. Le biofilm fournit ainsi un environnement stable et une proximité entre bactéries qui favorise la transformation et la conjugaison (Molin & Tolker-Nielsen, 2003).

7. RÉGULATION

Comme toute réponse d'adaptation, la formation de biofilms requiert l'intégration des signaux environnementaux dans un réseau de régulation. Les bactéries utilisent donc une fois de plus des systèmes régulateurs pour percevoir des signaux et engager une réponse adaptative favorisant ou inhibant la formation de biofilms. Parmi les modifications requises pour la formation de biofilms, un leitmotiv revient systématiquement : le passage d'un style de vie planctonique à un mode de vie sessile ou la régulation inverse entre l'expression des gènes impliqués dans la production du flagelle et de l'EPS (Garrett *et al.*, 1999; Moorthy & Watnick, 2004; Prigent-Combaret *et al.*, 1999). L'adaptation physiologique nécessaire au développement d'un biofilm fait intervenir différents mécanismes régulateurs.

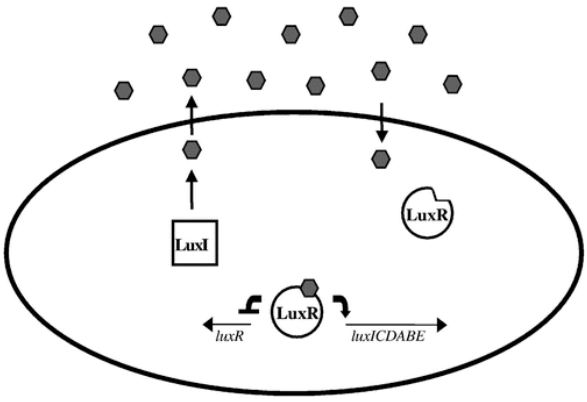
7.1. Quorum Sensing

L'implication du Quorum Sensing (QS) (**cfr. Box. 7**) dans la régulation de biofilms a été mise en évidence pour la première fois chez *P. aeruginosa.* Cette bactérie possède deux circuits QS de type LuxR (LasI/LasR et RhlI/RhlR) organisés en cascade. Une souche mutée pour la production de 3oxoC12-HSL (produit par LasI) forme un biofilm mince qui présente une sensibilité accrue au dodécylsulfate de sodium (SDS) (Davies *et al.*, 1998). Ce système contrôle la production d'EPS (Sakuragi & Kolter, 2007) ainsi que la libération d'ADN extracellulaire (Allesen-Holm *et al.*, 2006) nécessaire à la formation de biofilms chez *P. aeruginosa*. En tant que coordinateur de la réponse multicellulaire, le QS est impliqué dans la formation mais aussi la dispersion de biofilms chez de nombreuses espèces (Boles & Horswill, 2008; Dow *et al.*, 2003; Hammer & Bassler, 2003; Liu *et al.*, 2007).

Box 7. Quorum Sensing

Le Quorum Sensing (QS) est un système qui repose sur la production, la diffusion et la détection de molécules diffusibles appelées auto-inducteurs (AI) par une population d'organismes. Ces signaux permettent aux bactéries de percevoir lorsque leur population a atteint une densité critique ou « quorum ». En effet, les AI s'accumulent dans l'environnement et lorsqu'un certain seuil de concentration est atteint, ils activent un ou plusieurs régulateurs transcriptionnels qui mènent à l'activation/répression de gènes cibles. Historiquement, le QS a été défini comme un système de communication bactérien permettant la régulation de l'expression génique en fonction de la densité de population (Fuqua *et al.*, 1994). En réalité, la concentration en AI perçue est multifactorielle et dépend à la fois du taux de production, du nombre et de la distribution spatiale des organismes producteurs, du taux de diffusion, du volume de confinement et de la dégradation/production éventuelle de la même molécule par des tiers (Hense *et al.*, 2007). Ce système régule de nombreux comportements comme la bioluminescence de *Vibrio fischeri* (Fuqua *et al.*, 1994), la production d'antibiotique et la virulence d'*Erwinia carotovora* (Bainton et al., 1992) ou la formation de biofilms et la virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* (Pearson et al., 1997).

Différentes classes de molécules AI ont été répertoriées (Miller & Bassler, 2001). La plus connue fait intervenir une communication spécifique entre bactéries d'une même espèce. Appelé autoinducteur de type I, le composé employé diffère en fonction du type bactérien. Jusqu'à présent spécifique des bactéries Gram négatives, la communication via une acyl-homosérine lactone (AHL) est sans nul doute la plus étudiée en microbiologie. Ce système d'abord décrit chez la bactérie modèle *V. fischeri* met en jeu trois acteurs moléculaires : une AHL, une enzyme AHL-synthétase (de type LuxI) produisant l'AHL et un régulateur allostérique (de type LuxR) chargé de la détection. Ce dernier est formé de 2 domaines, un domaine de liaison à l'AHL et un domaine de liaison à l'ADN permettant le contrôle de la transcription de gènes cibles. Chez *V. fischeri*, LuxR permet, à haute densité cellulaire, d'activer le phénomène de bioluminescence via la transcription de l'opéron *luxICDABE*. L'activation de la transcription du gène de la synthétase *luxI* permet ainsi d'établir un feedback positif sur la production d'AHLs.



Modèle du Quorum Sensing chez la bactérie *V. fischeri*. Image de (Miller & Bassler, 2001).

7.2. Cyclic-di-GMP

Le di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) est un messager secondaire qui joue un rôle central dans la formation de biofilms et la transition d'un mode de vie planctonique à un mode de vie sessile mais aussi dans la virulence ou le cycle cellulaire (Christen *et al.*, 2010; Simm *et al.*, 2004). Il est synthétisé par une diguanylate cyclase (DGC) qui contient un domaine GGDEF, tandis qu'une phosphodiestérase (PDE) contenant un domaine EAL ou HD-GYP est responsable de sa dégradation **(figure 26)** (revue par (Ryan *et al.*, 2006a)). Les bactéries à Gram négatifs possèdent généralement de multiples gènes codant des protéines à domaine GGDEF ou EAL dans leur génome. En général, les protéines à domaine GGDEF, EAL ou HD-GYP sont modulaires et contiennent également un domaine senseur ou receveur (PAS, GAF, REC) additionnel. Elles sont souvent associées aux systèmes à deux composants (Paul *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2006a). Des protéines composites comportant les deux types de domaines (GGDEF et EAL/HD-GYP) ont été décrites (pour revue voir (Jenal & Malone, 2006; Schirmer & Jenal, 2009)).

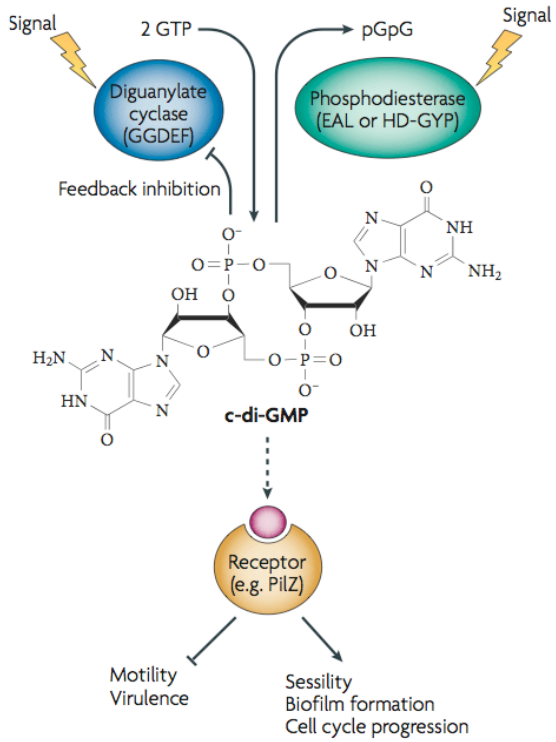


Figure 26. Synthèse, dégradation et structure du c-di-GMP. Le c-di-GMP est synthétisé par une diguanylate cyclase (DGC) (à domaine GGDEF) à partir de 2 molécules de GTP. Il est dégradé par une phosphodiestérase (PDE) (à domaine EAL ou HD-GYP) en pGpG qui sera ensuite clivé en 2 molécules de GMP. Le c-di-GMP est un inhibiteur allostérique de l'enzyme DGC. Les protéines à domaines GGDEF, EAL et DH-GYP répondent à un signal par leur domaine senseur associé. Des récepteurs spécifiques reconnaissent le c-di-GMP qui affecte alors leurs activités effectrices (régulation de la transcription, activité enzymatique, riboswitch). Image de (Schirmer & Jenal, 2009).

La régulation par le c-di-GMP permet ainsi d'intégrer la perception de signaux environnementaux (revue par (Hengge, 2009)). Généralement, les DGCs favorisent tandis que les PDEs inhibent la formation de biofilms, ce qui indique un rôle positif du c-di-GMP sur la formation de biofilms (Boehm *et al.*, 2009). Cependant, le signal perçu par ces protéines GGDEF/EAL de même que les mécanismes effecteurs par lesquels le c-di-GMP régule ses cibles demeurent souvent inconnus. Certains mécanismes d'action du c-di-GMP ont toutefois été décrits soit comme modulateur d'activités enzymatiques telles que la cellulose synthétase ou l'alginate synthétase (Christen *et al.*, 2006; Merighi *et al.*, 2007), de riboswitches (Lee *et al.*, 2010; Sudarsan *et al.*, 2008) ou de régulateurs transcriptionnels **(table 2)** (Baraquet *et al.*, 2012; Fazli *et al.*, 2011; Wilksch *et al.*, 2011).

Protein	Organism	Domain organization[a]	Biological output
GGDEF and/or EAL domain-containing proteins			
FimX	*P. aeruginosa*	REC/PAS/GGDEF/EAL	Twitching motility
PelD	*P. aeruginosa*	TM/TM/TM/TM/GAF/GGDEF	Exopolysaccharide production
LapD	*P. aeruginosa*	HAMP/GGDEF/EAL	Biofilm formation
PopA	*C. crescentus*	REC/REC/GGDEF	Protein localization
Transcription factors			
FleQ	*P. aeruginosa*	FLEQ/AAA/HTH	Motility
Bcam1349	*B. cenocepacia*	cNMP/HTH	Biofilm formation and virulence
VpsT	*V. cholerae*	/LuxR-HTH	Exopolysaccharide production and biofilm formation
Clp	*Xanothomonas axonopodis*	cNMP/HTH	Virulence
	X. campestris		
PilZ domain-containing proteins			
Alg44 (PA4608)	*P. aeruginosa*	PilZ	Alginate production
XC1028	*X. campestris*	PilZ	Motility, virulence and biofilm formation
PilZ (XCC6012)	*X. campestris*	PilZ	Virulence
PP4397	*P. putida*	YcgR-N/PilZ	NA
PlzD (VCA0042)	*V. cholerae*	YcgR-N/PilZ	Virulence
PilZ (XAC1133)	*X. axonopodis*	YcgR-N/PilZ	Virulence
MrkH	*K. pneumoniae*	PilZ	Virulence and biofilm formation
Riboswitches			
Class I	*V. cholerae*	NA	Gene expression
Class II	*C. difficile*;	NA	Translational control
	Clostridium acetobutylicum		
Other			
PNPase	*E. coli*	NA	Motility, biofilm formation and virulence

Table 2. Effecteurs du c-di-GMP. Modifiée de (Ryan *et al.*, 2012).

V. Le genre Brucella

La bactérie pathogène *Brucella* doit son nom au médecin britannique l'ayant identifiée en 1887, David Bruce. Il s'agit d'un petit coccobacille à Gram négatif non sporulé et aérobie strict dont la taille oscille entre 0,6 et 1,5µm de long et le diamètre, entre 0,5 et 0,7µm.

Cultivable *in vitro*, la bactérie peut survivre pendant un certain temps dans l'environnement, c'est pourquoi elle est considérée comme une bactérie intracellulaire facultative. Néanmoins, cette définition occulte quelque peu la réelle nature de ce microorganisme qui est mieux défini comme une bactérie intracellulaire facultativement extracellulaire (Gorvel & Moreno, 2002; Moreno & Moriyon, 2002).

1. La brucellose

Les bactéries du genre *Brucella* sont responsables d'une zoonose mondiale caractéristique de mammifères placentaires sauvages et domestiques, la brucellose (Pappas *et al.*, 2006). La brucellose affecte principalement le système reproducteur de l'animal causant l'avortement chez les femelles gravides et l'infertilité chez les mâles. Chez l'Homme, l'infection prend la forme d'une maladie aux symptômes aspécifiques, la fièvre de Malte. Dans beaucoup de cas, la brucellose est d'ailleurs asymptomatique et l'infection n'est mise en évidence que lors d'analyses sérologiques. La brucellose débute par une phase aiguë avec des symptômes grippaux diffus tels que de la fièvre, des maux de tête, des maux de dos, des malaises, de la myalgie et des douleurs généralisées. Si non diagnostiquée ou incorrectement traitée, la maladie peut prendre une forme chronique et entraîner de graves complications telles que des endocardites, des méningites et enfin la mort. La contamination chez l'Homme se fait principalement lors de contacts accidentels avec le réservoir animal infecté, de la consommation de produits non pasteurisés ou de la manipulation en laboratoire.

La brucellose reste très présente en région méditerranéenne et au Moyen-Orient ainsi que dans certaines parties de l'Asie, de l'Afrique et de l'Amérique du Sud causant des pertes économiques considérables pour les éleveurs (Pappas *et al.*, 2006). Zoonose d'ampleur mondiale, elle représente également un problème de santé publique.

Le traitement de la brucellose consiste en l'administration d'antibiotiques, généralement de doxycycline et de rifampicine. La thérapie recommandée par l'O.M.S. est longue de plusieurs semaines. A ce jour, aucun vaccin efficace et sûr pour l'Homme n'est disponible tandis que des vaccins destinés aux animaux ont été mis au point mais présentent des efficacités variables (Godfroid J., 2003). L'absence de vaccin fait de *Brucella* un pathogène de classe III, dont la manipulation est fortement réglementée, et considéré comme un agent potentiel de bioterrorisme (Boschiroli *et al.*, 2001).

2. Taxonomie et nouveaux réservoirs

Le genre *Brucella* appartient à la subdivision α-2 de la classe des Protéobactéries (Yanagi & Yamasato, 1993). Cette subdivision regroupe des bactéries telles que *Bartonella*, *Rickettsia*, *Agrobacterium* ou *Rhizobium* souvent en étroite interaction avec un hôte eucaryote animal ou végétal mais aussi de bactéries libres de l'environnement

comme *Caulobacter* (Moreno, 1998). La présence de *Brucella* au sein de ce groupe suggère que *Brucella* dérive d'un ancêtre du sol, probablement pathogène opportuniste qui se serait adapté aux hôtes mammifères (Barquero-Calvo *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 1990).

Historiquement, 6 espèces de *Brucella* étaient reconnues par les taxonomistes : *Brucella melitensis, Brucella abortus, Brucella suis, Brucella ovis, Brucella neotomae* et *Brucella canis*. Chacune de ces espèces se différencie par une gamme d'hôtes préférentiels bien que non exclusive ainsi que des caractéristiques biochimiques et de surface (Moreno & Moriyón, 2006). Ces dernières années, quatre nouvelles espèces sont venues allonger cette liste. Ainsi, les souches *Brucella ceti* et *Brucella pinnipedialis* ont été décrites comme infectant des mammifères marins respectivement les cétacés et les pinnipèdes. *Brucella microti* a été isolée chez le campagnol *Microtus Arvalis* et est considéré comme un agent persistant dans le sol (Scholz *et al.*, 2008a; Scholz *et al.*, 2008b). Enfin, un cas inattendu rapporte l'isolement d'une nouvelle espèce dans un implant mammaire, *Brucella inopinata* (Scholz *et al.*, 2010). Récemment, la présence d'une nouvelle espèce a été rapportée dans un isolat de crapaud buffle (Eisenberg *et al.*, 2012). La **table 3** reprend les différentes espèces, leur préférence d'hôte ainsi que leur potentiel zoonotique.

Table 1 Host preference and zoonotic potential of *Brucella* species

Species	Host preference	Zoonotic potential[a]
Brucella melitensis	Sheep, goat (*Ovis* spp. and *Capra* spp.)	High
Brucella abortus	Cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*)	Moderate
Brucella suis	Pig (*Sus scrofa*)	Moderate
Brucella canis	Dog (*Canis lupus familiaris*)	Mild
Brucella ceti	Dolphin, porpoise, whale (Cetacea)	Mild
Brucella pinnipedialis	Seal (Pinnipedia)	Mild
Brucella inopinata	Unknown	Mild
Brucella ovis	Sheep (*Ovis* spp.)	No reported infections
Brucella neotomae	Desert woodrat (*Neotoma lepida*)	No reported infections
Brucella microti	Common vole (*Microtus arvalis*)	No reported infections
Brucella sp. (baboon isolate)	Baboon (*Papio* spp.)	No reported infections

[a]Based on the number of human cases reported and depends on a combination of exposure to the pathogen and infectivity.

Table 3 : Espèce, préférence d'hôte et potentiel zoonotique (Atluri *et al.*, 2011).

Il convient de noter que la brucellose humaine est principalement due à *B. melitensis* mais peut être causée par *B. abortus* et *B. suis*. Des rares cas de contamination humaine par *B. canis* ou des souches marines ont aussi été décrits (Lucero *et al.*, 2005; Mcdonald *et al.*, 2006; Sohn *et al.*, 2003; Whatmore *et al.*, 2008; Zygmunt *et al.*, 2010). Par ailleurs, la découverte de nouvelles espèces et de nouveaux réservoirs met en évidence la ré-émergence de la brucellose pour laquelle de nouvelles populations humaines sont à risque (Pappas, 2010).

3. BRUCELLA, UNE BACTÉRIE DISCRÈTE

La longue coévolution de *Brucella* avec son hôte mammifère en a fait un pathogène extrêmement bien adapté (Moreno & Moriyon, 2002). Elle pénètre dans l'organisme par voie respiratoire, digestive ou cutanée et gagne par voie lymphatique le premier relais ganglionnaire. La dissémination dans tout l'organisme se fait par voie sanguine et lymphatique. Contrairement à d'autres pathogènes, *Brucella* ne possède pas de facteurs de virulence classiques comme les endotoxines, exotoxines, plasmide de virulence, etc. Au contraire, il est communément admis qu'elle développe une stratégie furtive au sein de son hôte. *Brucella* présente des PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) altérés qui lui permettent d'échapper à la détection par le système immunitaire inné. Cette esquive est décisive pour la stratégie de *Brucella* (Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Freer *et al.*, 1996; Lapaque *et al.*, 2005). L'exemple le mieux décrit de PAMPs altéré chez *Brucella* spp. est le lipopolysaccharide (LPS), considéré comme un facteur de virulence (Goldstein *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1981).

4. BRUCELLA, UNE BACTÉRIE INTRACELLULAIRE

La virulence de la bactérie réside dans sa capacité d'entrer, de survivre et de se répliquer à l'intérieur des cellules de son hôte. Elle est ainsi capable de persister et de se multiplier dans les macrophages et les trophoblastes (Meador & Deyoe, 1989). La chronicité de l'infection par *Brucella* est vraisemblablement liée à cette caractéristique.

L'entrée de *Brucella* dans la cellule est la première étape de la colonisation cellulaire. Des micro-domaines membranaires riches en cholestérol appelés « lipid rafts » sont nécessaires à cette étape (Naroeni & Porte, 2002; Watarai *et al.*, 2002; Watarai, 2004). Cela suggère qu'un ou plusieurs récepteurs reconnaissant *Brucella* soient situés dans ces *lipid rafts* (Celli, 2006). Notons que la voie d'entrée ainsi que la niche de réplication de *Brucella* dans la cellule diffèrent selon que la bactérie soit opsonisée ou non (Bellaire *et al.*, 2005). En outre, lors d'une infection de *Brucella* spp. opsonisées avec un sérum immun (spécifiquement contre *Brucella*), le nombre de bactéries internalisées est plus important mais la proportion de bactéries phagocytées qui parviennent à atteindre la niche réplicative est plus faible (Rolan & Tsolis, 2007).

Localisée à l'intérieur d'une vacuole dénommée BCV (*Brucella containing vacuole*), la bactérie est notamment capable de contrôler son propre trafic intracellulaire. Après son entrée dans la cellule, *Brucella* se trouve dans un compartiment acide qui s'engage dans la voie de fusion phago-lysosomale (Detilleux *et al.*, 1991). Cependant, les souches virulentes sont en mesure de dévier la suite du processus cellulaire. Durant très longtemps, il a été admis que la BCV évitait la fusion avec le lysosome (Celli, 2006). Cependant, il a récemment été proposé que la BCV fusionne transitoirement avec le lysosome et que cette fusion est nécessaire pour la maturation en vacuole réplicative **(figure 27)** (Starr *et al.*, 2008). L'acidification associée au stress nutritionnel au sein du compartiment phagosomal précoce constitue un stimulus nécessaire à l'activation du système de sécrétion de type IV VirB, essentiel à la survie intracellulaire (Boschiroli *et al.*, 2002; Dozot *et al.*, 2006; O'Callaghan *et al.*, 1999; Porte *et al.*, 1999). En effet, un mutant *virB* est incapable de dévier son trafic et est dirigé vers le lysosome où il est dégradé **(figure 27)** (Comerci *et al.*, 2001).

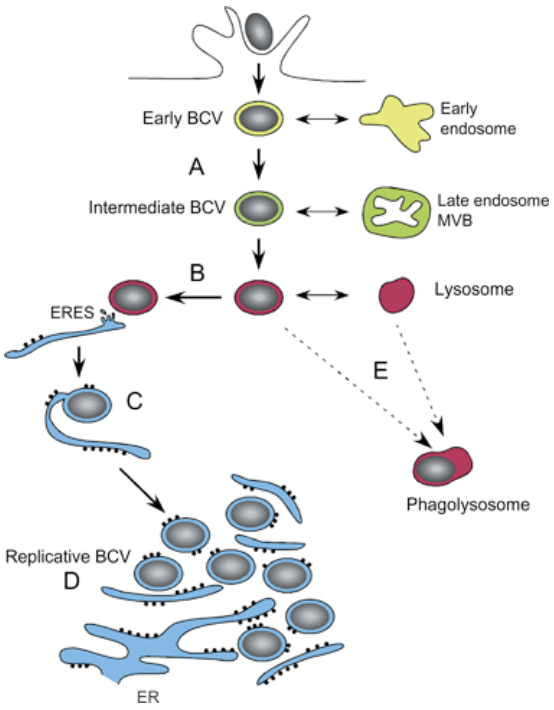


Figure 27 : Trafic intracellulaire de *Brucella*. Après son entrée, la bactérie dans sa BCV interagit successivement avec les endosomes précoces et tardifs (**A**) avant de fusionner avec le lysosome (**B**). Cette fusion transitoire est nécessaire pour interagir avec les ERES (*Endoplasmic reticulum exit site*) (**C**) et finalement atteindre sa niche de réplication dérivée du réticulum endoplasmique (**D**). Un mutant *virB* voit sa vacuole maturée en vacuole bactéricide après fusion avec le lysosome (**E**). Image de (Starr *et al.*, 2008).

Afin d'atteindre le réticulum endoplasmique pour se répliquer, la vacuole entre en contact avec une partie de la membrane du réticulum endoplasmique appelé ERES[9] (*Endoplasmic Reticulum Exit Site*). Ce mécanisme fait intervenir la petite GTPase Sar1 (Celli *et al.*, 2005). Les bactéries se retrouvent alors dans un phagosome réplicatif ou « brucellosome » possédant des caractéristiques du réticulum endoplasmique (Celli et al., 2003).

5. BRUCELLA ET SES FACTEURS DE VIRULENCE

Malgré des années de recherches, les mécanismes moléculaires qui interviennent dans la pathogénicité de *Brucella* spp. sont peu connus. Les facteurs décrits dans la littérature sont principalement liés au système de sécrétion de type IV (T4SS) et à la paroi bactérienne ainsi qu'aux mécanismes d'adaptation à différents stress.

5.1. Système de sécrétion de type IV

La déviation du trafic phago-lysosomal est dépendante du T4SS *virB*, probablement par la sécrétion d'effecteurs. En effet, un mutant Δ*virB* chez *B. suis* est incapable de survivre et de se multiplier en cellules (Comerci *et al.*, 2001; O'Callaghan *et al.*, 1999). Bien que la translocation de sept protéines dans le cytosol de la cellule de façon T4SS-dépendante ait, à ce jour, été montrée (de Jong *et al.*, 2008; Marchesini *et al.*, 2011), seule RicA peut être qualifiée d'effecteur de *Brucella* puisque c'est la seule protéine sécrétée pour laquelle une fonction effectrice ait été proposée (de Barsy *et al.*,

[9] L'ERES constitue le point de départ de la voie sécrétoire des vésicules exportées du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi.

2011). *In vitro*, RicA interagit avec la GTPase Rab2 dont la présence en membrane des BCV est capitale pour la réplication de *B. abortus* en cellules (de Barsy *et al.*, 2011; Fugier *et al.*, 2009).

5.2. L'enveloppe bactérienne

Interface avec l'extérieur, l'enveloppe bactérienne et les mécanismes de régulation qui en assurent le maintien sont des déterminants indispensables de la virulence de *Brucella*. Nous présenterons ici les principaux facteurs associés à cette enveloppe qui influencent sa virulence.

5.2.1. Le lipopolysaccharide (LPS)

Les souches *Brucella* spp. possèdent un lipopolysaccharide (LPS) formé d'un lipide A atypique, d'un core d'oligosaccharide branché et d'une chaîne O de N-formylperosamine **(figure 28)** (Cardoso *et al.*, 2006). Chez *Brucella*, le lipide A est formé d'un squelette de diaminoglucose (à la place de glucosamine) relié par des liens amides aux chaînes acyl et contient une très longue chaîne d'acides gras. Le core, dépourvu d'heptose et de phosphate, est composé de mannose, glucose, acide 3-deoxy-D-manno-octulosonic (Kdo) et quinovosamine. La chaîne O est uniquement présente chez les bactéries lisses et composée d'un homopolymère de N-formylpérosamine, dérivé du mannose (Perry & Bundle, 1990). Ces résidus sont liés entre eux par des liens α(1,2) et α(1,3) chez *B. melitensis,* tandis qu'il n'y a que des liens α(1-2) chez *B. abortus*.

Chacune de ces parties contribue à minimiser la reconnaissance de la bactérie par le système immunitaire. Faiblement endotoxique, le LPS permet la résistance à l'activité du complément et de peptides antimicrobiens (Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Conde-Alvarez *et al.*, 2012; Fernandez-Prada *et al.*, 2001; Goldstein *et al.*, 1992; Lapaque *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 1981). En plus de son rôle immunitaire, le LPS et particulièrement sa chaîne O intervient dans le mécanisme d'internalisation des bactéries (Porte *et al.*, 2003). Ainsi, des mutants possédant un LPS rugueux (dépourvu de chaîne O) n'entrent pas dans la cellule via les « lipid rafts » (Porte *et al.*, 2003). Notons toutefois que les souches *B. ovis* et *B. canis* possèdent un LPS rugueux et gardent leur caractère virulent au moins vis-à-vis de leur hôte naturel.

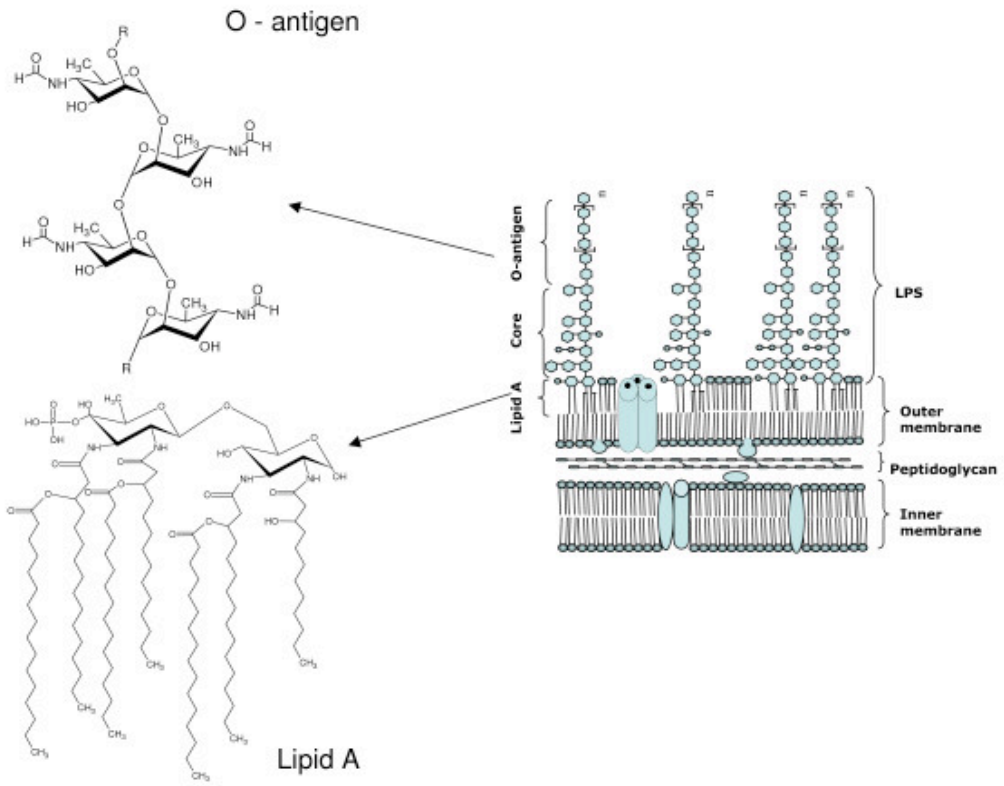


Figure 28. Représentation schématique du LPS de *Brucella*. Chez les bactéries Gram négatives, le LPS est situé dans le feuillet externe de la membrane externe. Image de (Cardoso *et al.*, 2006).

5.2.2. Le β-glucan cyclique (cβG)

Comme d'autres alpha-protéobactéries, *Brucella* produit un polymère de glucose cyclique appelé le β,1-2-glucan cyclique (cβG) (Briones *et al.*, 1997). Contrairement à *Agrobacterium tumefaciens* ou *S. meliloti,* il a été décrit que la production de cβG ne semble pas être osmotiquement régulée chez *B. abortus* (de Iannino *et al.*, 2000). La synthèse de ce polymère à partir d'UDP-glucose est catalysée par une seule enzyme[10] Cgs (*cyclic glucan synthase*) ancrée en membrane interne. Après initiation, la chaîne linéaire de glucose s'allonge jusqu'à 17 à 24 unités avant de subir la cyclisation. Après la synthèse, le polymère est transporté dans le périplasme par un ABC transporteur impliquant la protéine Cgt. Dans le périplasme, la molécule est alors modifiée par la protéine Cgm (Roset *et al.*, 2006).

Le β,1-2-glucan périplasmique est un facteur de virulence qui affecte le trafic vésiculaire et la réplication intracellulaire (Briones *et al.*, 2001). Il a été suggéré que le cβG perturbe les « lipid rafts » et empêche ainsi les interactions prolongées avec le lysosome. Cependant, la façon dont ces polymères périplasmiques interagissent avec la membrane de la BCV n'est pas résolue (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Enfin, le mutant *cgs*

[10] La protéine Cgs est une protéine de la membrane interne de 300kDa qui possède toutes les activités enzymatiques requises pour la synthèse du cβG : initiation (transfert d'un glucose sur l'enzyme Cgs à partir d'UDP-glucose), élongation (formation d'une chaîne linéaire de glucose par ajout successif d'UDP-glucose) et cyclisation (liaison entre deux résidus glucoses de la chaîne et libération du cβG).

(incapable de synthétiser le cβG) montre une sensibilité accrue aux détergents, ce qui suggère une altération de son enveloppe.

5.2.3. Le système à deux composants BvrS/BvrR

L'invasion et la survie intracellulaire de *Brucella* spp. dépend fortement du système à deux composants BvrR/BvrS (*Brucella virulence related*). Les gènes *bvrR/bvrS* sont co-transcrits avec les gènes du système PTS localisés en aval (Dozot *et al.*, 2006). D'abord décrit comme régulateur du maintien de la paroi bactérienne, il est aujourd'hui considéré comme un système régulateur global affectant la paroi mais aussi le métabolisme (Viadas *et al.*, 2010). Il régule les composants de la membrane externe (protéines de membrane externe (OMP), lipide A du LPS) ainsi que le système de sécrétion *virB* (Guzman-Verri *et al.*, 2002; Lamontagne *et al.*, 2007; Martinez-Nunez *et al.*, 2010). Outre une sévère atténuation de leur virulence, les mutants *bvrR/bvrS* présentent une sensibilité accrue aux peptides cationiques et aux détergents (Manterola *et al.*, 2005; Sola-Landa *et al.*, 1998).

5.2.4. Le régulateur de Quorum Sensing VjbR

Deux régulateurs de type LuxR, VjbR et BabR (ou BlxR) ont été identifiés chez *Brucella* spp (Delrue *et al.*, 2005; Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Uzureau *et al.*, 2007). Par ailleurs, des analyses de surnageants de culture ont révélé la présence, en faible quantité, d'au moins deux types d'AHL dont l'un a été identifié comme une C12-HSL et l'autre étant vraisemblablement une 3oxo-C12-HSL (sur base de comparaison de profils TLC) (Taminiau *et al.*, 2002). Bien qu'à ce jour, aucune AHL-synthétase n'ait été identifiée chez *B. melitensis,* il semble que le système régulateur QS soit fonctionnel (Terwagne, 2011). Le régulateur VjbR joue un rôle crucial dans la virulence de *Brucella* spp en modèle d'infection cellulaire et murin (Delrue *et al.*, 2005). VjbR est requis pour l'expression du système de sécrétion VirB et des gènes flagellaires. A l'inverse, en présence de C12-HSL exogène VjbR réprime l'expression de *virB* et des gènes flagellaires (Delrue *et al.*, 2005; Uzureau *et al.*, 2007). Le rôle de VjbR et de BabR en tant que régulateurs globaux du métabolisme, de la réponse au stress et de la virulence a été établi lors d'analyses transcriptomiques et protéomiques (Uzureau *et al.*, 2010; Weeks *et al.*, 2010).

Récemment, la détection *in situ* d'AHL produites par *Brucella* dans sa vacuole a remis en cause le concept de QS (en tant que senseur de densité de population) chez *Brucella* qui pourrait se définir comme un « Confinement Sensing », ou moyen pour la bactérie de détecter qu'elle est enfermée dans un compartiment intracellulaire (Terwagne, 2011).

6. BRUCELLA ET LA RÉPONSE AU STRESS

Brucella est confrontée à différents stress non seulement dans sa phase extracellulaire mais aussi à l'intérieur des cellules hôtes : stress oxydatif dû aux ROS suite à l'internalisation (Gee *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 1993; Phillips & Roop, 2001), au stress acide dans la BCV (Kohler *et al.*, 2003; Porte *et al.*, 1999) et au stress nutritif. *Brucella* spp. est non seulement adaptée pour résister aux stress qu'elle rencontre mais certains de ces stress sont nécessaires à l'induction de facteurs de virulence tels que le T4SS induit à pH

acide aux temps précoces de l'infection (Boschiroli *et al.*, 2002; Porte *et al.*, 1999). De façon similaire, l'induction de l'expression de *dnaK* à pH acide permet la résistance au stress oxydatif (Köhler *et al.*, 2002).

6.1. Réponse générale

L'entrée en phase stationnaire s'accompagne d'un changement de physiologie où les bactéries passent de la production de biomasse à des activités métaboliques de maintenance favorisant la survie face à différents stress. Par conséquent, les facteurs permettant l'adaptation en phase stationnaire devraient être bénéfiques pour l'adaptation de *Brucella* spp. aux stress rencontrés durant l'infection. Parmi les facteurs d'adaptation à la phase stationnaire, le facteur σ^S (encodé par le gène *rpoS*) permet de rediriger l'ARN polymérase pour induire la transcription de gènes spécifiques. Cependant, aucun gène homologue à *rpoS* n'a été mis en évidence dans le génome de *Brucella* spp. (DelVecchio *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005; Paulsen *et al.*, 2002). En revanche, Hfq (Host Factor I ou HF-1) est une protéine capable de lier l'ARN et nécessaire à l'entrée en phase stationnaire chez de nombreuses bactéries. Le gène *hfq* est présent chez *Brucella* spp. et est nécessaire à la virulence en modèle cellulaire et murin. Plus précisément, un mutant de *B. abortus* pour le gène *hfq* présente une sensibilité accrue face au stress acide et à l'H_2O_2 (Robertson & Roop, 1999).

Bien qu'aucun homologue à *rpoS* n'ait été mis en évidence dans le génome de *Brucella* spp., la bactérie possède néanmoins six facteurs sigma : *rpoD*, *rpoH1, rpoH2, rpoEI, rpoE2 et rpoN.* Une souche mutée pour *rpoH2* présente une sensibilité à la chaleur et au stress oxydatif associée à une atténuation de sa virulence. Il a aussi été montré que la délétion de *rpoH2* réduit l'expression du T4SS et des protéines flagellaires*.* Les mutants *rpoH1, rpoE1 et rpoE2* présentent également un défaut de persistance (Delory *et al.*, 2006).

De façon générale, des chaperonnes (ClpA, ClpB, ClpX) en association avec une protéase (ClpP) sont impliquées dans l'élimination des protéines endommagées suite à différents stress. Le rôle de ClpA dans la dégradation de protéines dénaturées a été démontré chez *B. suis* (Ekaza *et al.*, 2000). Le mutant *clpB* montre, quant à lui, une sensibilité au pH acide et à la chaleur. Par ailleurs, le double mutant *clpA clpB* présente également une sensibilité au stress oxydatif (Ekaza *et al.*, 2001).

6.2. Réponse au stress oxydatif

De part son métabolisme aérobie, *Brucella* spp. produit des ROS comme le O_2^- et l'H_2O_2 (Rest & Robertson, 1975). Par ailleurs, la production de ROS ainsi que des dérivés actifs de l'azote (RNI, *reactive nitrogen intermediate*) fait partie du mécanisme bactéricide des macrophages infectés (Gross *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1993). *Brucella* spp. possède donc des mécanismes pour répondre à un stress oxydatif qu'il soit endogène ou exogène.

6.2.1. Dégradation des ROS

Brucella spp. possède notamment deux superoxydes dismutases (Stabel *et al.*, 1994). SodC (Cu-Zn superoxyde dismutase periplasmique) participe spécifiquement à la

détoxification de l'O_2^- notamment généré par le *burst* oxydatif dans des macrophages activés par l'IFNγ tandis que SodA (Mn superoxyde dismutase cytoplasmique) protège la cellule de générateurs d'O_2^- endogènes mais aussi de l'H_2O_2 et du pH acide. Le mutant *sodC* présente une atténuation de la virulence en macrophages et en souris chez *B. abortus* (Gee *et al.*, 2005), tandis que pour le mutant *sodA,* l'atténuation ne se marque que dans les temps précoces de l'infection (Martin *et al.*, 2012). Il convient de noter que la virulence du mutant *sodA* en macrophages infectés ne peut être restaurée par l'apocyanine, inhibiteur de la NADPH oxydase (enzyme phagosomale productrice de ROS) suggérant également une production ROS endogène par la bactérie intracellulaire à moins que la sensibilité accrue du mutant à l'acidité (rencontrée dans les phagosomes précoces) n'explique l'atténuation de sa virulence. (Martin *et al.*, 2012).

Par ailleurs, *Brucella* spp. possède une catalase et une alkyl hydroperoxidase (AhpC). L'expression de la catalase semble notamment être régulée par OxyR chez *B. abortus* (Kim & Mayfield, 2000). La catalase périplasmique KatE joue un rôle dans la détoxification de l'H_2O_2 principalement exogène, tandis que l'alkyl hydroperoxidase AhpC, comme chez *E. coli*, protège de l'H_2O_2 endogène (Kim *et al.*, 2000; Seaver & Imlay, 2001; Sha *et al.*, 1994). Néanmoins, en l'absence d'AhpC fonctionnelle, KatE peut également prendre en charge l'H_2O_2 endogène (Steele *et al.*, 2010). En outre, seul le double mutant *ahpC katE* présente une atténuation en souris (Steele *et al.*, 2010).

6.2.2. Dégradation des RNI

Brucella spp. est également équipée pour faire face aux dérivés actifs de l'azote comme l'oxyde d'azote NO ou le peroxinitrite $ONOO^-$ (résultat de la réaction de l'O_2^- avec le NO) produits par les macrophages (Gross *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1993). Parmi les gènes de dénitrification, les gènes *nor* et *nnrA* encodant respectivement une NO réductase et son régulateur seraient impliqués dans la détoxification du NO produit par les macrophages activés (Haine *et al.*, 2006; Loisel-Meyer *et al.*, 2006). Certains de ces gènes de dénitrification (*narG*, *norB* et *nosZ*) sont surexprimés durant le premier stade de l'infection en cellule et permettraient à la bactérie de survivre en condition de microaérobiose en permettant la respiration de nitrate (Rossetti *et al.*, 2011). Il a récemment été montré que le système à deux composants NtrY/NtrX, nécessaire pour la survie intracellulaire de la bactérie, est un senseur rédox qui perçoit l'O_2 via un groupement hème lié à son domaine PAS et induit la transcription des gènes de dénitrification en conditions de microaérobiose (Carrica *et al.*, 2012; Foulongne *et al.*, 2000). Enfin, l'AhpC en plus de détoxifier l'H_2O_2 serait également capable de neutraliser le $ONOO^-$ *in vitro.* Cependant, le rôle d'AhpC dans la détoxification du $ONOO^-$ *in vivo* pendant l'infection n'a pas encore été démontré (Steele *et al.*, 2010).

6.2.3. Contrôle du fer et du manganèse

Outre les mécanismes de détoxification des ROS et RNI, *Brucella* spp. est également capable de réguler son homéostasie en fer. En effet, si l'apport en fer est crucial chez les bactéries pathogènes, il doit être contrôlé afin de limiter le stress oxydatif qu'il engendre via la réaction de Fenton. Chez les α-protéobactéries, c'est le régulateur Irr qui régule l'homéostasie en fer. Irr est une protéine dont la dégradation dépend directement de la liaison d'un groupement hème et donc de la disponibilité en fer (Qi *et al.*, 1999). En

conditions de carence en fer, le régulateur Irr (*Iron response regulator*) inhibe la synthèse des groupements hèmes et active la synthèse des sidérophores (brucebactin et 2,3-acide dihydroxybenzoique (DHBA)), du transporteur d'hème (BhuA) ainsi que l'hème oxygénase (BhuQ), une enzyme qui catalyse la dégradation de l'hème et la libération du fer (Anderson *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2006; Ojeda *et al.*, 2012). Une souche mutée pour *Irr* présente une plus grande résistance au stress oxydatif accompagnée d'une hypervirulence en cellules *in vitro* (Martinez *et al.*, 2006).

Indispensable à l'activité de détoxification de la Mn-superoxyde dismutase SodA, le manganèse favorise la réponse au stress oxydatif. *Brucella* possède un régulateur appelé Mur (*manganese responsive regulator*) dont l'activité dépend du manganèse. *Brucella* spp. possède un transporteur de manganèse, MntH dont l'expression est directement contrôlée par l'abondance de Mn^{2+} (Menscher *et al.*, 2012) et essentielle à la virulence de la bactérie et à la résistance au ROS (Anderson *et al.*, 2009).

6.3. Réponse au stress acide

Durant la première phase de l'infection, le compartiment endosomal dans lequel *Brucella* spp. réside dans les cellules infectées s'acidifie (Detilleux *et al.*, 1991). Cette acidification constitue même un stimulus nécessaire à l'activation de facteurs de virulence comme le T4SS VirB (Boschiroli *et al.*, 2002; Porte *et al.*, 1999).

L'expression des protéines HtrA, GroEL et DnaK est induite à la chaleur et en milieu acide (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996; Teixeira-Gomes *et al.*, 2000). La protéine HtrA, une sérine protéase périplasmique, est impliquée dans la dégradation des protéines endommagées. La mutation du gène *htrA* entraîne une sensibilité accrue de *Brucella* à la chaleur et aux substances oxydantes ainsi qu'une atténuation de la survie intracellulaire (Elzer *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1997). DnaK est impliquée dans la réponse aux stress acide et oxydatif et est essentielle à la survie de *Brucella* au sein des macrophages (Kohler *et al.*, 1996; Köhler *et al.*, 2002). Sa fonction précise n'est cependant pas connue à ce jour.

De même, le régulateur CenR, requis pour l'infection, permet la résistance à la chaleur et à l'acidité ainsi qu'à l'hyperosmolalité chez *B. melitensis* bien que les mécanismes et les cibles sous-jacentes restent inconnus (Zhang *et al.*, 2009). La chaperonne HdeA et la protéine Asp24 protègent *Brucella* spp. d'un stress acide *in vitro* mais seule Asp24 semble requise pour la persistance de l'infection chez la souris et chez la chèvre (Kahl-McDonagh *et al.*, 2006; Lin & Ficht, 1995; Valderas *et al.*, 2005). Le mécanisme par lequel Asp24 protège de l'acidité n'a pas été mis en évidence.

Sauf exceptions, la majorité des espèces de *Brucella* présentent une activité uréase encodée par l'opéron *ure1* (*ureABCDEFG*). L'activité uréase protège de l'acidité et favoriserait l'infection de *Brucella* par voie gastrique (lorsque la bactérie fait face aux conditions de pH acide dans l'estomac). Elle n'est cependant pas impliquée dans l'adaptation au pH acide dans le compartiment intracellulaire (Bandara *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007).

6.4. Réponse au stress nutritionnel

Brucella spp. doit également être capable d'adapter son métabolisme aux conditions de stress nutritionnel rencontrées au cours de leur cycle infectieux. Différents mutants

métaboliques ont été identifiés comme affectés en modèle d'infection cellulaire et/ou en modèle murin (Delrue *et al.*, 2001; Foulongne *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Kohler *et al.*, 2002; Lestrate *et al.*, 2000; Lestrate *et al.*, 2003). Plus globalement, la réponse de stringence joue un rôle crucial dans l'adaptation de *Brucella* spp. lors de l'infection (Dozot *et al.*, 2006; Kohler *et al.*, 2002). Ainsi, il a été démontré que Rsh (RelA/SpoT homologue) est requis pour la virulence de *Brucella* spp. en modèle d'infection cellulaire et murin ainsi que pour l'activation de l'opéron *virB* (Dozot *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). D'autre part, *Brucella* possède un système PTS fonctionnel mais aucune perméase associée. Ce système régulateur, indicateur de l'état métabolique de la cellule, est co-transcrit avec le SDC BvrS/BvrS et affecte la virulence et la production des protéines du T4SS (Dozot *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2006).

Durant son cycle infectieux, *Brucella* spp. rencontre des conditions de microaérobiose voire même d'anaérobiose. Ainsi, la concentration en oxygène est fortement réduite à l'intérieur des phagosomes (James *et al.*, 1995) mais aussi dans les granulomes dans lesquels *Brucella* spp. réside dans la phase chronique d'infection (Ariza *et al.*, 2001; Colmenero Jde *et al.*, 2002; Copin *et al.*, 2012; Sohn *et al.*, 2003). Les complexes CydCDAB et CcoNOPQ forment respectivement le cytochrome bd ubiquinol oxidase et le cbb3-type cytochrome oxydase qui, par leur haute affinité pour l'O_2, permettrait la respiration aérobie en conditions de microaérobiose. La cytochrome oxydase *bd* participe à l'adaptation de *Brucella* spp. aux conditions de microaérobiose intracellualire (Endley *et al.*, 2001; Loisel-Meyer *et al.*, 2005). En revanche, le CcoN est uniquement requis pour la persistance de l'infection en modèle murin suggérant un rôle dans l'adaptation dans l'hôte (Jimenez de Bagues *et al.*, 2007).

L'acquisition du fer est également requise par *Brucella* spp. dans certaines conditions d'infection et de croissance (Bellaire *et al.*, 2003a; Bellaire *et al.*, 2003b). En effet, les deux sidérophores (DHBA et brucebactin) ne sont pas requis pour la virulence de la bactérie en modèle d'infection cellulaire et murin (Bellaire *et al.*, 1999; Gonzalez Carrero *et al.*, 2002). Néanmoins, la production du sidérophore DHBA est cruciale lors de l'infection de ruminants gestants (Bellaire *et al.*, 2003b). Cette particularité trouverait son origine dans la nécessité pour *Brucella* spp. de recevoir un apport en fer important pour le métabolisme de l'érythritol (Bellaire *et al.*, 2003a; Jain *et al.*, 2011), présent en abondance dans le placenta des femelles gestantes (Williams *et al.*, 1962).

6.5. Formation de biofilms et production d'EPS

Au vu des stress qu'elle rencontre et auxquels elle doit s'adapter, la capacité de *Brucella* à former des biofilms pourrait constituer un avantage certain. De plus, les biofilms étant associés à des formes de vie résistantes pourrait expliquer le caractère persistant de l'infection par *Brucella*. La possibilité pour *Brucella* spp. de former des biofilms est fortement suggérée par l'observation d'agrégats bactériens, ceux-ci étant considérés comme l'étape initiale de formation des biofilms (Alhede *et al.*, 2011). La formation d'agrégats par *B. melitensis* a été observée à plusieurs reprises dans des souches et des conditions différentes que nous décrivons brièvement ci-dessous.

6.5.1. Agrégats dépendants de VjbR

Divers mutants du gène *vjbR* de *B. melitensis* (mutant de délétion (Δ*vjbR*), mutant ponctuel empêchant la reconnaissance des AHL (*vjbRD82A*) ou mutant délété pour le domaine senseur d'AHL (*vjbRΔ1-180*) et donc incapables de percevoir la présence d'AHL agrègent spontanément en culture liquide en milieu 2YT[11]. Ces agrégats bactériens sont associés à un marquage au calcofluor[12] et à la concanavaline A[13]. Ce type de marquage laisse entrevoir la présence d'un EPS. Etrangement, les mêmes mutations dans un background *B. abortus* n'engendrent pas de phénotype d'agrégats. La différence de phénotype entre les deux souches a été expliquée par l'absence, chez *B. abortus,* d'un locus de 25 kb encodant des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'un EPS et particulièrement le gène *omp31* dont la délétion chez *B. melitensis* empêche la formation d'agrégats (Uzureau *et al.*, 2007).

6.5.2. Agrégats dépendants du Quorum Quenching

La surexpression d'un gène *aiiD* encodant un homologue de l'AHL-acylase de *Ralstonia* sp. engendre également la production d'agrégats en culture liquide en 2YT chez *B. melitensis* (Godefroid *et al.*, 2010). L'AHL-acylase est une enzyme de Quorum Quenching[14] (QQ) capable de dégrader les AHL (Terwagne, 2011). La surexpression de ce gène mène donc théoriquement au même phénotype que les souches Δ*vjbR*, *vjbRD82A* et *vjbRΔ1-180* d'une souche insensible aux AHL. Une caractérisation approfondie des agrégats a été réalisée sur cette souche (Godefroid *et al.*, 2010). D'après les analyses effectuées, ils contiennent un EPS qualifié de mannan, de l'ADN extracellulaire et des vésicules de membranes externes (Godefroid *et al.*, 2010), tous des constituants typiques des biofilms. Toutefois, dans ce cas, la formation d'agrégats semble indépendante de la présence du locus de 25 kb. En effet, les souches *B. suis* (où le locus de 25 kb est présent)

[11] Milieu riche contenant 16 g/l de peptones, 10 g/l d'extraits de levure et 5 g/l de NaCl.

[12] Le calcofluor est une sonde fluorescente spécifique des β-glucans.

[13] La concanavaline A est une lectine reconnaissant spécifiquement les α-mannopyranosyl et α-glucopyranosyl.

[14] Le Quorum Quenching est défini comme tout mécanisme qui interfère avec le QS dans le cas de l'AHL-acylase en dégradant les AHL.

et *B. abortus* (où le locus de 25 kb est absent) portant le plasmide de surexpression de l'AHL-acylase forment des agrégats en 2YT (Godefroid, 2010).

OBJECTIFS

OBJECTIFS

En tant que bactérie pathogène intracellulaire, *B. melitensis* fait face à des conditions environnementales changeantes et quelquefois nuisibles. Entre le compartiment intracellulaire où elle réside et le milieu extérieur, les contraintes sur son parcours sont nombreuses. Chez les bactéries, l'adaptation ainsi que la réponse au stress dépendent de la coordination de différents acteurs moléculaires impliqués dans la réception de stimuli, l'intégration de signaux ou la mise en place de la réponse adaptative. Parmi ces acteurs, les systèmes à deux composants (SDC) et les régulateurs transcriptionnels jouent un rôle prédominant. Processus finement régulé, la formation de biofilms constitue une forme de résistance aux stress souvent profitable aux bactéries pathogènes.

Dans ce contexte, il a été observé que différentes souches de *B. melitensis* altérées dans leur système Quorum Sensing (QS) forment des agrégats bactériens en culture liquide. De structure similaire aux biofilms, ces agrégats sont constitués d'une matrice extracellulaire polysaccharidique englobant les bactéries. En dépit des tentatives infructueuses d'identification des gènes impliqués dans sa biosynthèse, ce polysaccharide a été qualifié d'EPS et décrit comme un mannan. D'après ces observations, il a été postulé que *Brucella* spp. pourrait former des biofilms et que ceux-ci seraient régulés par le QS. En outre, en tant que structure de surface, l'EPS est potentiellement impliqué dans la relation à l'hôte de la bactérie. La régulation d'une telle structure apparaît donc comme essentielle pour le bon déroulement du processus d'infection.

Cependant, jusqu'à récemment, les conditions d'agrégation de la souche WT étaient inconnues rendant hasardeuse la compréhension des mécanismes de régulation sous-jacents à la production d'EPS et leur rôle dans le cycle infectieux. La découverte de la formation d'agrégats par la souche *B. melitensis* WT lors d'une culture prolongée en 2YT contenant 400 mM NaCl constitue donc un nouveau point de départ pour nos investigations. La formation de ces agrégats en réponse à ce stress hypersalin renforce d'autant plus l'idée que la formation de biofilms pourrait être l'une des stratégies de *Brucella* spp. face au stress.

Nos objectifs ont donc visé à comprendre le rôle de l'EPS chez *Brucella* spp., à identifier des gènes de sa biosynthèse et des régulateurs impliqués dans sa production en réponse au stress hypersalin ainsi que leurs rôles dans la virulence de la bactérie. Lors de nos travaux, nous avons donc entrepris la purification de l'EPS produit par la souche WT afin d'en comparer la composition avec le mannan déjà décrit. En parallèle, une tentative d'identification des gènes de biosynthèse de cet EPS a été mise en œuvre. Enfin, nous avons étudié le rôle de deux régulateurs, le SDC PlrS/PrlR et MucR dans la formation d'agrégats ainsi que dans la virulence de *B. melitensis*.

RESULTATS

RESULTATS

CHAPITRE I : REMISE EN CAUSE DE LA PRODUCTION D'UN EPS PAR *BRUCELLA* SPP.

1. INTRODUCTION

1.1. La formation d'agrégats chez des souches QS déficientes

Des souches affectées dans le QS (voir introduction) ont été décrites comme formant des agrégats après une nuit de culture en milieu 2YT liquide (Godefroid *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2007). Les agrégats ont été étudiés de façon appronfondie dans une souche *B. melitensis* surexprimant une AHL-acylase. Il a ainsi été montré qu'ils contenaient une matrice de polysaccharides ainsi que des vésicules de membrane externe et de l'ADN extracellulaire, tous constituants typiques des biofilms (Godefroid *et al.*, 2010). Dans un premier temps, un marquage du polysaccharide contenu dans ces agrégats par une lectine spécifique, la concanavaline A (ConA), indiquait la présence de résidus α-mannopyrannosyl et/ou α-glucopyranosyl (Godefroid *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2007). Par la suite, grâce à la mise au point d'un protocole de purification, la composition de cet exopolyssacharide (EPS) a été déterminée (Godefroid *et al.*, 2010). L'analyse en HPLC a montrée que l'EPS purifié contenait des résidus mannose:glucose:glucosamine:galactose dans les proportions 89:10:1:trace. Au vu de sa composition, l'EPS a été qualifié de mannan. En outre, la prédominance de mannose et de glucose justifie le marquage observé avec la ConA-FITC (Godefroid *et al.*, 2010).

1.2. Recherche infructueuse de gènes de biosynthèse d'un EPS

Par ailleurs, une recherche visant à identifier les gènes codant les enzymes responsables de la biosynthèse de cet EPS a été menée chez *B. melitensis* sans réel succès (voir **Annexe**).

Cette recherche se basait notamment sur le postulat que la formation d'agrégats bactériens était intimement liée à la production d'EPS. La stratégie adoptée visait la construction systématique de mutants de délétion pour des gènes homologues aux gènes de biosynthèse de l'EPSI chez *S. meliloti,* une α-protéobactérie modèle. Ces mutants construits dans un *background* surexprimant l'AHL-acylase étaient ensuite mis en culture afin d'observer un éventuel changement du phénotype d'agrégation. Même en allant jusqu'à la purification et l'analyse de la composition de l'EPS produit par les différents mutants (**voir**

Annexe), cette tentative est restée infructueuse (Godefroid, 2010). En effet, aucune différence dans la composition de l'EPS des différents mutants n'a été détectée (Godefroid, 2010).

1.3. Formation d'agrégats chez les souches *B. melitensis* et *B. abortus* WT, un nouveau cadre de recherche

Néanmoins, la formation d'agrégats n'avait jamais été rapportée dans une souche sauvage de *Brucella* spp. Plus tard, au cours de sa thèse, consacrée à l'étude du système à deux composants *prlR/S* (dont nous reparlerons au chapitre II), Rosse-Mary Yañez Villanueva a constaté un comportement agrégatif de souches sauvages de *Brucella* spp. dans des conditions particulières. Ainsi, lorsque la souche *B. melitensis* est cultivée pendant 72 heures dans un milieu 2YT contenant 400 mM NaCl[15], elle forme des agrégats similaires à ceux décrits précédemment. Ces agrégats sont produits à la fois par la souche *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308 et présentent également le marquage caractéristique à la ConA **(figure 1)** (Yanez-Villanueva, 2009).

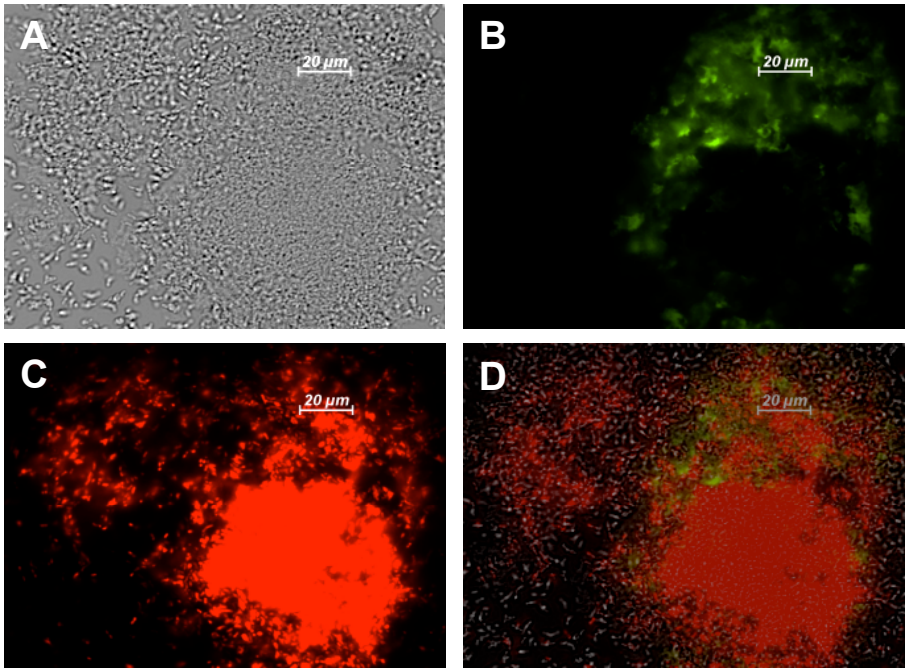


Figure 1 : Phénotype d'agrégation de la souche *B. melitensis* après 72h de culture en 2YT 400 mM NaCl. Observations microscopiques en DIC et épifluorescence des agrégats marqués à la concanavaline A et iodure de propidium sur agarose pad. (A) DIC (B) ConA-FITC (C) Iodure de propidium (D) Superposition.

Cette observation nous a donné l'opportunité d'étudier le comportement agrégatif dans un contexte plus physiologique afin d'essayer de comprendre en quoi il pouvait être utile à *Brucella* spp. Plus précisément, cette donnée permettait de nous pencher sur les conditions pouvant induire la formation d'agrégats chez une souche WT et les acteurs impliqués dans cette réponse (sur lesquels nous reviendrons au chapitre II et III).

[15] Le phénotype apparaît dès 48 heures mais s'intensifie à des temps plus tardifs.

2. RÉSULTATS

2.1. Etude de la composition de l'EPS produit par la souche WT en condition hypersaline

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la composition relative de l'EPS produit par les souches *B. melitensis* ou *B. abortus* en condition hypersaline était identique à celle de l'EPS produit par le mutant surexprimant l'AHL-acylase. Pour répondre à cette question, nous avons appliqué le protocole de purification et d'analyse par HPLC sur des cultures de souches WT en milieu hypersalin. Ces analyses ont mis en évidence une composition similaire quelle que soit la souche mais ne seront pas présentées[16]. En effet, des résultats obtenus plus tardivement ont fortement remis en cause la production même d'un EPS par *Brucella* spp. et de façon certaine sa composition. Le raisonnement suivi pour arriver à cette conclusion est détaillé dans la suite de ce point.

2.2. Remise en cause de la production d'EPS par *Brucella* spp.

2.2.1. Mise au point d'un test de dosage de l'EPS

Dans le cadre de la recherche des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'EPS (**cfr. Annexe**), un test de dosage du polysaccharide a été mis au point afin de pouvoir déceler une différence quantitative de la production d'EPS. Ce test est basé sur la capacité d'hémagglutination de la ConA (tétravalente) soit la capacité de cette lectine à engendrer l'agglutination de globules rouges (Sumner & Howell, 1936). Par ailleurs, la ConA reconnaît également l'EPS présent au sein des agrégats bactériens de *Brucella* spp (Godefroid *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2007; Yanez-Villanueva, 2009). Tirant profit de ces deux propriétés, nous avons mis au point un test d'inhibition de l'hémagglutination dont le principe est illustré dans la **figure 2**.

[16] Les chromatogrammes sont comparables à ceux présentés à la figure 6.

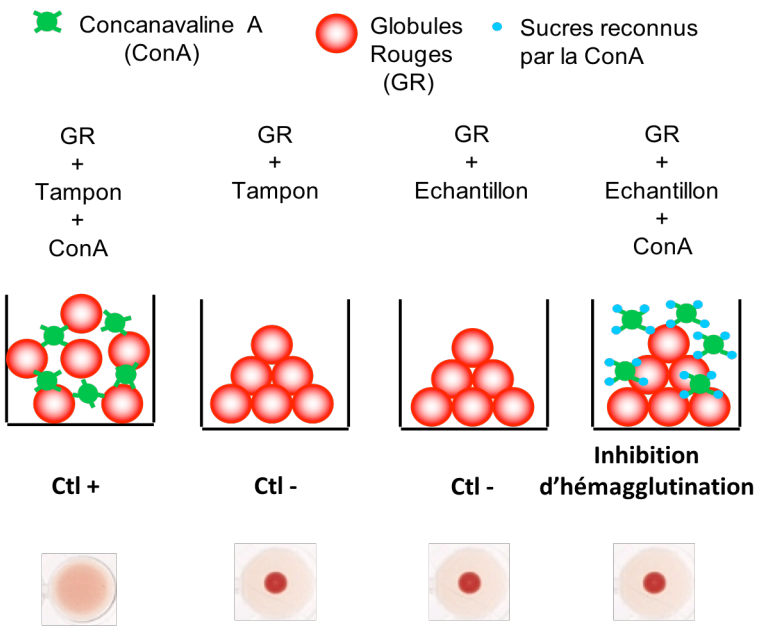


Figure 2 : Principe du test d'inhibition d'hémagglutination. En l'absence de ConA, les globules rouges (GR) (en rouge) sédimentent dans le fond du puits et se déposent en bouton. Il y a formation d'un agglutinat lorsque la ConA (en vert) et les GR sont mis en présence en concentrations adéquates. En présence de sucres (en bleu) contenus dans l'échantillon et reconnus par la ConA, une compétition pour les sites de liaisons de la ConA se met en place entre les GR et ces sucres. Au-delà d'une concentration critique en sucres, les GR sédimentent en bouton dans le fond du puits. Il y a donc inhibition de l'hémagglutination. Les photos sous le schéma représentent une vue du dessous des puits d'une plaque à 96 puits.

Dans notre cas, nous avons testé l'inhibition d'hémagglutination en présence de surnageant de culture contenant un éventuel EPS. La semi-quantification est rendue possible en réalisant des dilutions sériées (de deux en deux) de ces échantillons, toutes choses égales par ailleurs.

Afin d'assurer que l'hémagglutination observée n'était pas due à la présence de l'échantillon ou du tampon de dilution (NaCl 0,9%), deux contrôles négatifs sont réalisés : l'un contenant uniquement les globules rouges et l'échantillon et l'autre contenant les globules rouges et le tampon de dilution utilisé. Dans les deux cas, nous avons montré la sédimentation en bouton des globules rouges.

2.2.2. Inhibition d'hémagglutination en présence d'EPS purifié de *Brucella* spp.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'EPS purifié provenant du mutant QS et des souches *B. melitensis* et *B. abortus* WT en condition hypersaline était capable d'inhiber l'hémagglutination. En outre, un mannan commercial (issu de la levure *Saccharomyces cerevisiae*) a également été testé. L'inhibition d'hémagglutination a été observée quel que soit le polysaccharide testé **(figure 3)**.

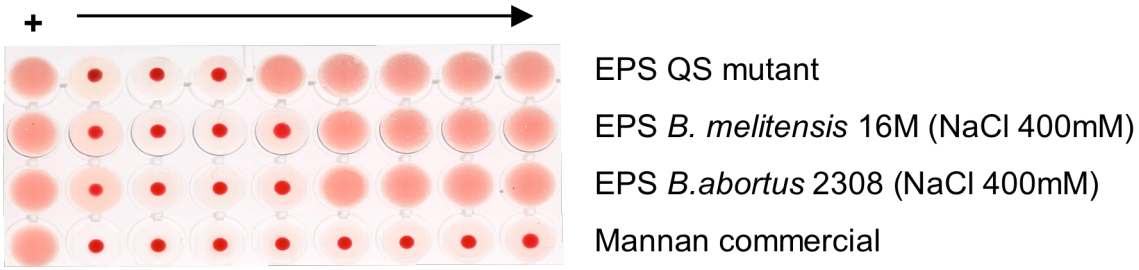


Figure 3. Inhibition de l'hémagglutination par l'EPS purifié de *Brucella spp*. L'EPS est purifié à partir des cultures de *B. melitensis* surexprimant l'AHL acylase (QS mutant) et des souches *B. melitensis* 16M et *B. abortus 2308* en milieu hypersalin. Le mannan commercial issu de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisé comme contrôle. Les premiers puits (contrôle +) montrent le dépôt de l'agglutinat dans le fond du puits contenant uniquement les globules rouges, la ConA et le tampon de dilution. La flèche indique le début des puits « tests » contenant les globules rouges, la ConA et l'échantillon. Ce dernier est dilué de 2 en 2 (de gauche à droite). L'image représente une vue du dessous des puits.

2.2.3. Inhibition d'hémagglutination en présence de surnageant de culture de *Brucella* spp. en milieu défini

Par la suite, le test a été réalisé avec le 2YT utilisé classiquement comme milieu de culture de *Brucella* spp. Les résultats obtenus ont montré que ce milieu contient des sucres reconnus par la ConA. Dès lors, le 2YT n'a plus été utilisé pour faire ce test **(figure 4A)**. Afin de nous focaliser uniquement sur des sucres reconnus par la ConA qui proviendraient de la bactérie et non plus du milieu de culture, nous avons donc cultivé les bactéries *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308 dans un milieu défini pendant 72h. Le choix du milieu s'est porté sur le RPMI1640 (sans glucose) contenant du xylose (2g/l) (RPMI-Glu+Xyl) comme source de carbone. Ce milieu avait été utilisé précédemment pour la purification de l'EPS. Pour générer un stress hypersalin, 400 mM NaCl ont été ajoutés. Après passage sur un filtre 0,22µm, les surnageants de culture ont été récupérés et concentrés 10 fois avant d'être testés. Le milieu de culture utilisé (avec ou sans NaCl) a également été concentré et testé de façon à vérifier l'absence de sucres reconnus par la ConA dans ce milieu. La **figure 4B** illustre que le milieu de culture RPMI-Glu+Xyl n'a pas permis d'inhiber l'hémagglutination qu'il contienne ou non du NaCl. A l'opposé, des sucres reconnus par la ConA ont été détectés dans les surnageants de culture de *Brucella* spp.

Cependant, de façon surprenante, alors que des agrégats bactériens macroscopiques étaient présents seulement dans les cultures contenant 400 mM de NaCl, aucune différence quantitative entre les échantillons issus des cultures en milieu hypersalin ou non n'a pu être mise en évidence lors du test. En effet, pour les surnageants de culture, l'inhibition d'hémagglutination s'arrête à la même dilution quelle que soit la souche et ce, qu'elle soit cultivée dans un milieu supplémenté ou non en NaCl **(figure 4)**.

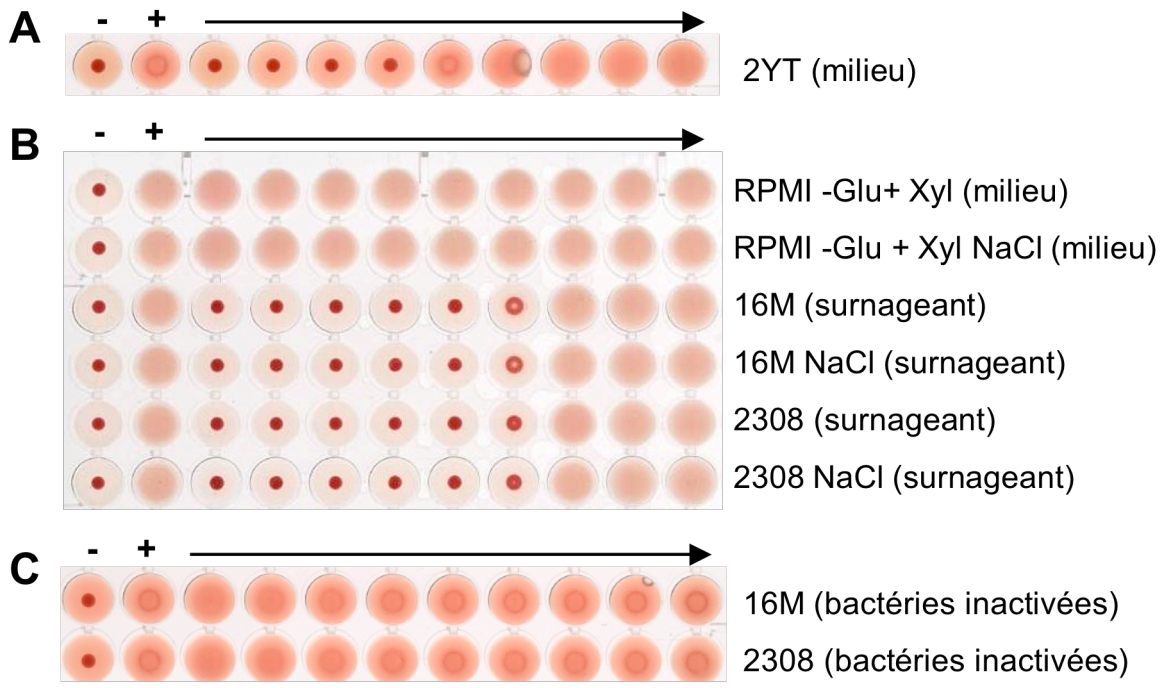


Figure 4 : (A) Inhibition de l'hémagglutination par le milieu 2YT. (B) Inhibition de l'hémagglutination par les surnageants de culture des souches *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308 en RPMI-Glu+Xyl supplémenté ou non avec 400 mM NaCl. (C) Hémagglutination en présence de *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308 cultivées dans un milieu hypersalin et inactivées à la chaleur. Les puits (-) montrent le dépôt en bouton des globules rouges après sédimentation en absence de ConA. Les puits (+) montrent le dépôt de l'agglutinat dans le fond du puits contenant uniquement les globules rouges, la ConA et le tampon de dilution. La flèche indique le début des puits « tests » contenant les globules rouges, la ConA et l'échantillon. Ce dernier est dilué de 2 en 2 (de gauche à droite). Des contrôles sur les milieux de culture 2YT (inhibition de l'hémagglutination) et RPMI-Glu+Xyl avec ou sans NaCl (pas d'inhibition de l'hémagglutination) sont réalisés. L'image représente une vue du dessous des puits. Glu : glucose ; Xyl : xylose ; 16M : *B. melitensis* 16M ; 2308 : *B. abortus* 2308.

2.2.4. Absence d'inhibition d'hémagglutination par les bactéries

Suite à ce résultat, nous avons émis l'hypothèse que l'EPS pouvait d'une certaine façon rester accroché en surface de la bactérie. Nous avons donc procédé à un test utilisant cette fois des *Brucella spp.* cultivées en milieu RPMI1640 supplémenté en NaCl pendant 72h, lavées dans du PBS et inactivées à la chaleur. Cette fois, aucune inhibition de l'hémagglutination n'a pu être détectée **(figure 4C)**. Des résultats identiques ont été obtenus sur les bactéries vivantes (non montré) suggérant qu'aucun sucre reconnu par la ConA n'est présent en surface de la bactérie même lorsqu'elles forment des agrégats.

2.2.5. *Brucella* spp. n'est pas à l'origine de la présence de sucres détectés par la concanavaline A dans les surnageants de culture

Sachant que ni le milieu RPMI1640 utilisé, ni les bactéries ne sont capables d'inhiber l'hémagglutination et qu'aucune différence quantitative ne pouvait être mise en évidence dans les surnageants de cultures réalisées en présence ou non de NaCl, nous avons postulé que les sucres reconnus par la ConA présents dans les surnageants de culture proviendraient en réalité de la préculture en 2YT.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons donc recommencé le test mais cette fois en réalisant deux lavages successifs des bactéries *B. abortus* et *B. melitensis* entre la préculture et le passage en RPMI-Glu+Xyl avec ou sans NaCl. Les surnageants de culture non filtrés et concentrés 20 fois ont ensuite été utilisés pour le test. Lors de ce test, des agglutinats ont été observés dans tous les puits, ce qui indique que dans ces conditions, aucun sucre reconnu par la ConA n'est présent dans le surnageant **(figure 5)**. Par ailleurs, force est de constater que les bactéries lavées ont une croissance très faible en RPMI-Glu+Xyl 400 mM NaCl et qu'aucun agrégat n'est observé dans ces cultures inoculées à partir de bactéries lavées.

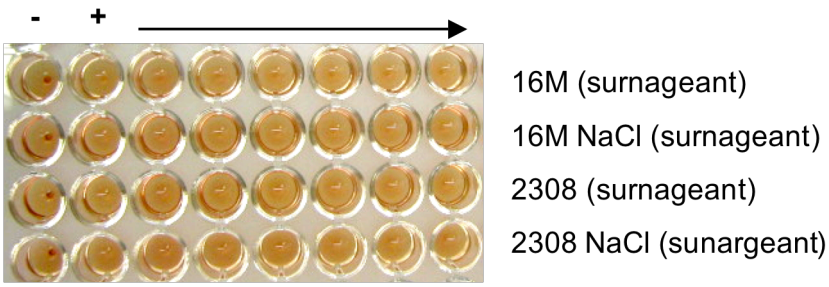


Figure 5. Test d'inhibition d'hémagglutination sur les surnageants de culture des souches *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 2308 en RPMI-Glu+Xyl supplémenté ou non avec 400 mM NaCl après lavage. Les puits (-) montrent le dépôt en bouton des globules rouges après sédimentation en absence de ConA. Les puits (+) montrent le dépôt de l'agglutinat dans le fond du puits contenant uniquement les globules rouges, la ConA et le tampon de dilution. La flèche indique le début des puits « tests » contenant les globules rouges, la ConA et l'échantillon. Ce dernier est dilué de 2 en 2 (de gauche à droite). L'image présente une vue du dessus des puits.

Toutes ces données mises ensemble nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le polysaccharide purifié et détecté lors du test d'hémagglutination provenait en réalité du milieu 2YT utilisé lors de la préculture.

2.2.6. Analyse en HPLC du polysaccharide contenu dans le 2YT

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience visant à purifier un/des éventuel(s) polysaccharide(s) présent(s) dans le 2YT et qui pourrai(en)t persister dans la culture en RPMI-Glu-Xyl. Le protocole de purification, d'hydrolyse et d'analyse a donc été appliqué de façon similaire soit sur le 2YT soit sur le surnageant d'une préculture en 2YT de *B. melitensis* 16M. Par ailleurs, une nouvelle purification de l'EPS de la souche *B. melitensis*

surexprimant l'AHL-acylase (mutant QS) réalisée suivant le protocole décrit précédemment a servi de contrôle. L'analyse de la composition saccharidique de l'EPS du mutant QS a révélé 4 pics correspondant au mannose, glucose, glucosamine et galactose **(figure 6A)**. Cependant, comme suspecté, ces 4 mêmes pics sont présents dans des proportions similaires dans l'extrait issu du 2YT **(figure 6B)** ou du surnageant de la préculture **(figure 6C)**.

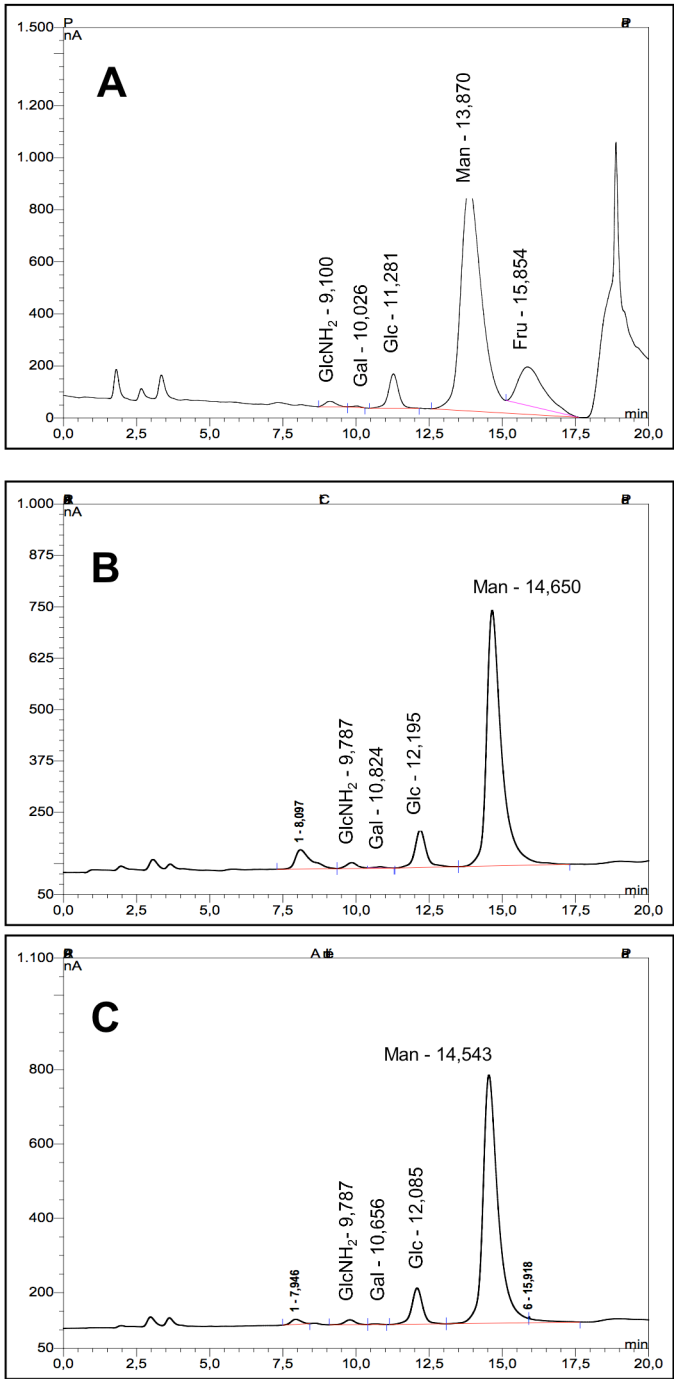


Figure 6. Chromatogrammes issus de l'analyse en HPLC des polysaccharides hydrolysés. Polysaccharides purifiés à partir de surnageants de culture de la souche *B. melitensis* surexprimant l'AHL-acylase (A), du 2YT (B) ou du surnageant issu d'une préculture de *B. melitensis* 16M en 2YT (C). Chaque pic associé au temps de rétention spécifique est associé à un monosaccharide identifié selon les standards. Le fructose est utilisé comme standard interne en A. $GlcNH_2$: glucosamine ; Gal: galactose ; Glc: glucose ; Man: mannose et Fru: fructose.

3. DISCUSSION

3.1. Un polysaccharide trop vite considéré comme un EPS

La formation d'agrégats bactériens a été rapportée pour la première fois chez des souches *B. melitensis* affectées dans le système QS (Godefroid *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2007). La composition de ces agrégats a été caractérisée chez une souche *B. melitensis* pMR*aiiD* surexprimant une AHL-acylase (Godefroid *et al.*, 2010). Bien que non associés à une surface, ces agrégats reflètent une association de bactéries adhérentes entre elles et contiennent des constituants typiques de biofilms (Godefroid *et al.*, 2010). Particulièrement, le marquage de ces agrégats par la lectine concanavaline A témoignait de la présence de sucres autour des bactéries. Une approche visant à déterminer quelle était la composition de ce sucre extracellulaire a été mise en place (Godefroid *et al.*, 2010). Ainsi, la purification et l'analyse de polysaccharides à partir de cultures de la souche agrégative ont été réalisées. Au vu de sa composition riche en mannose, ce polysaccharide a été qualifié de mannan (Godefroid *et al.*, 2010). En outre, la composition justifiait le marquage des agrégats par la concanvaline A, lectine spécifique des résidus α-mannopyrannosyl et/ou α-glucopyranosyl (Goldstein *et al.*, 1965). De par l'analogie avec la composition des biofilms, la présence extracellulaire d'un polysaccharide au sein de ces agrégats a été assimilée à la production d'un exopolysaccharide (EPS) par la bactérie (Godefroid *et al.*, 2010). Cependant, les conditions dans lesquelles cet EPS était produit par *Brucella* WT, son rôle et les acteurs impliqués dans sa biosynthèse restaient obscurs.

3.2. *Brucella* spp. produit-elle un EPS ?

La formation d'agrégats par les souches *B. melitensis* et *B. abortus* WT cultivées en 2YT 400 mM NaCl **(figure 1)** rapportée ultérieurement (Yanez-Villanueva, 2009) constituait donc un nouveau point de départ pour approfondir nos connaissances sur ce phénotype. Afin de faciliter la recherche des gènes de biosynthèse, nous avons développé un test d'inhibition d'hémagglutination par la concanavaline A (Sumner & Howell, 1936). Ce test constitue une méthode astucieuse pour détecter et quantifier l'abondance relative de sucres spécifiquement reconnus par la concanavaline A dans des surnageants de culture. Cependant, aucune différence quantitative n'a pu être mise en évidence entre les surnageants issus de culture supplémentée ou non avec 400 mM NaCl **(figure 4)**. Par ailleurs, le lavage intermédiaire des bactéries entre la préculture et la culture en milieu défini rendait indétectable la présence d'un EPS **(figure 5)**. Alertés par ces résultats, nous avons postulé que le polysaccharide détecté dans le surnageant de culture et purifié en vue des analyses en HPLC avait pour origine les résidus de 2YT de la préculture. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à une expérience contrôle en appliquant le protocole de purification sur le milieu 2YT et sur un surnageant de préculture de *B. melitensis* 16M.

Les données obtenues **(figure 6)** ont permis d'établir qu'un polysaccharide de composition similaire à celui identifié comme l'EPS produit par *B. melitensis* QS déficiente était présent initialement dans le milieu de préculture (2YT) **(figure 6)**. Ce polysaccharide ne

peut donc être le produit d'une voie de biosynthèse active de la bactérie. En effet, force est de constater que si un milieu défini a bien été utilisé en vue de réduire la présence de polysaccharides contaminants dans le milieu pour la purification et l'analyse de l'EPS (Godefroid *et al.*, 2010), la dilution des précultures réalisée sans lavage intermédiaire entraînait avec elle une quantité non négligeable de 2YT. Ce dernier contenant des extraits de levures dont la paroi est majoritairement composée de mannan (Phaff, 1963; Tkacz *et al.*, 1971).

L'ensemble des données nous a donc à terme amené à remettre en cause la présence d'un EPS dans les agrégats bactériens formés par *Brucella* spp. En absence d'autres indications, ces résultats remettent également en cause la production même d'un EPS par *Brucella* spp. A l'heure d'aujourd'hui, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que *Brucella* spp. produit un EPS. Néanmoins, la production d'un EPS par *Brucella* spp. reste possible au vu de la présence dans son génome de nombreux gènes codant des enzymes de biosynthèse d'un éventuel EPS (**voir Annexe**).

3.3. Le phénotype d'agrégation, avec ou sans EPS

Enfin, si l'origine du polysaccharide présent dans les agrégats est remise en cause, il n'en reste pas moins que les agrégats bactériens sont présents. Peu importe la souche considérée, un marquage par la concanavaline A est toujours associé à la formation de ces agrégats. On est donc en droit de se demander ce qui pousse les bactéries à former des agrégats. Et pourquoi observe-t-on un marquage avec la ConA autour des bactéries agrégées ?

Bien qu'elle reste possible, la production d 'un EPS par *Brucella* spp. ne pourrait être invoquée pour expliquer le marquage à la ConA des agrégats en culture que sous certaines conditions requises conjointement : (1) l'EPS doit être reconnu pas la ConA, (2) sa production dépend de la présence de 2YT dans le milieu de culture, (3) le protocole de purification mis au point est inadapté à sa purification et (4) sa production doit rester constante indépendamment de la salinité du milieu.

Enfin, les bactéries pourraient produire un EPS à la fois non détectable par la concanavaline A et non purifiable par le protocole mis au point. Dans ce cas, cet EPS ne pourrait être responsable du phénotype d'agrégation que si sa production est dépendante de la présence de 2YT. Parallèlement à la production de cet EPS, le marquage à la concanavaline A des agrégats devrait s'expliquer par un polysaccharide tel que le mannan du 2YT adhérant aux bactéries.

Une hypothèse alternative pour expliquer le marquage des agrégats par la ConA serait l'agglutination du mannan issu de l'extrait de levure présent dans le 2YT autour des bactéries. Ce phénomène pourrait prendre source dans l'expression ou l'exposition de lectines à la surface de la bactérie. Une protéine de 14 kDa a été décrite chez *B. abortus* comme ayant une affinité pour le mannose et une propriété d'hémagglutination (Vemulapalli *et al.*, 2006). Exposée en surface de la bactérie, cette protéine pourrait attirer à elle des polysaccharides présents dans le milieu extracellulaire.

Dans ce cadre, on peut émettre l'hypothèse que l'agrégation de *Brucella* spp. ne dépend en rien de la production d'un EPS. La formation d'agrégats bactériens pourrait résulter de modifications des propriétés pariétales des bactéries en réponse au stress hypersalin ou à la déficience du système QS. Allant dans ce sens, le mutant *vjbR* présente de drastiques modifications de surface (absence de flagelle, absence du système de sécrétion de type IV, changement d'expression de protéines de membrane externe (OMP)) (Uzureau *et al.*, 2007). De même, la souche surexprimant l'AHL-acylase montre un changement d'expression des OMPs (Godefroid *et al.*, 2010). Comme exposé dans l'Annexe, des souches de *B. melitensis* rugueuses (absence de la chaîne O du LPS) présentent aussi la capacité de former des agrégats en culture liquide. Ces souches rugueuses présentent également une profonde altération de leur membrane (hydrophobicité, exposition d'OMP) en raison de l'absence de la chaîne O (Fernandez-Prada *et al.*, 2001; González *et al.*, 2008; Kreutzer & Robertson, 1979).

CHAPITRE II : LE SYSTEME A DEUX COMPOSANTS PRLS/PRLR REGULE LA PRODUCTION D'AGREGATS CHEZ *BRUCELLA* SPP.

Cette partie du travail a été acceptée pour publication dans le journal « Microbiology ».

Contributions des auteurs : A. Mirabella a écrit le manuscrit et réalisé toutes les expériences exceptées celles citées ci-après. La construction des mutants, l'observation des agrégats au microscope, la purification de la protéine PrlR, la production du sérum et les infections ont été réalisées par R-M. Yañez Villanueva. Les tests d'agrégation sur les différentes espèces de *Brucella* spp. ont été réalisés en partenariat avec l'INRA (Tours, France) par M. Zygmunt. Ce travail a été supervisé par J.J. Letesson et X. De Bolle.

1. PAPER : THE TWO COMPONENT SYSTEM PRLS/PRLR OF *BRUCELLA MELITENSIS* IS REQUIRED FOR PERSISTENCE IN MICE AND APPEARS TO RESPOND TO IONIC STRENGTH

Title:

The two component system PrlS/PrlR of *Brucella melitensis* is required for persistence in mice and appears to respond to ionic strength

Authors:

Aurélie Mirabella[1], Rosse-Mary Yañez Villanueva[1&], Rose-May Delrue[1§], Sophie Uzureau[1£], Michel S. Zygmunt[23], Axel Cloeckaert[23], Xavier De Bolle[1], Jean-Jacques Letesson[1*]

Affiliations and addresses:

[1]Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes (URBM), NARILIS, University of Namur (FUNDP), 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

[&] Present address: UMSS Instituto de Investigaciones Biomédicas et Interacción Social de la Facultad de Medicina (Biología Molecular) - Universidad Mayor de San Simon. Av. Aniceto Arce N° 371 Cochabamba-Bolivia

[§] Present address: BioWin, Point Centre, Avenue Georges Lemaître, 19 6041 Gosselies, Belgium

[£] Present address: Laboratoire de Parasitologie Moléculaire,ULB-IBMM, rue des Professeurs Jeener et Brachet 12, 6041 Charleroi – Gosselies, Belgium

[2] INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

[3] Université François Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France

[*]**Corresponding author:**

URBM – FUNDP
61 rue de Bruxelles
5000 Namur
Belgium
Phone: +32 81 72 44 20
Fax: +32 81 72 42 97
E-mail: jean-jacques.letesson@fundp.ac.be

Running title: PrlS/R a crucial two component system in *B. melitensis*

Summary

Bacterial adaptation to environmental conditions is essential to ensure a maximal fitness in the face of several stresses. In this context, two-component systems (TCSs) represent a predominant signal transduction mechanism, allowing an appropriate response to be mounted when a stimulus is sensed. As facultative intracellular pathogens, *Brucella* spp. face various environmental conditions and an adequate response is required for a successful infection process. Recently, bioinformatic analysis of *Brucella* genomes predicted a set of 15 bona fide TCS pairs, among which some have been previously investigated. In this report, we characterized a new TCS locus called *prlS/R* for probable proline sensor/regulator. It encodes a hybrid histidine kinase (PrlS) with a unusual Na^+/solute symporter N-terminal domain and a transcriptional regulator (belonging to the LuxR family) (PrlR). *In vitro*, *Brucella* spp. with a functional PrlR/S system form bacterial aggregates, which seems to be an adaptive response to a hypersaline environment, while a *prlS/R* mutant does not. We identified the ionic strength as a possible signal sensed by this TCS. Finally, this work correlates the absence of functional PrlR/S system with the lack of hypersaline-induced aggregation in particular marine *Brucella* spp.

Introduction

Brucella spp. are Gram negative facultative intracellular pathogens (Letesson *et al.*, 2002; Moreno & Moriyon, 2002) that cause chronic infections in a variety of mammalian hosts. The key feature of its infectious cycle is the capacity to survive and multiply intracellularly in both phagocytic and non-phagocytic cells. This ability relies mostly on the subversion of the vacuolar traffic of the eukaryotic infected host cells (Gorvel & Moreno, 2002) and on the modulation of the host immune response. During the infection of the host and its cells, *Brucella* has to adapt to an array of environmental conditions, necessitating a timely and spatially coordinated expression of virulence genes (Letesson & De Bolle, 2004). In bacteria, two-component systems (TCSs) are the predominant signal transduction mechanisms that allow the cells to sense their environment and to mount an appropriate response. In a typical TCS, a sensor histidine kinase (HK), in response to an internal or external stimulus, becomes autophosphorylated on a conserved histidine residue, and the phosphate is then transferred to a conserved aspartate residue in a cognate response regulator (RR) that mostly acts through regulation of gene expression (Parkinson, 1993).

Before reaching the final output regulator, the phosphate can go through additional partners following a His-Asp-His-Asp route in a more complex pathway called a phosphorelay (Laub *et al.*, 2007; Perraud *et al.*, 1999). Worthy of note is the emerging view of the bacterial TCS as a signalling unit on which auxiliary regulators or adaptors can act to integrate multiple signal and cellular pathways (for reviews, see (Buelow & Raivio, 2010; Mascher *et al.*, 2006; Mitrophanov & Groisman, 2008)).

Recent bioinformatics analysis of *Brucella* genomes has identified the available set of HKs and RRs with 15 predicted bona fide TCS pairs (Lavin *et al.*, 2010). Several of these systems have been characterized previously in some *Brucella* species: BvrSR (Sola-Landa *et al.*, 1998), FeuQP (Dorrell *et al.*, 1998b), NtrBC (Dorrell *et al.*, 1999), NtrXY (Carrica *et al.*,

2012; Foulongne *et al.*, 2000), the flagellar master regulator FtcR (Leonard *et al.*, 2007), the CtrA phosphorelay (Hallez *et al.*, 2007), the blue-light-activated LOV HKs (Swartz *et al.*, 2007), and CenR ((Zhang *et al.*, 2009). Some other TCSs have been identified by transpositional mutagenesis during global screening for virulence factors (Lestrate *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006) but left uncharacterized. This is the case for the *Brucella melitensis* transpositional mutant (G4) that we identified in a previous study (Lestrate *et al.*, 2000). Indeed, a mini-Tn5 was inserted between genes encoding a sensor (BMEI1606) and a regulator (BMEI1607) of a TCS pair that was later, based on homology, called PrlS and PrlR, for probable proline sensor and regulator (Lavin *et al.*, 2010; Letesson & De Bolle, 2004). Here we report the characterization of this TCS. Mutants in either *prlS* or *prlR* have no defect in cellular models of infection but are highly attenuated in mice at 4 weeks post-infection. We also describe the involvement of this TCS in the formation of bacterial aggregates in response to ionic strength and a possible signal sensed by this TCS. Finally, this work correlates the absence of functional PrlR/S system with the lack of hypersaline-induced aggregation in particular marine *Brucella* spp.

Methods

Strains, plasmids and culture conditions

All strains and plasmids used in this study are listed in **Table 1**. Following the classical method, *Brucella* strains were grown with shaking at 37°C in 2YT medium (10 g yeast extract l^{-1}, 16 g peptone l^{-1}, 5 g NaCl l^{-1}) containing appropriate antibiotics from an initial OD_{600} of 0.05. The *Escherichia coli* strains DH10B (Invitrogen) and S17-1 (Simon *et al.*, 1983) were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C with appropriate antibiotics. Chloramphenicol, nalidixic acid, and gentamicin were used at 20, 25 and 50 μg ml^{-1}, respectively.

An aggregative phenotype was observed only when the strains were grown in rich medium containing 400 mM NaCl (10 g yeast extract l^{-1}, 16 g peptone l^{-1}, 23.3 g NaCl l^{-1}) for 72 h in 10 ml cultures at 37°C with shaking in 50 ml high-clarity polypropylene conical centrifuge tubes (BD).

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Charasteristics	Source or reference
Strains		
***Brucella spp.* strains**		
B. melitensis 16M	WT, Nal^R, parental strain	A. Macmillan, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK
B. melitensis Δ*prlS*	Nal^R	This study
B. melitensis Δ*prlR*	Nal^R	This study
B. melitensis Δ*vjbR*	Δ*vjbR*::Kan^R,Nal^R (formely CD100)	(Delrue *et al.*, 2005)
B. abortus 2308	WT, Nal^R	(Sangari & Aguero, 1991)
B. suis 1330	Reference strain ATCC 23444, swine isolate	(Morgan & Corbel, 1976)
B. canis RM6/66	Reference strain ATCC23365, dog	(Carmichael & Bruner, 1968)
B. ovis 63/290	Reference strain ATCC25840, sheep	(Buddle, 1956)
B. neotamae 5K33	Reference strain NCTC 10084, desert woodrat	(Stoenner & Lackman, 1957)
B. microti CCM4915	Isolated in common vole, Czech Republic	(Scholz *et al.*, 2008b)
B. pinnipedialis B2/94	Reference strain NCTC 12890, common seal, Scotland	(Foster *et al.*, 2007)
B. ceti B1/94	Reference strain NCTC 12891, porpoise, Scotland	(Groussaud *et al.*, 2007)
B. ceti M13/05/01	Also named UK3/05, striped dolphin, Scotland	(Groussaud *et al.*, 2007)
B. ceti M644/93/1	Also named B14/94, common dolphin, Scotland	(Groussaud *et al.*, 2007)
E. coli		
DH10B	F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L *nup*G λ^- (Str^R)	Invitrogen
S17-1	*recA*, *thi*, *pro*, *hsdR*$^-$*M*$^+$RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir, allows plasmid mobilization	(Simon *et al.*, 1983)
BL21(DE3)	F^- *ompT gal* (*dcm*) (*lon*) *hsdS*$_B$ ($r_B^-m_B^-$; an *E.coli* B strain) with DE3, a λ prophage carring the T7 RNA polymerase	Novagen
Plasmids		
pBBR1MCS1	Broad-host-range cloning vector, high copy number, Cm^R	(Kovach *et al.*, 1994)
pGEM-T Easy	Amp^R	Promega
pET15b	Amp^R	Novagen
pET15bGW	Amp^R Cm^R Gateway-compatible pET15b (Novagen)	V. Van Mullem, unpublished
pDonR201	Kan^R, BP cloning vector	Invitrogen

Molecular techniques.

DNA manipulations were performed according to standards techniques (Ausubel, 1991). Restriction enzymes were purchased from Roche and primers were purchased from Eurogentec. Primers sequences are listed in **Table S1** available with the online version of this paper.

Construction of mutants

B. melitensis 16M knockout mutants Δ*prlS* and Δ*prlR* were both generated by allelic replacement using a two-step strategy. Briefly, upstream and downstream regions of about 500 bp flanking *prlS or prlR* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from *B. melitensis* genomic DNA using the following primers: (i) F1_D1606 and F2_D1606 (ii) R1_D1606 and R2_D1606; (i) F1_D1607 and F2_D1607 (ii) R1_D1607 and R2_D1607. For each construct, a second PCR was used to associate the two PCR products using the following primers pairs: (i) F1_D1606 and R2_D1606 (ii) F1_D1607 and R2_D1607. Finally, the Δ*prlS* and Δ*prlR* fragment were cloned into pGEM-T Easy (Promega) to generate pGEM-TΔ*prlS* or pGEM-TΔ*prlR* intermediates vectors. The Δ*prlS* and Δ*prlR* fragments excised by *NotI* restriction were subcloned into final vectors and used to construct *Brucella* mutants following the strategy previously described (Mignolet *et al.*, 2010). Gene replacement was confirmed by PCR. It should be noted that the *prlS* CDS (BMEI1606) in the *B. melitensis* 16M genome sequence (GenBank accession number AE008917) is predicted to encode a 1305 amino acids protein. However, when aligned to orthologous sequences it became obvious that the gene encoding *prlS* in *Brucella abortus* 2308 or *B. melitensis* Rev.1 encoded a shorter protein (composed of 1174 amino acids) with a predicted molecular mass of 128 kDa. This difference was assigned to a sequencing error in the GenBank *B. melitensis* 16M sequence which was confirmed by resequencing (results not shown).

Cellular infections

Evaluation of the intracellular survival of the *B. melitensis* wild-type (WT) and the Δ*prlS*, Δ*prlR* and Δ*vjbR* mutant strains in SV40 bovine macrophages and JAR713 trophoblasts was performed as previously described (Delrue *et al.*, 2001)**.** Briefly, the bacterial strains were grown overnight in 2YT medium and then inoculated at an m.o.i. of 300 to monolayers of cells in 24-well plates. After a 10 min centrifugation at 1000 r.p.m. at room temperature, the plates were placed in a 5% CO_2 atmosphere at 37 °C for 1 h. Afterwards, the cells were washed with PBS and incubated in the presence of medium containing gentamicin 50 μg ml^{-1} at 37 °C under 5 % CO_2 until the end of the infection (48 h later). Cells were then washed and lysed with 0.1 % Triton X100 in PBS for 10 min, and serial dilutions of lysates were plated on 2YT solid medium to enumerate viable bacteria able to develop colonies. We used the Δ*vjbR* strain as positive control for attenuation in cellular model of infection (Delrue *et al.*, 2005). Data are expressed as the log_{10} of the number of c.f.u. per well.

Mice infections

Virulence assays with BALB/c mice were performed as described previously (Fretin *et al.*, 2005). Briefly, 8-week-old female mice were inoculated intraperitoneally with 0.2 ml of a suspension containing 10^5 c.f.u. of the appropriate bacterial strain. At 5 days and 4 weeks post-inoculation, four mice from each group were sacrificed for spleen collection. Spleens were homogenized in 2 ml of PBS 0.1 % TritonX100 and serial dilutions of the homogenate were plated on 2YT solid medium to determine bacterial survival. Data are expressed as the log_{10} of the number of c.f.u. per spleen. The animal handling and procedures of this study were in accordance with the current European legislation (directive 86/609/EEC) and in agreement with the corresponding Belgian law 'Arrêté royal relatif à la protection des animaux d'expérience du 6 avril 2010 publié le 14 mai 2010'. The complete protocol was reviewed and approuved by the Animal Welfare Committee of the Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix (FUNDP, Belgium) (permit number 05-558).

Microscopy.

Strains previously grown for 72 h in 2YT containing 400 mM NaCl were placed on a microscope slide that was covered with a pad of 1 % agarose containing PBS (Jacobs *et al.*, 1999) with a sealed coverslip. These slides were placed on a microscope stage at room temperature. The samples were observed on a Nikon E1000 microscope through a X 100 differential interference contrast (DIC, Normarski) objective with a Hamamatsu Orca-ER LCD camera. Images acquisition and processing were performed with NIS element (Nikon) software.

Protein purification, generation of antibodies and immunoblot analysis

B. melitensis recombinant PrlR was overexpressed in *E. coli* as fusion proteins with an N-terminal tag comprising a hexahistidine peptide (Novagen). The overexpression vector pET15b*prlR* was constructed by the Gateway™ technique (Invitrogen) using a sequenced pDonR201-*prlR* from the ORFeome version 1.1 (Dricot *et al.*, 2004) as the entry vector. After

overexpression in *E. coli* BL21DE3, protein purification was performed on a nickel-loaded IMAC Sepharose High Performance Resin (GE Healthcare) in denaturating conditions with 6 M guanidium chloride. Protein refolding was performed using dialysis with 20 mM Tris/HCl and 500 mM NaCl (pH 8) at 4 °C.

Immunization was performed as described previously (Denoel *et al.*, 1997) with 50 µg of purified recombinant proteins to produce specific antibodies to PrlR. Immunoblot analysis was performed as described previously (Bellefontaine *et al.*, 2002). Immunodetection of the PrlR, FliC and FlgE proteins was performed using anti-PrlR (diluted 1:1000), anti-FliC (diluted 1:3000) and anti-FlgE (1:5000) rabbit polyclonal antibodies (Fretin *et al.*, 2005) respectively.

Omp89 detection with anti-Omp89 monoclonal mouse antibodies (A53/10B02/A01) (Cloeckaert *et al.*, 1990) was used as loading control. The secondary antibodies used were horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-rabbit (Amersham catalogue no. NA934, 1/5000 dilution) and HRP-conjugated goat anti-mouse antibodies (Amersham catalogue no. NA931, 1/10000 dilution). The ECL system was used to produce chemoluminescence before detection using film.

Dot blot analysis

Brucella strains were grown overnight in 2YT medium at 37 °C and cells were harvested in stationary phase. Crude extracts were prepared as described previously (Uzureau *et al.*, 2007) and serial twofold dilutions were applied to a nitrocellulose membrane (Amersham). Outer-membrane protein (Omp) immunodetection was performed using the following mAbs: anti-Omp10 (A68/07G11/C10), anti-Omp16 (A68/08C03/G03) and anti-Omp2b Mabs (A68/25G05/A05). HRP-conjugated goat anti-mouse antibodies (Amersham) were used at a 1 : 5000 dilution with the ECL system for development before visualization on film.

Results

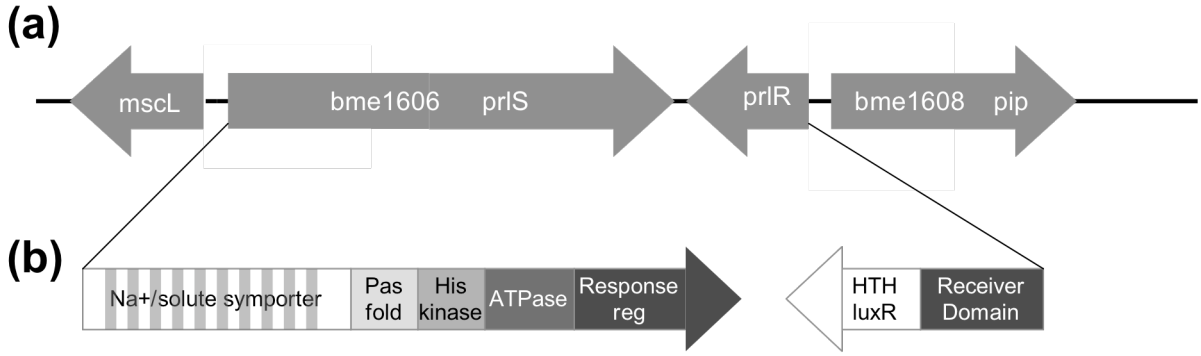
The genomic locus of prlS/R *genes is well conserved in α-proteobacteria*

The genes *prlS* and *prlR* are in opposite orientation and very well conserved in brucellae (Lavin *et al.*, 2010; Letesson & De Bolle, 2004). This predicted TCS pair is also well conserved in several other α-proteobacteria. In all these bacteria, a gene (*mscL*) encoding a large-conductance mechanosensitive channel is found upstream *prlS* **(Fig. 1a, c)**. In *Brucellaceae* only, a gene encoding a proline imidopeptidase is found upstream of *prlR* **(Fig. S1)**.

The *prlS* CDS (BMEI1606) in the *B. melitensis* 16M genome sequence (GenBank accession number AE008917) is a probable hybrid HK that, in addition to the classical domains found in HK (i.e. PAS fold, HisKA, ATPase) contains an N-terminal sensory domain with 12 transmembrane segments homologous to members of the Na^+/solute symporter (SSS) family (Jung, 2001) and a conserved RR domain at its C-terminal part **(Fig. 1b)**. Homologous proteins are found not only in α-proteobacteria but also in γ-proteobacteria [e.g. *Pseudomonas aeruginosa* (40 % identity) or *Vibrio cholerae* (39 % identity)]; in these two cases, the HK is not located close to a RR. The *prlS* gene has been described as a probable

pseudogene in *Brucella ovis* (strain ATCC 25840) and in *Brucella microti* (strain CCM4915) (Lavin et al., 2010).
The *prlR* gene (BMEI1607) encodes a 213 amino acids protein with a predicted molecular mass of 23 kDa. PrlR is a typical RR with an N-terminal domain bearing the conserved aspartate residue of the receptor domain (REC) and a C-terminal HTH domain of the LuxR-like (GerE) superfamily (Pfam no. PF00196) (Galperin, 2010).

None of the homologues of this highly conserved TCS has been characterized, and the function of the corresponding proteins is completely unknown as well as the signal that could be perceived by the HK. We described previously (Lestrate et al., 2000) that the G4 mutant bearing a mini-Tn5 inserted between *prlS* and *prlR*, is attenuated in mice. Therefore, we started to characterize this TCS and its putative function further.



(c)

	Hybrid histidine kinase		Response regulator	
Bacteria	Name	Identity (%)	Name	Identity (%)
Brucella suis 1330	sensor histidine kinase/response regulator	100	two component trancriptional regulator, LuxR	100
Mesorhizobium sp. BNC1	periplasmic sensor hybrid histidine kinase	60	two component transcrptional regulator, LuxR family	67
Rhizobium etli CFN 42	probable two-component sensor histidine/response regulator hybrid protein	52	probable two-component response regulator protein	65
Rhodopseudomonas palustric CGA009	sensor histidine kinase, possible sensor PrlS	47	two-component transcriptional regulator, LuxR family	57

Fig 1. The TCS PrlS/PrlR. **(a)** Genomic organization of the locus (*mscL*: large conductance mechanosensitive channel, *pip*: proline imidopeptidase). **(b)** Domain organization of the PrlS and PrlR proteins. **(c)** Conservation of this TCS in several α-proteobacteria.

Mutants in the prlS *or* prlR *genes are attenuated at 4 weeks post infection in mice*

Transpositional insertions may fail to fully eliminate target gene function (Kang *et al.*, 2004); therefore, we decided to start the characterization from newly constructed mutants. Two deletion mutants of the TCS genes, Δ*prlS* and Δ*prlR*, were constructed by allelic replacement

in the *B. melitensis* 16M strain (see Methods). The capacity of the two mutants, Δ*prlS* and Δ*prlR,* to multiply within cultured cells was analyzed. As shown in **Table 2**, neither mutant displayed a growth defect 48 h post-infection, either in bovine SV40 macrophage-like cells or in JAR713 trophoblastic cells. In contrast, the Δ*vjbR* strain, used as control for attenuation (Delrue *et al.*, 2005), showed an important growth defect in both cell lines **(Table 2)**. Taken together, these results demonstrated that this TCS is not essential for intracellular growth of the pathogen in the cell types tested.

To determine whether the PrlS/R TCS could be involved in adaptation of *B. melitensis* to the *in vivo* conditions, the ability of the mutants to infect BALB/c mice was assessed and compared to the *B. melitensis* 16M parental strain. The number of viable bacteria in the spleen was evaluated at different times post-infection. At 5 days post-infection, Δ*prlS* or Δ*prlR* replication in the spleen was indistinguishable from that of the WT strain **(Table 2)**. However, after 4 weeks, both mutants were markedly attenuated (with almost two logs difference from the control). These results indicated that the TCS PrlS/R is necessary for persistence in mice and is somehow involved in adaptation of *B*. *melitensis* to the *in vivo* environments.

Table 2. Attenuation of *prlS* and *prlR* mutants

	Attenuation in[a]			
			BALB/c mice	
Mutation	SV40 bovine macrophages	JAR713 trophoblasts	5 days p.i.	4 weeks p.i.
Δ*prlR*	-0,08 ± 0.14	0.11 ± 0.21	-0.13 ± 0.32	1.93 ± 0.46
Δ*prlS*	-0.01 ± 0.08	-0.23 ± 0.09	-0.21 ± 0.11	1.73 ± 0.79
Δ*vjbR*	2.5 ± 0.2	2.2 ± 0.3	ND[b]	ND

[a] Attenuation in cellular models (48 h post-infection) and in BALB/c mice (5 days and 4 weeks post-infection) is expressed as the difference of the log(c.f.u.) between the WT strain and the mutants ± SD, which was calculated from values obtained for each mutant in the different models of infection (n = 3 for the cellular models and n = 4 for the mouse model). Cellular infections were performed twice in triplicate, with a m.o.i. of 300 bacteria per cell. The Δ*vjbR* mutant was used as a positive control for attenuation in the cellular models. [b] ND, not determined; p.i., post-infection.

Mutant in either prlR or prlS have unaltered growth in 2YT culture

To rule out any possible effect of an *in vitro* growth defect on the above-reported *in vivo* attenuation, we examined the growth of the Δ*prlR,* Δ*prlS* and WT strains in rich 2YT broth using a Microbiology Reader Bioscreen. No significant growth impairment was discernible for the two mutated strains in this medium (growth rate and OD_{600} at the stationary phase were almost similar to the WT) **(Fig. 2a)**. This was indicative that neither PrlS nor PrlR was needed during growth under the tested conditions. To ascertain whether the PrlR protein was produced or not during the *in vitro* growth we performed a Western blot on bacterial extracts harvested along the growth curve in 2YT **(Fig 3a)**. As shown in Fig. 3(b), PrlR is present in quantity when *Brucella* is growing *in vitro.* PrlR was detected at a similar level from the lag phase to the stationary phase. The detection of flagellar proteins known to be only present in early exponential phase was used as a control for variably expressed proteins. As a laoding control, we used the detection of Omp89 (Leonard *et al.*, 2007).

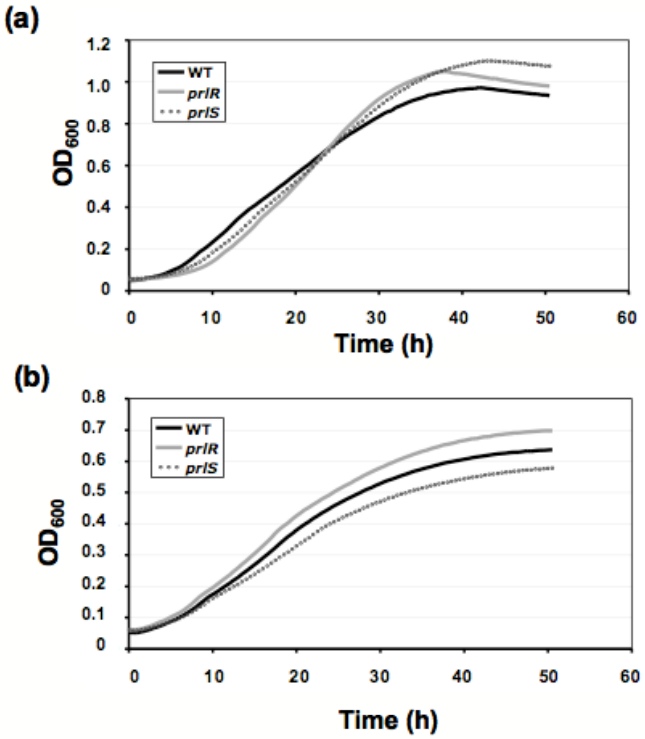


Fig. 2. Cultures of *B. melitensis* 16M WT and of the *prlS* and *prlR* mutants in 2YT (a) and 2YT 400 mM NaCl (b). Monitoring of OD_{600nm} in a Microbiology Reader Bioscreen of triplicate samples.

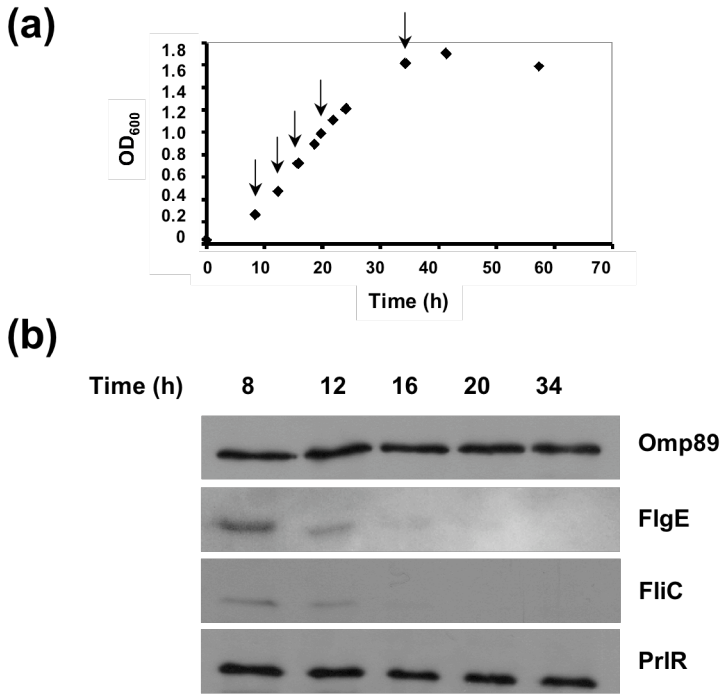
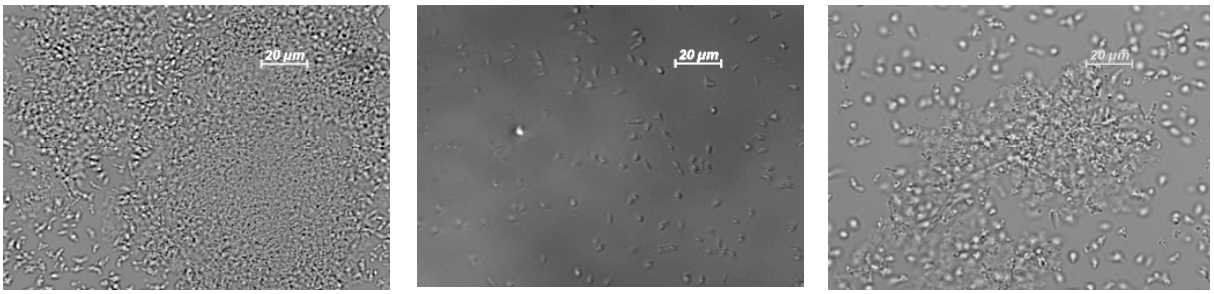


Fig 3. Constitutive expression of the PrlR protein in 2YT medium in *B. melitensis* 16M. (a) Growth of *B. melitensis* 16M in liquid 2YT broth. Arrows indicate samples harvesting for Western blotting. **(b)** Western blot of Omp89, FlgE, FliC and PrlR expression in *B. melitensis* WT. The strain was cultivated in 2YT broth and samples were harvested after 8, 12, 16, 20 and 34 h of culture. Total extracts were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed with anti-PrlR, anti-FliC and anti-FlgE rabbit sera. The monoclonal antibody against the Omp89 was used as loading control.

The WT B. melitensis *16M strain but not the* ΔprlS *or* ΔprlR *mutants aggregates in liquid culture containing 400 mM NaCl*

The conservation of the *mscL* gene (encoding a large conductance mechanosensitive channel), known to participate in the regulation of osmotic pressure within the cell (Moe *et al.*, 1998) upstream of the *prlS* homologue in several α-proteobacteria (i.e. *Sinorhizobium meliloti, Mesorhizobium loti, Rhizobium etli and Agrobacterium tumefaciens*), prompted us to test whether the mutants in the *prlS/R* genes have an altered behaviour in response to osmotic stress. The WT strain and the two mutants Δ*prlS* and Δ*prlR* were grown in liquid cultures in a rich medium (2YT) with various amounts of NaCl added (100, 200, 300 and 400 mM). All the strains were able to grow under these conditions up to 400 mM NaCl (in liquid medium but not on solid medium). No significant growth impairment was shown for the mutant strains as compared with the WT in 2YT 400 mM NaCl **(Fig. 2b)**. However in the presence of such concentration of NaCl all the strains appeared to slow down growth earlier than in regular 2YT medium, reaching a slightly lower OD_{600}.

With increasing duration of culture in the presence of 400 mM NaCl it became obvious that the WT strain formed bacterial aggregates, while the *prlR* mutant failed to do so **(Fig. 4)**. Similar results were obtained with the *prlS* mutant (not shown). The aggregative phenotype of both mutants was restored by supplying *in trans* a WT copy of the *prlS* or *prlR* gene to generate the respective complemented strains (**Fig. 4** and data not shown).



B. melitensis* WT** ***B. melitensis* Δ*prlR ***B. melitensis* Δ*prlR* pMR10*prlR***

Fig. 4. Aggregative phenotype after 72 h of growth in 2YT rich medium supplemented with 400 mM NaCl. Microscopic observation (DIC) of the strains on an agarose pad. Aggregates are present in the WT but absent in the Δ*prlR* mutant. The aggregative phenotype was restored by supplying *prlR in trans* on plasmid pMR10.

Aggregation of the WT B. melitensis *16M strain is induced by ionic stress but not osmotic stress*

To determine whether the aggregative phenotype observed for the WT *B. melitensis* 16M strain in the presence of NaCl was a response to an osmotic stress or to a salt stress we cultivated the strain for 72 h in liquid 2YT containing either 400 mM NaCl or other molecules [namely KCl (314.45 mM) or sucrose (628.9 mM)] to reach an equivalent osmolality (around 800 mosmol kg^{-1}), with or without an ionic stress.

As illustrated in **Table 3**, both KCl and NaCl were able to induce clumping of the WT strain similarly when added to 2YT medium to reach around 800 mosmol kg^{-1}. In contrast, sucrose was unable to induce aggregates in iso-osmolal conditions. This indicates that the clumping phenotype is not an adaptation to hyperosmotic non-ionic stress but probably a saline stress response.

In order to further test this hypothesis, we used $MgCl_2$ (or $CaCl_2$) to supplement the 2YT. These multivalent salts allowed us to keep the same ionic strength (0.4 M) but almost halve the osmolality (485 mosmol kg^{-1}) as compared with the 2YT medium containing 400 mM NaCl. In these conditions aggregates were clearly visible after 72 h of culture (**Table 3**). In contrast, when NaCl was added to reach 485 mosmol kg^{-1} (corresponding to only 0.24 M ionic strength), no clumping arose.

Table 3. Effect of osmolality and ionic strength on the clumping phenotype of *B. melitensis* 16M

2YT complemented with	Osmolality* (mosmol kg^{-1})	Ionic strength (mole l^{-1})	Aggregates observed
-	85.5		-
NaCl**	800	0.40	+
KCl**	800	0.40	+
Saccharose	800	0	-
$MgCl_2$***	485	0.40	+
NaCl	485	0.24	-

*Taking only account of NaCl and added molecules
**The same results were obtained with LiCl, NaBr and KBr
***The same results were obtained with $CaCl_2$
+ , macroscopically discernible aggregates; **-**, no macroscopically discernible aggregates.

Naturally occurring **prlS** *or* **prlR** *mutant strains display the same lack of aggregative phenotype in the presence of 400 mM NaCl*

Since an increasing number of sequenced *Brucella* genomes are available [Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/brucella_group/MultiHome.html)], we were able to determine that the TCS PrlS/R is well conserved in most species of the genus *Brucella,* even if there is some amino acid sequence length heterogeneity. Indeed, *prlS* was previously identified as a pseudogene in both *B. ovis* and *B. microti* (Lavin *et al.*, 2010). Moreover, the predicted PrlR protein is 56 amino acids shorter in two *Brucella ceti* strains (M13/05/1 and M644/93/1), while the PrlS protein is 400-500 amino acids shorter in *Brucella neotomae* 5K33 and two *B. ceti* strains (M490/95/1 and B1/94). This offered us a unique opportunity to test whether these natural mutants in either *prlS* or *prlR* display the same phenotype as the mutants that we constructed in *B. melitensis*. PrlR was detected by Western blotting in all the tested strains except the two *B. ceti* strains, which had a truncated version (M13/05/1 and M644/93/1) (not shown). As expected according to the PrlS/PrlR-dependent clumping, these two strains also failed to aggregate in the presence of 400 mM NaCl. Moreover, all the tested strains with a normal-sized PrlS aggregated in the presence of 400 mM NaCl, but the two tested strains with an altered version of PrlS (*B. microti* CCM 4915 and *B. ceti* B1/94) failed to do so (see **Table 4**).

Table 4. Comparison of the amino acid sequence length of PrlS/R from various *Brucella* species and correlation with the detection of PrlR in Western blots (WB) and the aggregative phenotype in the presence of 400 mM NaCl.

Species	Strain	Length of the PrlR protein (aa)	Length of the PrlS protein (aa)	Aggregation in 2YT 400 mM NaCl	PrlR detected by WB
B. melitensis	16M	213	1174*	+	+
B. abortus	2308	213	1174	+	+
B. suis	1330	213	1174	+	+
B. canis	RM6/66	213	1174	#	+
B. ovis	63/290	213	Pseudogene (ψ)	#	+
B. neotomae	5K33	213	760	ND	+
B. microti	CCM 4915	213	Pseudogene (ψ)	-	+
B. pinnipedialis	B2/94	213	1174	+	+
B. ceti	B1/94	213	641	-	+
B. ceti	M13/05/01	157	1174	-	-
B. ceti	M644/93/1	157	1174	-	-

* Based on the *prl*S sequence of the Rev.1 strain. There is a sequencing error in the Genbank *B. melitensis* 16M sequence (Gene ID: 1197317). This was confirmed by resequencing (results not shown).
# rough strains are self aggregative even in the absence of NaCl
ND, not determined.

Discussion

In this paper we characterized a novel TCS of *Brucella* called PrlS/PrlR that appears to control stress adaptation but also the persistence in the host. *B. melitensis* deletion mutants in either *prlS* or *prlR* share the same phenotype. This reinforces the previous idea (Lavin *et al.*, 2010; Letesson & De Bolle, 2004) that PlrS and PrlR are part of a same bona fide TCS.

PrlS has an N-terminal input domain with 12 predicted transmembrane helices. This N-terminal sensor domain belongs to the SSS family (Jung, 2001), and is homologous but distantly related to the transporter protein PutP of *E. coli*. While the biochemistry and topology of the PutP-like carrier proteins have been extensively studied (Jung, 1998; Pirch *et al.*, 2003; Wegener *et al.*, 2000) there is almost no data on the corresponding domain when it is part of a sensor kinase. It is clear that these domains function as sensors of membrane-associated stimuli, but whether the stimulus is related to ion or electrochemical gradients and transport processes, to the mechanical properties of the cell envelope (such as turgor or mechanical stress) or both remains to be determined (Mascher *et al.*, 2006).

Up to now, no functional data were available for the TCS orthologous to PrlS/PrlR in α-proteobacteria. One clue was the presence of a gene encoding a large conductance mechanosensitive channel (*mscL*) upstream *prlS* in the highly conserved genomic environment around this TCS in α-proteobacteria. These channels are widely distributed (Kung *et al.*, 2010) and play a critical role in reacting to physical stresses at the cell membrane by the release of cytoplasmic osmolytes (Levina *et al.*, 1999). These stresses could be changes in turgor pressure caused by osmotic perturbation or even when remodelling cell wall upon entry into stationary phase or during growth and division (Kung *et al.*, 2010). This genomic conservation, as well as the fact that several *prlS* homologues are annotated as “proline sensor” and that proline is a well-known osmoprotectant (Kunte *et al.*, 1999; Racher *et al.*, 1999), are preliminary indications that the TCS PrlS/PrlR could play a role in the *Brucella* response to change in osmotic pressure or related membrane stresses. In fact, preliminary studies from our laboratory using microarray technology suggest that PrlR regulates, directly or indirectly, genes involved in cell wall (peptidoglycan biosynthesis and remodelling) and envelope biogenesis [Omps, lipoproteins, LPS, extracellular polysaccharide (EPS)], as well as genes involved in metabolism and stress response mechanisms. (R.M. Yañez Villanueva, unpublished data). Some Omps also have their patterns of expression modified in the Δ*prlR* background and this effect is complemented (**see Fig. S2**).

Bacteria adapt to osmotic or related stress through multiple mechanisms leading to the accumulation of K^+ and neosynthesis of osmoprotectants (Kramer, 2010; Wood, 2006; Wood, 2007). Osmoadaptation also induces also remodelling of the cell envelope and cell surface structures i.e. membrane or periplasmic protein composition, lipid composition, periplasmic glucan level and EPS synthesis (Miller & Wood, 1996). Ultimately some of these modifications could lead to biofilm (or aggregate) formation (Karatan & Watnick, 2009).

In the presence of up to 400 mM of NaCl (800 mosmol Kg^{-1}) neither the *prlS* nor the *prlR* mutants showed a significant growth defect, although both mutants exhibited a lack of aggregation as compared to the WT strain, and this phenotype could be complemented. Moreover, natural *Brucella* strains with truncation or pseudogenization in orthologues of

either *prlS* or *prlR* behave similarly in the presence of 400 mM of NaCl. Importantly, all the *B. ceti* strains analyzed have a defective PrlS/PrlR system. In contrast to a non-ionic hyperosmotic stress, a saline stress involves an ionic component in addition to the osmotic one. The aggregative phenotype was not a response to osmotic stress alone because it was not observed in the presence of sucrose at the same osmolality (800 mosmol Kg^{-1}) and appears to be linked to the ionic strength of the medium, which reduces the water availability.

This behaviour related to "biofilm" formation could promote bacterial survival when faced to desiccation by maintaining a hydrated microenvironment, even if inherent resistance linked to biofilm cannot be ruled out (Iibuchi *et al.*, 2010). Importantly, *Brucella* spp. cannot tolerate this osmolality on solid media, probably because water availability is reduced even further on solid medium. Moreover, the lack of aggregation, if generalized to all *B. ceti* strains, could be related with their ecology. Although *B. pinnipedialis* (affecting predominantly seals) and *B. ceti* (affecting predominantly porpoises and dolphins) are both reported as marine mammal *Brucella* strains, the lifestyle of their respective hosts are very different. Indeed, in contrast to cetaceans, pinnipeds are able to live out of water, notably for reproduction, birth and breeding. So, in contrast to their close marine mammal neighbours, it is unlikely that *B. ceti* has to cope with hydric stress. In such context, a reduced selective pressure could explain the loss of the TCS *prlS/R*.

Here we describe for the very first time to our knowledge a condition in which all the tested *Brucella* spp. with an intact PrlS/R TCS form an aggregate in rich culture media containing a high concentration of NaCl and yeast extract. We suggest that the TCS PrlS/R is somehow involved in sensing a membrane perturbation signal. This aggregation in the presence of 400 mM NaCl could result from an EPS production and/or from a modification of the outer membrane properties. An aggregative phenotype has already be described for QS mutants in *B. melitensis* (Godefroid *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2007) and was though to be linked to the production of an EPS. Nevertheless, the *vjbR* mutant also has a lot of other surface modifications that could also account for the aggregative phenotype (Delrue *et al.*, 2005; Uzureau *et al.*, 2007). Finally, the lower persistence of the *prlR/S* mutants of *B. melitensis* in mice suggests that this system and, more likely, the genes under its control, are crucial to ensure a successful infection of the eukaryotic host.

Acknowledgments

A. M. holds a grant from the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (FRIA). R. M. Y. V. holds a grant from the Commission Universitaire pour le développement (CUD).

Supplementary data

Table S1. Primers used in this study for mutants and plasmids constructions.

Primers	Sequences (5' to 3')
F1_D1606	CAGGGCGAATTCCTGAAATTC
F2_D1606	CAAGCCTAAGGGAGGAAATGCGATAAGCGGCAAAGGCCGA
R1_D1606	CATTTCCTCCCTTAGGCTTG
R2_D1606	ACGGGACTTTCCGGACTTGT
F1_D1607	GGGTTTCGGCATAGGCAAG
F2_D1607	ATCGCTGATGACCACCCGCTGTTTAGCGACGTTCTGGGCGTTTGA
R1_D1607	AAACAGCGGGTGGTCATCAGCGATAATGAAATGCATTTG
R2_D1607	CCGCCAGCCGAAGAGGTTA

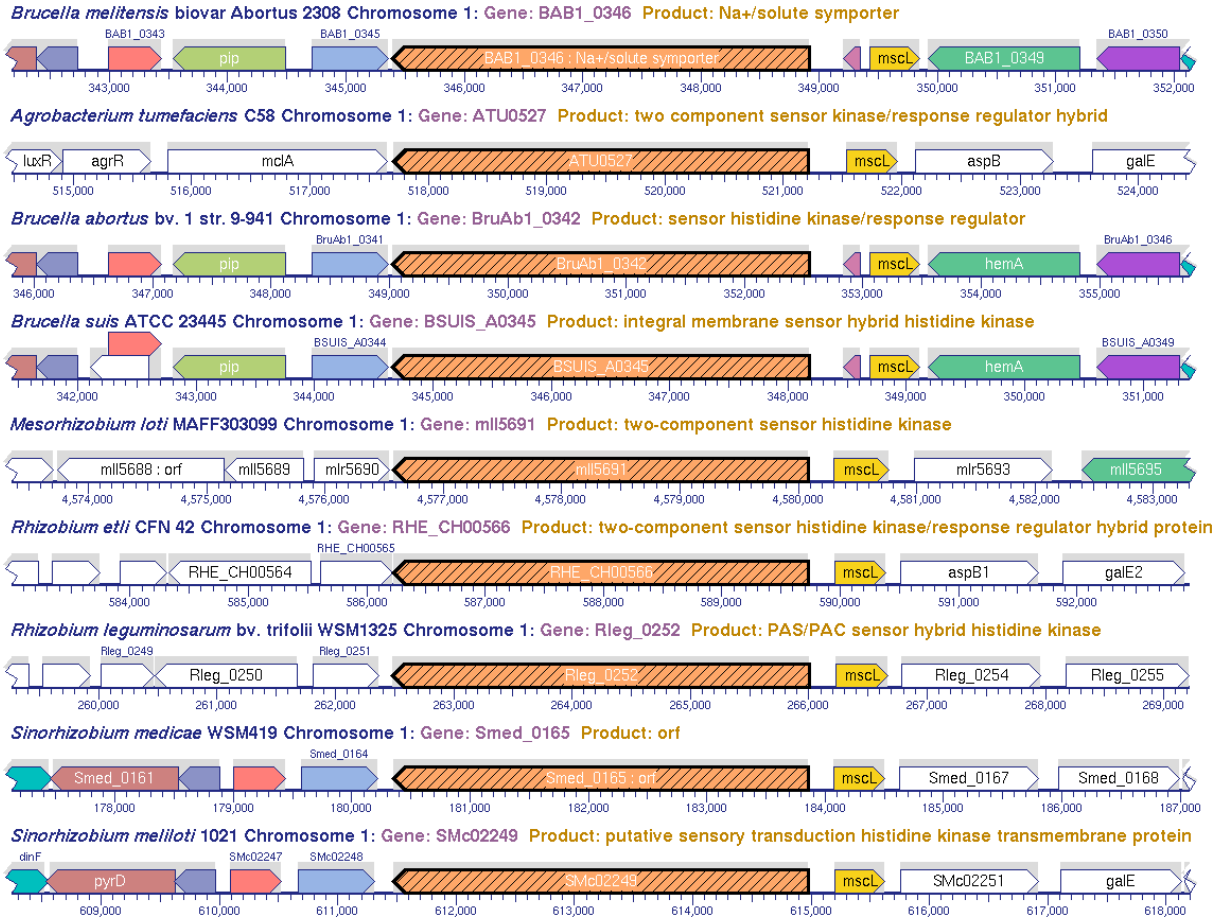


Fig. S1. Genomic context of *prlS* gene in several alpha-proteobacteria (Biocyc). The *prlS* and *prlR* genes are represented by an orange and blue arrow, respectively.

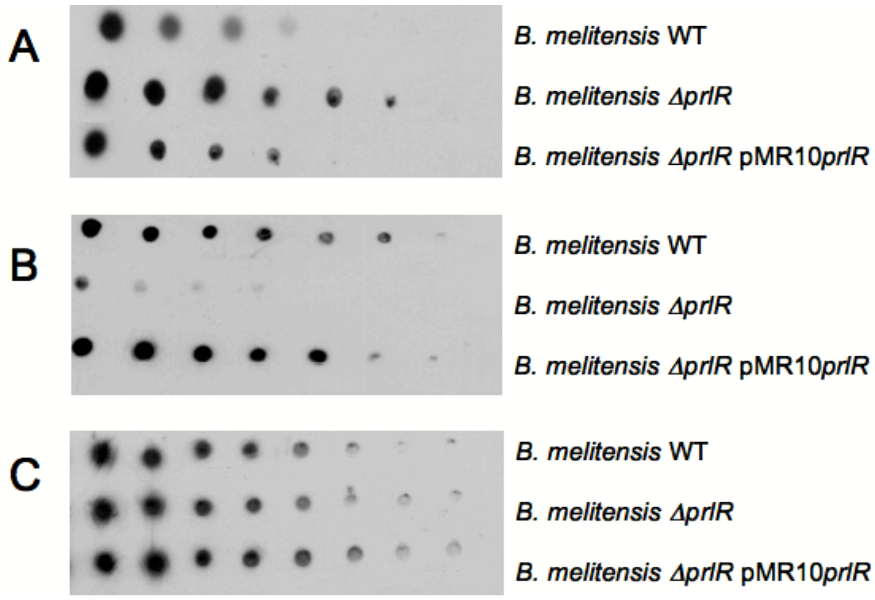


Fig. S2. Mutation in *prlR* of *B. melitensis* affects the production of several Omps. Cells were grown in 2YT medium and harvested in stationary phase. Whole-cell extracts were diluted as described in Methods, and dilutions were subjected to dot blot analysis using different Omp MAbs (**panel A**: anti-Omp 10; **panel B**: anti-Omp36) . Omp16 was unaffected (**panel C**). Complementation restores the WT pattern.

References

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D.E. Moore, J.G. Seidmann, J.A. Smith and K. Struhl (1991). *Current protocols in molecular biology*. New York, NY.

Bellefontaine, A. F., Pierreux, C. E., Mertens, P., Vandenhaute, J., Letesson, J. J. & 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**, 945-960.

Buddle, M. B. (1956). Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg (Lond)* **54**, 351-364.

Buelow, D. R. & Raivio, T. L. (2010). Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol* **75**, 547-566.

Carmichael, L. E. & Bruner, D. W. (1968). Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet* **48**, 579-592.

Carrica, M. D., Fernandez, I., Marti, M. A., Paris, G. & Goldbaum, F. A. (2012). The NtrY/X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. *Mol Microbiol* **85**, 39-50.

Cloeckaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G. & 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**, 3980-3987.

Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrate, P. & other authors (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**, 487-497.

Delrue, R. M., Deschamps, C., Leonard, S. & other authors (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* **7**, 1151-1161.

Denoel, P. A., Vo, T. K., Weynants, V. E., Tibor, A., Gilson, D., Zygmunt, M. S., Limet, J. N. & Letesson, J. J. (1997). Identification of the major T-cell antigens present in the *Brucella melitensis* B115 protein preparation, Brucellergene OCB. *J Med Microbiol* **46**, 801-806.

Dorrell, N., Spencer, S., Foulonge, V., Guigue-Talet, P., O'Callaghan, D. & 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**, 143-150.

Dorrell, N., Guigue-Talet, P., Spencer, S., Foulonge, V., O'Callaghan, D. & Wren, B. W. (1999). Investigation into the role of the response regulator NtrC in the metabolism and virulence of *Brucella suis*. *Microb Pathog* **27**, 1-11.

Dricot, A., Rual, J., Lamesch, P. & other authors (2004). Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res* **14**, 2201-2206.

Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. & Cloeckaert, A. (2007). *Brucella ceti sp. nov.* and *Brucella pinnipedialis sp. nov.* for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2688-2693.

Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieille, C., Michaux-Charachon, S. & 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**, 1297-1303.

Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S. & other authors (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* **7**, 687-698.

Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* **13**, 150-159.

Godefroid, M., Svensson, M. V., Cambier, P., Uzureau, S., Mirabella, A., De Bolle, X., Van Cutsem, P., Widmalm, G. & Letesson, J.-J. (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **59**, 364-377.

Gorvel, J. P. & Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**, 281-297.

Groussaud, P., Shankster, S. J., Koylass, M. S. & Whatmore, A. M. (2007). Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. *J Med Microbiol* **56**, 1512-1518.

Hallez, R., Mignolet, J., Van Mullem, V., Wery, M., Vandenhaute, J., Letesson, J. J., Jacobs-Wagner, C. & De Bolle, X. (2007). The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. *Embo J* **26**, 1444-1455.

Iibuchi, R., Hara-Kudo, Y., Hasegawa, A. & Kumagai, S. (2010). Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. *J Food Prot* **73**, 1506-1510.

Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**, 111-120.

Jung, H. (1998). Topology and function of the Na^+/proline transporter of *Escherichia coli*, a member of the Na^+/solute cotransporter family. *Biochim Biophys Acta* **1365**, 60-64.

Jung, H. (2001). Towards the molecular mechanism of Na(+)/solute symport in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1505**, 131-143.

Kang, Y., Durfee, T., Glasner, J. D., Qiu, Y., Frisch, D., Winterberg, K. M. & Blattner, F. R. (2004). Systematic mutagenesis of the *Escherichia coli* genome. *J Bacteriol* **186**, 4921-4930.

Karatan, E. & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 310-347.

Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-802.

Kramer, R. (2010). Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. *Chem Rec* **10**, 217-229.

Kung, C., Martinac, B. & Sukharev, S. (2010). Mechanosensitive channels in microbes. *Annu Rev Microbiol* **64**, 313-329.

Kunte, H. J., Crane, R. A., Culham, D. E., Richmond, D. & Wood, J. M. (1999). Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **181**, 1537-1543.

Laub, M. T., Biondi, E. G. & Skerker, J. M. (2007). Phosphotransfer profiling: systematic mapping of two-component signal transduction pathways and phosphorelays. *Methods Enzymol* **423**, 531-548.

Lavin, J. L., Binnewies, T. T., Pisabarro, A. G., Ussery, D. W., Garcia-Lobo, J. M. & Oguiza, J. A. (2010). Differences in two-component signal transduction proteins among the genus *Brucella*: implications for host preference and pathogenesis. *Vet Microbiol* **144**, 478-483.

Leonard, S., Ferooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X. & 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**, 131-141.

Lestrate, P., Delrue, R. M., Danese, I. & other authors (2000). Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* **38**, 543-551.

Letesson, J. J., Lestrate, P., Delrue, R. M. & other authors (2002). Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug". *Vet Microbiol* **90**, 317-328.

Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2004). *Brucella* Virulence : a matter of control In *Brucella Molecular and Cellular Biology*. Edited by I. Lopez-Goni & I. Moriyon. Universidad de Navarra, Pamplona (Spain).

Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. & 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**, 1730-1737.

Mascher, T., Helmann, J. D. & Unden, G. (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 910-938.

Mignolet, J., Van der Henst, C., Nicolas, C., Deghelt, M., Dotreppe, D., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2010). PdhS, an old-pole-localized histidine kinase, recruits the fumarase FumC in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **192**, 3235-3239.

Miller, K. J. & Wood, J. M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**, 101-136.

Mitrophanov, A. Y. & Groisman, E. A. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* **22**, 2601-2611.

Moe, P. C., Blount, P. & Kung, C. (1998). Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol Microbiol* **28**, 583-592.

Moreno, E. & Moriyon, I. (2002). *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1-3.

Morgan, W. J. & Corbel, M. J. (1976). Recommendations for the description of species and biotypes of the genus *Brucella*. *Dev Biol Stand* **31**, 27-37.

Parkinson, J. S. (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**, 857-871.

Perraud, A. L., Weiss, V. & Gross, R. (1999). Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**, 115-120.

Pirch, T., Landmeier, S. & Jung, H. (2003). Transmembrane domain II of the Na^+/proline transporter PutP of *Escherichia coli* forms part of a conformationally flexible, cytoplasmic exposed aqueous cavity within the membrane. *J Biol Chem* **278**, 42942-42949.

Racher, K. I., Voegele, R. T., Marshall, E. V. & other authors (1999). Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry* **38**, 1676-1684.

Sangari, F. & Aguero, J. (1991). Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb Pathog* **11**, 443-446.

Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedlacek, I. & other authors (2008). *Brucella microti sp. nov*., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 375-382.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature Biotechology* **1**, 784-791.

Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P. & 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**, 125-138.

Stoenner, H. G. & Lackman, D. B. (1957). A preliminary report on a *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida Thomas*. *J Am Vet Med Assoc* **130**, 411-412.

Swartz, T. E., Tseng, T. S., Frederickson, M. A. & other authors (2007). Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* **317**, 1090-1093.

Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2007). Mutations of the Quorum Sensing-Dependent Regulator VjbR Lead to Drastic Surface Modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol* **189**, 6035-6047.

Wegener, C., Tebbe, S., Steinhoff, H. J. & Jung, H. (2000). Spin labeling analysis of structure and dynamics of the Na(+)/proline transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **39**, 4831-4837.

Wood, J. M. (2006). Osmosensing by bacteria. *Sci STKE* **2006**, pe43.

Wood, J. M. (2007). Bacterial osmosensing transporters. *Methods Enzymol* **428**, 77-107.

Wu, Q., Pei, J., Turse, C. & Ficht, T. A. (2006). Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. *BMC Microbiology* **6**, 102.

Zhang, X., Ren, J., Li, N., Liu, W. & Wu, Q. (2009). Disruption of the *BMEI0066* gene attenuates the virulence of *Brucella melitensis* and decreases its stress tolerance. *Int J Biol Sci* **5**, 570-577.

2. COMPLEMENTARY INFORMATION

Here are presented complementary data about the abundance of the PrlR protein in 2YT and 2YT containing 400 mM NaCl and about the morphological alteration of cells grown in that NaCl-supplemented medium.

In the above manuscript, we showed the implication of the PrlS/PrlR system in the formation of bacterial clumps in response to hypersaline medium. Using constructed mutants in *B. melitensis* or natural strains bearing a truncated version of the *prlR/prlS* genes, we showed that the formation of aggregates required an intact PrlR/PrlS system. Therefore, we wondered if this system could be induced in the hypersaline medium. Using the anti-PrlR polyclonal serum that was generated in this work, we performed a Western blot on total extract of *B. melitensis* WT cultivated in 2YT or 2YT containing 400 mM NaCl at both 24 h and 72 h of culture **(figure S3)**. We used an extract of the Δ*prlR* strain as negative control and the monoclonal antibody anti-Omp89 as loading control **(figure S3**). We did not observe any difference in the abundance of the PrlR protein in NaCl-supplemented 2YT compared with the classical 2YT medium at least in the tested conditions.

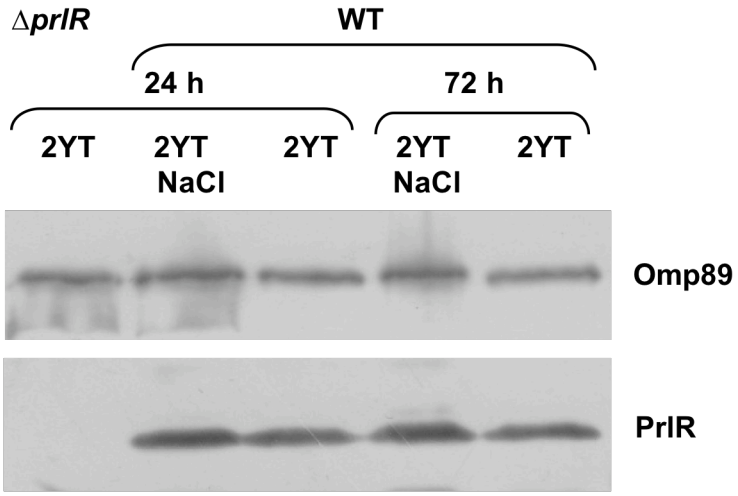


Figure S3. Detection by Western blot of PrlR protein in *B. melitensis* WT in both 2YT and 2YT containing 400 mM NaCl. Bacteria were grown for 24 h and 72 h in both media. An extract from the Δ*prlR* strain was used as negative control. Total extracts were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane and probed with PrlR-specific antiserum. A monoclonal antibody anti-Omp89 was used as loading control.

In our work, we noticed a morphological change when *Brucella* spp. were cultivated in 2YT containing 400 mM NaCl which did not occur in 2YT classical broth. Whether this cell shape alteration is correlated or not with the formation of bacterial aggregates, we observed the morphology of the *B. meltitensis* WT, Δ*prlR* and Δ*prlS* strains after 24 h of culture in NaCl-supplemented medium. The three strains presented a cell shape alteration together with a increased of cell size **(figure S4)**. This suggests that the morphological change is PrlS/PrlR independent and that at least it is not sufficient to trigger the formation of bacterial aggregates. We will come back to that phenotype later in the Chapter III.

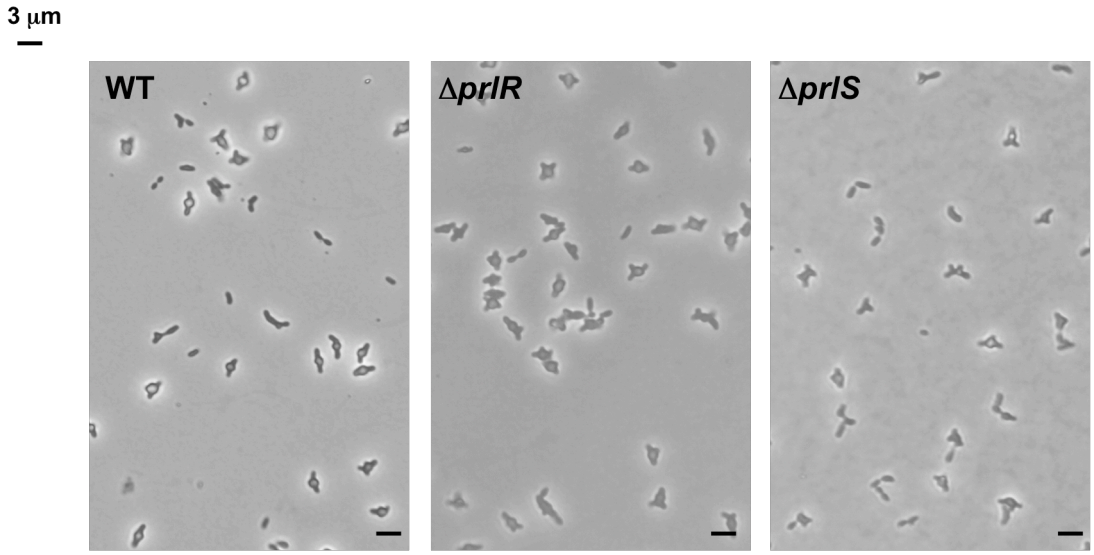


Figure S4. NaCl-supplemented medium promotes cell shape alteration in *B. melitensis* WT, Δ*prlR* and Δ*prlS*. Representative micrographs of bacterial strains in phase contrast microscopy. The strains were cultivated for 24 h in 2YT containing 400 mM NaCl and observed on agarose pad. Scale bars, 3 μm.

CHAPITRE III : MUCR EST IMPLIQUE DANS LA REGULATION DE STRUCTURES DE SURFACE ET LA REPONSE AU STRESS CHEZ *B. MELITENSIS*

Cette partie du travail sera prochainement soumis dans le journal « Journal of Bacteriology » pour publication.

Contributions des auteurs : A. Mirabella a écrit le manuscrit et réalisé toutes les expériences exceptés les profils de migration du LPS SDS-protéinase K réalisé par M. Zygmunt (INRA, Tours, France). Ce travail a été supervisé par J.J. Letesson et X. De Bolle.

1. PAPER : THE ORTHOLOG OF THE *SINORIZOBIUM MELILOTI MUCR* IS INVOLVED IN CELL SURFACE MODIFICATIONS IN THE INTRACELLULAR PATHOGEN *BRUCELLA MELITENSIS*

Title :

The ortholog of the *Sinorizobium meliloti mucR* is involved in cell surface modifications in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*

Authors :

A. Mirabella[1], M. Terwagne[1], M.S. Zygmunt[23], A. Cloeckaert[23], X. De Bolle[1], J.J. Letesson[1*]

Affiliations and addresses :

[1]Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes (URBM), NARILIS, University of Namur (FUNDP), 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

[2] INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

[3] Université François Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France

[*]**Corresponding author :**

URBM – FUNDP
61 rue de Bruxelles
5000 Namur
Belgium
Phone: +32 81 72 44 20
Fax: +32 81 72 42 97
E-mail: jean-jacques.letesson@fundp.ac.be

Running title : MucR regulates cell envelope components in *B. melitensis*

Summary

Brucella spp and *Sinorhizobium meliloti* are two alphaproteobacteria that are known to share not only an intravacuolar lifestyle in their respective hosts but also a crucial requirement of cell envelope components and their timely regulation for a successful infectious cycle. Here we report the characterization of *Brucella melitensis mucR* encoding a zinc finger transcriptional regulator that is shown to be involved in cell and mice infection already at early time points. MucR modulates bacterial surface properties and resistance to environmental stresses (i.e. oxidative stress, cationic peptide, detergents). We showed that *B. melitensis mucR* is a functional ortholog of S*. meliloti mucR* because it was able to restore the production of succinoglycan in an *S. meliloti mucR* mutant as detected by calcofluor staining. In addition, like in *S. meliloti*, *B. melitensis* MucR represses its own transcription and the flagellar gene expression through the flagellar master regulator *ftcR*. More surprisingly, we demonstrated that MucR regulates a lipidA-core modification in *B. melitensis*. Altogether these alterations accounted for the attenuated virulence of the *mucR* mutant. These data reinforce the idea that a common conserved circuitry is conserved between plant symbionts and animal pathogens to regulate their relationship with their host.

Introduction

The envelope of bacteria is the first point of contact with their challenging environment and, in the case of symbionts or pathogens, is the main target for the host antibacterial defense (Nizet, 2006). These multilayered structures (cytoplasmic membrane, cell wall, and possibly the outer membrane, polysaccharidic capsule and proteinaceous S-layer) have both protective and adaptive functions (Melin *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Tellstrom *et al.*, 2006) that require a tightly regulated gene expression to control their biosynthesis and to adjust their properties to the changing environments (Janczarek, 2011).

In α-proteobacteria, *Sinorhizobium meliloti* is the paradigmatic model for studying the crucial role played by surface components and their finely tuned production in order to respond appropriately to environmental signals (e.g. carbon and nitrogen sources, phosphate starvation and plant signals) and various stresses (osmolality, ionic strength, oxidative) related to either their free-living or their partnership with the leguminous host. For example, the establishment of rhizobium-legume symbiosis requires the timely and spatially regulated bacterial synthesis (or modification) of four classes of envelope associated polysaccharides: the outer membrane lipopolysaccharides (LPS), the periplasmic cyclic β-(1,2)-glucans and the external capsular polysaccharides (K) or the exopolysaccharides (succinoglucan: EPS I and galactoglucan: EPS II) (Glazebrook & Walker, 1989; Hozbor *et al.*, 2004; Reuhs *et al.*, 1995). The regulated production of these EPS is particularly well described and involves an intricate regulatory network (for review see (Janczarek, 2011)). In brief, the inner membrane sensor histidine kinase ExoS and the cytoplasmic transcriptional regulator ChvI constitute a two-component system (TCS) controlling succinoglycan production (Cheng & Walker, 1998). A third partner, the periplasmic protein ExoR (believed to sense calcium and ammonium), is involved in this

regulatory cascade (Reed *et al.*, 1991; Wells *et al.*, 2007). Both ExoR and ExoS are involved in the regulation of the EPS I production, of genes involved in LPS sulphatation and in flagellum biosynthesis (Keating, 2007; Ozga *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 2004). The *S. meliloti exoR* and *exoS* mutants overproducing EPS I are symbiotically deficient (Bélanger *et al.*, 2009; Doherty *et al.*, 1988; Gibson *et al.*, 2006).

Finally, the zinc-finger protein MucR appears to couple the two EPS biosynthetic pathways by positively regulating succinoglycan biosynthesis genes and by repressing the synthesis of galactoglucan (Bertram-Drogatz *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 1995; McIntosh *et al.*, 2008; Rüberg *et al.*, 1999). How *mucR* becomes active remains to be determined but it was also shown to repress flagellar gene expression (Bahlawane *et al.*, 2008b). In addition, most of these signaling pathways are influenced by the Quorum Sensing (QS) hierarchy of *S. meliloti* (Mueller & Gonzalez, 2011). *S. meliloti* belongs to the order *Rhizobiale* in the α-2 subdivision of the class *Proteobacteria* and is, although a plant symbiont, very closely related to animal pathogens of the genus *Brucella* (Moreno *et al.*, 1990). *Brucella* spp. are considered as facultative intracellular parasites causing brucellosis, a chronic world widespread zoonotic disease affecting a broad range of mammals including livestock and humans (Pappas *et al.*, 2006).
Most of the *Brucella* virulence determinants have been related to the bacterial surface either as permanent or transient structural components (e.g. the envelope and its appendices: the *virB* type IV secretion system (O'Callaghan *et al.*, 1999), the flagellum (Fretin *et al.*, 2005) or their respective regulators (Delrue *et al.*, 2005; Sola-Landa *et al.*, 1998; Uzureau *et al.*, 2007)). *Sinorhizobium* and *Brucella* have not only in common the intracellular chronic infection of their respective hosts within a host-derived membrane-bound compartment (Ugalde, 1999) but also share similar requirements for establishing the relationship with their dedicated host (Lestrate *et al.*, 2003). In *Brucella* spp. also, envelope related polysaccharides and their regulated production play a crucial role during the interaction with the host: (i) the LPS O-chain being required to resist the complement-mediated lysis (Fernandez-Prada *et al.*, 2001), to avoid intracellular killing, to mediate the early step of vacuolar trafficking (Porte *et al.*, 2003) and to inhibit the host cell apoptosis (Fernandez-Prada *et al.*, 2003) ; (ii) the cyclic glucans that enable the bacteria to prevent phagosome-lysosome fusion and to reach the final replicative compartment (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005) ; (iii) the TCS BvrS/R, the ortholog of the ExoS/ChvI TCS, is crucially needed for the infectious cycle and clearly involved in the homeostasis of the Outer Membrane (OM) (Guzman-Verri *et al.*, 2002; Manterola *et al.*, 2005) (iv) among the targets of this TCS identified by transcriptomic analysis (Viadas *et al.*, 2010) is the Quorum Sensing regulator VjbR that was previously demonstrated to be a major regulator of outer membrane organization (OM proteins, flagellum, type IV secretion system) (Uzureau *et al.*, 2010). Noteworthy, in yeast extract containing medium, VjbR mutant has an aggregative phenotype that was suggested to be linked to EPS production (Uzureau *et al.*, 2007) ; (v) finally, a transcriptional regulator with 61% of identity with MucR from *S. meliloti* has been identified during a screen of transpositional *B. melitensis* mutants (Wu *et al.*, 2006). The transpositional *mucR* mutant presented a reduced virulence both in cellular and mouse model of infection but otherwise was left uncharacterized. More recently, the protective efficiency of this mutant as live attenuated vaccine was evaluated (Arenas-Gamboa *et al.*, 2011).

Here, we report an in depth characterization of the transcriptional regulator MucR that modulate bacterial surface properties and resistance to environmental stresses (i.e. oxidative stress, cationic peptide, detergents). Through a heterospecific complementation we showed that *B. melitensis mucR* is a functional ortholog of *S. meliloti mucR* because it was able to restore the production of succinoglycan in *S. meliloti mucR* mutant Rm101. In addition, like in *S. meliloti*, *B. melitensis* MucR inhibited flagellar gene expression through the flagellar master regulator and negatively regulated its own transcription. More surprisingly, we demonstrated that MucR regulates a lipidA-core modification in *B. melitensis*. With the TCS BvrS/R (Manterola *et al.*, 2005), this is the second transcriptional regulator of *Brucella* spp. shown to modulate the lipidA-core component of the LPS. Considering the strong conservation of the *mucR* gene in α-proteobacteria and the link generally established between this gene and altered host/bacteria interaction, it can be worth to look, in other α-proteobacteria, to LPS alteration in relation to *mucR* mutation.

Material and methods

Strains, plasmids and culture conditions

All strains and plasmids used in this study are listed in Table n°1.
Classically, *Brucella* strains were grown with shaking at 37°C in 2YT medium (10 g yeast extract l^{-1}, 16 g peptone l^{-1}, 5 g NaCl l^{-1}) containing appropriate antibiotics from stationary-phase overnight culture (2YT, 10 ml) at an OD_{600} of 0.05. For RNA extraction, bacteria were harvested from a volume of 10 ml from a 200 ml culture in 2YT at mid-log phase (OD_{600nm} = 0.5). 10-ml cultures were used to follow GFP(ASV) production from *B. melitensis* pBBRP*mucRgfp*(ASV) and from *B. melitensis* harbouring the pBBR-*gfp*(ASV) vector. The GFP(ASV) is a unstable variant of the GFPmut3 that is useful as reporter gene to monitor transient gene expression because of a reduced half-life of the reporter gene (Andersen *et al.*, 1998). The *Escherichia coli* strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium with appropriate antibiotics at 37 °C. *Sinorhizhobium meliloti* strains were cultivated in LB broth with 2.5 mM $MgSO_4$ and 2.5 mM $CaCl_2$ at 30 °C. Mating was performed by mixing *E. coli* S17-1 cells with *Brucella* or *S. meliloti* recipient strain respectively on 2YT or LB for 3-4 h. Then a mixed population was plated on medium containing the appropriate antibiotics to select *B. melitensis and S. meliloti* conjugants. Chloramphenicol, gentamycin, and nalidixic acid were used at 20, 50 and 25 (8 for *S. meliloti*) μg ml^{-1} respectively. Growth curves were monitored using a Bioscreen system (Thermo Fisher, Erembodegem-Aalst, Belgium), allowing continuous monitoring for OD_{600} in a multiwell format.

Table 1 : Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Source or reference
B. melitensis		
16M	Wild-type, Nal^R, parental strain	A. Macmillan, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK
16M pBBR-gfp(ASV)	Nal^R Cm^R, WT carrying pBBR-*gfp*(ASV)	This study
16M pBBRP*mucRgfp*(ASV)	Nal^R Cm^R, WT carrying pBBRP*mucRgfp*(ASV)	This study
Δ*mucR*	Nal^R, deletion strain for *mucR* gene	This study
Δ*mucR* KI	Nal^R, *knock in* of *mucR* gene in the Δ*mucR* strain	This study
Δ*mucR* pBBRMCS1	Nal^R Cm^R, Δ*mucR* carrying pBBRMCS1 plasmid	This study
Δ*mucR* pBBR*mucR*	Nal^R Cm^R, Δ*mucR* carrying pBBR*mucR* complementation plasmid	This study
Δ*mucR* pBBRP*mucRgfp*(ASV)	Nal^R Cm^R, Δ*mucR* carrying pBBRP*mucRgfp*(ASV)	This study
Δ*mucR*KI pBBRP*mucRgfp*(ASV)	Nal^R Cm^R, Δ*mucR* KI carrying pBBRP*mucRgfp*(ASV)	This study
Δ*vjbR*	Nal^R Δ*vjbR*::Kan^R (refered as CD100 in (Uzureau *et al.*, 2007)	(Delrue *et al.*, 2005)
S. meliloti		
Rm1021	Nal^R Sm^R, wild-type	(Meade *et al.*, 1982)
Rm1021:exoY	*Rm1021 exoY*:Tn5 (formely Rm7210) Nal^R, Sm^R, Neo^R	(Leigh *et al.*, 1985)
Rm2011	Nal^R Sm^R, wild-type	(Casse *et al.*, 1979)
Rm101	*Rm2011* Spc^R cassette inserted into the P*mac*I site of *mucR*	(Becker *et al.*, 1997)
E. coli		
DH10B	F– *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L *nup*G λ – (Sm^R)	Gibco BRL
S17-1	recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λ pir, allow plasmid mobilization	(Simon R, 1983)
Plasmids		
pBBR1MCS1	Broad-host –range cloning vector, high copy number, Cm^R	(Kovach *et al.*, 1994)
pGEM-Teasy	Amp^R	Promega
pJQ200-uc1	*SacB* gene, Gtm^R	(Donnenberg & Kaper, 1991)
pBBR-*gfp*(ASV)	Cm^R	Terwagne M.
pJQΔ*mucR*	*SacB* gene, Gtm^R containg Δ*mucR* fragment, to construct deletant strain	This study
pJQ*mucR*	*SacB* gene, Gtm^R containing *mucR* gene flanking by its upstream and downstream regions	This study
pBBR*mucR*	Cm^R, complementation plasmid	This study
pBBRP*mucRgfp*(ASV)	Cm^R, reporter plasmid bearing the transcriptional fusion P*mucRgfp(ASV)*	This study

Nal^R, nalidixic acid resistance ; Sm^R, streptomycin resistance ; Neo^R, neomycin resistance ; Cm^R, chloramphenicol resistance ; Spc^R, spectinomycin resistance ; Amp^R, ampicillin resistance ; Gtm^R, gentamycin resistance.

Molecular techniques.

DNA manipulations were performed according to standard techniques (Ausubel, 1991). Restriction enzymes were purchased from Roche and primers were purchased from Eurogentec. Primers sequences are listed in **Supplementary Table 1.**

Mutant construction

B. melitensis 16M knock-out mutant Δ*mucR* was constructed by allelic replacement using a two-step strategy. Briefly, upstream and downstream regions of about 500 bp flanking *mucR* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from *B. melitensis* genomic DNA using the following primers: (i) P*mucR*F and P*mucR*R (ii) T*mucR*F and T*mucR*R. For each construction, a second PCR was used to associate the two PCR products using the primers pairs P*mucR*F and T*mucR*R. Finally, the Δ*mucR* fragment was cloned into pGEMT-easy (Promega) to generate pGEMTΔ*mucR* intermediate vector. The Δ*mucR* fragment was excised by *NotI* restriction and subcloned into the final vector pJQ200-uc1 and used to construct *Brucella* mutant following the strategy previously described (Mignolet *et al.*, 2010). Gene replacement was confirmed by PCR using the following primers: *mucR* upstream and *mucR* dowstream. To construct the Δ*mucR*KI strain, we used the same recombination strategy but with the plasmid pJQ*mucR* carrying the *mucR* gene with its upstream and downstream regions.

Construction of the complementation plasmid pBBR*mucR*

The *mucR* gene was amplified by PCR from *B. melitensis* genomic DNA using the following primers (Eurogentec) : *mucR* XhoI F and *mucR* ClaI R containing *XhoI* and *ClaI* restriction sites respectively. The PCR product was cloned into pGEMT-easy (Promega) to generate pGEMT*mucR* intermediate vector. After sequencing, the fragment *mucR* was excised by a double *ClaI and XhoI* restriction and subcloned into *XhoIClaI* -previously restricted pBBRMCS1 to obtain pBBR*mucR*. The vector was finally transferred to the Δ*mucR* strain to obtain the complemented strain Δ*mucR* pBBR*mucR.*

Construction of the reporter plasmid pBBRP*mucRgfp*(ASV).

A region containing the putative *mucR* promoter was amplified by PCR from *B. melitensis* genomic DNA using the primers XhoI*pmucR*R and BamHI*pmucR*F containing *XhoI* and *BamHI* restriction sites respectively. The PCR product was first subcloned into pGEMT-easy vector. The fragment was then inserted in frame upstream of the promoterless *gfp(ASV)* reporter gene into pBBR1MCS to generate the pBBR*PmucRgfp*(ASV) plasmid.

Cellular Infection

Evaluation of the intracellular survival of the *B. melitensis* wild-type and the Δ*mucR* strains in murine macrophages RAW 264.7 were performed as previously described (Delrue *et al.*, 2001). Briefly, the bacterial strains were grown overnight in 2YT medium and then inoculated at a m.o.i. of 300 to monolayers of cells in 24-well plates. After a 10-min centrifugation at 1000 r.p.m. at room temperature, the plates were placed in a 5 % CO_2 atmosphere at 37 °C for 1 h. Afterwards, the cells were washed with PBS and incubated in presence of medium containing gentamycin 50 μg ml^{-1} at 37 °C under 5 % CO_2 until the end of the infection (48 h). Cells were then washed and lysed with sterile MilliQ water for 10 minutes and serial dilutions of lysates were plated on 2YT solid medium to enumerate viable bacteria able to develop colonies. Data are expressed as the logarithm (log) of the number of colony forming units (CFU) per well.

Mice infection

Virulence assays with BALB/c mouse were performed as described previously (Fretin *et al.*, 2005). Briefly, eight-weeks-old mice were inoculated intraperitoneally with 500 μl of a suspension containing 4.10^4 CFU of the appropriate bacterial strain. At 1 and 4 weeks post-inoculation, mice from each group were sacrificed for spleen collection. Spleens were homogenized in 2 ml of PBS 0.1 % Triton X100 and serial dilutions of the homogenate were plated on 2YT solid medium to evaluated the bacterial load. Data are expressed as the log of the number of CFU per spleen. Data were statistically analyzed via Prism™ with a Mann-Witney statistical test. The animal handling and procedures of this study were in accordance with the current European legislation (directive 86/609/EEC) and in agreement with the corresponding Belgian law "*Arrêté royal relatif à la protection des animaux d'expérience du 6 avril 2010 publié le 14 mai 2010*". The complete protocol was reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of the Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix (FUNDP, Belgium) (Permit Number: 05-558).

Oxidative resistance assay

Oxidation resistance assays were performed according to previously described protocol with some modifications (Zhang *et al.*, 2009). Cells were grown overnight in 10 ml of 2YT medium with shaking and adjusted to a concentration of 5.10^5 CFU ml^{-1} in PBS. In a 96-wells plate, 50 µl of the bacterial suspension was supplemented with 50 µl of H_2O_2 (freshly diluted in PBS) to obtain final concentration of 1 mM, 2.5 mM and 5 mM. A negative control was performed adding 50 µl of PBS (without H_2O_2) to the same bacterial suspension. After exposure for 1 h in a 37 °C shaking incubator, the cells were rapidly diluted with PBS and plated rapidly onto 2YT. After 5 days at 37 °C, CFU were enumerated and for each strain the percentage of bacterial survival was determined by comparing to the negative control.

Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNA samples were prepared as previously described (Uzureau *et al.*, 2010) on *B. melitensis* 16M*, the* Δ*mucR* and the complemented Δ*mucR* pBBR*mucR*. DNA was removed from the samples using the DNase (Kit Fermentas) and samples were retro-transcribed with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) using random oligonucleotide hexamers according to the manufacturer's protocol. RNA and cDNA quantities were measured using a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific). The resulting cDNA samples were used as template in real-time PCR reactions. Primers were designed with the PrimerExpress 2.0 software (Applied Biosystems) to generate PCR products ranged from 80 to 100 bp and are listed in **Supplementary Table 2**. Reactions without reverse transcriptase were performed as negative control to attest the lack of DNA contamination. Real-time PCR reactions were made with SYBR Green Mix (Applied Biosystems) in 96-well Optical Reaction plates (Applied Biosystems). Ratios were calculated using the ΔΔCT method for each primer in an Applied Biosystems Step One Plus real-time PCR instrument. Results for each target mRNA was normalized to 16S rRNA transcript and averaged.

Total extracts and SDS-proteinase K extraction of LPS

Total extracts were prepared from *B. melitensis* strains cultivated in 2YT. Bacteria were concentrated to obtain an OD_{600} of 10 and inactivated at 80 °C during 1 h. Total extracts were used for SDS-proteinase K extraction of LPS as previously described (Garin-Bastuji *et al.*, 1990). Samples were loaded for migration on SDS-PAGE gel containing 16 or 15 % of polyacrylamide. Gels were then silver stained or transferred on nitrocellulose membrane (Amersham) for western blotting (Garin-Bastuji *et al.*, 1990).

Western blot

Nitrocellulose membranes were blocked by overnight incubation in PBS with 5 % non fat dry milk. After washing three times for 10 min in PBS 0.05 % Tween 20, membranes were incubated for 1 h with the primary antibodies diluted in PBS (0.05 % Tween 20, 1 % dry milk), washed three times for 10 min in PBS 0.05 % Tween 20, incubated 1 h with the secondary antibody in PBS (0.05 % Tween 20, 1 % dry milk) and finally washed three times

for 10 min in PBS 0.05 % Tween 20. Revelation was performed with ECL system (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.009 % H_2O_2, 0.2 mM coumaric acid and 1.25 mM luminol).

Immunodetection

Immunodetection was performed with primary antibodies using mouse monoclonal antibodies (undiluted hybridoma culture supernatant) against O-antigen of *Brucella* A76/12G12/F12 (Cloeckaert *et al.*, 1992) and against LPS core A68/24G12/A8 and A68/24D8/G9 (Bowden *et al.*, 1995) for LPS detection. Flagellar protein were detected using anti-FliC (dilued 1:3000) or anti-FlgE (1 :5000) rabbit polyclonal antibodies (Fretin *et al.*, 2005). The PrlR detection with anti-PrlR polyclonal rabbit antibodies (1:1000) (Mirabella *et al.*, 2012) was used as loading control. Secondary antibodies were horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Amersham catalog. no. NA931, 1:10000 dilution) and HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG, HRP-linked whole antibody (Amersham catalog no. NA934, 1:5000 dilution).

Fluorescence microscopy

Bacteria were placed on a microscope slide first covered with a pad of 1 % agarose containing PBS (Jacobs *et al.*, 1999). These slides were placed on a microscope stage at room temperature. The samples were observed on a Nikon i80 fluorescence microscope through a 100X differential interference contrast (DIC, Normarski) or phase contrast objectives with a Hamamatsu Orca-ER LCD camera. Images acquisition and processing were performed with NIS element (Nikon) software.

FACS analysis

Bacterial suspensions were washed in PSB and fixed in 2 % paraformaldehyde (PFA), pH 7.4, at RT for 20 min. After an additional wash in PBS, bacteria were used for flow-cytometric analysis of GFP(ASV) production with a FACScalibur using CellQuest software (Becton Dickinson) as previously described (Jubier-Maurin *et al.*, 2001). Bacteria were gated according to size and scatter to eliminate debris from analysis. Then, 50,000 individual events were excited with a 488-nm argon-ion laser, and emission light was detected through a 530-nm bandpass filter.

Scanning Electron microscopy

Bacterial aggregates of *B. melitensis* overexpressing *mucR* (pBBR*mucR)* were observed by scanning electron microscopy. *B. melitensis* WT. The two strains were cultivated for 72 h in 2YT medium. Glass coverslips were treated with poly-L-lysine (0.05 mg ml^{-1}, Sigma) for 1 h at 4 °C. For each strains, 1ml-cells suspension were centrifuged on pretreated coverslips for 10 min at 1000 r.p.m. at room temperature. Medium was removed and adherent cells were fixed for 20 min with 2 % PFA in PBS. After incubation, samples were washed with PBS and dehydrated for 2x10 min in 25, 50, 75, 85 and 100 % of ethanol at room temperature. Dehydrated samples were then prepared by critical-point drying (Balzer, CPD 030), covered with a thin layer of gold (25 nm). Examinations were carried out with a scanning electron microscope (Jeol 7500F) at the University of Namur.

Statistical analysis

For mice experiment, we used a Mann-Whitney test provided by GraphPad Prism™ program to statistically analyze our results. Values of $p < 0.05$ were considered to represent a significant difference. The triple asterisks denote $p < 0.001$.
For cellular infection, ANOVA I was performed on the log number of CFU per well values after testing the homogeneity of variance (Bartlett test). Values of $p < 0.05$ were considered to represent a significant difference. An asterisk denote $p < 0.05$.
For oxidative resistance assay, ANOVA I was performed on values of the survival percentage after testing the homogeneity of variance (Bartlett test). Values of $p < 0.05$ were considered to represent a significant difference. An asterisk denote $p < 0.05$.
For qRT-PCR, fold change ratio was averaged from biological triplicate. ANOVA I on ΔCT values from the biological triplicate was used for statistical analysis after testing the homogeneity of variance (Bartlett test). A Scheffe's comparison test was performed and statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

The *mucR* mutant of *B. melitensis* is attenuated in macrophages and in BALB/c mice

In order to characterize the role of *mucR* in virulence, we constructed a deletion mutant for BMEI1364 (referred as Δ*mucR)* in *Brucella melitensis* 16M by allelic replacement and started its phenotypic characterization. We first analyzed the ability of the newly constructed mutant to multiply within cultured macrophages. As shown in figure 1A, the intracellular bacterial load of the Δ*mucR* strain was significantly reduced at 24 h and 48 h post-infection (p.i.) in murine RAW 264.7 macrophages compared with the wild type (WT) control. The intracellular replication of the Δ*mucR* strain was almost restored to WT level in the complemented Δ*mucR* strain. These results are in agreement with the reduced intracellular growth of the transpositional mutant described previously using mouse macrophage-like cell line J774.A1 (Wu *et al.*, 2006). The difference between Δ*mucR* and the WT strains cannot be related to a reduced capacity of the mutant to invade the cells, as the number of intracellular bacteria 1 h p.i. was the same for each strain. On the other hand, all strains displayed the same growth rate between 24 h p.i and 48 h p.i. (Figure 1A). A reduced virulence of the Δ*mucR* strain was also observed in HeLa cells (data not shown). Taken together, these results confirm the importance of MucR for the intracellular infection of *B. melitensis* 16M notably during the first hours of infection.
To verify that, as previously described for the transpositional mutant (Wu *et al.*, 2006), the *mucR* gene is involved in the successful infection process of *B. melitensis in vivo*, we compared the behavior of the Δ*mucR* and WT strains in a mice model of infection at 1 and 4 weeks post infection (p.i.) (Figure 1B). We observed a strongly reduced (more then 2 logs difference) splenic bacterial load already at 1 week p.i. in BALB/c mice infected with Δ*mucR* strain. A lower persitence of the Δ*mucR* strain was also consistently observed 4 weeks p.i. (Figure 1B). Moreover, this virulence attenuation was associated with a reduced splenomegaly (data not shown).

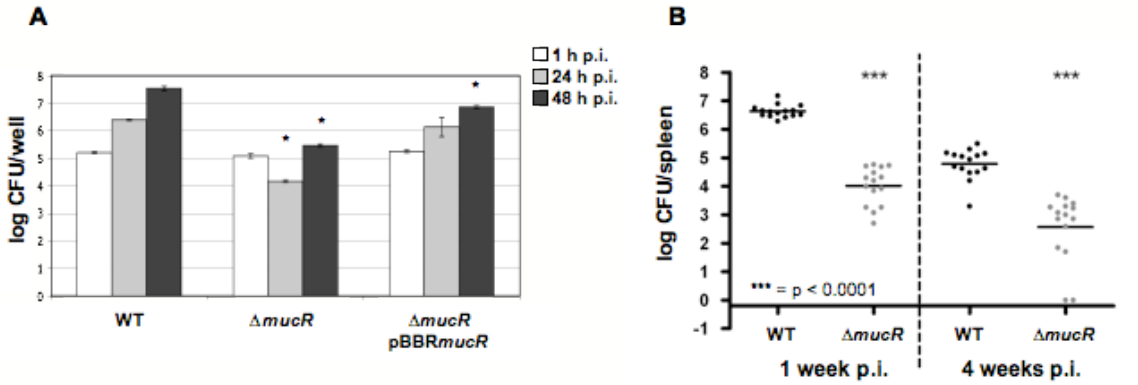


Figure 1. MucR is crucial for virulence of *Brucella melitensis* both in cellular and mice models of infection. **(A)** Intracellular replication of *B. melitensis* WT, Δ*mucR,* Δ*mucR* pBBR*mucR* strains in Raw 264.7 murine macrophages. Data are the averages of log number of colony-forming units (CFU) per well. Error bars represent the standard deviation of triplicates in one representative experiment (out of three). ANOVA I was used for statistical analysis after testing the homogeneity of variance (Bartlett test). Significant differences between the strains are shown by an asterisk ($p < 0.05$). **(B)** Virulence of *Brucella melitensis* WT and Δ*mucR* strains in the spleens of BALB/c mice. Graph represent pooled data of two independent experiment and indicate the log number of colony-forming units (CFU) per spleen in each mouse. The lines show the mean of log number of CFU in each group ($n = 15$). Statistical analysis were performed using a Mann-Whitney test ($p < 0.0001$).

The *mucR* mutant enters prematurely into the stationary phase in bacteriological culture

Because the above reported attenuation could be caused by an *in vitro* growth defect exacerbated in intracellular environments, we examined the growth of the Δ*mucR* and WT strains in rich 2YT broth. The Δ*mucR* mutant presented a growth rate similar to the WT until 22 h (log phase) (Figure 2). From this time point, the Δ*mucR* entered the transition and the stationary phase earlier, more abruptly and at a lower bacterial density as compared to the WT (Figure 2). One hypothesis could be that the Δ*mucR* is poorly adapted to cope with stresses linked to stationary phase and this would be relevant to the reduction of its virulence, as previously suggested for other *Brucella* mutants affected for their adaptation to the stationary phase (Roop *et al.*, 2003).

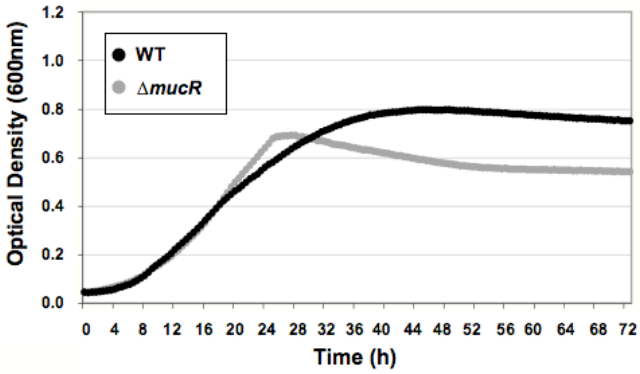


Figure 2. Growth curve of *B. melitensis* WT (black) and Δ*mucR* (grey) strains in 2YT rich medium. Cultures were inoculated at an initial $OD_{600} = 0.05$ in a Bioscreen plate from a preculture. Bacteria were grown for 72 h with continuous shaking in 2YT medium. Optical density is measured every 30 minutes. Graph represents the averaged OD on technical triplicate for each condition of one representative experiment (out of two).

The *mucR* mutant is more sensitive to H_2O_2, detergents and polymyxin B

Inherent to their intracellular lifestyle, *Brucella spp*. have to withstand various harsh environmental conditions including exposure to reactive oxygen species (ROS) and nutrient deprivation in their phagosomal compartment within host macrophages. The successful adaptation *Brucella* to these stresses has been correlated to the stationary-phase physiology (Roop *et al.*, 2003). Moreover, it has been shown in other bacteria that limited availability of nutrients associated with the entry in stationary phase triggers a general stress response which can be cross-protective against heat and oxidative challenges (Jenkins *et al.*, 1988; Nguyen *et al.*, 2011).

For this reason, we evaluated the ability of the Δ*mucR* mutant to resist exposure to exogenous hydrogen peroxide (H_2O_2). After one-hour exposure to various concentration of H_2O_2, the survival rates of the Δ*mucR* strain were significantly reduced as compared to the WT strain in the same conditions (Figure 3A). The sensitivity of Δ*mucR* to this oxidative exogenous stress was complemented *in trans* with the pBBR*mucR* plasmid (Figure 3A).

We further wondered if the *mucR* mutation generates sensitivity to other stresses. To assert this idea, we evaluated bacterial growth on media containing detergents like 0.1 % Triton X100 or 2 % sodium dodecyl sulfate (SDS). While these concentrations did not perturb the WT, the Δ*mucR* strain had an impaired growth/survival in presence of both detergents (Figure 3B). Furthermore, on medium containing 0.01 % Congo Red we observed that the Δ*mucR* strain retains much importantly the dye, appearing with a more intense dark spot (Figure 3B). All these inhibitions of growth or altered staining were restored by supplying *mucR* either on a plasmid or by knock in (KI) (Figure 3). Taken together, these observations suggested a major cell envelope alteration that affects susceptibility to these compounds in *B. melitensis* lacking *mucR*.

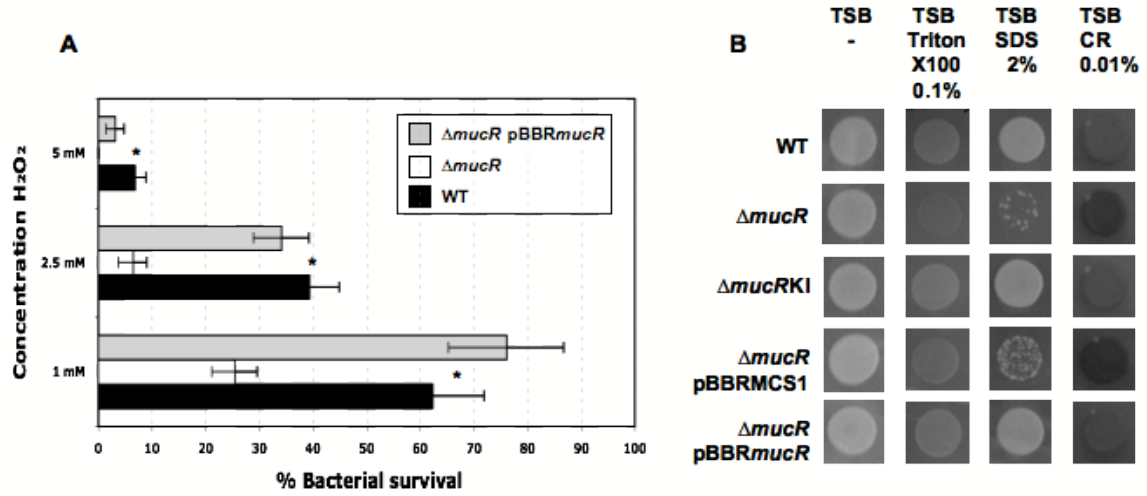


Figure 3. Sensitivity to oxidative stress and detergents. (A) Survival of *B. melitensis* WT (black bars), Δ*mucR* mutant (white bars) and Δ*mucR* pBBR*mucR* (grey bars) to various concentration of H_2O_2. Data are the averages of log number of colony-forming units (CFU) per well. Error bars represent the standard deviation of triplicates **(B)** Susceptibility to surfactants and Congo Red. Strains from an overnight preculture were spotted on TSB plates containing detergents 0.1% Triton X100, 2% SDS or 0.01% Congo Red (CR) in triplicates. Plates were incubated 4 days at 37 °C. Pictures shown one representative spot for each strain.

As envelope defect in *Brucella* had been related to sensitivity to antimicrobial peptides as polymyxin B (Sola-Landa *et al.*, 1998), we used polymyxin B E-test (Biomérieux) strip to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the polymyxin B for all strains. While WT showed a MIC of 64 units, the MIC for Δ*mucR* was 32 units. This result confirms the previous indications of an altered envelope for the Δ*mucR* strain.

The *mucR* mutant displays a LPS alteration

In brucellae, LPS is a major virulence factor and its alterations can impede the successful infection process in general (Lapaque *et al.*, 2005) and the resistance to antimicrobial compounds in particular (Velasco *et al.*, 2000). Like the WT, the Δ*mucR* strain was smooth as determined by crystal violet staining (data not shown and Figure 4). Nevertheless, in order to detect some subtle alterations of the LPS, we investigated the LPS migration pattern and the reactivity of the Δ*mucR* strain compared to the WT with anti-LPS monoclonal antibodies (MAbs). Figure 4A shows the SDS-PAGE profiles of SDS-proteinase K treated extracts of *B. melitensis* WT (lane 1) and Δ*mucR* mutant (lane 2) strains. As expected, both strains showed a similar migration pattern for their S-LPS. Similarly, their reactivity in Western blot with the anti-O antigen MAb A76/12G12/F12 was comparable (Figure 4B). However, the lipidA-core fraction of the Δ*mucR* mutant migrated faster than the corresponding WT fraction. This observation suggests a modification of the lipidA-core. This hypothesis was corroborated by differences in Western blot reactivity of the extracts with anti-core MAbs A68/24G12/A8 and A68/24D8/G9 (Figure 4B). Normal SDS-profile and epitope detection were restored by complementation *in trans* or by knock in (KI) with the *mucR* gene (Figure 4).

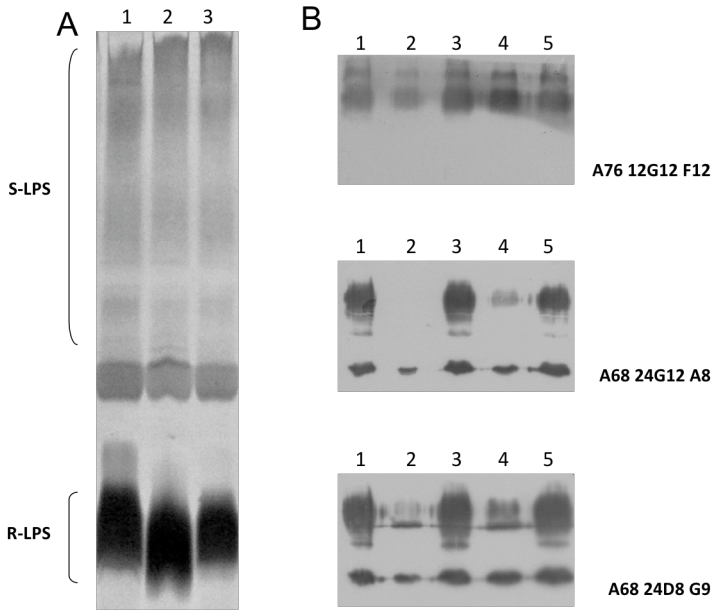


Figure 4. Modification of the LPS in the Δ*mucR* strain. (A) Silver staining of SDS-proteinase K treated extracts after electrophoresis on a 16 % acrylamide gel. Lane 1: WT, lane 2 : Δ*mucR* and lane 3: Δ*mucR* KI **(B)** Western blot with anti-LPS monoclonal antibodies (MAbs). Total extracts were separated on a 15 % acrylamide gel by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed using anti-O-antigen MAb A76/12G12/F12 and anti-core MAbs A68/24G12/A8 and A68/24D8/G9. Lane 1: WT, lane 2: Δ*mucR*, lane 3: Δ*mucR* KI*, lane 4:* Δ*mucR* pBBRMCS1 and lane 5: Δ*mucR pBBRmucR.*

The activity of the promoter of *mucR* is induced in 2YT containing 400 mM of NaCl, correlating with morphological alteration of *B. melitensis*.

We described previously that *Brucella* spp. forms bacterial aggregates with prolonged time of culture when grown in 2YT containing 400 mM NaCl (Mirabella *et al.*, 2012). Because MucR in *S. meliloti* regulates EPS-I biosynthesis (Keller *et al.*, 1995; Zhan *et al.*, 1989) and is somehow involved in environmental stress response (see figure 3) we wondered if MucR could be required for the formation of these bacterial clumps in *B. melitensis* 16M. The Δ*mucR* strain displayed a strong growth defect when placed in 2YT medium containing 400 mM NaCl (data not shown), suggesting that MucR is required to face optimally that hypersaline condition.
We used the *B. melitensis* strain carrying a reporter plasmid pBBRP*mucRgfp*(ASV) (see material and method) to monitor the activity of the *mucR* promoter (P*mucR)* in *B. melitensis* at different times of culture in 2YT supplemented or not with 400 mM NaCl. The *B. melitensis* strain carrying the promoterless vector pBBR-*gfp*(ASV) was used as a negative control. These strains displayed similar growth curves in both conditions (Figure 5A). Figure 5 (C to H) represents the intensity of the fluorescent signal measured by flow cytometry in the reporter strain at different times of culture in either 2YT or 2YT 400 mM NaCl. In 2YT (red curve), the activity of the P*mucR* is constitutive and gives a mean fluorescent channel intensity (MFI) of around 40-50, no matter what the time of culture considered (figure 5). In hypersaline condition (blue curve) the activity of the P*mucR* is induced from 8 h post-inoculation (MFI = 200) and then strongly enhanced along culture progression (MFI = 300, 1000, 1500 for 12, 24 and 48 h respectively). These data were confirmed by fluorescence microscopy (see inserts figure 5). Worth to notice is the progressive and major morphological change of the bacteria growing in such concentration of salt (see inserts figure 5). An equatorial bulge can be distinguished already after 8 h of growth in hypersaline 2YT (figure 5D). The subsequent increase of the bulge in the ongoing culture leads to an increase in the cell size that is also translated by a small shift of the MFI of the negative control (see green curve as compared to the violet one in figure 5). This cell shape alteration seems to be salt specific as it did not occur in isoosmolal conditions with sucrose (Supplementary figure S1). At equivalent osmolality, the NaCl-supplemented medium promotes cell shape alteration and a strong induction of P*mucR* activity compared to the cells grown in the sucrose supplemented one (figure S1). However, the fluorescent signal from cells grown for 24 h in sucrose-supplemented 2YT seems slightly increased compared to the one from cell grown in the classical 2YT medium (figure S1). Taken together, these data suggest that the promoter of *mucR* is induced by an osmotic stress but more strongly by an ionic one in *B. melitensis*.

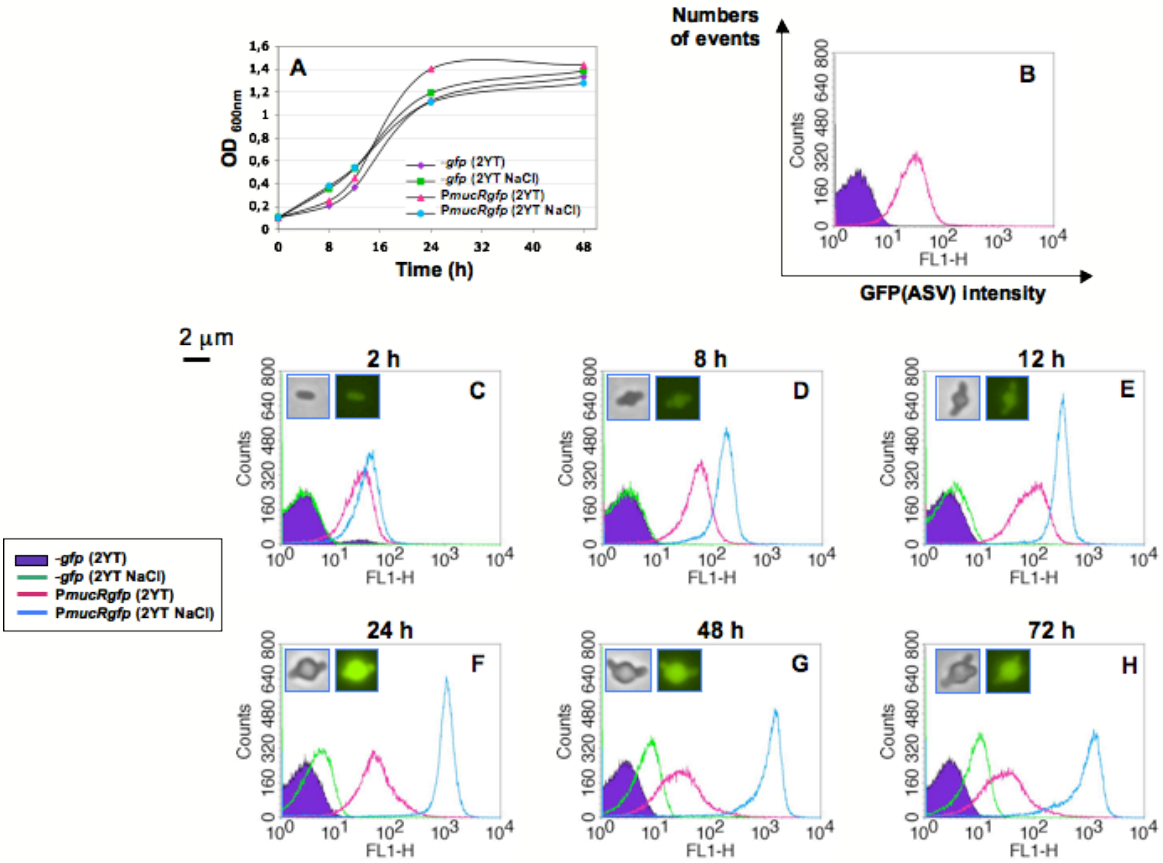


Figure 5 : The P*mucR* activity is induced in *B. melitensis* growing in 2YT containing 400 mM NaCl. (A) Growth curve of the reporter (*B. melitensis* WT expressing the transcriptional fusion P*mucRgfp*(ASV)) and the control (WT bearing the pBBR-*gfp*(ASV) plasmid) strains in both 2YT (85.5 mM NaCl) and 2YT containing 400 mM NaCl. **(B)** Fluorescence intensity measured by flow cytometry (5.10^4 events acquired) on *B. melitensis* WT expressing the transcriptional fusion P*mucRgfp*(ASV) at the end of preculture in 2YT. The WT bearing the pBBR-*gfp*(ASV) plasmid was used as negative control. Following graphs corresponds to the fluorescence intensity measured in the reporters strains growing in 2YT supplemented or not with 314.5 mM NaCl at **(C)** 2 h, **(D)** 8 h, **(E)** 12 h, **(F)** 24 h, **(G)** 48 h and **(H)** 72 h of culture. The inserts are phase contrast and corresponding fluorescent pictures of the major morphotype of the reporter strain in 2YT containing 400 mM NaCl at the indicated time. Scale bar, 2 µm

MucR regulates cyclic-β glucan synthase mRNA abundance

The various susceptibilities reported above suggest a major cell envelope alteration in *B. melitensis* lacking *mucR*. Susceptibility to detergents (deoxycholic acid, SDS, Zwittergent) was already described for a *cgs B. abortus* mutant which was unable to produce periplasmic cyclic-β-glucans (cβG) (Briones *et al.*, 2001). In order to know if MucR could transcriptionally regulate the level of cβG, the relative abundance of *cgs* (encoding the cβG synthase) and *cgt* (encoding the cβG transporter) mRNA were evaluated by qRT-PCR on RNA purified from the different strains harvested during the exponential growth phase (OD_{600} = 0.5) in 2YT. While deletion of *mucR* does not affect the abundance of *cgt* transcripts, we found a nearly two-fold reduced quantity of *cgs* transcripts in the Δ*mucR* compared with the WT (table 2). WT levels of *cgs* mRNA was restored by the presence of a complementation plasmid pBBR*mucR* (table 2). Although further investigations are needed, these results suggest that MucR could be the first regulator of cβG identified in *B. melitensis* 16M.

	Locus tag	ratio Δ*mucR*/wt	ratio Δ*mucR* pBBR*mucR*/WT
fliC	BMEII0150	4.62	0.95
flgE	BMEII0159	3.78	0.96
ftcR	BMEII0158	4.45	1.35
fliF	BMEII0151	6.81	1.69
cgs	BMEI1837	0.55	0.96

Table 2. MucR regulates the mRNA abundance of flagellar and cyclic β glucan synthase genes. The relative abundance of *cgs*, *fliC*, *flgE*, and *ftcR* and *fliF* mRNAs was determined by quantitative Real-Time PCR on RNA isolated from bacteria harvested at the mid exponential phase of growth in rich medium (2YT). Normalization was performed with 16S rRNA. Fold change ratio was averaged from biological triplicates. ANOVA I on ΔCT values from the biological triplicate was used for statistical analysis after testing the homogeneity of variance (Bartlett test). A Scheffe's comparison test was performed and statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Restoration of EPSI production in *Sinorhizobium meliloti mucR* mutant through constitutive expression of *B. melitensis mucR*

The *mucR* gene is well conserved within Rhizobiales notably in *S. meliloti* (61 % amino acids identity), where its function was well investigated. In *S. meliloti*, MucR is described as a regulator of both flagellar genes expression and of exopolysaccharide (EPS) synthesis (Bahlawane *et al.*, 2008b). *S. meliloti* produces two differents EPS : succinoglycan, first described as calcofluor-binding acidic exopolysaccharide (EPSI) and galactoglucan (EPSII). Strains producing one or the other EPS can be rapidly discriminated on agar medium containing calcofluor under UV light (Zhan *et al.*, 1989). In standard laboratory conditions, both wild-type strains Rm1021 and Rm2011 produce EPSI and appear fluorescent on calcofluor containing medium as opposed to EPSI-non producing strains (Rm1021 *exoY*:Tn5) (figure 6). *S. meliloti mucR* mutant (Rm101) forms colonies which are more mucoïd and lack the blue-green color characteristic of EPSI-producing strains (Keller *et al.*, 1995; Zhan *et al.*, 1989) (figure 6). We observed that the constitutive expression of $mucR_{Bm}$ in the *S. meliloti* Rm101 background restored the production of EPSI (figure 6). This data suggested that the *mucR* gene of *B. melitensis* 16M encodes a fully functional protein at least able to regulate the expression of EPS-biosynthesis genes in *S. meliloti*.

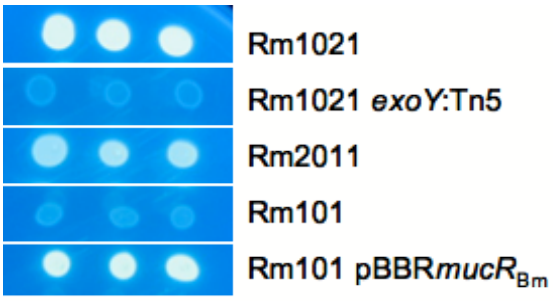


Figure 6. Heterospecific complementation of *S. meliloti mucR* mutant with the *mucR* gene from *B. melitensis* on LB plate containing Calcofluor. The strains Rm1021 (wild-type), Rm1021 *exoY*:Tn5 (EPSI non-producing strain) , Rm2011 (wild-type), Rm101 (*mucR* mutant), Rm101 pBBR$mucR_{Bm}$ (*mucR* mutant carrying the wild-type *mucR* gene of *B. melitensis* 16M) were spotted in triplicate on LB medium containing 0.02% calcofluor and incubated at 30°C for 2 days before subjected to UV-light.

MucR repressed flagellar proteins expression through mRNA level modulation

In addition to regulate EPS production, MucR is also a regulator of flagellar genes expression in *S. meliloti*. Indeed, it has been shown that MucR inhibit *rem* expression, the flagellar master regulator (Rotter *et al.*, 2006) and consequently the expression of *rem*-regulated genes (Bahlawane *et al.*, 2008b). Our lab has shown previously that the *Brucella* flagellar master regulator is orthologous to Rem (Leonard *et al.*, 2007). We therefore examined the putative impact of MucR on flagellar regulation in *B. melitensis* 16M. Even if described as non-motile, *Brucella spp*. possess flagellar genes which are expressed only in the early log phase of growth in rich medium (Fretin *et al.*, 2005). Using specific antibodies against FliC (flagellin), we looked for expression of this protein in different growth phase in the *mucR* mutant as compared to the WT strain (figure 7A). We detect FliC not only at the beginning of log phase of growth as in the WT strain but also in the stationary phase when the protein is no more present in the WT background. Similar results were obtained for FlgE, the hook monomer (data not shown). Complementation of *mucR in trans* restored the WT phenotype for both FlgE and FliC (figure 7B-C). This result indicates that MucR could also be a repressor of flagellar genes expression in *B. melitensis* 16M.

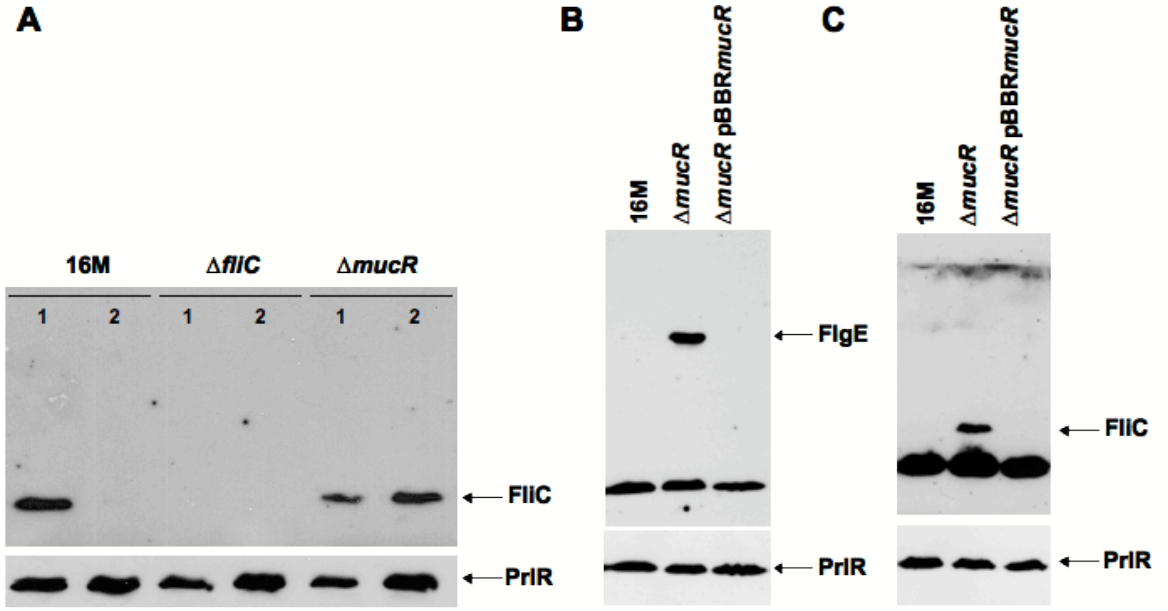


Figure 7 . Western blot for the detection of flagellar proteins FliC and FlgE. (A) Detection of flagellin (FliC) production in *B. melitensis* WT, Δ*fliC* and Δ*mucR* strains in both early log phase and stationary phase. The strains were cultivated in 2YT broth, and extracts were prepared from samples harvested at the beginning of the exponential phase of growth (OD_{600} of 0.2) (lanes 1) and in the stationary phase ($OD_{600}$of 1.0) (lanes 2). **(B)** FlgE or FliC **(C)** expression in the Δ*mucR* mutant in stationary phase. Complementation of *mucR in trans* restored the WT phenotype for both FlgE and FliC. The strains were cultivated in 2YT broth, and extracts were prepared from samples harvested in the stationary phase (OD_{600} of 1.0).Total extracts were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with FlgE-specific or FliC-specific antiserum. A polyclonal antibody anti-PrlR was used as a loading control. The PrlR protein was shown to be constitutively expressed regardless of the growth phase in 2YT medium.

In order to confirm this hypothesis, relative abundance of *fliC (flagellin)*, *flgE (hook monomer)*, *fliF (MS ring monomer) and ftcR (master regulator)* mRNAs were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) on RNA extracted from the different strains harvested during the exponential growth phase (OD_{600} = 0.5) in 2YT medium. We found that deletion of *mucR* results in significant increase in the abundance of all tested mRNA compared with the WT including the RNA corresponding to the master regulator FtcR (table 2). For each mRNA, wild-type levels were restored by complementation of the Δ*mucR* (table 2). Taken together, these results clearly indicate that *B. melitensis* MucR, as in *S. meliloti,* is a regulator acting upstream of the master flagellar regulator FtcR, the ortholog of Rem.

MucR autoregulates negatively its transcription

In *S. meliloti*, MucR negatively regulates its own transcription (Bertram-Drogatz *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1995). To pinpoint a potentially similar self-regulation, the activity of the *mucR* promoter (P*mucR*) was monitored in *B. melitensis* WT, Δ*mucR and* Δ*mucR*KI strains. All the strains carrying the pBBRP*mucRgfp*(ASV) plasmid were grown in 2YT and GFP(ASV) fluorescence intensity was measured by flow cytometry at different time points. Figure 8 shows fluorescence signals measured by flow cytometry (left panel) and representative epifluorescence micrographies (right panel) of the different strains in the mid-log phase of growth. Similar results were obtained for each sampling time (data not shown). MFI of the Δ*mucR* mutant was higher (MFI = 350) compared to the WT (MFI = 45) or the corresponding complemented mutant Δ*mucR*KI (MFI = 30) (figure 8, left panel). The *B. melitensis* strain carrying the vector pBBR-*gfp*(ASV) was used as a negative control. P*mucR* is strongly induced when *Brucella* lacks *mucR gene* indicating that MucR regulates negatively its own transcription in *B. melitensis* 16M.

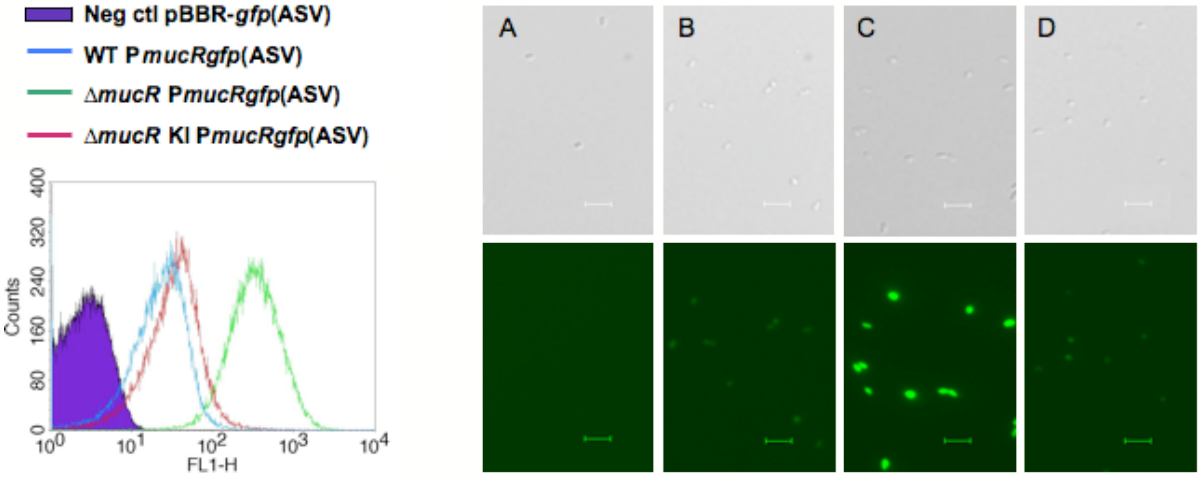


Figure 8. MucR negatively autoregulates its own transcription. Left Panel. Fluorescence intensity measured by flow cytometry (5.10^4 events acquired) on *B. melitensis* WT, Δ*mucR and* Δ*mucR*KI expressing the transcriptional fusion P*mucRgfp*(ASV) in mid-log phase of culture in 2YT medium. WT bearing the pBBR-*gfp*(ASV) plasmid was used as negative control. **Right panel.** DIC (above) and corresponding fluorescence (bottom) pictures. (A) WT pBBR-*gfp*(ASV) (B) WT pBBRP*mucRgfp*(ASV) (C) Δ*mucR* pBBRP*mucRgfp*(ASV) (D) Δ*mucR*KI pBBRP*mucRgfp*(ASV). Scale bars, 3 μm.

Discussion

In this study, we report the extensive characterization of an in frame deletion mutant of *B. melitensis mucR*. This gene was previously identified as necessary for virulence in a screen of transpositional mutants of *B. melitensis* but left uncharacterized (Wu *et al.*, 2006). Our study confirmed the attenuation in both cellular and murine infection models but also pointed to a deficient intracellular survival rather than to a deficit in cellular invasion as a plausible explanation for the attenuation.
In addition to the reduced virulence, the Δ*mucR* strain exhibits pleiotropic phenotypes that were complemented and that we discuss hereunder and tentatively correlate with the attenuation of the Δ*mucR* strain.

B. melitensis MucR is a functional ortholog of the *S. meliloti* MucR

The *mucR* gene is highly conserved in Rhizobiales (Bouhouche *et al.*, 2000) and encodes a protein predicted to contain a zinc finger motif of the C_2H_2-type. Zinc finger proteins include DNA binding proteins able to bind a zinc ion in a conserved structure (e. g. through cysteine and histidine amino acids) (Berg, 1990). In all the bacteria in which MucR orthologs have been characterized, this regulator controls various cell envelope modifications with a common theme of exopolysaccharides synthesis and altered host/bacteria interaction (Bittinger & Handelsman, 2000; Janczarek & Skorupska, 2007; Janczarek *et al.*, 2010). In *S. meliloti*, where MucR (61 % identity with *B. melitensis* MucR) has been the most deeply investigated, this regulator couples the regulation of motility and EPS production (Bahlawane *et al.*, 2008b). *S. meliloti* MucR protein appears to be highly specific for its own DNA recognition sequence as it does not bind to sites recognized by Ros, the orthologous regulator of *Agrobacterium tumefaciens* (61 % identity with *B. melitensis* MucR) (Bertram-Drogatz *et al.*, 1997; Close *et al.*, 1985). By contrast, as shown on calcofluor plates (figure 6), the constitutive expression of *B. melitensis mucR* gene in the *mucR* mutant of *S. meliloti* (Rm101) was able to restore the EPSI (succinoglycan) production. This heterospecific complementation experiment suggested that the *mucR* gene of *B. melitensis* 16M encodes a functional protein able to recognize MucR-targeted specific promoter sequences, at least in the promoter(s) regulating the expression of EPS-biosynthesis genes in *S. meliloti*.

B. melitensis MucR also controls flagellar genes expression and the formation of the aggregative phenotype

Our results indicate clearly that MucR of *B. melitensis* is also a repressor of flagellar gene expression likely acting upstream of FtcR, the flagellar master regulator orthologous of Rem (Leonard *et al.*, 2007) through which MucR of *S. meliloti* is acting (Bahlawane *et al.*, 2008b; Rotter *et al.*, 2006). In *B. melitensis* 16M, flagellar genes expression is very tightly regulated since quorum sensing (QS) regulators VjbR (Delrue *et al.*, 2005), sigma factors *rpoEI* (Delory *et al.*, 2006; Ferooz *et al.*, 2011a) and *rpoH2* (Delory *et al.*, 2006) and the cyclic-di-GMP phosphodiesterase BpdA (Petersen *et al.*, 2011) have already been involved in the flagellar regulation. Here, we describe that MucR is an additional actor within this complex regulatory network. According to the previous transcriptomic analysis, *mucR* expression is under the control of QS regulators (Uzureau *et al.*, 2010). We confirmed this

data by qRT-PCR with RNA extracts from Δ*vjbR* and WT strains at the end of log phase in rich medium (data not shown). This indicates that VjbR represses *mucR* expression allowing the expression of *ftcR* and subsequently of the flagellar genes. Together these results support the hypothesis of MucR is playing an intermediate role between VjbR and the regulation of flagellar genes expression.

It was previously reported that *B. melitensis* QS mutants form bacterial aggregates in 2YT medium (Godefroid *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2007). Moreover, recently we described a peculiar growth condition (2YT 400 mM NaCl for 72 h) in which *B. melitensis* WT also presents a similar aggregative phenotype (Mirabella *et al.*, 2012). This biofilm-related behaviour could result from EPS production and/or from a modification of the envelope/surface properties. Because of the functional conservation of *mucR* between *S. meliloti* and *B. melitensis* and because MucR in *S. meliloti* regulates EPS-I biosynthesis (see figure 6) (Keller *et al.*, 1995; Zhan *et al.*, 1989) we wondered if MucR could be involved in the formation of bacterial clumps in *B. melitensis* 16M. Unfortunately, the Δ*mucR* strain displays a growth defect in hypersaline medium. Therefore, the absence of clumps in culture could be due to poor growth or to the inability to properly respond to hypersaline stress. These data are in agreement with the strong induction of the promoter P*mucR* by an ionic stress that reinforced the idea that MucR is necessary to face optimally the hypersaline stress and could be required to promote aggregation. In this context, we showed that a strain overexpressing *mucR* in contrast to the WT developed bacterial aggregates when grown in standard 2YT medium for 72 h (Supplementary figure S2) indicating that MucR could actually be involved in clumps formation.
The aggregative phenotype of the strain overexpressing *mucR*, the cell envelope modifications of the Δ*mucR* mutant and the activation of the flagellar genes in the same mutant appears as coordinated phenotypes that are reminiscent of the paradigmatic transition from a “planktonic” to a “sessile” form of life which often implies an inversely coordinated expression of both surface polysaccharidic components and of the flagellar apparatus (Bahlawane *et al.*, 2008b; Merritt *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2004; Yeung *et al.*, 2009).

Altogether, the negative autoregulation (see figure 8), the negative impact on both flagellar mRNA and proteins abundance (figure 7, table 2) and the ability to make aggregates (figure S2, figure 6) seems to be conserved between *S. meliloti* and *B. melitensis* MucR possibly through a similar DNA binding site. This reinforced the idea that these bacterial species have evolved from a common ancestor and shared molecular mechanisms for the interaction with their respective hosts (Batut *et al.*, 2004; Bellefontaine *et al.*, 2002). Worth to notice is that with the induction of P*mucR* by the ionic stress and in a lesser extend by the osmotic one, we highlighted for the first time factors affecting the expression of the autoregulated *mucR* gene in an α-proteobacterium.

The *mucR* mutant has an altered growth curve and a exacerbated sensitivity to oxidative stress

Despite having the same lag phase and a similar growth rate in rich medium *in vitro*, the Δ*mucR* strain enters in the stationary phase much earlier (thus at a lower OD_{600}) than the

WT strain. As already demonstrated in *B. abortus hfq* mutant the stationary-phase physiology plays an important role in the capacity of *brucellae* to establish and maintain long term intracellular residence in host macrophages (Robertson & Roop, 1999) but probably also to cope with the stresses of the early non replicative phase (the 10 first hours) of the intracellular infection (Barbier *et al.*, 2011). A common feature for all these conditions is the exposure to oxidative stress either by accumulation of endogenous oxygen radicals (Dukan & Nystrom, 1999; Gonzalez-Flecha & Demple, 1995; Steele *et al.*, 2010) or following the oxidative burst inside infected macrophages (Jiang *et al.*, 1993). Based on unpublished microarrays analysis, the involvement of *mucR* in stress response mechanisms was already suggested in *B. melitensis* (Arenas-Gamboa *et al.*, 2011). Consistent with this hypothesis, we showed a strongly increased sensitivity of the Δ*mucR* to exogenous oxidative stress compared with the WT. This feature could partially explain the 2-log decrease in survival that we and other described in macrophages (figure 1) (Wu *et al.*, 2006) and that we also saw in HeLa cells.

Δ*mucR* sensitivity to detergent and cationic peptide correlated with cell envelope alteration.

In addition to the oxidative stress sensitivity, an increased susceptibility to detergents (SDS, Triton) and polymyxin B was also observed with the Δ*mucR* strain. These observations and the altered staining of the mutant colonies with Congo Red suggested a major cell surface alteration in this *B. melitensis* mutant. A link between reduced virulence and sensitivity to detergents was also observed in the *B. abortus* mutant for the cyclic-β-glucans synthase (*cgs*) (Briones *et al.*, 2001) and for the *bvrR/bvrS* two-component system (TCS) which is also more sensitive to bactericidal polycationic substances (polymyxin B, melittin, poly-L-lysine) (Sola-Landa *et al.*, 1998). Mutants in this latter system have a severely altered cell envelope including lipid A modification (Lamontagne *et al.*, 2007; Manterola *et al.*, 2005; Viadas *et al.*, 2010).
In line with the detergent susceptibility assays, our qRT-PCR data suggest that MucR positively regulated the *B. melitensis* cyclic glucan synthase (*cgs*). Unfortunatly we were unable to show a modification of Cgs protein expression by Western blotting using a previously described antibody (Ciocchini *et al.*, 2004) as the antibody only give a positive signal in *cgs* overexpressing strain (Comerci D., personal communication).
Further investigations would be necessary to test whether or not there is a change in cyclic β-glucan production in the different strains. If ascertained MucR could be the first regulator of *cgs* identified in brucellae.

In conclusion, the conserved MucR regulator is proposed to play multiple roles in *B. melitensis* 16M, controlling growth in bacteriological medium, virulence in macrophages and mice, flagellar expression, aggregation and homeostasis of the cell envelope. Interestingly, in *B. abortus* 2308, MucR (100 % amino acid identity with *B. melitensis*) was very recently found (Caswell & Roop, personal communication) to be involved in virulence (in macrophage and spleen colonization in mice) and in growth in bacteriological medium, illustrating similarities between these two *Brucella* strains regarding the role of MucR. Moreover, the auto-regulation of *mucR* exists also in *B. abortus* as MucR was shown by EMSA to bind its own promoter (100 % nucleotides identity with *B. melitensis*) (Caswell & Roop, personal communication). In *B. abortus*

2308, MucR is controlling the expression of several transcriptional regulators, such as *babR* and *nolR* (Caswell & Roop, personal communication), suggesting that it could coordinate expression of several regulons, which would explain the pleiotropic phenotype of the *mucR* mutants.

Interestingly we have identified a probable alteration of the core-lipid A structure in the *B. melitensis* Δ*mucR* mutant. In fact, in Western blot, anti-core MAbs have a modified staining pattern in the Δ*mucR* background as compared to the WT or the complemented mutants. Interestingly the recognition of the free (not linked to the O-chain) core-lipid A structure is far less altered than the recognition of the O-chain linked core (figure 4B). Surprisingly, The *B. abortus* Δ*mucR* mutant is rough (by crystal violet staining) and this phenotype is complemented (Caswell & Roop, personal communication). On the contrary the *B. melitensis* 16M Δ*mucR* mutant reported here remains smooth, illustrating that, regarding MucR functions, remarkable differences could be found between *Brucella* strains that are worth to be investigated. These differences in phenotype could probably be linked to still unidentified differences in the core from these closely related species (González *et al.*, 2008). For example, differences in negative charge in the core-lipid A (Velasco *et al.*, 2000) that can also account for the difference in resistance to polymyxin B between *B. abortus* and *B. melitensis* (Farrell & Robertson, 1967). This impact of MucR on the core-lipid A has never been reported in previously studied α-proteobacteria and could be a more general compensatory mechanism allowing the bacteria to adapt to an altered envelope homeostasis (Hozbor *et al.*, 2004). Alternatively as MucR function is suspected to be interwoven into the cell cycle regulatory circuitry of *Caulobacter crescentus* (P. Viollier personnal communication), its differential impact on the envelope of the two sibling cells is worth to investigate in other asymmetrically dividing α-proteobacteria (Hallez *et al.*, 2004). This opens a new avenue to decipher why, how (directly or indirectly through other induced membrane changes) and in which part of the bacterial life cycle the lipid A-core structure has to be modulated.

Supplementary data

Supplementary table 1 : Primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')
P*mucR*F	CCGGAAATGTCCGATGCGAGTTGTTTTCCATG
P*mucR*R	GAAGATCTTCGGAATTCCGCAGCGGCTGACAATGGC
T*mucR*F	GGAATTCCGAAGATCTTCCTTCAGCGCGTGAATCAC
T*mucR*R	CAAACGGGAATCACATGATGCAGGCCACACTG
mucR upstream	CGCATTTTCAGCTGTGAC
mucR dowstream	CCGTGTATGAATGACATC
mucR XhoI F	CTCGAGGATGGAAAATCTGGAAACG
mucR ClaI R	ATCGATTCAGGCGTCCTTCGGCTT
XhoI*pmucR*R	CTCGAGCCTCCTTTTTTAATTTTTTGTTGTCC
BamHI*pmucR*F	GGATCCAGGAAGAGGGCGTAGGAA

Supplementary table 2 : Primers used for qRT-PCR.

ORF	**Forward** (5'-3')	**Reverse** (5'-3')
fliC (BMEII0150)	CTTCGTACAATCGTTCCGGT	CCATGGTCTTCGCATCAGT
flgE (BMEII0159)	TTCCGTGAACGCTGC	GAAACGAGATCGCCCGT
ftcR (BMEII0158)	GCCGCATTCTGGAATATCTGAT	AATGCCGTAAATCGCACTAAAAA
fliF (BMEII0151-0152)	CCTACGAGACGCTCTATGTCG	AAGGGAATGCCAGCTTCAC
mucR(BMEI1364)	ATGACGACTATATTGTCTGCCTTG	TCATGTTGTAATGGGTCACCAG
cgs (BMEI1837)	GCCGATCAGAAACAGGCG	TTCCCACTGGTGCCTTGC
cgt (BMEI0984)	CAATGTTTCGGTGGTGCAGA	TTTCGAGGTTCTTGGCGTAATC

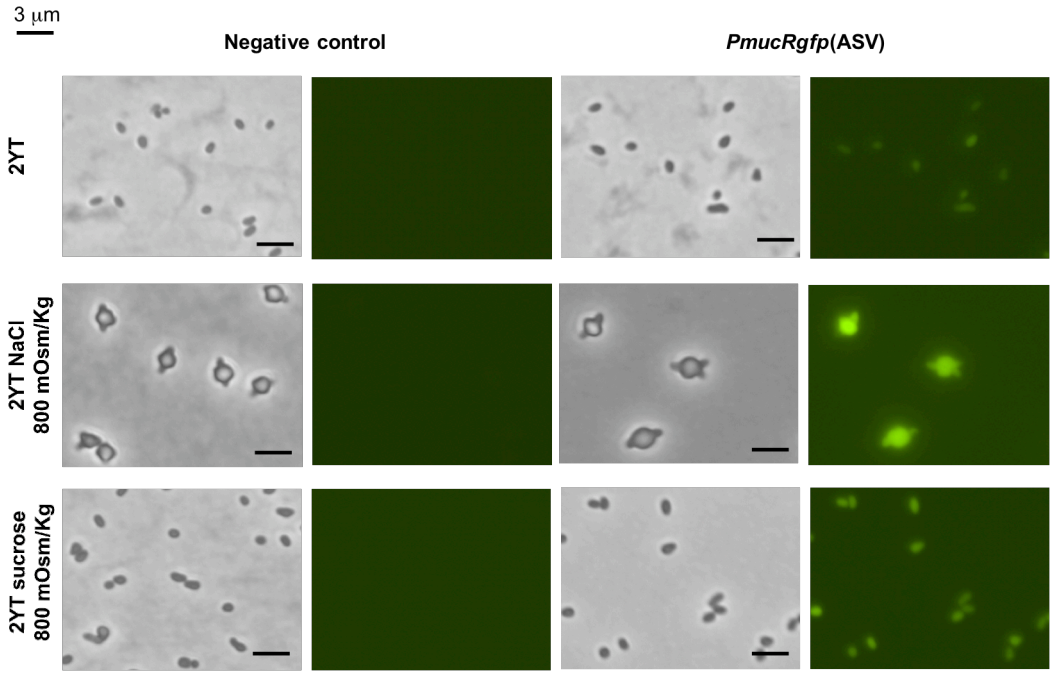


Figure S1. Induction of the P*mucR* activity in response to osmotic and saline stress. Representative micrographs of bacterial strains in phase contrast and corresponding fluorescence pictures on *B. melitensis* WT expressing the transcriptional fusion P*mucRgfp*(ASV). The WT bearing the pBBR-*gfp*(ASV) plasmid was used as negative control. Reporter and control strains were cultivated for 24 h in 2YT, 2YT supplemented with 314.5 mM NaCl or 2YT supplemented with 628.9 mM sucrose. The concentration of sucrose added in the medium were calculated to reach the same osmolality (800 mosmol kg^{-1} taking into account only NaCl and sucrose). Cells were observed on agarose pad in phase contrast and epifluorescence microscopy. For a equivalent osmolality, the NaCl-supplemented medium promotes cell shape alteration and a strong induction of P*mucR* activity which is much lower in unchanged cells grown in the sucrose-supplemented one. Scale bars, 3 µm.

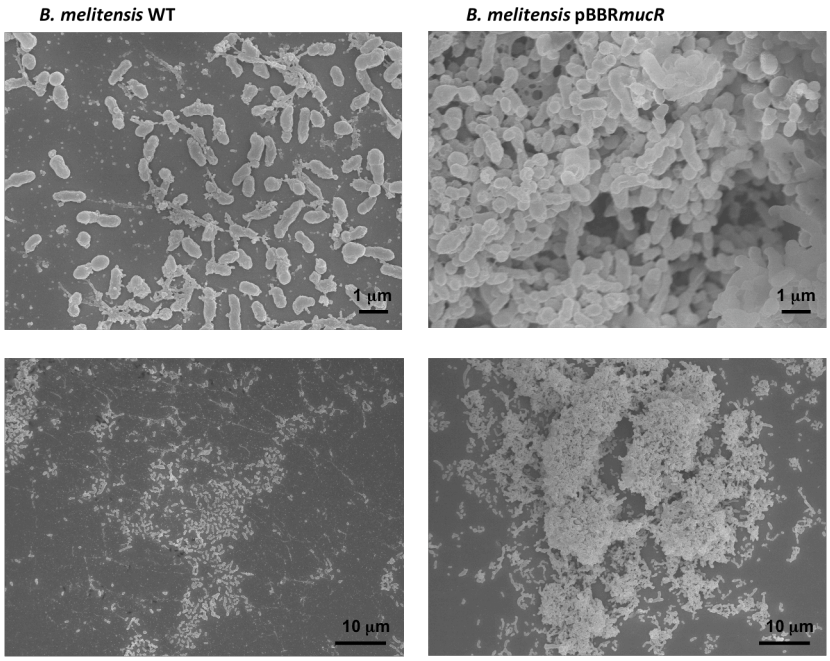


Figure S2 : Scanning electron micrographs of *B. melitensis* WT and *B. melitensis* pBBR*mucR* after 72 h of culture in 2YT liquid medium. One ml of bacterial suspension was centrifuged on poly-L-lysine-coated coverslip and fixed with PFA 2 % in PBS buffer. Pictures represent free or clumping bacteria at 8500 X magnication (upper, scale bars: 1 µm) and 1500 X magnication (below, scale bars: 10 µm).

Acknowledgments

We thank A. Becker (CeBiTec) and G. Walker (MIT) for providing *S. meliloti* strains. We are grateful to C. Didembourg for helpful technical assistance. Part of this work has been granted by an ARC Convention from the French community of Belgium (N° 08/13-015). Mirabella A. holds a specialization grant from FRIA (Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture).

Reference

Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjorn, S. P., Givskov, M. & Molin, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2240-2246.

Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I. & Gorvel, J.-P. (2005). Cyclic β-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**, 618-625.

Arenas-Gamboa, A. M., Rice-Ficht, A. C., Kahl-McDonagh, M. M. & Ficht, T. A. (2011). Protective efficacy and safety of *Brucella melitensis* 16MDelta*mucR* against intraperitoneal and aerosol challenge in BALB/c mice. *Infect Immun* **79**, 3653-3658.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D.E. Moore, J.G. Seidmann, J.A. Smith and K. Struhl (1991). *Current protocols in molecular biology.* New York, NY.

Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E. & Becker, A. (2008). *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1498-1509.

Barbier, T., Nicolas, C. & Letesson, J. J. (2011). *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Lett* **585**, 2929-2934.

Batut, J., Andersson, S. G. E. & O'callaghan, D. (2004). The evolution of chronic infection strategies in the α-proteobacteria. *Nat Rev Micro* **2**, 933-945.

Becker, A., Ruberg, S., Kuster, H., Roxlau, A. A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H. P., Walker, G. C. & Puhler, A. (1997). The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J Bacteriol* **179**, 1375-1384.

Bélanger, L., Dimmick, K. A., Fleming, J. S. & Charles, T. C. (2009). Null mutations in *Sinorhizobium meliloti exoS* and *chvI* demonstrate the importance of this two-component regulatory system for symbiosis. *Molecular Microbiology* **74**, 1223-1237.

Bellefontaine, A. F., Pierreux, C. E., Mertens, P., Vandenhaute, J., Letesson, J. J. & 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**, 945-960.

Berg, J. M. (1990). Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *J Biol Chem* **265**, 6513-6516.

Bertram-Drogatz, P. A., Ruberg, S., Becker, A. & Puhler, A. (1997). The regulatory protein MucR binds to a short DNA region located upstream of the *mucR* coding region in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* **254**, 529-538.

Bertram-Drogatz, P. A., Quester, I., Becker, A. & 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**, 433-441.

Bittinger, M. A. & Handelsman, J. (2000). Identification of genes in the RosR regulon of *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **182**, 1706-1713.

Bouhouche, N., Syvanen, M. & Kado, C. I. (2000). The origin of prokaryotic C_2H_2 zinc finger regulators. *Trends Microbiol* **8**, 77-81.

Bowden, R. A., Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Bernard, S. & Dubray, G. (1995). Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun* **63**, 3945-3952.

Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P. S. & 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**, 4528-4535.

Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M. & Dénarié, J. (1979). Identification and characterization of large plasmid in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *Microbiology* **113**, 229-242.

Cheng, H. P. & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol* **180**, 20-26.

Ciocchini, A. E., Roset, M. S., Inon de Iannino, N. & Ugalde, R. A. (2004). Membrane topology analysis of cyclic glucan synthase, a virulence determinant of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **186**, 7205-7213.

Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Nicolle, J. C., Dubray, G. & 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**, 1211-1219.

Close, T. J., Tait, R. C. & Kado, C. I. (1985). Regulation of Ti plasmid virulence genes by a chromosomal locus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **164**, 774-781.

Delory, M., Hallez, R., Letesson, J. & 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**, 7707-7710.

Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrate, P. & other authors (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**, 487-497.

Delrue, R. M., Deschamps, C., Leonard, S. & other authors (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* **7**, 1151-1161.

Doherty, D., Leigh, J. A., Glazebrook, J. & Walker, G. C. (1988). *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *J Bacteriol* **170**, 4249-4256.

Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1991). Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**, 4310-4317.

Dukan, S. & Nystrom, T. (1999). Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **274**, 26027-26032.

Farrell, I. D. & Robertson, L. (1967). The sensitivity of the biotypes of *Brucella abortus* to three antibiotics used in selective media, and the description of a new biotype. *J Hyg (Lond)* **65**, 165-172.

Fernandez-Prada, C. M., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Schurig, G. G., Hadfield, T. L. & Hoover, D. L. (2001). Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **69**, 4407-4416.

Fernandez-Prada, C. M., Zelazowska, E. B., Nikolich, M., Hadfield, T. L., Roop, R. M., 2nd, Robertson, G. L. & Hoover, D. L. (2003). Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* **71**, 2110-2119.

Ferooz, J., Lemaire, J., Delory, M., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2011). RpoE1, an extracytoplasmic function sigma factor, is a repressor of the flagellar system in *Brucella melitensis*. *Microbiology* **157**, 1263-1268.

Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S. & other authors (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* **7**, 687-698.

Garin-Bastuji, B., Bowden, R. A., Dubray, G. & Limet, J. N. (1990). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* **28**, 2169-2174.

Gibson, K. E., Campbell, G. R., Lloret, J. & Walker, G. C. (2006). CbrA is a stationary-phase regulator of cell surface physiology and legume symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**, 4508-4521.

Glazebrook, J. & Walker, G. (1989). A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* **56**, 661-672.

Godefroid, M., Svensson, M. V., Cambier, P., Uzureau, S., Mirabella, A., De Bolle, X., Van Cutsem, P., Widmalm, G. & Letesson, J.-J. (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **59**, 364-377.

González, D., Grilló, M.-J., De Miguel, M.-J. & other authors (2008). Brucellosis Vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* Lipopolysaccharide Rough Mutants Defective in Core and O-Polysaccharide Synthesis and Export. *PLoS ONE* **3**, e2760.

Gonzalez-Flecha, B. & Demple, B. (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 13681-13687.

Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A. & other authors (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 USA* **99**, 12375-12380.

Hallez, R., Bellefontaine, A. F., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2004). Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**, 361-365.

Hozbor, D. F., Pich Otero, A. J., Lodeiro, A. R., Del Papa, M. F., Pistorio, M. & Lagares, A. (2004). The symbiotic defect in a *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant can be overcome by expression of other surface polysaccharides. *Res Microbiol* **155**, 855-860.

Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**, 111-120.

Janczarek, M. & Skorupska, A. (2007). The *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 867-881.

Janczarek, M., Kutkowska, J., Piersiak, T. & Skorupska, A. (2010). *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* rosR is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Microbiology* **10**, 284.

Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int J Mol Sci* **12**, 7898-7933.

Jenkins, D. E., Schultz, J. E. & Matin, A. (1988). Starvation-induced cross protection against heat or H_2O_2 challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**, 3910-3914.

Jiang, X., Leonard, B., Benson, R. & Baldwin, C. L. (1993). Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* **151**, 309-319.

Jubier-Maurin, V., Rodrigue, A., Ouahrani-Bettache, S., Layssac, M., Mandrand-Berthelot, M. A., Kohler, S. & Liautard, J. P. (2001). Identification of the *nik* gene cluster of *Brucella suis*: regulation and contribution to urease activity. *J Bacteriol* **183**, 426-434.

Keating, D. H. (2007). The *Sinorhizobium meliloti* ExoR protein is required for the downregulation of *lpsS* transcription and succinoglycan biosynthesis in response to divalent cations. *FEMS Microbiol Lett* **267**, 23-29.

Keller, M., Roxlau, A., Weng, W. M., Schmidt, M., Quandt, J., Niehaus, K., Jording, D., Arnold, W. & Puhler, A. (1995). Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 267-277.

Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-802.

Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E. & other authors (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res* **6**, 1519-1529.

Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* **8**, 60-66.

Leigh, J. A., Signer, E. R. & Walker, G. C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6231-6235.

Leonard, S., Ferooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X. & 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**, 131-141.

Lestrate, P., Dricot, A., Delrue, R., Lambert, C., Martinelli, V., De Bolle, X., Letesson, J. & Tibor, A. (2003). Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun* **71**, 7053-7060.

Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D., Koch, M., Howe, J., Brandenburg, K. & 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**, 5631-5639.

McIntosh, M., Krol, E. & Becker, A. (2008). Competitive and cooperative effects in quorum-sensing-regulated galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **190**, 5308-5317.

Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**, 114-122.

Melin, M., Trzcinski, K., Meri, S., Kayhty, H. & Vakevainen, M. (2010). The capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* is more important than the genetic background for resistance to complement. *Infect Immun* **78**, 5262-5270.

Merritt, J. H., Brothers, K. M., Kuchma, S. L. & O'Toole, G. A. (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J Bacteriol* **189**, 8154-8164.

Mignolet, J., Van der Henst, C., Nicolas, C., Deghelt, M., Dotreppe, D., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2010). PdhS, an old-pole-localized histidine kinase, recruits the fumarase FumC in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **192**, 3235-3239.

Mirabella, A., Yanez Villanueva, R. M., Delrue, R. M., Uzureau, S., Zygmunt, M. S., Cloeckaert, A., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2012). The two-component system PrlS/PrlR of *Brucella melitensis* is required for persistence in mice and appears to respond to ionic strength. *Microbiology*.

Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & 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**, 3569-3576.

Mueller, K. & Gonzalez, J. E. (2011). Complex regulation of symbiotic functions is coordinated by MucR and quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **193**, 485-496.

Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F. & other authors (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **334**, 982-986.

Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol* **8**, 11-26.

O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. & 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**, 1210-1220.

Ozga, D. A., Lara, J. C. & Leig, J. A. (1994). The regulation of exopolysaccharide production is important at two levels of nodule development in *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 758-765.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **6**, 91-99.

Petersen, E., Chaudhuri, P., Gourley, C., Harms, J. & Splitter, G. (2011). *Brucella melitensis* cyclic di-GMP phosphodiesterase BpdA controls expression of flagellar genes. *J Bacteriol* **193**, 5683-5691.

Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. & 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**, 1481-1490.

Reed, J. W., Glazebrook, J. & 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**, 3789-3794.

Reuhs, B. L., Williams, M. N., Kim, J. S., Carlson, R. W. & Cote, F. (1995). Suppression of the Fix^- phenotype of *Rhizobium meliloti exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J Bacteriol* **177**, 4289-4296.

Robertson, G. & Roop, R. (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**, 690-700.

Roop, R. M., 2nd, Gee, J. M., Robertson, G. T., Richardson, J. M., Ng, W. L. & Winkler, M. E. (2003). *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu Rev Microbiol* **57**, 57-76.

Rotter, C., Muhlbacher, S., Salamon, D., Schmitt, R. & Scharf, B. (2006). Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**, 6932-6942.

Rüberg, S., Pühler, A. & Becker, A. (1999). Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology (Reading, Engl)* **145 (Pt 3)**, 603-611.

Simon R, P. U., Pühler A (1983). A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature Biotechology* **1**, 784-791.

Singh, A., Wyant, T., Anaya-Bergman, C., Aduse-Opoku, J., Brunner, J., Laine, M. L., Curtis, M. A. & Lewis, J. P. (2011). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect Immun* **79**, 4533-4542.

Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P. & 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**, 125-138.

Steele, K. H., Baumgartner, J. E., Valderas, M. W. & Roop, R. M., 2nd (2010). Comparative study of the roles of AhpC and KatE as respiratory antioxidants in *Brucella abortus* 2308. *J Bacteriol* **192**, 4912-4922.

Tellstrom, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Kuster, H. & Niehaus, K. (2006). The Lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* Suppresses Defense-Associated Gene Expression in Cell Cultures of the Host Plant *Medicago truncatula*. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**, 825-837.

Ugalde, R. (1999). Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect* **1**, 1211-1219.

Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2007). Mutations of the Quorum Sensing-Dependent Regulator VjbR Lead to Drastic Surface Modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol* **189**, 6035-6047.

Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res* **9**, 3200-3217.

Velasco, J., Bengoechea, J. A., Brandenburg, K., Lindner, B., Seydel, U., Gonzalez, D., Zahringer, U., Moreno, E. & Moriyon, I. (2000). *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect Immun* **68**, 3210-3218.

Viadas, C., Rodríguez, M. C., Sangari, F. J., Gorvel, J.-P., García-Lobo, J. M. & López-Goñi, I. (2010). Transcriptome Analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS Two-Component Regulatory System. *PLoS ONE* **5**, e10216.

Wells, D., Chen, E., Fisher, R. & Long, S. (2007). ExoR is genetically coupled to the ExoS-ChvI two-component system and located in the periplasm of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **64**, 647-664.

Wu, Q., Pei, J., Turse, C. & Ficht, T. A. (2006). Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. *BMC Microbiology* **6**, 102.

Yao, S. Y., Luo, L., Har, K. J., Becker, A., Ruberg, S., Yu, G. Q., Zhu, J. B. & Cheng, H. P. (2004). *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *J Bacteriol* **186**, 6042-6049.

Yeung, A. T., Torfs, E. C., Jamshidi, F., Bains, M., Wiegand, I., Hancock, R. E. & Overhage, J. (2009). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol* **191**, 5592-5602.

Zhan, H. J., Levery, S. B., Lee, C. C. & Leigh, J. A. (1989). A second exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain SU47 that can function in root nodule invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 3055-3059.

Zhang, X., Ren, J., Li, N., Liu, W. & Wu, Q. (2009). Disruption of the *BMEI0066* gene attenuates the virulence of *Brucella melitensis* and decreases its stress tolerance. *Int J Biol Sci* **5**, 570-577.

2. Complementary Information

Here are presented complementary data about the morphological alteration of cells grown in 2YT containing 400 mM NaCl and some preliminary data about the activity of the P*mucR* promotor in the morphologically unchanged bacteria in iso-osmolar conditions of sucrose.

As already mentioned in the above paper, we noticed a progressive morphological change when *Brucella* spp. are cultivated in 2YT containing 400 mM NaCl which did not occur in 2YT classical broth. After 8 h of culture in hypersalin medium, a small equatorial bulge can be observed on bacteria which subsequently increased in cell size and presented a pseudomulticellular appearance. This pecular phenotype was observed by scanning electron microscopy (SEM) in cells grown in 2YT 400 mM NaCl but not in cells grown in 2YT **(figure S3)**. This morphological and size change is even highlighted in FACS analysis **(figure S4)**. From the beginning of culture, the cell population is similar in both 2YT and NaCl-supplemented 2YT but with increasing time of culture we observed a shift of the cell population in NaCl-supplemented medium in contrast to the 2YT **(figure S4)**. In hypersaline medium, we observed a small vertical shift of the bacterial population on the granulosity scale (SSC) after 8 h. This shift seems to correlate with the bulge emergence at the future septum observed in microscopy. After 12 h of culture, the SSC shift was more obvious as the cell population began also to shift on the size scale (FFC). At the prolonged time of culture (24 h, 48 h and 72 h), the homogenous cell population of pseudomulticellular appearance was more concentrated in a zone corresponding to larger size and higher granulosity **(figure S4)**.

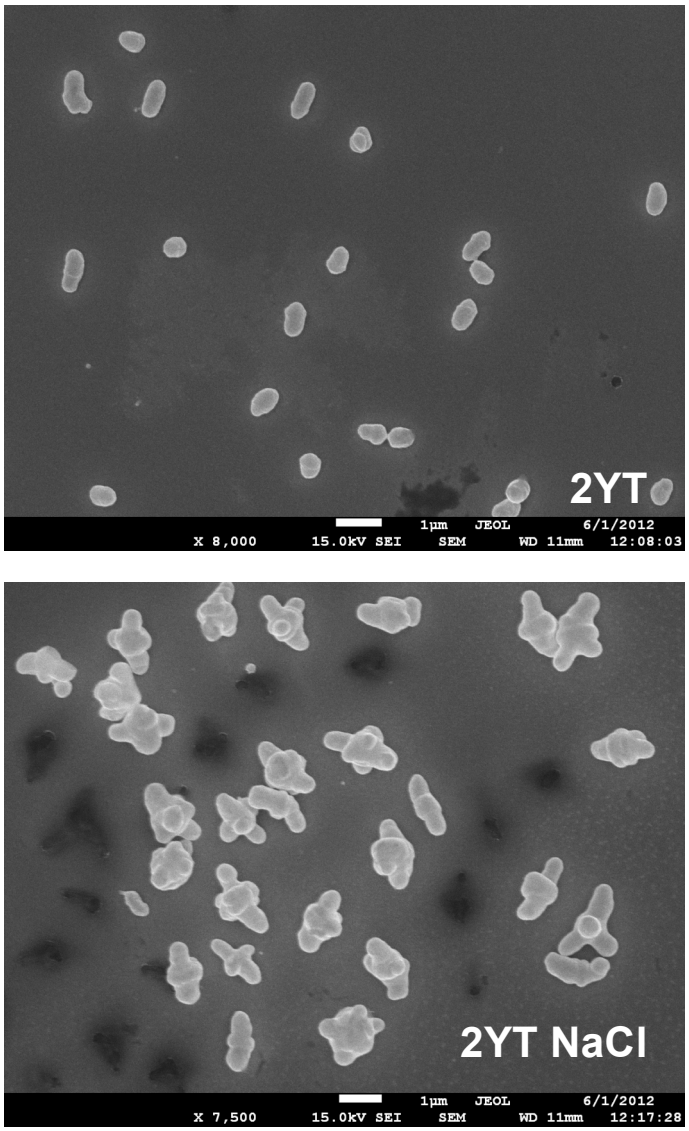


Figure S3. Scanning electron micrographs of *B. melitensis* pBBR-*gfp*(ASV) after 24 h of culture in 2YT (8000 X magnication) or 2YT containing 400 mM NaCl (7500 X magnication). One ml of bacterial suspension was centrifuged on poly-L-lysine-coated coverslip and fixed with PFA 2 % in PBS buffer. Pictures illustrate the change of morphology and size of cells grown in the hypersalin medium. Scale bars, 1 µm.

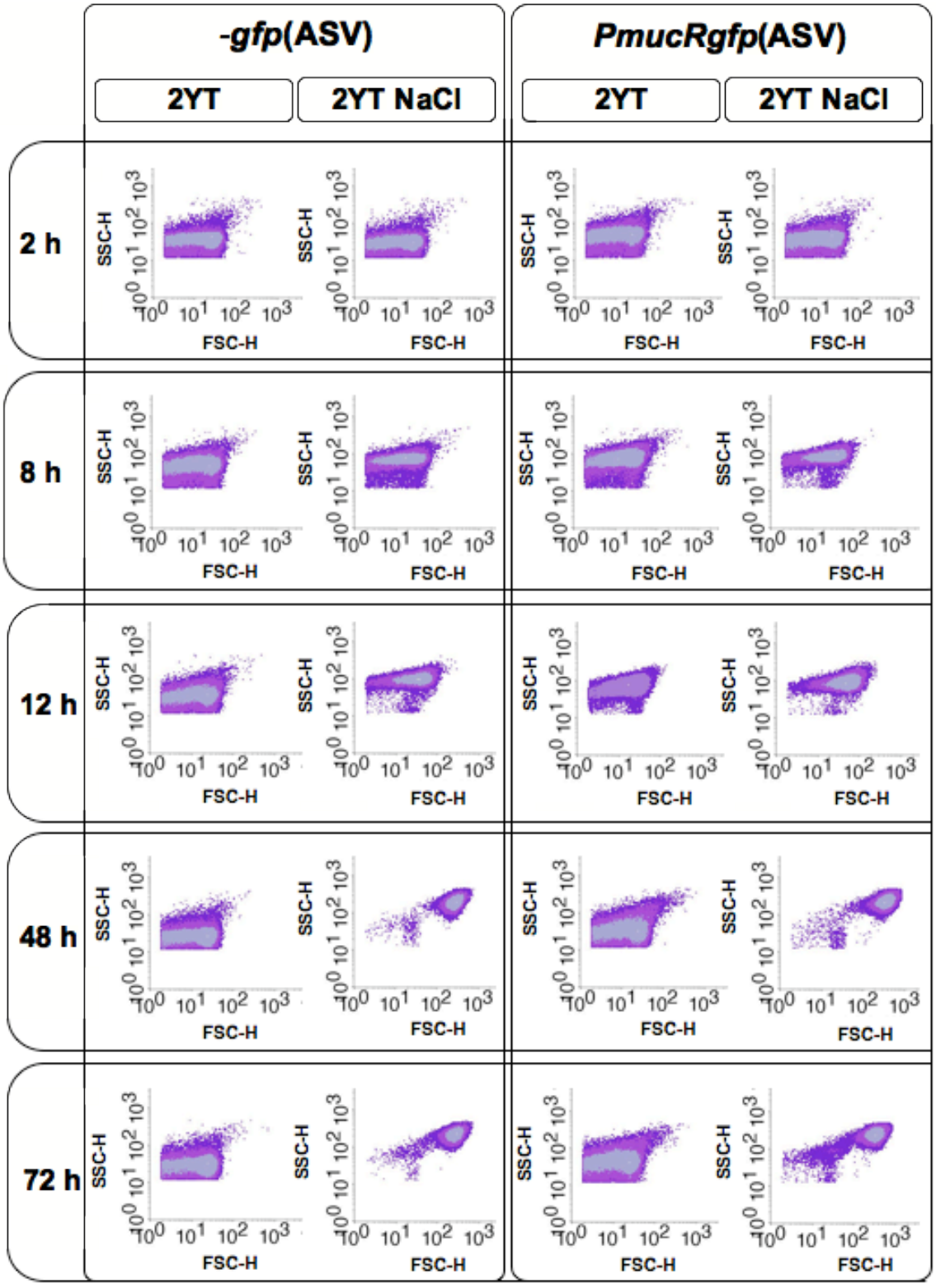


Figure S4. FACS analysis, dot plot showing the forward scatter (FSC) *versus* side scatter (SSC).
Flow cytometry on *B. melitensis* expressing the transcriptional fusion P*mucRgfp*(ASV) or bearing the pBBR-*gfp*(ASV) in both 2YT and 2YT containing 400 mM NaCl after 2 h, 8 h, 12 h, 48 h and 72 h of culture. These graphs illustrates the distribution of cells based upon size and morphology. Each dot represents one events. The events are color-coded from light (high frequency) to dark purple (low frequency). Data represented 25 % of the 5.10^4 events acquired.

DISCUSSION, CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

DISCUSSION, CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Lors de nos travaux, nous nous sommes penchés sur le phénotype d'agrégation des souches *B. melitensis* et *B. abortus* en 2YT contenant 400 mM NaCl. Visant à identifier la nature de l'EPS potentiellement produit dans ces conditions, nos résultats ont remis en cause l'origine du polysaccharide identifié ainsi que la production d'un EPS par *Brucella spp.* Enfin, nous avons étudié le rôle de deux régulateurs, le SDC PlrS/PrlR et MucR dans la réponse au stress ainsi que dans la virulence de *B. melitensis*.

I. FORMATION D'AGREGATS PAR *BRUCELLA* SPP. EN MILIEU HYPERSALIN

La formation d'agrégats par des souches QS déficientes et la purification d'un polysaccharide ont fortement appuyé l'hypothèse que *Brucella* spp. pourrait former des biofilms. Cependant, les conditions dans lesquelles les agrégats étaient formés par la souche sauvage, leur rôle et les acteurs impliqués restaient obscurs. Ce travail a permis de mettre en lumière une condition particulière (72 h dans 2YT 400 mM NaCl) dans laquelle des souches sauvages de *Brucella* spp. agrègent. Ces conditions sont assez surprenantes car inattendues sur le parcours d'une bactérie intracellulaire facultative comme *Brucella* spp. En outre, d'après nos observations, la formation de ces agrégats dépend de la présence d'un système PrlR/PrlS intact et de la force ionique du milieu plus que de l'hyperosmolalité. Nous avons également montré que des souches *B. ceti* naturellement mutées pour le gène *prlR* ou *prlS* sont incapables de former des agrégats en milieu hypersalin. Toutefois, afin de prouver que cette incapacité à former des agrégats est effectivement dûe à l'altération des gènes *prlR*/*prlS*, il serait utile de réaliser un test de complémentation en apportant une copie intacte du gène *prlR* ou *prlS* dans les souches présentant respectivement une version altérée de *prlR* ou *prlS*. En perspective de ce travail, nous proposons également d'appronfondir notre étude par la caractérisation des agrégats formés par les souches sauvages *B. abortus* et *B. melitensis* en vue d'identifier le ou les facteur(s) responsable(s) de l'agrégation ainsi que la composition d'une éventuelle matrice extracellulaire.

Par ailleurs, nous avons postulé que la formation d'agrégats pourrait favoriser la survie des bactéries en cas de déshydratation en dehors de l'hôte. Cette hypothèse est renforcée par les mutations naturelles du système *prlR/prlS* chez les souches marines *B. ceti* pour lesquelles la probabilité de rencontrer des conditions de déshydratation est fortement réduite. Afin de vérifier cette hypothèse, des tests de survie face à des conditions de déshydratation de souches agrégatives ou non pourraient être réalisés. Par ailleurs, la mise en évidence de la présence d'agrégats de *Brucella* spp. dans l'hôte naturel

suggérerait fortement un rôle dans l'infection *in vivo*. Dans ce cas, un changement salin à l'origine de l'agrégation serait improbable. Nous pourrions, dès lors, penser que le stress salin ou la réponse bactérienne qu'il engendre, mime en quelque sorte les conditions requises pour l'agrégation *in vivo*.

II. Prodution d'un EPS par *Brucella* spp. ?

Bien qu'aucun gène de biosynthèse n'ait été mis en évidence, le polysaccharide purifié et qualifié de mannan a été assimilé à un EPS produit par la souche *B. melitensis* QS déficiente. Au cours de nos investigations, nous avons montré que le polysaccharide purifié antérieurement provenait en réalité du milieu 2YT utilisé pour la préculture. Dès lors, chez *Brucella* spp. l'origine de la formation des agrégats reste inconnue tandis que la production d'un EPS reste hypothétique. Une hypothèse alternative à la présence d'EPS pour expliquer la formation d'agrégats serait une modification des propriétés pariétales des bactéries en réponse au stress hypersalin ou à l'altération du système QS.

Néanmoins, *Brucella* spp. possède théoriquement tous les éléments requis pour les étapes de production d'un EPS ainsi que de nombreux régulateurs (*exoR*, *mucR*, *mucS, bvrS/bvrR*) dont les orthologues sont impliqués dans la régulation de la production d'EPS chez d'autres alphaprotéobactéries. La production d'EPS par *Brucella* spp. reste donc tout à fait possible. A l'heure actuelle, les conditions dans lesquelles l'EPS serait produit par *Brucella* spp. restent à déterminer. Par ailleurs, la production d'EPS pourrait notamment requérir la présence de facteurs eucaryotiques. Il a ainsi été montré chez *R. leguminosarum* que la production d'EPS est augmentée en présence d'exsudats de plantes (Janczarek & Skorupska, 2011). La mise en évidence de la production d'un EPS par *Brucella* spp., des facteurs requis pour sa production et des gènes codant les enzymes responsables de sa synthèse constituent des perspectives d'intérêt en vue d'en définir un rôle éventuel dans le succès infectieux de *Brucella* spp. L'implication d'un EPS dans la persistance *in vivo* de *B. melitensis* est d'ailleurs appuyée par les résultats d'infection murine obtenus pour les souches mutées pour les gènes *exoF* et *exoY.*

Bien que *Brucella* soit pathogène et *Rhizobium* symbionte, ces deux bactéries sont issues d'un ancêtre commun et ont gardé, au cours de l'évolution, des stratégies communes pour l'établissement de la relation avec leur hôte. *Rhizobium spp.* établit une relation symbiotique basée sur sa capacité à fixer l'azote atmosphérique avec des plantes légumineuses. L'établissement de cette symbiose repose sur un échange coordonné de signaux spécifiques entre les deux organismes. La production de flavonoïdes par la plante est perçue par un régulateur transcriptionnel NodD de la bactérie qui active alors la transcription des gènes *nod* encodant les enzymes nécessaires à la production de lipochitooligosaccharides ou facteurs Nod. Ceux-ci induisent alors une réponse complexe de la plante menant simultanément à la formation de nodules et à l'enroulement du poil racinaire permettant la colonisation de l'hôte (pour revue (Jones *et al.*, 2007)).

De façon similaire, *Brucella* doit intégrer une multitude de signaux en provenance de son hôte. Bien que certains de ces signaux aient été identifiés, l'interaction de *Brucella* spp. avec son hôte est loin d'être entièrement comprise. Ainsi, des veaux femelles infectés par *Brucella in utero* ou à la naissance restent séronégatifs jusqu'à la moitié de

leur première gestation. Durant la deuxième moitié de la gestation, le réveil des bactéries latentes coïncide avec la réplication de la bactérie dans les trophoblastes placentaires lorsque ceux-ci sécrètent activement des stéroïdes (Samartino *et al.*, 1994). Dans ce cadre, il convient de remarquer que le régulateur NodD, impliqué dans la perception de flavonoïdes chez *Rhizobium,* présente une fonction analogue à des récepteurs des stéroides animales (Fox, 2004). Certains de ces stéroïdes pourraient donc agir comme des signaux indiquant à *Brucella* spp. que le temps de la dissémination est arrivé (Letesson & De Bolle, 2004). De la même façon, certains signaux de l'hôte pourraient indiquer à *Brucella* que la production d'EPS est nécessaire.

III. Alteration de la morphologie de *Brucella* spp. en milieu hypersalin

Par ailleurs, la croissance de *Brucella spp.* dans un milieu hypersalin s'accompagne d'une altération de la morphologie des cellules. Cette altération commence par un gonflement au futur septum suivie d'une augmentation progressive du volume cellulaire. L'augmentation de la taille de la cellule suite à un stress salin a déjà été rapportée chez la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* et est associée à une modification de la composition du peptidoglycane (Vijaranakul *et al.*, 1995). En outre, le gonflement au futur septum ressemble à l'altération morphologique observée chez *Brucella* spp. lors du traitement à l'aztréonam (M. Deghelt, données non publiées). L'aztréonam est un antibiotique de la famille des β-lactames qui inhibe spécifiquement la PBP3 (*penicillin binding protein 3,* transpeptidase) et dans une moindre mesure la PBP1a (*penicillin binding protein 3,* transpeptidase et transglycosylase) (Georgopapadakou *et al.*, 1982). Ces PBP possèdent une activité transpeptidase impliquée dans la formation des liaisons peptidiques du peptidoglycane qui sont essentielles pour la viabilité de *Brucella* spp. (Bandara *et al.*, 2009). Il est donc raisonnable de penser que le gonflement de la paroi au septum pourrait résulter d'une diminution du nombre de liaisons entre les tétrapeptides des chaînes du peptidoglycane et donc d'une réticulation plus lâche.

Une hypothèse possible pour expliquer le phénotype observé est la dégradation ou l'inhibition spécifique de protéines PBP en conditions hypersalines. Récemment, il a été montré qu'une augmentation d'osmolalité a un effet presque instantané sur la distribution spatiale de certaines PBP chez *Caulobacter crescentus* (Hocking *et al.*, 2012). Toutefois, dans notre cas, l'altération morphologique commence à être détectable uniquement après 8 h de culture en 2YT 400 mM NaCl et semble spécifique d'un stress salin puisque des données préliminaires montrent que les bactéries ne présentent pas d'altération visible en conditions isoosmolaires en sucrose. L'altération morphologique pourrait également résulter de l'induction, par le stress salin, de l'expression de gènes codants pour des protéines impliquées dans le maintien de la paroi cellulaire décrit chez *Azospirillum brasilense* Sp7. (Nagarajan *et al.*, 2007). Dans ce cadre, l'induction de peptidoglycane hydrolases (par exemple endopeptidase et carboxypeptidase) et/ou leur délocalisation vers le septum pourrait également résulter en un peptidoglycane moins réticulé. Il a d'ailleurs été montré qu'une PBP4 (PbpE) (mureine hydrolase) chez *B. subtilis*

et une D-ala-D-ala carboxypeptidase chez *Ochrobactrum* sp.11a étaient induites par un stress salin (Palomino *et al.*, 2009; Principe *et al.*, 2009).

Notons également que ce changement morphologique semble indépendant du système PrlR/PrlS dans la mesure où les mutants Δ*prlR* et Δ*prlS,* bien qu'ils ne forment pas d'agrégats, présentent également une morphologie altérée.

En perspective de ce travail, nous proposons d'identifier le mécanisme responsable de l''altération morphologique observée chez *Brucella* spp. lors du stress salin. Dans ce cadre, il serait intéressant de déterminer si l'activité des PBP de *Brucella* spp. peut directement et spécifiquement être inhibée par une concentration élevée en sels ou si ces changements résultent d'un processus plus complexe. Il serait alors intéressant de réaliser une étude comparative des profils d'expression d'ARN et/ou de protéines entre des souches sauvages mis en culture durant 8h en 2YT ou en 2YT 400mM NaCl. Cette étude pourrait alors mettre en évidence l'expression différentielle de gènes codant pour des protéines et/ou de protéines impliqués dans le maintien de la paroi bactérienne. Par ailleurs, il serait intéréssant de déterminer si le changement morphologique observé avec *Brucella* lors d'un stress salin est conservé chez d'autres alphaprotéobactéries.

IV. Roles des regulateurs PrlR et MucR dans la reponse au stress et la virulence de *B. melitensis*

L'implication de ces deux régulateurs dans la virulence de *Brucella* spp. a été découverte lors de cribles visant à identifier des facteurs de virulence (Lestrate *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006). Cependant, leur fonction n'a pas été caractérisée ultérieurement. Au cours de notre travail, nous avons confirmé l'implication de ces deux régulateurs dans la virulence de *B. melitensis*. Par ailleurs, nos investigations suggèrent que ces deux régulateurs sont impliqués dans la réponse au stress chez *Brucella* spp.

1. Le système PrlR/PrlS

1.1. Particularités du système PrlR/PrlS

Sur base de similarités de séquences, les gènes *prlR* et *prlS* ont été définis comme encodant un système à deux composants (SDC) composé d'une histidine kinase (HK) hybride PrlS et d'un régulateur de réponse (RR) PrlR. Bien que les gènes *prlR* et *prlS* soient conservés chez la plupart des espèces de *Brucella*, les souches *B. ceti*, *B. ovis* et *B. microti* présentent néanmoins des versions tronquées ou pseudogènes du système *prlS/prlR*. Les gènes *prlR et prlS* en orientation inversée sont également conservés parmi les α-protéobactéries. Par ailleurs, un gène homologue à *prlS* non associé à un RR a été identifié chez les γ-protéobactéries du genre *Pseudomonas.*

Tous les orthologues de PrlS présentent deux particularités :

(1) Il s'agit d'histidine kinases hybrides qui en plus des domaines classiques HK possèdent un domaine receveur (REC) C-terminal contenant un résidu aspartate conservé. Cette architecture modulaire permet une voie de transmission de signal plus complexe nécessitant une protéine histidine phosphotransferase (Hpt) additionnelle. La protéine Hpt associée au système PrlS/PrlR n'a pas été identifiée au cours de ce travail. Excepté une protéine homologue à ChpT (BMEI0424), aucune Hpt n'a été identifiée chez *Brucella* spp. En raison de leur faible similarité de séquence, la prédiction de protéines Hpt est difficile.
(2) Elles possèdent un domaine N-terminal composé de 12 segments transmembranaires appartenant à la famille *sodium solute symporter* (SSS) et caractéristique du transporteur PutP d'*E. coli*. À ce jour, aucune kinase comportant un tel domaine SSS n'a été caractérisée et le transport de soluté par l'une d'elles reste à démontrer.

Toutefois, aucune fonction n'est associée à ces orthologues PrlS/PrlR chez les α-protéobactéries. La présence d'un gène encodant un canal mécanosensitif (*mscL*) en amont de *prlS*, l'annotation de plusieurs homologues de *prlS* en tant que senseur de proline ainsi que le rôle d'osmoprotectant de la proline (Kunte *et al.*, 1999; Racher *et al.*, 1999) sont autant d'éléments qui indiquaient un rôle potentiel du SDC PrlR/PrlS dans la réponse au stress osmotique. Bien que le transfert de phosphate entre les partenaires et l'identité de la protéine Hpt restent à être démontrés, le phénotype commun entre les mutants de délétion Δ*prlR* et Δ*prlS* appuie l'idée de l'implication des protéines dans une même voie de signalisation. Par ailleurs, notre travail a permis de mettre en évidence la force ionique comme signal potentiellement perçu par ce système et l'implication de celui-ci dans la formation d'agrégats en milieu hypersalin chez *Brucella* spp.

Le mécanisme de perception de la force ionique n'est pas été élucidé. Le domaine SSS de PrlS pourrait en être le senseur direct ou indirect par la détection d'ions, d'un gradient électrochimique ou d'une perturbation de la membrane (dépendante de la force ionique). Cependant, nous ne pouvons exclure une perception indépendante du domaine transmembranaire par exemple via la détection d'ions intracytoplasmiques comme cela semble être le cas pour l'histidine kinase EnvZ (Wang *et al.*, 2012).

En perspective, il serait intéressant de déterminer si le domaine SSS est impliqué dans le phénotype d'agrégation de *Brucella* en milieu salin. Ainsi, la mise en évidence du rôle « senseur » de la force ionique permettrait d'attribuer pour la première fois une fonction à ce domaine lorsqu'il fait partie intégrante d'une protéine HK. Par ailleurs, un rôle de transporteur de ce domaine SSS reste également à explorer. Enfin, nous proposons d'étudier le rôle des homologues de PrlS et de PrlR chez d'autres α-protéobactéries et leur implication éventuelle dans la réponse au stress salin ainsi que dans la régulation de la formation de biofilm et plus particulièrement de la production d'EPS.

1.2. Rôle dans la formation d'agrégats

Contrairement à la souche sauvage, les mutants de délétion Δ*prlR* et Δ*prlS* ne forment pas d'agrégats bactériens lors de cultures en 2YT contenant 400 mM de NaCl. Ces données semblent indiquer que le système PrlR/PrlS est directement ou indirectement impliqué dans la réponse au stress hypersalin et la régulation de l'expression des acteurs nécessaires à l'agrégation (EPS, modification pariétale, OMP, gènes flagellaires) et potentiellement impliqué dans la formation de biofilms. Néanmoins, l'absence de phénotype agrégatif ne compromet pas la croissance des souches Δ*prlR et* Δ*prlS* dans les conditions testées. Au cours de ce travail, nous avons également montré l'expression constitutive de la protéine PrlR en milieu 2YT et 2YT contenant 400 mM NaCl.

1.3. Rôle dans la virulence

Bien que non indispensable en modèle d'infection cellulaire, PrlS/PrlR est requis pour la persistance de l'infection *in vivo*. Au cours de ce travail, nous avons confirmé l'atténuation de la virulence de souches Δ*prlR et* Δ*prlS* en modèle d'infection murin. Ces résultats suggèrent un rôle du système PrlR/PrlS et vraisemblablement des gènes qu'il régule dans l'adaptation de *Brucella* à long terme avec son l'hôte. Enfin, si nous avons mis en évidence la force ionique comme signal potentiellement perçu *in vitro*, le signal perçu *in vivo* et impliqué dans la persistance reste à définir ainsi que son mécanisme de perception.

2. MucR

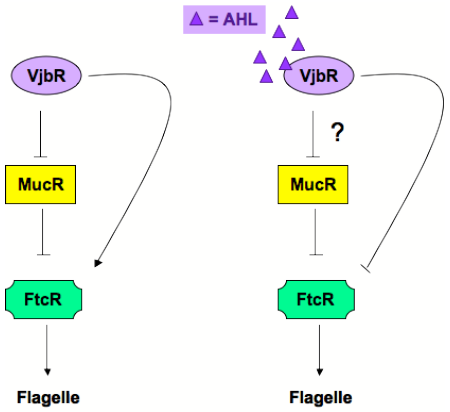
2.1. Un régulateur transcriptionnel conservé chez les α-protéobactéries

Le gène *mucR* est conservé chez les α-protéobactéries et code pour une protéine contenant un motif en doigt de zinc (de type C_2-H_2) inhabituel chez les Procaryotes (Bouhouche *et al.*, 2000). Les orthologues de *mucR* sont tous impliqués dans la régulation de structure de surface et la relation hôte/bactérie chez les Rhizobiales. Chez la bactérie modèle *S. meliloti*, le régulateur MucR agit comme un répresseur de l'expression des gènes de mobilité et de biosynthèse de l'EPSII et comme un activateur de l'expression des gènes de biosynthèse de l'EPSI (Bahlawane *et al.*, 2008b; Keller *et al.*, 1995). Nos recherches ont montré que MucR régule également des structures de surface (flagelle, LPS) et intervient dans la réponse au stress et la virulence chez *B. melitensis*.

2.2. Régulation de l'expression des gènes flagellaires

Au cours de ce travail, nous avons montré le rôle de MucR en tant que répresseur de l'expression des gènes flagellaires et notamment de leur régulateur maître FtcR chez *B. melitensis*. Il semble donc que la régulation négative des gènes flagellaires par MucR soit conservée entre les bactéries *B. melitensis et S. meliloti.* Toutefois, cette régulation similaire de l'expression des gènes flagellaires pourrait se limiter aux Rhizobiales. Ainsi, l'homologue de MucR réprime un répresseur de l'expression des gènes flagellaires chez *Caulobacter crescentus* (P. Viollier, communication personnelle) tandis qu'il réprime un activateur (Rem/FtcR) chez *S. meliloti* et *B. melitensis* (Bahlawane *et al.*, 2008b; Leonard *et al.*, 2007; Rotter *et al.*, 2006). Cette donnée constitue une deuxième disparité entre *C. crescentus* et *B. melitensis* dans la régulation des gènes flagellaires. En effet, FlbT déstabilise le transcrit encodant la flagelline chez *C. crescentus* (Anderson & Gober, 2000) tandis qu'il active son expression chez *B. melitensis* (Ferooz *et al.*, 2011b).

Par ailleurs, d'après l'analyse transcriptomique (Uzureau *et al.*, 2010) et nos expériences de qRT-PCR, le régulateur VjbR réprime l'expression du gène *mucR* chez *B. melitensis*. Sachant que VjbR est nécessaire à l'activation des gènes flagellaires (Delrue *et al.*, 2005), MucR peut dès lors être considéré comme un acteur intermédiaire entre VjbR et l'expression des gènes flagellaires. La façon dont les N-acyl homosérine lactones (AHL) influence la transcription de *mucR* et leur répercussion sur ses gènes cibles reste à déterminer. Toutefois, des données préliminaires montrent que la répression des gènes flagellaires en présence de concentration élevée en AHL se fait probablement par une répression de l'expression de *ftcR* mais pas par l'activation de la transcription de *mucR* (M. Terwagne, communication personnelle).



Cohérente avec cette idée, il a été suggéré que l'expression de *mucR* ne dépend pas d'un QS fonctionnel chez *S. meliloti* étant donné que MucR agit comme un répresseur des gènes de biosynthèse de l'EPSII en présence comme en absence d'un système QS fonctionnel (McIntosh *et al.*, 2008).

2.3. Implication de MucR dans la formation d'agrégats

Sachant que le régulateur MucR joue un rôle clé dans la régulation de la production d'EPS chez *S. meliloti* et bien que la production d'EPS par *B. melitensis* reste hypothétique, nous avons étudié le rôle de MucR dans la formation des agrégats en conditions hypersalines. Le mutant de délétion Δ*mucR* ne forme pas d'agrégats et présente un défaut de croissance important en 2YT 400 mM NaCl. Dès lors, l'absence d'agrégats peut être dûe au défaut de croissance autant qu'à l'incapacité de la souche à répondre au stress hypersalin. L'induction du promoteur P*mucR* dans le milieu hypersalin en parallèle avec l'altération morphologique suggère l'importance de MucR dans la réponse au stress hypersalin. De cette façon, nous avons mis en évidence un facteur qui affecte l'expression du gène autorégulé *mucR*. Jusqu'à présent aucun facteur altérant l'expression de *mucR* n'était connu, pas même chez les autres α-protéobactéries.

Par ailleurs, l'induction du promoteur P*mucR* lors d'un stress salin pourrait indiquer que le phosphorelay PrlS/PrlR et le MucR interviennent dans une même voie de régulation. En perspective de ce travail, nous proposons donc d'étudier les liens potentiels entre le système PrlS/PrlR et le régulateur MucR afin de déterminer si MucR pourrait être sous le contrôle du système PrlS/PrlR et ainsi être impliqué dans la formation d'agrégats.

En outre, nos données suggèrent indirectement un changement de style de vie des bactéries en milieu hypersalin. Ainsi, sachant que *mucR* régule négativement l'expression des gènes flagellaires, on peut postuler que l'induction de *mucR* favorise la répression des gènes flagellaires essentielle au passage à un mode de vie sessile associé à la formation des biofilms. Cette hypothèse est appuyée par la formation d'agrégats bactériens en milieu 2YT de la souche surexprimant le régulateur MucR. Par ailleurs, notre expérience de complémentation hétérospécifique suggère que si l'implication de MucR dans la régulation d'un EPS reste hypothétique chez *Brucella* spp, la protéine MucR de *B. melitensis* est au moins capable de réguler la production d'EPS chez *S. meliloti*.

2.4. Recherche de cibles directes de MucR.

Chez *S. meliloti*, des expériences de retard sur gel ont mis en évidence la liaison de la protéine MucR aux séquences promotrices des gènes ou opérons *wgaA*, *wgeA*, *wgdA*, *wggR*, *rem* et *mucR* (Bahlawane *et al.*, 2008a; Bahlawane *et al.*, 2008b; Bertram-Drogatz *et al.*, 1997). Par ailleurs, les séquences promotrices des gènes *exoY* et *exoHK* peuvent entrer en compétition avec la séquence promotrice P*mucR* pour la liaison de MucR (Bertram-Drogatz *et al.*, 1998). L'expérience de complémentation hétérospécifique réalisée au cours de ce travail nous indique que la protéine MucR de *B. melitensis* est capable de réguler la production d'EPSI chez *S. meliloti* et donc au moins de reconnaître les sites qui lui sont spécifiques chez *S. meliloti*. Néanmoins, la séquence consensus définie chez *S. meliloti* (Bahlawane *et al.*, 2008b) ne semble pas très conservée et il nous est difficile de mettre en évidence une telle séquence chez *B. melitensis*.

En perspective de notre travail, nous proposons de déterminer les cibles directes de MucR en ciblant préférentiellement les gènes *mucR* et *ftcR*. Dernièrement, des tests de retard sur gel ont été réalisés et ont montré la liaison *in vitro* de la protéine MucR aux régions promotrices de 5 gènes (BAB1_0594, BAB1_1035, BAB1_1605, BAB1_1893 et de *mucR* BAB1_746) de *B. abortus* (M. Roop, communication personnelle) qui sont conservées chez *B. melitensis*. L'autorégulation de *mucR* que nous mettons en évidence dans ce travail repose donc sur la répression directe de son propre promoteur. Des expériences d'empreinte à la DNase devraient permettre d'identifier la séquence de liaison du régulateur et de mettre en évidence d'autres cibles directes de MucR par des analyses bioinformatiques.

2.5. MucR, régulateur de l'enveloppe bactérienne et du LPS

Nos résultats montrent une sensibilité accrue du délétant Δ*mucR* aux détergents ainsi qu'une différence de comportement vis-à-vis du rouge congo. Ces données suggèrent une altération majeure de la surface bactérienne chez la souche Δ*mucR*. Un lien a déjà été observé entre la sensibilité aux détergents et la virulence pour les mutants de la CβG synthétase (*cgs*) et du système à deux composants *bvrR/bvrS* chez *B. abortus*. (Briones *et al.*, 2001; Sola-Landa *et al.*, 1998). Par ailleurs, nous avons montré que MucR influence la quantité de transcrit codant le gène *cgs* et pourrait ainsi constituer le premier régulateur de la production de β-glucan cyclique chez *Brucella* spp. Nous attirons également l'attention sur l'utilisation des détergents souvent employés dans les protocoles d'infections en laboratoire. Ceux-ci sont utilisés pour faciliter la lyse cellulaire de cellules infectées afin d'en récupérer les bactéries intracellulaires. L'utilisation de ces détergents devrait faire l'objet d'une vérification systématique préalable de la sensibilité des différentes souches testées.

Plus qu'une simple altération de surface, nos données indiquent que MucR influence un composant majeur de la surface bactérienne chez *B. melitensis* : le lipopolysaccharide (LPS). Si la souche Δ*mucR* possède un LPS lisse (avec une chaîne O), nos données ont mis en évidence une altération de la fraction R-LPS (lipide A-core). Nous avons montré l'altération du profil de migration et de la reconnaissance par des anticorps monoclonaux spécifiques du core du LPS. Notre étude suggère une modification du core du LPS dans le mutant Δ*mucR* chez *B. melitensis* et en perspective, nous proposons d'approfondir l'étude du LPS de la souche.

De façon intéressante, un mutant Δ*mucR* construit dans la souche *B. abortus* présente un LPS rugueux (M. Roop, communication personnelle). Dans les deux *background*, un LPS sauvage est restauré par l'expression, en *trans,* d'une copie du gène *mucR*. L'une des hypothèses pouvant expliquer cette disparité entre les deux souches serait la régulation par MucR de l'expression d'un gène effectivement impliqué dans la synthèse et/ou le greffage de la chaîne O sur le lipide A-core. Dès lors, on peut imaginer qu'une version redondante de ce gène soit présente chez *B. melitensis* et absente chez *B. abortus* (par exemple dans le locus de 25 kb). Par ailleurs, le LPS de *B. melitensis* et *B. abortus* présente des différences intrinsèques. La chaîne O est constituée de

monomères reliés par des liaisons α,1-2 et α,1-3 chez *B. melitensis* et uniquement des liaisons α,1-2 chez *B. abortus*. En outre, la substitution par un groupement éthanolamine phosphate du lipide A chez *B. melitensis* est absente chez *B. abortus* en raison d'une mutation du gène *lptA*. L'absence de ce groupement éthanolamine phosphate est notamment liée à la sensibilité accrue de la souche *B. abortus* à la polymyxine B (Y.T. Gil Ramirez, communication personnelle). Des différences de structures additionnelles dans la partie profonde du LPS (lipide A et core) pourraient entraîner une altération du processus de biosynthèse du LPS dans une souche et pas dans l'autre. Il serait donc intéressant d'approfondir la caractérisation des LPS de *B. melitensis* et *B. abortus* en parallèle avec ceux de leurs mutants *mucR* respectifs.

2.6. Implication de MucR dans la réponse au stress et la virulence

Nous avons confirmé que la délétion du gène *mucR* est associée à une atténuation de la virulence en modèle murin et cellulaire chez *B. melitensis*. Plus précisément, MucR est crucial pour la survie intracellulaire de la bactérie dans les cellules hôtes. En outre, une réduction de la splénomégalie chez les souris infectées par le mutant Δ*mucR* indique une réponse inflammatoire diminuée probablement en raison de la réduction de la charge bactérienne. Néanmoins, l'altération de la surface et du LPS comme PAMP de la souche Δ*mucR* pourrait résulter en une modification de ses propriétés antigéniques ce qui influencerait la réponse immunitaire de l'hôte. Récemment, l'efficacité protectrice d'un mutant *mucR* comme vaccin vivant atténué a été montrée (Arenas-Gamboa *et al.*, 2011). Au cours de notre travail, outre le rôle de MucR dans la virulence, nous avons mis en évidence son implication dans une réponse plus générale au stress incluant le stress oxydatif et salin. En perspective, nous proposons de réaliser une étude transcriptomique et/ou protéomique afin de comparer les profils d'expression du mutant *mucR* à celui de la souche parentale dans différentes conditions de stress (stress salin, stress oxydatif). Ces résultats pourraient nous indiquer si les différentes sensibilités du mutant *mucR* par rapport à la souche parentale reflètent uniquement une perméabilité accrue de l'enveloppe bactérienne ou l'altération d'un système de régulation complexe (par exemple, altération d'expression d'enzymes de détoxification des ROS, de transporteurs d'osmoprotectants, de protéines impliqués dans le maintien de la paroi ou d'enzymes potentielles de biosynthèse d'EPS). En outre, en ce qui concerne le stress oxydatif, il serait intéressant de déterminer la concentration intracellulaire en ROS des bactéries en cours de croissance jusqu'en phase stationnaire. Ces données nous permettraient de mettre en évidence un potentiel lien entre la concentration intracellulaire en ROS et le passage en phase stationnaire (précoce chez le mutant *mucR*). En outre, nous proposons de comparer la croissance des différentes souches en condition d'anaérobiose ou de microaérobiose afin de réduire la production de ROS endogène.

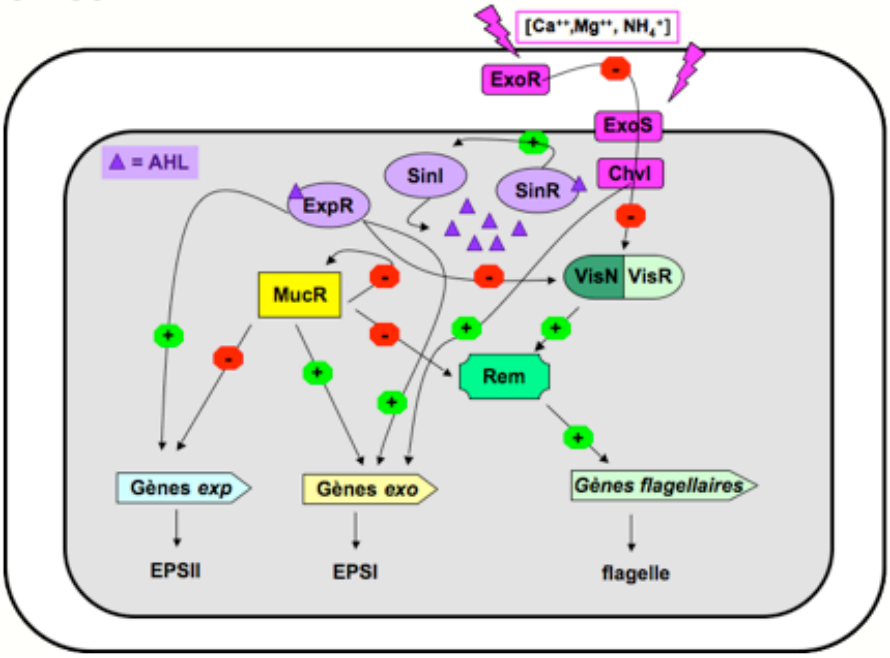
3. COMPARAISON DES SYSTÈMES DE RÉGULATION ENTRE *S. MELILOTI* ET *B. MELITENSIS*.

Malgré l'incertitude quant à la production d'un EPS chez *Brucella* spp., nous avons montré que certaines voies de régulation sont conservées entre le symbionte *S. meliloti* et le pathogène *B. melitensis.* Dans ce cadre, nous avons au cours de ce travail mis en évidence le rôle de MucR en tant que répresseur du régulateur central FtcR de l'expression des gènes flagellaires. Nos données indiquent également l'autorégulation de MucR chez *B. melitensis* appuyée par les données de retard sur gel obtenues chez *B. abortus* (M. Roop, communication personnelle).

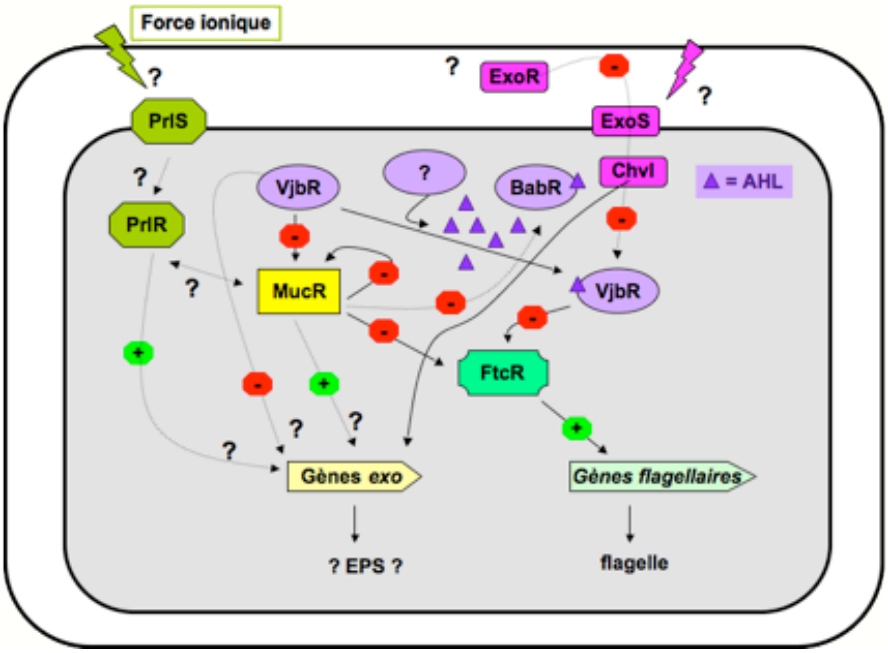
Par ailleurs, des données de transcriptomiques indiquent que MucR est régulé par le régulateur du QS VjbR peut-être indépendamment de la présence d'AHLs (Uzureau *et al.*, 2010) et régule le régulateur BabR (M. Roop, communication personnelle). Dans ce contexte, MucR pourrait alors constituer l'intermédiaire d'une hiérarchisation entre les deux régulateurs du QS. Par ailleurs, nos résultats indiquent que le promoteur du gène *mucR* est fortement induit par un stress salin et pourraient indiquer que le phosphorelay PrlS/PrlR et le régulateur MucR interviennent dans une même voie de régulation. Il serait donc intéressant de comparer l'expression du gène *mucR* dans les mutants *prlR/prlS* par rapport à la souche WT. Dans ce cadre, le vecteur pBBRP*mucRgfp*(ASV) construit au cours de ce travail pourrait constituer un outil pratique permettant de tester rapidement l'activité du P*mucR* dans différentes souches (*prlR/prlS*, *vjbR*, *bvrR*) ainsi que dans un certain nombre de conditions (par exemple face à au stress salin ou à la présence d'AHL).

Pour conclure, nous présentons ci-après un schéma du réseau de régulation chez les bactéries *S. meliloti* et *B. melitensis* en nous focalisant uniquement sur les acteurs contrôlant l'expression des gènes encodant les protéines flagellaires et les enzymes de biosynthèse d'un EPS. Ce réseau n'est qu'un aperçu du réseau d'acteurs dont les bactéries sont équipées pour faire face aux différents changements de leur environnement.

S. meliloti



B. melitensis



Comparaison des réseaux de régulation de l'expression des gènes flagellaires et de la production d'EPS chez *S. meliloti* et chez *B. melitensis* : contribution de notre étude dans la compréhension du réseau chez *B. melitensis*. Les flèches en trait plein représentent un lien démontré entre deux acteurs tandis que les flèches en pointillés représentent un lien potentiel entre deux acteurs. Une flèche annotée du symbole (+) en vert symbolise une activation tandis qu'une flèche annotée du symbole (-) en rouge symbolise une répression**.** Les acteurs de la voie ExoR/ExoS/ChvI chez *S. meliloti* et leur homologues ExoR/BvrS/BvrR chez *B. melitensis* sont représentés en rose. Les acteurs du Quorum Sensing sont représentés en mauve. Les acyl-homosérine lactones (AHL) sont réprésentés par des triangles mauves. Le régulateur MucR est représenté par un rectangle jaune. Les régulateurs flagellaires sont en vert foncé. Les protéines VisN et VisR forment un hétérodimère qui constitue un régulateur primaire (de classe I) dans l'expression des gènes flagellaires chez *S. meliloti* (Sourjik *et al.*, 2000). Les gènes codant les régulateurs VisN et VisR sont absents chez *Brucella*. La protéine FtcR et son homologue Rem sont les régulateurs maîtres de l'expression des gènes flagellaires chez *Brucella* et chez *S. melioti,* respectivement (Leonard *et al.*, 2007; Rotter *et al.*, 2006). Les acteurs du phosphorelay PrlS/PrlR sont représentés par des polygones en vert pomme. Les gènes codant les enzymes de biosynthèse de l'EPSI (gènes *exo*) et de l'EPSII (gènes *exp*) et les gènes flagellaires sont représentés par des flèches.

Chez *S. meliloti* :

Le système QS ExpR/Sin est composé de l'AHL-synthétase SinI, responsable de la production d'AHL et de deux régulateurs SinR et ExpR, capables de lier les AHL. L'induction de l'expression de *sinI* requiert la présence de SinR et ce, même en présence du régulateur ExpR (McIntosh *et al.*, 2008). Le système QS régule l'expression des gènes flagellaires par l'intermédiaire de ExpR qui réprime l'expression de *visN* et de *rem* en présence d'AHL (Hoang *et al.*, 2008). Le système ExpR/Sin complet est requis pour l'expression des gènes *exp* et la production de l'EPSII de faible poids moléculaire, actif pour la symbiose (LMW) (Marketon *et al.*, 2003; Pellock *et al.*, 2002). ExpR active également l'expression de certains gènes *exo* (*exoI* et *exsH*) et régule ainsi la production d'EPSI de faible poids moléculaire (Glenn *et al.*, 2007; Hoang *et al.*, 2004; McIntosh *et al.*, 2008). L'histidine kinase membranaire ExoS et le régulateur de réponse ChvI constituent les partenaires d'un système à deux composants qui active la production de succinoglycan (EPSI) (Cheng & Walker, 1998; Doherty *et al.*, 1988). Le système ExoR/ExoS/ChvI semble répondre à la concentration extracellulaire en ammonium et en cations divalents (Ca^{++}, Mg^{++}) (Doherty *et al.*, 1988; Keating, 2007). ExoR est une protéine périplasmique qui intéragit avec la protéine ExoS et réprime la voie de transduction ExoS/ChvI (Chen *et al.*, 2008; Wells *et al.*, 2007). Le système ExoR/ExoS/ChvI réprime l'expression de *visN* et de *rem*, gènes encodant les régulateurs primaires de l'expression des gènes flagellaires et affecte ainsi négativement la mobilité de *S. meliloti* (Hoang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Chez *S. meliloti*, MucR active les gènes codant les enzymes de biosynthèse de l'EPSI, réprime les gènes codant les enzymes de biosynthèse de l'EPSII et réprime le régulateur flagellaire Rem (classe Ib) ainsi que sa propre expression (Bahlawane *et al.*, 2008b; Bertram-Drogatz *et al.*, 1997; Bertram-Drogatz *et al.*, 1998; Rotter *et al.*, 2006). Jusqu'à présent, aucune fonction n'est associée au phosphorelay PrlS/PrlR (non représenté) chez *S. meliloti*.

Chez *B. melitensis* :

L'AHL synthétase est inconnue tandis que deux régulateurs du QS ont été identifiés : VjbR et BabR (Delrue *et al.*, 2005; Uzureau *et al.*, 2007). VjbR régule l'expression de *mucR* (Uzureau *et al.*, 2010) tandis qu'il active l'expression de *ftcR* (Leonard *et al.*, 2007). En présence d'AHL, l'expression de *ftcR* et des gènes flagellaires sous son contrôle est réprimée (Delrue *et al.*, 2005). BvrR régule l'expression de VjbR (Viadas *et al.*, 2010). Le signal perçu par le système BvrS/BvrR est inconnu. Chez *B. melitensis*, la production d'EPS, les gènes codant les enzymes de sa biosynthèse et l'implication de cet EPS dans la formation d'agrégats reste hypothétique. Néanmoins, nous avons mis en évidence l'autorégulation négative de MucR et le rôle de MucR en tant que répresseur du régulateur FtcR, et des gènes flagellaires sous son contrôle, chez *B. melitensis*. D'après les recherches effectuée par l'équipe de M. Roop chez *B. abortus*, MucR réprime l'expression du régulateur BabR (communication personnelle). Nous avons montré l'implication du phosphorelay PrlS/PrlR dans la réponse au stress salin et dans la formation d'agrégats chez *B. melitensis* (Mirabella *et al.*, 2012). Le mécanisme de perception de la force ionique, le transfert de phophate entre les partenaires PrlS et PrlR ainsi que l'identité de la protéine Hpt restent à démontrer. Si on postule que *B. melitensis* produit un EPS (par l'intermédiaire d'enzymes encodées par les gènes *exo*) responsable de l'agrégation, il est probable que les régulateurs PrlR et MucR régulent positivement l'expression de ces gènes *exo* contrairement à VjbR qui les réprimerait. Nous avons montré que le promoteur du gène *mucR* est fortement induit par un stress salin ce qui pourrait indiquer que le phosphorelay PrlS/PrlR et le régulateur MucR interviennent dans une même voie de régulation.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. SOUCHES, PLASMIDES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les souches et plasmides utilisés dans ce travail sont répertoriés dans la **table 1**.

Table 1 : Souches et plasmides utilisés dans ce travail.

Souches ou plasmides	Caractéristiques	Source ou référence
B. melitensis		
16M	Souche sauvage parentale, Nal^R, virulente	A. Macmillan, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK
Δ*BMEII1101*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *BMEII1101*	Cette étude
Δ*BMEI2025*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *BMEI2025*	Cette étude
Δ*BMEII0900*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *BMEII0900*	Cette étude
manBcore	Nal^R, souche rugueuse R3, mutant transpositionnel (mini-Tn5) pour le gène *manBcore* (*BMEII0899*)	(González *et al.*, 2008)
B3B2	Nal^R, souche rugueuse R1, mutant transpositionnel (mini-Tn5) pour le gène *per (BMEI1414, perosamine synthase)*	(Godfroid *et al.*, 1998)
pMR*aiiD*	Souche de surexpression de l'AHL-acylase (nommée MG210)	(Godefroid *et al.*, 2010)
Δ*exoF* pMR*aiiD*	Souche Δ*exoF* portant le plasmide pMR*aiiDs*	(Godefroid, 2010)
Δ*exoF* pMR*aiiD*	Souche Δ*exoY* portant le plasmide pMR*aiiDs*	(Godefroid, 2010)
Δ*exoF* Δ*exoF*	Nal^R, souche de délétion pour les gènes *exoF* et *exoY*	Cette étude
B. abortus		
2308	Souche sauvage parentale, Nal^R, virulente	Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France
Δ*exoF*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *exoF* (BAB2_0804)	Cette étude
Δ*exoY*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *exoY* (BAB1_0802)	Cette étude
Δ*exoP1*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *exoP1* (BAB2_0805)	Cette étude
Δ*exoP2*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *exoP2* (BAB2_0099)	Cette étude
Δ*exoQ*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *exoQ* (BAB2_0106)	Cette étude
Δ*CS*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *cellulose synthétase* (BAB2_0693)	Cette étude
Δ *BAB2_0133*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *BAB2_0133*	Cette étude
Δ*BAB1_2103*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *BAB1_2103*	Cette étude
Δ*ManCcore*	Nal^R, souche de délétion pour le gène *BAB2_0856*	Cette étude
E. coli		
DH10B	F– *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 Δ(*ara leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L *nup*G λ – (Sm^R)	Gibco BRL
S17-1	recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λ pir, allow plasmid mobilization	(Simon R, 1983)
Plasmids		
pGEMT-easy	Amp^R	Promega
pJQ200-uc1	*SacB* gene, Gtm^R	(Donnenberg & Kaper, 1991)
pJQΔ*exoF(ab)*	*SacB* gene, Gtm^R, plasmid contenant le fragment Δ*exoF* pour construire la souche de délétion *B. abortus*	Cette étude
pJQΔ*exoY*	*SacB* gene, Gtm^R, plasmid contenant le fragment Δ*exoY* pour construire la souche de délétion *B. abortus*	(Godefroid, 2010)
pJQΔ*exoP1*	*SacB* gene, Gtm^R, plasmid contenant le fragment Δ*exoP1* pour construire la souche de délétion *B. abortus*	(Godefroid, 2010)
pJQΔ*exoP2*	*SacB* gene, Gtm^R, plasmid contenant le fragment Δ*exoP2* pour construire la souche de délétion *B. abortus*	(Godefroid, 2010)
pJQΔ*exoQ*	*SacB* gene, Gtm^R, plasmid contenant le fragment Δ*exoQ* pour construire la souche de délétion *B. abortus*	(Godefroid, 2010)
pJQΔ*CS*	*SacB* gene, Gtm^R, plasmid contenant le fragment Δ*CS* pour construire la souche de délétion *B. abortus*	(Godefroid, 2010)
pJQΔ*BMEII1101*	*SacB* gene, Gtm^R, plasmid contenant le fragment Δ*BMEII1101* pour construire les souches de délétion *B. melitensis* et *B. abortus*	Cette étude
pJQΔ*BMEI2025*	*SacB* gene, Gtm^R plasmid contenant le fragment Δ*BMEI2025* pour construire les souches de délétion *B. melitensis* et *B. abortus*	Cette étude
pJQΔ*BMEII0900*	*SacB* gene, Gtm^R plasmid contenant le fragment Δ*BMEII0900* pour construire les souches de délétion *B. melitensis* et *B. abortus*	Cette étude

Nal^R, résistance à l'acide nalidixique ; Amp^R, résistance à l'ampicilline; Gtm^R, résistance à la gentamycine.

Les souches de *Brucella* spp. sont cultivées en milieu 2YT (16 g/l peptone 10 g/l yeast extract 5 g/l NaCl) liquide en préculture (une nuit). Des cultures sont inoculées à DO = 0.1 dans du 2YT ou du 2YT contenant 400 mM NaCl et incubées pendant 72 h à 37°C avec agitation. Les cultures en milieu défini RPMI1640-Glucose (Invitrogen, Cat. N° 11879020) contenant du xylose (2 g/l) et supplémenté si nécessaire avec 400 mM NaCl sont inoculées à partir d'une préculture en 2YT. Au besoin, les bactéries sont lavées deux fois dans du PBS avant d'être remise en culture. Inoculées à une DO initiale de 0.1, les cultures sont incubées à 37°C sous agitation pendant 72 h. Ces cultures en milieu défini sont utilisées pour la purification de l'EPS et les tests d'hémagglutination.

Les souches d'*E. coli* sont cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) avec les antibiotiques adéquats. L'ampicilline, la gentamycine et l'acide nalidixique sont utilisé à 100 μg/ml, 50 μg/ml et 25 μg/ml.

II. Construction des mutants de deletion

Les mutants de délétions dans les souches *B. melitensis* et *B. abortus* ont été construits par remplacement allèlique comme décrit précédemment (Mignolet *et al.*, 2010). Les mutants de délétion pour les gènes *exoY*, *exoP1*, *exoP2*, *exoQ* et *cellulose synthétase* chez *B. abortus* ont été obtenus grace aux plasmides pJQΔ*exoY,* pJQΔ*exoP1,* pJQΔ*exoP2,* pJQΔ*exoQ et* pJQΔ*CS* construit précédemment (Godefroid, 2010). Les plasmides pJQΔ*exoF(ab),* pJQΔ*BMEII1101,* pJQΔ*BMEI2025 et* pJQΔ*BMEII0900* ont été construits au cours de ce travail afin d'obtenir les mutants de délétion pour le gène *exoF chez B. abortus* et les mutants de délétion pour les gènes BMEII1101 (ou BAB2_0133), BMEI2025 (ou BAB1_2103) *et* BMEII0900 (ou BAB2_0856) *chez B. melitensis* (ou *B. abortus*).

1. Obtention des plasmides

Les enzymes de restriction et les amorces proviennent respectivement de Roche et d'Eurogentec. Les séquences des amorces utilisées sont répertoriées dans la **table 2**.

Afin d'obtenir les mutants de délétions, nous avons généré un plasmide pJQ200 en deux étapes de clonage. D'abord, les régions (de 500 pb) en amont et en aval du gène à déléter ont été amplifiées par réaction PCR à partir d'ADN génomique de *B. melitensis* ou *B. abortus* en utilisant les couples d'amorces [F1 et R2] et [F3 et R4]. Pour chaque construction, une seconde PCR est utilisée pour accoler les 2 produits PCR avec les amorces [F1 et R4]. Le fragment ainsi obtenu a été cloné dans le pGEM-Teasy (Promega) pour générer un vecteur intermédiaire. Après vérification par restriction et séquençage, le fragment a été excisé par une restriction *NotI* et recloné dans le vecteur pJQ200-uc1 pour générer les vecteurs pJQΔ*exoF(ab),* pJQΔ*BMEII1101,* pJQΔ*BMEI2025 et* pJQΔ*BMEII0900*.

2. Conjugaison et sélection de mutants de délétion

Les vecteurs pJQ contenant le fragment d'intérêt a été transféré par conjugaison chez *B. melitensis* ou *B. abortus* à l'aide de la souche *E. coli* S17-1. Concrètement, 1 ml d'une suspension de *Brucella* spp. est mélangé avec 50 µl de bactéries donneuses *E. coli* S17-1 contenant le vecteur pJQ. Après lavage en 2YT, les bactéries sont resuspendues dans 100 µl de 2YT et déposées sur une boîte 2YT (sans antibiotique) pendant une nuit. Le lendemain, les bactéries sont striées sur une boîte 2YT contenant de l'acide nalidixique et de la gentamycine afin de sélectionner les *Brucella* spp. ayant reçu le plasmide.

Après sélection, les clones sont mis en culture en 2YT (sans pression de séléction) afin de favoriser la perte du plasmide. Enfin, une contre-sélection sur un milieu contenant 5 % de sucrose, permet d'obtenir des clones candidats (gentamycine sensible et sucrose résistant). Le remplacement allèlique a été vérifié par PCR en utilisant les amorces [Amont et Aval].

Table 2 : Amorces utilisées dans cette étude.

Nom	Séquence (5'-3')
I2025 F1	TGATCGAGGTCAGCCTTG
I2025 R2	GCCTCCTCACTCAGGCATTTTCATTGTG
I2025 F3	AATGCCTGAGTGAGGAGGCAAGCAGAATGTG
I2025 R4	GGCGCAATGCTGGTAAGC
II1101 F1	CGGGCCTCTGTATTCATC
II1101 R2	CGATCCGCATCATGCTGGACTCTTTGC
II1101 F3	CCAGCATGATGCGGATCGCGGATGATT
II1101 R4	TTTTCAGTCCTGCCCTGAC
ManCcore F1	ATGTCATCGCAAGCATGGC
ManCcore R2	GAATATGTTTCATGGCCTCGTCGCATC
ManCcore F3	AGGCCATGAAACATATTCAGCCAAATG
ManCcore R4	CTGTTTACCGAGCAACTG
PexoF amont F1	GGCAACATGCAGTCTTTGATCGGC
PexoF aval R2	GAAGATCTTCGGAATTCCCGATGAAAGCAAAGCCGC
T exoF amont F3	GGAATTCCGAAGATCTTCTGTGATACAATAATAGCG
ExoFab R4	CTGCGCGATAAGCCATTCCT
Amont I2025	CCGTTTTCTTGCGCACCTG
Amont II1101	GAAGAACCGCATAATCTG
Amont ManCcore	ACACCGCATTGGAAAGCC
Amont CS F	ATTCATCGGCAGCCACAC
Amont exoF F	GCGGAAAATCGGGCTTAG
Amont exoP1 F	GAACAGTGGCAGCATCAG
Amont exoP2 F	GGCGAAAAGCTCAGGCTT
Amont exoQ F	CGAGAACATGGTTTCCGC
Amont exoY F	ATCGCTTCCAAACTGC
Aval I2025	CCGCGTGACGATATCAAG
Aval II1101	CCGGGATGGAGCATTATCAG
Aval ManCcore	ATTCCTCACGGATACTGGG
Aval CS R	CTTGAACGTCAGGCCCAT
Aval ExoFab R	GGGTAAACACGATATCCG
Aval exoP1 R	CAACTCAGCCTCAAACCG
Aval exoP2 R	CGCGCTATCTCAAGGATG
Aval exoQ R	AGGCTGAAACGCTTTCCA
Aval exoY R	CGCCAAGCAGGAATATAC

III. Observations microscopiques

1. Agarose PAD

Cette technique rapide et facile à mettre en œuvre consiste à immobiliser les bactéries sur une couche d'agarose recouvrant une lame de verre. Pratiquement, 2 µl de bactéries issus d'une culture liquide (pour l'observation d'agrégats, les 2 µl bactéries sont prélevées à partir d'une culture de 72 h en 2YT 400mM NaCl) sont déposés sur une couche d'agarose 1 % PBS et recouverts d'une lamelle couvre-objet (Jacobs *et al.*, 1999). Le montage est scellé au VALAP (vaseline : lanoline : paraffine dans les proportions 1: 1: 1) et les bactéries sont observées au microscope Nikon i80 avec un objectif 100X. L'acquisition et le traitement des images sont réalisés par la caméra Hamamatsu Orca-ER LCD et le software NIS element (Nikon).

2. Marquage FM4-64

Les bactéries sont incubées en présence de la sonde fluorescente FM4-64 (1 µg/ml) pendant 5 minutes et lavées au PBS. Le FM4-64 est une sonde fluorescente qui marque spécifiquement les membranes (Bolte *et al.*, 2004).

3. Double marquage ConA-FITC/iodudre de propidium

Ce marquage est réalisé selon le protocole décrit par (Uzureau *et al.*, 2007). En bref, 200 µl bactéries préalablement fixée à la paraformaldéhyde 2 % sont incubées en présence de 100 µl de Concanavaline A couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (ConA-FITC) (1 mg/ml) et de 1 µl d'iodure de propidium (10 mM). Après incubation pendant 30 minutes dans le noir, un lavage au PBS pH 8.5 est réalisé et les bactéries sont observées au microscope à fluorescence.

IV. Infections cellulaire et en souris

Les infections en modèle cellulaire et murin ont été réalisées selon le protocole décrit au chapitre III.

V. Methodes relatives au LPS

1. Cristal violet

La solution de cristal violet utilisée est composée de 0.05 % de cristal violet et d'éthanol 100 %. Cette solution est appliquée sur des colonies sur milieu solide. Cette méthode permet la discrimination entre les colonies violettes de souches rugueuses-LPS et les colonies blanches de souches lisses-LPS.

2. Dot blot

Le dot blot consiste à déposer directement l'échantillon sur une membrane de nitrocellulose sous forme de gouttes. Après dépôt, les étapes de détection classiques d'un Western blot sont réalisées. Concrètement, des extraits totaux de bactéries inactivées à la chaleur (1 h à 80°C) sont dilués en série et déposés sur une membrane de nitrocellulose. Après séchage à température ambiante, la membrane est saturée dans une solution de PBS Tween 20 0.05 % lait 5 % pendant une nuit à 4°C. L'immunodétection est réalisée par un anticorps monoclonal de souris (A76 12G12 F12, surnageant de culture d'hybridomes) (Cloeckaert *et al.*, 1992) reconnaissant spécifiquement la chaîne O du LPS de *Brucella* spp. Après trois lavages successifs de 10 minutes avec du PBS Tween 20 0.05 %, la membrane est incubée en présence de l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplée à l'HRP (Horseradish peroxidase) (Amersham) (dilution 1:10 000 dans du PBS Tween 20 0.05 % lait 1 %). Enfin, après trois lavages successifs de 10 minutes avec du PBS Tween 20 0.05 %, la révélation a été réalisée par le système ECL (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.0009 % H_2O_2, 0.2 mM acide coumarique et 1.25 mM luminol).

VI. Purification de l'EPS

Le protocole de purification de l'EPS a été mis au point par M. Godefroid (Godefroid *et al.*, 2010). La première étape consiste à précipiter les protéines présentes dans la culture, par ajout d'acide trichloroacétique (concentration finale de 4 %). Une ultracentrifugation (35 min à 22000 g et à 4°C permet ensuite d'éliminer les bactéries et les précipitats. Le surnageant récolté est filtré (Stericup de 0,22 µm ; Millipore) et les polysaccharides s'y trouvant sont précipités par ajout graduel d'éthanol 95 % froid. Une centrifugation (30 min à 10000 rpm, 4°C) permet de récupérer les polysaccharides. Après avoir resuspendus les polysaccharides dans de l'eau MilliQ, un volume égal de phénol chaud (66°C) est ajouté. L'incubation à 66°C suivie d'une centrifugation permet d'obtenir deux phases : une phase aqueuse contenant l'EPS et une phase phénol contenant le LPS. Seule la phase aqueuse est récupérée et ensuite dosée (voir méthode de dosage à l'anthrone). Enfin, une étape de dialyse est réalisée afin d'éliminer les monosaccharides contaminants et l'analyse par HPLC après une hydrolyse acide (voir méthode HPLC) peut être effectuée.

VII. Dosage a l'anthrone de l'EPS

Le dosage à l'anthrone est une des méthodes permettant de doser les sucres présents au sein d'un échantillon. Cette méthode est basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide (H_2SO_4 100 %). Les dérivés qui en résultent se condensent avec l'anthrone pour donner des produits colorés. Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle à partir d'une solution étalon en glucose (2 g/l). Les concentrations de la gamme de glucose sont comprises entre 0 et 200 mg/l. L'anthrone est préparé à une concentration de 2 g/l en H_2SO_4 et ajouté à raison de 800 µl aux 400 µl des échantillons de la gamme ou de chaque échantillon d'intérêt. La réaction s'effectue à 37°C pendant 10 minutes au terme desquelles la DO est mesurée à 620 nm (Godefroid *et al.*, 2010).

VIII. Analyse HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

La technique HPAE (High Performance Anion Exchange) a été utilisée afin de séparer les hydrates de carbone par l'intermédiaire de colonnes de chromatographie adaptées. La diffusion des constituants au sein de la colonne est limitée par l'application d'une forte pression augmentant ainsi la résolution. L'HPAE est couplée à l'ampérométrie pulsée comme méthode de détection. Avant d'être analysés, les échantillons de polysaccharides purifiés ont été hydrolysés à l'acide trifluoroacétique (TFA) 4 N. Après évaporation, chaque échantillon est resuspendu dans 200µl d'eau et injecté dans la colonne (Godefroid *et al.*, 2010).

IX. Test d'inhibition d'hemagglutination

1. Isolement et conservation de globules rouges de moutons

Ce test se base sur l'agglutination de globules rouges, ou hémagglutination, reconnus par la Concanavaline A (ConA) (Sumner & Howell, 1936). Ce test est réalisé en plaque 96 puits à fond rond. Les globules rouges ont été purifiés à partir de sang de moutons prélevé en présence de l'anticoagulant héparine lithium (tube BD Vacutainer LH 170I.U). Après centrifugation du sang (15 minutes à 2500 rpm), la phase contenant les globules rouges a été récupérée. Les globules rouges ont été resuspendus dans du tampon Véronal (Biomérieux) dans lequel de l'azide de sodium (0.1 % final) est ajouté comme agent conservant. Les globules rouges sont ensuite conservés à 4°C.

2. TEST D'INHIBITION D'HÉMAGGLUTINATION

2.1. Obtention des échantillons

Après 72 h de croissance, le surnageant de culture est obtenu après centrifugation et filtration (0.22 μm) des cultures. Les surnageants obtenus sont alors concentrés (10 ou 20X) sur centricon (3500 Da) (Millipore). Pour le test sur les bactéries, celles-ci sont récupérées par centrifugation (10 min à 3500 rpm) après 72 h de croissance dans un milieu RPMI-Glu+Xyl 400 mM NaCl, lavées dans du PBS et inactivées à la chaleur (1 h à 80°C) si nécessaire. Des dilutions sériées de 2 en 2 des échantillons sont réalisées en utilisant une solution de NaCl 0.9 %.

2.2. Mise en place du test d'inhibition d'hémagglutination

Le test se réalise en deux étapes dans une plaque 96 puits à fond rond. D'abord, chaque dilution des échantillons (25 μl) est mise en présence de 25 μl d'une solution de Concanavaline A (Sigma) préparé à 0.05 mg/ml dans une solution de 0.9 % NaCl pendant 15 min à température ambiante. Par la suite, une quantité égale de globules rouges est ajouté dans chaque puits soit un volume de 50 μl d'une suspension fraîchement diluée. Un contrôle positif consiste à mettre en présence 25 μl de NaCl 0.9 % et 25 μl de ConA avant l'ajout des globules rouges. Deux contrôles négatifs sont réalisés : l'un met en présence les globules rouges avec 50 μl de NaCl 0.9 % et l'autre avec 50 μl d'échantillon non dilué. Une solution de mannan (Sigma) préparé dans du NaCl 0.9 % à une concentration de 10 mg/ml est utilisé comme contrôle. Après sédimentation, les plaques sont scannées (vue du dessous) ou photographiées (vue du dessus). Il convient cependant de noter que les globules rouges subissant une certaine hémolyse au cours du temps, des lavages ont été nécessaires et répétés avant chaque manipulation de façon à éliminer les cellules lysées rendant de ce fait difficile la reproductibilité. En effet, la quantité de globules peut quelque peu varier d'une expérience à l'autre. C'est pourquoi chaque expérience a été réalisé en parallèle avec les contrôles nécessaires.

ANNEXE

ANNEXE

RECHERCHE DE GENES DE BIOSYNTHESE D'UN EPS CHEZ *BRUCELLA* SPP.

Bien avant de remettre en doute la production ou la nature d'un EPS, des recherches ont été menées en vue d'identifier les gènes codant les enzymes de biosynthèse de l'EPS chez *Brucella* spp. Comme présenté dans le chapitre I, c'est le développement d'un test de dosage de l'EPS permettant de détecter sa présence (ou non) qui a d'ailleurs permis de remettre sa production en cause. Cependant, ces recherches ont néanmoins abouti à des résultats intéressants qui seront présentés dans les points suivants. Cette partie du travail n'est pas sujette à publication et est donc présentée comme des résultats supplémentaires.

1. INTRODUCTION

1.1. Recherche des gènes de biosynthèse chez *Brucella melitensis*

Dans un premier temps, le phénotype d'agrégation de souches QS déficientes[17] en culture liquide dans un milieu 2YT (Godefroid *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2007) a été utilisé comme témoin de la production d'EPS. Ainsi, un comportement agrégatif défectueux était attendu dans une souche qui serait déficiente pour la production d'EPS.

1.1.1. Recherche *a priori* de gènes homologues aux gènes de biosynthèse de l'EPS chez *B. melitensis* 16M

Une recherche dans le génome de *B. melitensis* a permis de mettre en évidence plusieurs gènes homologues à des gènes impliqués dans la biosynthèse d'EPS chez d'autres α-protéobactéries (**table 1**). Nombreux de ces gènes sont localisés dans un locus qui est absent du génome de *B. abortus* **(figure 1)**. L'analyse a notamment permis de mettre en évidence plusieurs gènes homologues aux gènes impliqués dans la production de succinoglycan chez *S. meliloti* (**table 1**).

[17] La dénomination de souches QS déficientes regroupe des souches de *Brucella* spp. altérées dans leur système QS en raison d'une mutation du régulateur VjbR ou de la surexpression d'une AHL-acylase, enzyme capable de dégrader les acyl homosérine lactones (AHL).

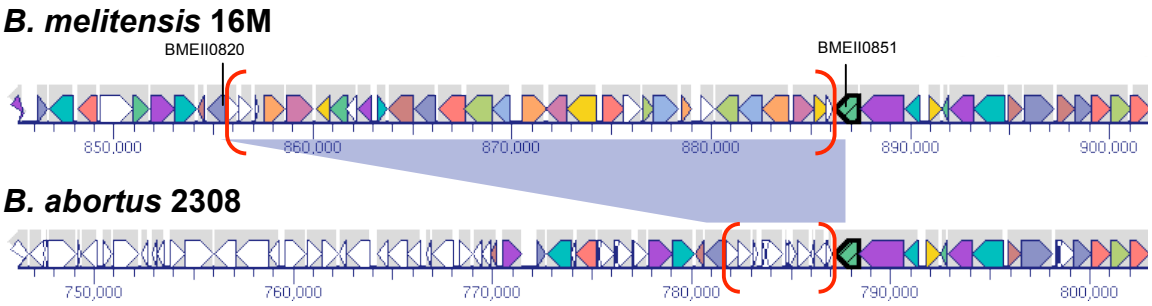


Figure 1 : Locus de 25 kb sur le chromosome 2 de *B. melitensis* absent dans le génome de *B. abortus*. Modifié à partir de Biocyc.

	B. melitensis			Gène homologue *S. meliloti*			
	Nom	**Locus Tag**	**Genbank Annotation**	**Nom**	**% identité (a.a.)**	**% similarité (a.a.)**	**E-value**
Synthèse/activation de sucres	*manBcore*	BMEI0899	phosphomannomutase				
		BMEI0921	UDP glucose-4-épimérase	*exoB*	43%	58%	1,00E-87
	wboB	BMEI0997	glycolstransferase				
		BMEI1237	UDP glucose-4-épimérase				
	manA	BMEI1394	mannose-6-phosphate isomérase				
	manC	BMEI1395	mannose-1-phosphate guanyltransferase				
	manB	BMEI1396	phosphomannomutase				
	gmd	BMEI1413	GDP-mannose 4,6-dehydratase				
	wbkC	BMEI1418	GDP-mannose 4,6-dehydratase				
	wbkD	BMEI1427	capsular polysaccharide biosynthesis protein CapD				
		BMEI2025	mannose-1-phosphate guanyltransferase				
		BMEII0023	UTP glucose-1-phosphate uridyltransferase	*exoN*	65%	80%	2,00E-144
		BMEII0440	dTDP-glucose 4,6-dehydratase				
		BMEII0724	endoglucanase H				
		BMEII0727	UDP-glucose 6-dehydrogenase				
		BMEII0728	cellulose synthase catalytic subunit				
		BMEII0729	cellulose synthase catalytic subunit				
		BMEII0730	UDP glucose-4-épimérase	*exoB*	53%	68%	1,00E-116
		BMEII0731	dTDP-glucose 4-6-dehydratase				
		BMEII0827	glucose-1-phosphate cytidyltransferase				
		BMEII0830	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase				
		BMEII0832	UDP glucose-4-épimérase				
		BMEII0836	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase				
		BMEII0848	GDP-mannose 4,6-dehydratase				
		BMEII0849	GDP-4-dehydro-D-rhamnose reductase				
		BMEII0850	GDP-fucose synthetase				
	manCcore	BMEII0900	mannose-6-phosphate isomérase				
Assemblage du monomère	*wboA*	BMEI0998	glycolstransferase				
		BMEI1037	glycolstransferase				
	exoY	BMEI1177	colanic biosynthesis UDP-glucose lipid carrier transferase	*exoY*	59%	72%	3,00E-40
		BMEI1326	glycolstransferase				
	wbkE	BMEI1393	glycolstransferase				
	wbkA	BMEI1404	glycolstransferase				
		BMEI1602	glycolstransferase				
	pgm	BMEI1886	phosphoglucomutase	*exoC*	74%	87%	0.0
		BMEII0835	glycolstransferase				
		BMEII0837	glycolstransferase	*exoA*	28%	47%	2,00E-40
		BMEII0846	glycolstransferase				
		BMEII0847	glycolstransferase				
	exoF	BMEII0851	exopolysaccharide production protein exoF precursor	*exoF*	28%	47%	2,00E-40
		BMEII1101	glycolstransferase				
		BMEII1128	glycolstransferase	*exoM*	27%	42%	1,00E-13
		BMEII1129	glycolstransferase				
		BMEII1130	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid transferase				
Polymérisation /transport	*exoP1*	BMEI0852	succinoglycan biosynthesis transport protein exoP	*exoP*	24%	44%	5,00E-31
		BMEI1175	putative capsule polysaccharide export protein precursor				
		BMEII0838	succinoglycan biosynthesis transport protein exoT	*exoT*	23%	42%	2,00E-13
	exoQ	BMEII1127	exopolysaccharide production protein exoQ	*exoQ*	25%	44%	2,00E-10
	exoP2	BMEII1132	succinoglycan biosynthesis transport protein exoP	*exoP*	25%	46%	6,00E-29

Table 1 : Liste des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'un EPS chez *B. melitensis* classifiés selon les étapes de synthèse. Les gènes surlignés en gris appartiennent au locus de 25 kb absent chez *B. abortus*. Les gènes surlignés en jaune sont impliqués dans la synthèse du LPS. Les gènes surlignés en bleu ont été ciblés lors de la recherche de gènes de biosynthèse d'un EPS chez *Brucella*. Les valeurs d'identité, de similarité et l'E-value entre les séquences protéiques de *B. melitensis* et *S. meliloti* sont indiquées.

1.1.2. Implication controversée du locus de 25 kb absent de la souche *B. abortus* dans la synthèse d'EPS chez une souche QS déficiente

Parmi les gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'un EPS chez *B. melitensis* (**table 1**), de nombreux gènes sont regroupés dans un locus de 25 kb. L'absence de ce locus dans le génome de *B. abortus* **(figure 1)**, fournissait d'emblée l'opportunité de vérifier l'implication potentielle de ce locus dans la production d'EPS chez *Brucella* spp. en comparant le comportement agrégatif d'une souche *B. abortus* et *B. melitensis*.

Cependant, en fonction du *background* de la souche QS déficiente utilisée, des résultats contradictoires ont été obtenus. En effet, contrairement aux souches *B. melitensis* mutées pour le gène *vjbR*, ou exprimant un allèle[18] de *vjbR* incapable de lier les AHL, une souche *B. abortus* mutée pour le gène *vjbR* et/ou exprimant ce même allèle déficient ne formait pas d'agrégats en culture (Uzureau *et al.*, 2007). Cette donnée suggérait fortement l'implication de ce locus dans la synthèse d'un EPS. En revanche, aucune différence d'agrégation n'a été observée entre les souches agrégatives surexprimant l'AHL-acylase, *B. melitensis aiiD*+[19] et *B. abortus aiiD*+ tant au niveau macroscopique que microscopique (Godefroid, 2010). L'implication de ce locus dans la production de l'EPS chez *Brucella* spp. a donc été exclue dans le background *aiiD*+ (Godefroid, 2010).

1.1.3. Délétions de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'un EPS chez *B. melitensis aiiD+*

Les recherches se sont ensuite focalisées sur les gènes de *B. melitensis* homologues aux gènes *exoF* (BMEII0851), *exoY* (BME1177), *exoP* (BMEII0852 et BMEII1132), *exoQ* (BMEII1127) impliqués dans la synthèse du succinoglycan (EPSI) chez *S. meliloti*. Par ailleurs, les agrégats formés par la souche *B. melitensis aiiD*+ étant partiellement dissociés par un traitement à la cellulase (Godefroid *et al.*, 2010), les gènes aannotés comme encodant une cellulose synthétase (BMEII0728-0729) ont également été ciblés (Godefroid, 2010). Des mutants de délétion pour les gènes *exoF*, *exoY*, *exoP1*, *exoQ* et *cellulose synthétase* ont été construit dans un background *B. melitensis aiiD*+ (Godefroid, 2010). Seul le gène *exoP2* n'a pu être délété chez *B. melitensis*.

La capacité des souches *B. melitensis aiiD*+ Δ*exoF*, Δ*exoY*, Δ*exoP1*, Δ*exoQ et* Δ*cellulose synthétase* à former des agrégats en culture liquide a été vérifiée aussi bien macroscopiquement que microscopiquement. Cependant, aucune de ces souches ne présentaient d'altération dans la formation d'agrégats en culture liquide. Les observations microscopiques ont néanmoins mis en évidence la présence de chaînettes de bactéries dans les cultures des souches *B. melitensis aiiD*+ Δ*exoF* et *B. melitensis aiiD*+ Δ*exoY*

[18] Souches Δ*vjbR* ::Kan^R (CD100) exprimant un allèle *vjbR* (*D82A*) ou *vbjR* (Δ*1-180*) incapable de lier les AHLs.
[19] L'abréviation *aiiD*+ est utilisée pour désigner une souche contenant un plasmide pMR*aiiD*, surexprimant l'AHL-acylase.

(figure 2). Une quantification de la proportion des bactéries formant des chaînettes (>5 bactéries) a été réalisée dans les différentes souches. Seules les souches Δ*exoF* (*aiiD*+) et Δ*exoY* (*aiiD*+) présentent une proportion significativement élevée de bactéries en chaînettes (respectivement 24,9 % et 34,5 %) comparativement à la souche *B. melitensis aiiD*+ (<3 %) (Godefroid, 2010).

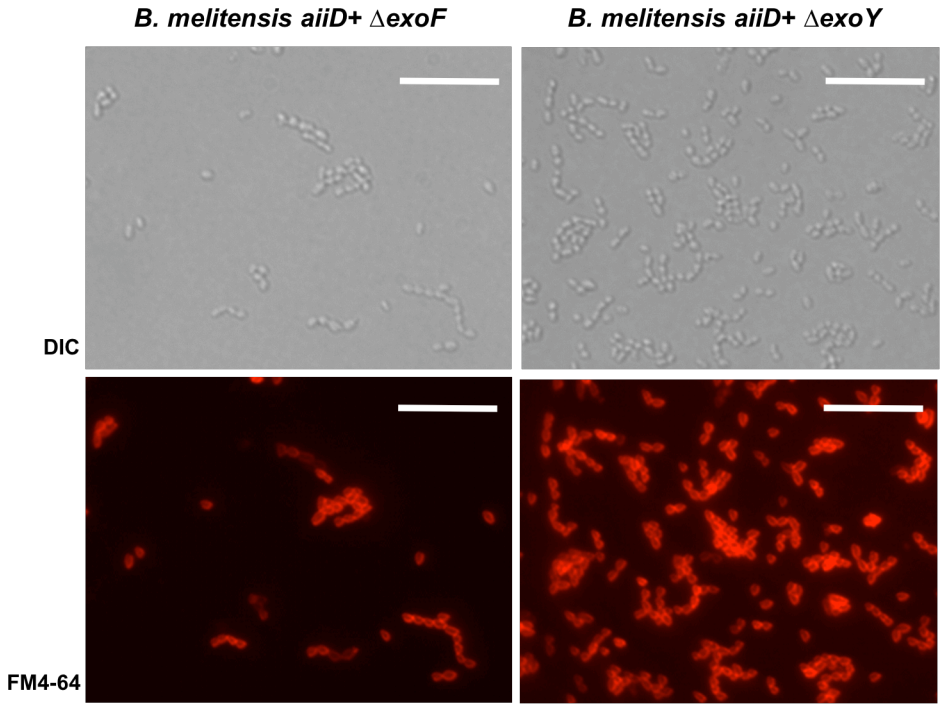


Figure 2 : Micrographies en DIC et épifluorescence des chaînettes formées par les bactéries *B. melitensis aiiD*+ Δ*exoF* et *B. melitensis aiiD*+ Δ*exoY* marquées par la sonde FM4-64 ciblant les lipides. Echelle : 10 μm

Enfin, l'EPS produit par les souches *B. melitensis aiiD*+ Δ*exoF*, *aiiD*+ Δ*exoY*, *aiiD*+ Δ*exoP1*, *aiiD*+ Δ*exoQ et aiiD*+ Δ*cellulose synthétase* a été purifié, hydrolysé et analysé en HPLC selon le protocole mis au point par M. Godefroid (Godefroid *et al.*, 2010). La comparaison de la composition de l'EPS issu de la souche *B. melitensis aiiD*+ et des EPS issus des différents mutants ou des souches *B. abortus aiiD*+ ou *B. suis aiiD*+ n'a révélée aucune différence **(figure 3)** (Godefroid, 2010). Le polysaccharide purifié dans ces conditions n'étant qu'un résidu du milieu de préculture utilisé (**cfr. chapitre I**), on sait actuellement que cette stratégie était inadaptée pour déceler des différences de composition d'EPS. En effet, quelque soit la souche mise en culture, le polysaccharide purifié et analysé s'avérait être le mannan présent dans le milieu de culture et donc de composition identique. Cette partie ne sera donc pas détaillée.

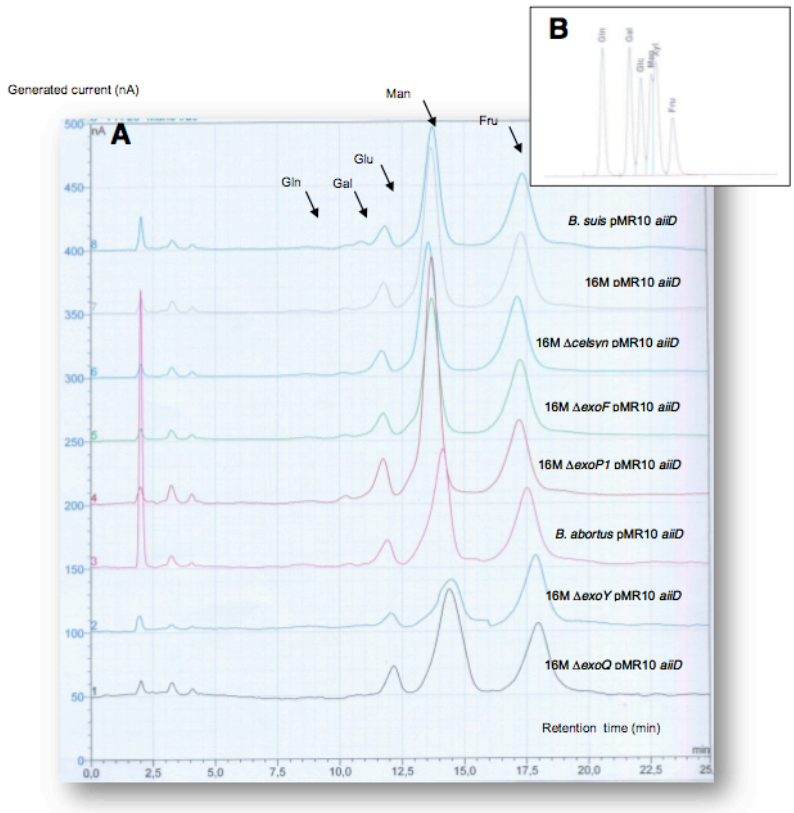


Figure 3 : Chromatogrammes HPLC de l'EPS hydrolysé issu des différentes souches de *Brucella aiiD*+. (A) avec les standards correspondants (B) Le fructose est utilisé comme standard interne dans tous les échantillons. Gln : Glucosamine ; Gal : galctose ; Glu : Glucose ; Man : mannose ; Fru : fructose (Godefroid, 2010).

2. RÉSULTATS

La mise au jour d'un phénotype d'agrégation des souches *B. melitensis* et *B. abortus* WT lors d'une croissance de 72 h en 2YT contenant 400 mM NaCl (Yanez-Villanueva, 2009) nous a donné à nouveau l'opportunité de rechercher des gènes de biosynthèse d'un EPS. Dans un premier temps, une stratégie comparable à celle mise en place par M. Godefroid a été appliquée. Cette stratégie est basée sur le postulat que la formation d'agrégats est intimement corrélée à la production d'EPS. Selon cette hypothèse, le phénotype d'agrégation peut être utilisé comme témoin de la production d'EPS. On s'attend ainsi à ce qu'une souche déficiente pour la production d'EPS présente un phénotype agrégatif défectueux.

Comme mentionné précédemment, *B. melitensis* possède un locus de 25 kb qui est absent du génome de *B. abortus* **(figure 1)**. Ce locus code pour des enzymes potentiellement impliquées dans le métabolisme des sucres et la voie de biosynthèse de polysaccharides (**Table 1**). Puisqu'au même titre que *B. melitensis,* la souche *B. abortus* possède la capacité de former des agrégats en milieu hypersalin et afin d'éviter une éventuelle redondance de fonction entre des gènes situés dans ce locus avec d'autres gènes situés ailleurs dans le génome, la suite de notre travail s'est essentiellement effectué sur *B. abortus* 2308.

2.1. La recherche des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'EPS chez la souche *B. abortus* 2308

2.1.1. Construction de mutants chez *B. abortus* 2308

Pour les mêmes raisons que celles citées plus haut, les gènes *exoF, exoY, exoP1, exoP2, exoQ* et *cellulose synthétase* ont été ciblés en priorité. Par ailleurs, un gène codant une bactoprénol glycosyl transférase (BMEII1101) a également fait l'objet de nos investigations.

Enfin, des gènes codant pour des enzymes potentiellement impliquées dans l'activation des sucres, étape initiale dans la voie de biosynthèse de l'EPS ont été aussi invalidés. Ces gènes sont annotés comme mannose-1-phosphate guanyltransférase (BMEI2025) et mannose-6-phosphate isomérase (BMEII0900) **(figure 4)**. Ce dernier est situé en aval d'un gène codant une phosphomannomutase (*manBcore*) impliquée dans la synthèse du core et de la chaîne O du LPS de *Brucella* (González *et al.*, 2008).

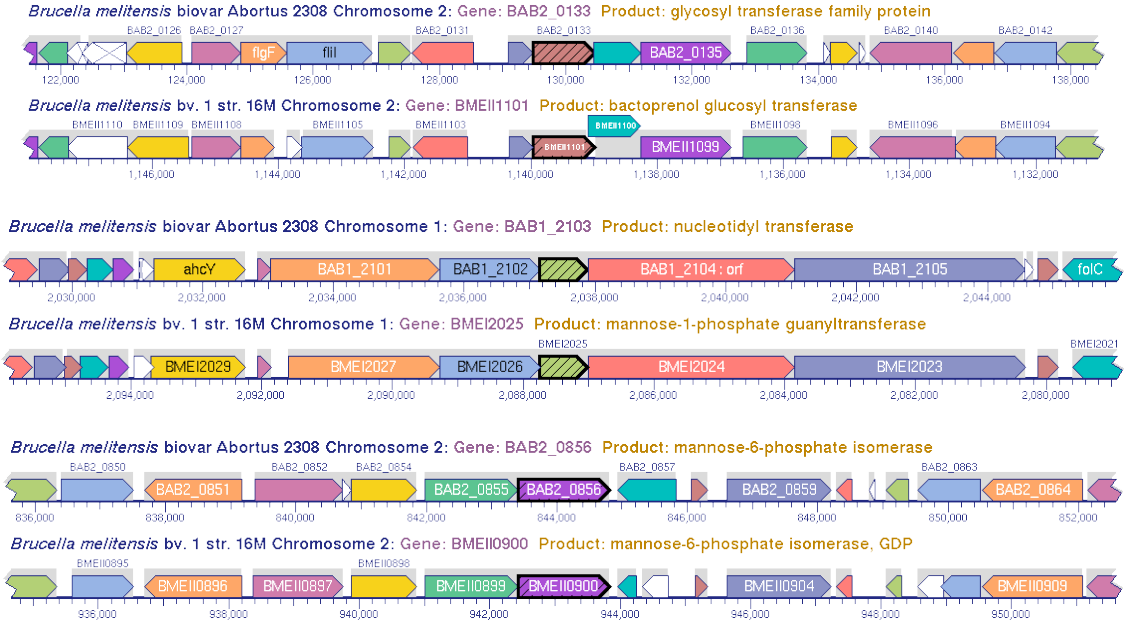


Figure 4 : Organisation génomique des gènes BMEII1101, BMEI2025 et BMEII0900 chez *B. melitensis* et de leurs homologues chez *B. abortus* (Biocyc)

Des mutants de délétion pour les gènes *exo*F (BAB2_0804), *exo*Y (BAB1_0802), *exo*P1 (BAB2_0805), *exo*P2 (BAB2_0099), *exo*Q (BAB2_0106) et *cellulose synthétase* (BAB2_0693) ont été construits chez *B. abortus* 2308. Parallèlement, des mutants de délétion pour les trois gènes (BMEII1101, BMEI2025 et BMEII0900) ont été construits dans les souches *B. melitensis* 16M *et B. abortus* 2308. L'ensemble de ces mutants a été construits par remplacement allélique (Mignolet *et al.*, 2010) et vérifié par PCR.

2.1.2. Vérification du phénotype rugueux des mutants construits

Avant de poursuivre, il nous fallait vérifier la présence d'un LPS lisse chez les souches mutées pour nos gènes d'intérêt. En effet, en plus de leur tendance à la sédimentation

(Moreno & Moriyón, 2006) **(figure 5A)**, les souches *Brucella* rugueuses (sans chaîne O) agrègent spontanément en milieu 2YT **(figure 5B)**. Ainsi, la souche *B. melitensis* B3B2 mutée pour le gène *perA* impliqué dans la synthèse de la pérosamine (précurseur de la chaîne O) et un mutant *B. melitensis manBcore* (Godfroid *et al.*, 1998; González *et al.*, 2008) forment des agrégats bactériens après 72 h de culture en 2YT **(figure 5B)**. Comme les agrégats des souches altérées pour le QS (Godefroid *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2007) et les souches WT en milieu hypersalin (Yanez-Villanueva, 2009), les agrégats formés par les souches rugueuses sont marqués par la ConA-FITC **(figure 5B)**. Ce marquage atteste donc de la présence de sucres contenant des dérivés de mannose ou glucose au sein de ces agrégats bactériens.

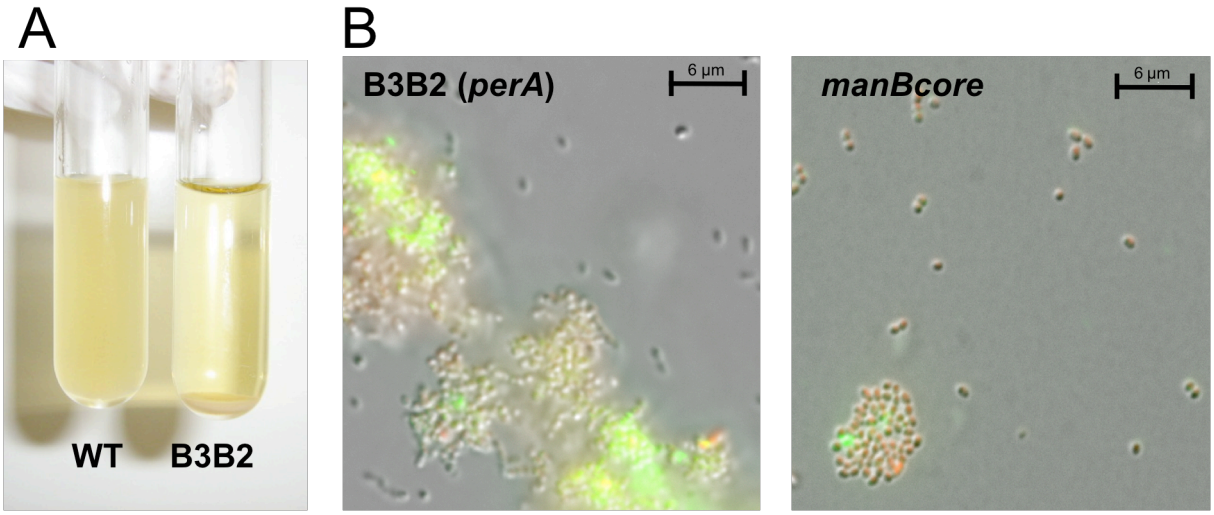


Figure 5 : (A) Sédimentation des bactéries *B. melitensis* WT (lisse) et B3B2 (rugueuse) d'une culture après une nuit en phase stationnaire. (B) Micrographies en épifluorescence des agrégats de souches B. *melitensis* rugueuses doublement marqués ConcanavalineA-FITC/Iodure de propidium.

Nous avons donc vérifié le phénotype lisse ou rugueux des mutants obtenus par la méthode de coloration au crystal violet (Moreno & Moriyón, 2006). Après coloration, les colonies formées par tous nos mutants étaient blanches comme celles de la WT contrairement à la souche contrôle B3B2 qui présentaient des colonies violettes (non montré). Afin de confirmer ces données, un dot blot a été réalisé sur des extraits totaux de bactéries avec un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne O du LPS de *Brucella* **(figure 6)**. Les résultats obtenus confirment la présence de la chaîne O du LPS dans toutes les souches testées sauf dans la souche rugueuse B3B2 utilisée comme contrôle négatif. Aucun des gènes délétés n'est donc impliqué dans la synthèse de la chaîne O du LPS. Ce résultat était au moins attendu pour les gènes *exoP2* et *exoQ* (González *et al.*, 2008). De façon plus surprenante, un phénotype lisse est aussi observé pour les souches délétées pour le gène BMEII0900 (ou BAB2_0856) situé en aval du gène *manBcore* ; ce dernier étant impliqué dans la synthèse du LPS (González *et al.*, 2008; Moreno & Moriyón, 2006).

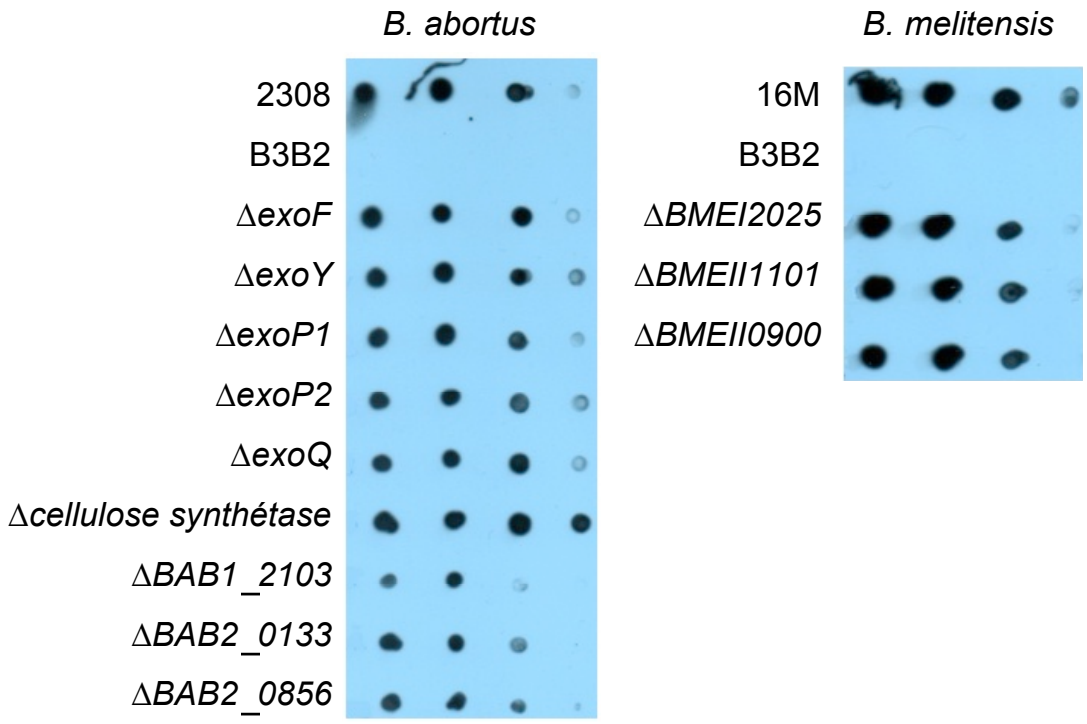


Figure 6 : Dot blot anti-chaîne O-LPS réalisé sur des extraits totaux des différents mutants obtenus. Des dilutions sériées ont été réalisées de gauche à droite. Les souches *B. abortus* 2308 et *B. melitensis* 16M ont été utilisées comme contrôle positif. La souche B3B2 (*B. melitensis*) a été utilisée comme contrôle négatif. L'anticorps primaire utilisé est un anticorps monoclonal de souris (A76 12G12 F12) spécifique de la chaîne O du LPS de *Brucella* spp.

2.1.3. Implication dans le phénotype d'agrégation

Afin de déterminer si les gènes ciblés par les différentes délétions codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'EPS, nous avons testé l'absence ou la présence d'agrégat en milieu 2YT supplémenté avec 400 mM NaCl pour chacun des mutants obtenus. Tous les mutants testés formaient des agrégats bactériens en milieu supplémenté en NaCl (non montrés).

Afin de dissocier l'agrégation bactérienne de la production d'un EPS, nous avons développé un test de dosage de l'EPS (marquée à la concanavaline A) par inhibition de l'hémagglutination (**cfr. Chapitre I**). Ce test devrait permettre de déceler une différence quantitative de la production d'EPS même si celle-ci ne se reflète pas vis-à-vis du phénotype agrégatif. Les conclusions inattendues de ces tests ont finalement remis en cause la présence d'un EPS dans les agrégats bactériens en culture.

2.2. Le rôle des gènes *exoF* et *exoY* chez *B. melitensis*

Pour rappel, les gènes *exoF* et *exoY* codent pour les enzymes responsables de l'addition du premier résidu saccharidique sur le *lipid carrier* chez *S. meliloti* **(cfr. introduction)**. Etant donné la formation particulière de chaînettes par les souches *B. melitensis aiiD+* Δ*exoF* et *B. melitensis aiiD+* Δ*exoY* **(figure 2)**, nous nous sommes penchés plus en détails sur l'implication de ces gènes chez *B. melitensis*.

2.2.1. La formation de chaînette par les souches *B. melitensis aiiD+ exoF* et *aiiD+ exoY*

Un marquage par la sonde FM4-64 (Vida & Emr, 1995) des chaînettes formées par les souches *B. melitensis aiiD+* Δ*exoF* et *B. melitensis aiiD+* Δ*exoY* a été effectué. Ce marquage a permis de constater que les chaînettes sont constitués de bactéries intègres au niveau de leur membrane et que ces chaînettes ne résultent pas d'un défaut de scission membranaire lors de la division.

2.2.2. Evaluation de la virulence des mutants *exoF* et *exoY* en modèle d'infection cellulaire et murin

Afin d'évaluer le rôle des gènes *exoF* et *exoY* dans la survie et la réplication intracellulaire de *B. melitensis*, nous avons réalisé des infections en macrophages RAW 264.7. Le taux de survie intracellulaire des mutants Δ*exoF* et Δ*exoY* (construits par M. Godefroid) a été comparé à celui de la souche parentale *B. melitensis* WT. Ce test se base sur le dénombrement des CFU correspondant aux bactéries intracellulaires à différents temps post-infection (1 h, 24 h et 48 h). Aucune différence n'a pu être observée entre les souches mutées et la WT et ce, quel que soit le temps d'infection **(figure 7)**. Ces résultats montrent que la délétion des gènes *exoY* et *exoF* n'entrave pas la capacité de *B. meliltensis* à survivre et se répliquer dans les macrophages en culture.

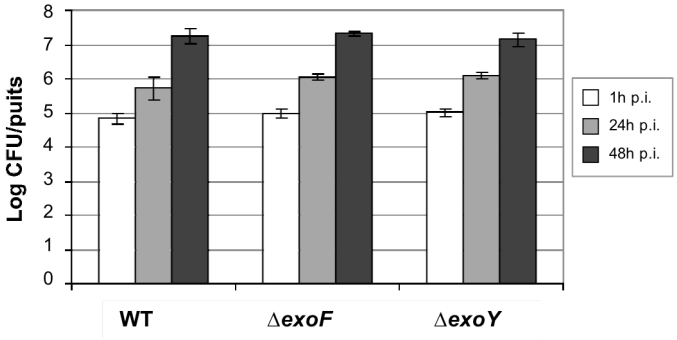


Figure 7 : Infection intracellulaire de *B. melitensis* WT, Δ*exoF* et Δ*exoY* en macrophages murins RAW 264.7. Les cellules sont infectées avec une dose infectante de 300 bactéries/cellule. Après différents temps d'incubation (1h, 24h, et 48h), les cellules sont lysées afin de libérer les bactéries intracellulaires. Différentes dilutions de la suspension sont étalées sur boîtes 2YT pour dénombrement des CFU après incubation à 37°C. Chaque histogramme représente la moyenne du logarithme des CFU pour des triplicats pour chaque souche et chaque temps tandis que les barres d'erreurs représentent l'écart-type au sein de chaque triplicats. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

En outre, nous avons comparé la colonisation splénique (CFU/rate) des mutants Δ*exoF* et Δ*exoY* et du double mutant Δ*exoF* Δ*exoY* par rapport à la souche WT dans des souris BALB/c infectées par voie intrapéritonéale. Pour chaque souche, la charge bactérienne dans la rate des souris a été évaluée 1 et 4 semaines post-infection (p.i.). Les résultats obtenus sont représentés à la **figure 8**. Les résultats pour le point à 1 semaine p.i. sont sujets à discussion. En effet, pour les souches Δ*exoF* et Δ*exoY* deux expériences indépendantes montrent des résultats différents. La première (n=9 pour Δ*exoF*, n=10 pour Δ*exoY*) indique une différence significative entre les mutants et la WT et l'autre (n=4 pour Δ*exoF*, n=6 pour Δ*exoY*) pas. Ces résultats discordants rendent difficile toute conclusion quant à une atténuation possible de la virulence des souches Δ*exoF* et Δ*exoY* une semaine p.i. et donc de l'implication de ces gènes dans le developpement du processus infectieux et ce, d'autant plus que le double délétant Δ*exoF*Δ*exoY* (n=3) ne présente pas de différence significative comparativement à la WT. Néanmoins, une diminution significative de la charge bactérienne splénique 4 semaines p.i. a été mise en évidence dans les mutants Δ*exoF*, Δ*exoY* et Δ*exoF*Δ*exoY* comparativement à la souche WT et ce, lors des 2 expériences. Ces résultats suggèrent donc un rôle des gènes *exoF* et *exoY* au moins dans la persistance de l'infection *in vivo*.

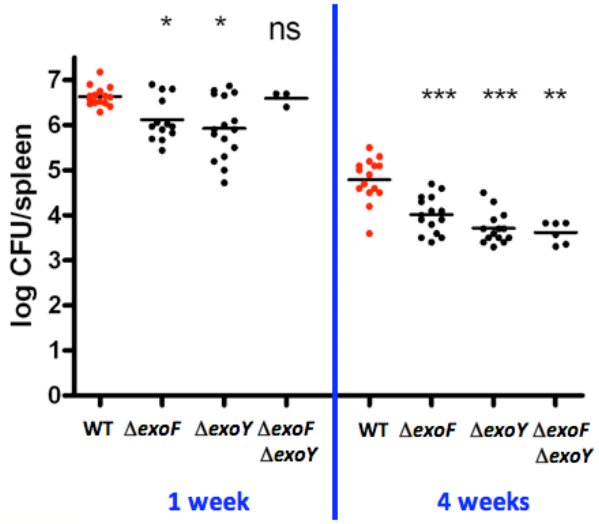


Figure 8 : Virulence de *B. melitensis* WT, Δ*exoF* et Δ*exoY* dans les rates de souris BALB/c infectées par voie intrapéritonéale. Chaque souris est inoculé avec 500µl d'une suspension contenant 4.10^4 bactéries. Une et quatre semaines après inoculation, des souris de chaque groupe ont été sacrifiées pour en prélever la rate. Après homogénéisation de la rate, différentes dilutions des homogénats ont été étalées sur milieu 2YT solide pour en dénombrer le nombre de bactéries en colony forming units (CFU). Chaque point correspond au logarithme des CFU par rate chez un individu. Les résultats correspondent aux données obtenus lors deux expériences indépendantes pour les souches WT, Δ*exoF* et Δ*exoY* tandis que la virulence de la souche Δ*exoF*Δ*exoY* n'a été évaluée qu'une seule fois. La ligne indique la moyenne des valeurs dans chaque groupe. L'analyse statistique consiste en un test Mann-Whitney. Les astérisques *, ** et *** indiquent respectivement $p < 0.05$, $p < 0,001$ et $p < 0.0001$; ns : non significatif.

3. DISCUSSION

3.1. Distinction entre la formation d'agrégats et la production d'EPS

Indépendamment de la remise en cause de la présence d'un EPS dans les agrégats formés par *Brucella* spp. (**cfr. Chapitre I**), la recherche des gènes de biosynthèse telle que menée précédemment était vouée à l'échec. En effet, une grande partie des recherches effectuées en vue d'identifier les gènes de biosynthèse chez *B. melitensis* comme chez *B. abortus* était basée sur l'association intime de la production d'EPS et de la formation d'agrégats. La purification d'un polysaccharide présent dans les cultures de bactéries agrégatives et la résolution de sa composition ayant fortement appuyé ce postulat (Godefroid *et al.*, 2010).

Afin de dissocier l'agrégation bactérienne de la production d'un EPS, nous avons mis au point un test d'inhibition d'hémagglutination en présence de concanavaline A (Sumner & Howell, 1936). Cependant, au lieu de favoriser la recherche des gènes de biosynthèse de l'EPS, les résultats obtenus nous ont *in fine* acculé à reconsidérer la présence d'un EPS dans les agrégats **(cfr. chapitre I)**.

3.2. La formation d'agrégats, un phénotype en apparence identique

La formation d'agrégats bactériens représente un phénotype récurrent dans plusieurs *backgrounds* de *Brucella* spp. résultant d'altérations environnementale ou génétique (souches QS déficientes, WT en milieu hypersalin ou souches rugueuses). Cependant, la source directe de l'agrégation (production d'EPS, altération des propriétés physico-chimiques de la membrane, expression de lectines) reste à déterminer et rien à l'heure actuelle n'indique que cette source soit identique dans chaque cas.

Au contraire, nous avons déjà mentionné des discordances en fonction du *background* des souches QS déficientes (*aiiD+ versus* mutée pour *vjbR)* quant à l'implication du locus de 25 kb dans l'agrégation. Du reste, si ces souches présentent un QS altéré, l'impact de cette altération sur la physiologie de la bactérie n'est pas équivalent. En effet, dans le cas de la souche *aiiD+*, la dégradation d'AHL devrait en théorie empêcher leur perception par la bactérie. En revanche, une souche mutée pour *vjbR* peut toujours percevoir la présence d'AHLs via le régulateur BabR (ou BlxR). Par ailleurs, les souches rugueuses présentent une altération d'hydrophobicité et de potentiel de surface en raison de l'absence de la chaîne O du LPS (González *et al.*, 2008). La production d'un EPS en réponse à cette altération constitue une hypothèse possible parmi d'autres pour expliquer la formation d'agrégats. Au vu des divergences observées, il serait donc peu judicieux de comparer un phénotype d'agrégation d'une souche à celui d'une autre souche.

3.3. La formation de chaînettes… un phénotype spécifique

D'après nos observations, la formation de chaînettes est indissociable de la présence du plasmide pMR*aiiD*. En effet, des chaînettes de bactéries comme celles formées par les souches *B. melitensis aiiD*+ Δ*exoF* et *aiiD*+ Δ*exoY* n'ont jamais été observées dans un *background* sauvage. Même dans des conditions hypersalines soutenant la formation d'agrégats, aucune chaînette de bactéries n'a été observée, et ce y compris pour les souches Δ*exoF et* Δ*exoY.* Toutefois, l'absence de chaînettes en milieu hypersalin peut être due à l'altération morphologique des bactéries dans ce milieu **(cfr. chapitre III)**.

Dans notre cas, la formation de chaînettes chez *B. melitensis* est donc restreinte au *background* portant le plasmide pMR*aiiD* et ce uniquement, pour des souches mutées pour des gènes homologues aux gènes *exoF* et *exoY* impliqués dans l'addition du premier résidu lors de l'assemblage du monomère de l'EPSI chez *S. meliloti* (Muller *et al.*, 1993; Reuber & Walker, 1993). A ce stade, il convient également de signaler la présence de chaînettes dans une culture de la souche *B. melitensis aiiD*+ Δ*mucR.* En plus de porter le plasmide pMR*aiiD,* cette dernière *est* mutée pour le gène *mucR,* homologue d'un activateur de la production d'EPSI *(Keller et al., 1995)* et liant la région promotrice de l'opéron *exoYFQ* chez *S. meliloti* (Bertram-Drogatz *et al.*, 1998).

Ces trois gènes codent pour des protéines fortement conservées chez *B. melitensis* avec 59%, 28% et 61% d'identité pour ExoY, ExoF et MucR respectivement. Dans les paragraphes suivants, nous avancerons quelques hypothèses pouvant expliquer la formation de ces chaînettes.

La formation de chaînes de bactéries pourrait résulter d'un défaut de division cellulaire ou d'une adhérence pôle à pôle des cellules entre elles. D'après le marquage membranaire réalisé **(figure 4)**, les bactéries formant les chaînettes sont bien séparées les unes des autres. Dès lors, l'hypothèse d'une adhérence intercellulaire semble privilégiée. L'adhérence pourrait s'établir par un contact aléatoire entre bactéries ou par un mécanisme déterminé suivant la division cellulaire. Dans les deux cas, une structure d'adhérence doit être présente.

Bien que controversé, la présence d'un EPS dans les agrégats reste toutefois possible **(cfr. chapitre I)**, celui-ci peut être ou non à l'origine du marquage à la ConA. Un EPS polaire et adhérant a été décrit chez certaines α-protéobactéries et pourrait expliquer la formation de chaînettes de bactéries. Ainsi, un glucomannan polaire également responsable d'adhérence a été decrit chez *Rhizobium leguminosarum* (Laus *et al.*, 2006). De même, chez *Agrobacterium tumefaciens,* un UPP (*unipolar polysaccharide*) serait induit par l'adhérence à une surface abiotique ou biotique (Tomlinson & Fuqua, 2009). Cependant, dans le cas où l'adhérence suit un contact fortuit entre bactéries, l'association des bactéries forme des rosettes (Braun & Elrod, 1946; Ong *et al.*, 1990; Tomlinson & Fuqua, 2009) et non des chaînes régulières. La formation de chaînettes par adhérence, devrait alors suivre la division cellulaire comme suggéré par une expérience antérieure de *time lapse*. Cependant, la présence d'un éventuel EPS polaire à l'origine de la formation des chaînettes n'a pas été détecté par la concanavaline A. En effet, aucun marquage n'est présent à la jonction des bactéries formant les chaînes. Un marquage avec d'autres lectines pourrait être effectué afin d'en appuyer l'existence. Néanmoins, paradoxalement,

ces chaînes sont présentes dans des souches mutées pour des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'un EPS. Si ces gènes sont effectivement impliqués dans la synthèse d'un EPS chez *Brucella* spp., une hypothèse serait alors qu'en l'absence de cet EPS, un autre EPS serait induit au pôle bactérien.

Enfin, une hypothèse alternative à la présence d'un EPS polaire serait l'expression d'adhésines aux pôles bactériens, induites ou rendues plus accessibles par l'absence d'un EPS. Récemment, une adhésine polaire BmaC impliquée dans l'adhérence de la bactérie aux cellules hôtes a été décrite chez *B. suis* (Posadas *et al.*, 2012).

3.4. Production possible d'EPS chez *Brucella* spp.

Le regard critique porté sur des données antérieures a non seulement remis en cause la présence d'EPS au sein des agrégats **(cfr. chapitre I)** mais aussi la production même d'EPS par *Brucella* spp. Néanmoins, tel qu'exposé précédement, *Brucella* spp. possède de nombreux gènes **(table 1)** qui pourraient encoder des enzymes de biosynthèse d'un authentique EPS. *Brucella* spp. possède tous les élements requis à chaque étape pour la production d'un EPS : enzyme d'activation des sucres, glycosyltransférases pour la formation d'une unité monomérique, la polymérisation et la sécrétion du polymère **(table 1)**.

La production d'un EPS par *Brucella* spp. reste donc tout à fait plausible. Par contre, les conditions dans lesquelles cet EPS pourrait être produit restent à déterminer. De nombreux rapports ont décrit l'association de la production d'EPS avec la formation de colonies de type mucoïdes (M) (Chan *et al.*, 1984; Markovitz, 1964; Zhan *et al.*, 1989). Des colonies M ont été décrites chez la souche rugueuse *B. canis* (Carmichael *et al.*, 1984; Zoha & Carmichael, 1981) et chez *B. abortus* mise en présence de pénicilline (Braun *et al.*, 1952). Par ailleurs, la production d'EPS par *Brucella* spp. pourrait requérir la présence de facteurs de l'hôte comme c'est le cas pour *Rhizobium leguminosarum* (Janczarek & Skorupska, 2011).

Cependant, afin d'éviter les conclusions hatives, deux conditions *sine qua non* doivent être respectées avant d'affirmer la production d'un EPS : (1) le polysaccharide doit être produit par la bactérie et (2) être sécrété à l'extérieur. La meilleure façon de mettre en évidence un EPS serait donc de montrer la présence d'un polysaccharide dans une culture en milieu complètement dépourvu de polysaccharides contaminants. Après purification et analyse de l'EPS, l'étude de souches incapables de produire ce polysaccharide pourrait permettre d'en identifier la voie de biosynthèse.

3.5. Rôles envisageables de l'EPS chez *Brucella* spp.

Enfin, si notre étude n'a pu montrer l'implication des gènes *exoF*, *exoY* et *mucR* dans la biosynthèse d'un EPS, ils jouent en revanche un rôle dans la virulence *in vivo* de *B. melitensis* **(figure 8 et chapitre III)**. Par conséquent, le rôle d'un éventuel EPS dans le succès infectieux de *Brucella* spp. ne peut être exclu et reste à explorer.

Hormis une éventuelle production d'EPS en milieu externe pouvant conférer à *Brucella* spp. une certaine forme de résistance contre divers stress environnementaux, la production d'EPS pourrait, comme c'est le cas pour *S. meliloti*, permettre l'établissement de la relation hôte-bactérie (Battisti *et al.*, 1992; Leigh *et al.*, 1985; Zhan *et al.*, 1989).

Lorsqu'elle rencontre un hôte, la bactérie passe par un stade extracellulaire avant de devenir intracellulaire. Durant ce stade, la production d'un EPS pourrait favoriser la survie de la bactérie face aux stress et au système immunitaire inné ainsi que l'adhérence aux cellules de l'hôte. Dans sa phase intracellulaire, l'EPS pourrait constituer un moyen de faire face aux changements de pH et à l'exposition des ROS et RNI.

En outre, un rôle immunomodulatoire ou de camouflage d'antigènes afin d'échapper à la réponse immune adaptative est possible. La chronicité de la brucellose est d'ailleurs causée par la persistance de foyers bactériens qui échappent au système immunitaire. L'implication d'un EPS dans la persistance dans l'hôte de *B. melitensis* est appuyée par les résultats d'atténuation pour les souches Δ*exoF et* Δ*exoY* à 4 semaines post-infection en souris.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Ades, S. E., Connolly, L. E., Alba, B. M. & Gross, C. A. (1999). The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev* **13**, 2449-2461.

Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C. & de Mendoza, D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *Embo J* **20**, 1681-1691.

Aiba, H. & Mizuno, T. (1990). Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, stimulates the transcription of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli. FEBS Lett* **261**, 19-22.

Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P. & Jenal, U. (2003). Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **47**, 1695-1708.

Alhede, M., Kragh, K. N., Qvortrup, K. & other authors (2011). Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. *PLoS One* **6**, e27943.

Allegrucci, M., Hu, F. Z., Shen, K., Hayes, J., Ehrlich, G. D., Post, J. C. & Sauer, K. (2006). Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. *J Bacteriol* **188**, 2325-2335.

Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**, 1114-1128.

Altendorf, K., Voelkner, P. & Puppe, W. (1994). The sensor kinase KdpD and the response regulator KdpE control expression of the *kdpFABC* operon in *Escherichia coli. Res Microbiol* **145**, 374-381.

Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjorn, S. P., Givskov, M. & Molin, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2240-2246.

Anderson, E. S., Paulley, J. T., Gaines, J. M., Valderas, M. W., Martin, D. W., Menscher, E., Brown, T. D., Burns, C. S. & Roop, R. M., 2nd (2009). The manganese transporter MntH is a critical virulence determinant for *Brucella abortus* 2308 in experimentally infected mice. *Infect Immun* **77**, 3466-3474.

Anderson, E. S., Paulley, J. T., Martinson, D. A., Gaines, J. M., Steele, K. H. & Roop, R. M., 2nd (2011). The iron-responsive regulator *irr* is required for wild-type expression of the gene encoding the heme transporter BhuA in *Brucella abortus* 2308. *J Bacteriol* **193**, 5359-5364.

Anderson, P. E. & Gober, J. W. (2000). FlbT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Mol Microbiol* **38**, 41-52.

Andresen, P. A., Kaasen, I., Styrvold, O. B., Boulnois, G. & Strom, A. R. (1988). Molecular cloning, physical mapping and expression of the *bet* genes governing the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **134**, 1737-1746.

Anjem, A., Varghese, S. & Imlay, J. A. (2009). Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **72**, 844-858.

Arakawa, T. & Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**, 411-414.

Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I. & Gorvel, J.-P. (2005). Cyclic β-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**, 618-625.

Arenas-Gamboa, A. M., Rice-Ficht, A. C., Kahl-McDonagh, M. M. & Ficht, T. A. (2011). Protective efficacy and safety of *Brucella melitensis* 16MDelta*mucR* against intraperitoneal and aerosol challenge in BALB/c mice. *Infect Immun* **79**, 3653-3658.

Ariza, J., Pigrau, C., Canas, C. & other authors (2001). Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *Clin Infect Dis* **32**, 1024-1033.

Atluri, V. L., Xavier, M. N., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B. & Tsolis, R. E. (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol* **65**, 523-541.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D.E. Moore, J.G. Seidmann, J.A. Smith and K. Struhl (1991). *Current protocols in molecular biology*. New York, NY.

Babior, B. M., Lambeth, J. D. & Nauseef, W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* **397**, 342-344.

Bahlawane, C., Baumgarth, B., Serrania, J., Ruberg, S. & Becker, A. (2008a). Fine-tuning of galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* by differential WggR (ExpG)-, PhoB-, and MucR-dependent regulation of two promoters. *J Bacteriol* **190**, 3456-3466.

Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E. & Becker, A. (2008b). *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1498-1509.

Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P., Stewart, G. S. & Williams, P. (1992). N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* **288 (Pt 3)**, 997-1004.

Bandara, A. B., Contreras, A., Contreras-Rodriguez, A. & other authors (2007). *Brucella suis* urease encoded by *ure1* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol* **7**, 57.

Bandara, A. B., Schurig, G. G., Sriranganathan, N., Prasad, R. & Boyle, S. M. (2009). The putative penicillin-binding proteins 1 and 2 are important for viability, growth and cell morphology of *Brucella melitensis. Vet Microbiol* **133**, 387-393.

Banin, E., Vasil, M. L. & Greenberg, E. P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11076-11081.

Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R. & Harwood, C. S. (2012). The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res*.

Barbier, T., Nicolas, C. & Letesson, J. J. (2011). *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Lett* **585**, 2929-2934.

Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A. & Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J Mol Biol* **305**, 673-688.

Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I. & 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**, e631.

Barquero-Calvo, E., Conde-Alvarez, R., Chacon-Diaz, C. & other authors (2009). The differential interaction of *Brucella* and *Ochrobactrum* with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens. *PLoS One* **4**, e5893.

Battesti, A. & Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol Microbiol* **62**, 1048-1063.

Battisti, L., Lara, J. C. & Leigh, J. A. (1992). Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5625-5629.

Batut, J., Andersson, S. G. E. & O'callaghan, D. (2004). The evolution of chronic infection strategies in the α-proteobacteria. *Nat Rev Micro* **2**, 933-945.

Baty, A. M., 3rd, Eastburn, C. C., Diwu, Z., Techkarnjanaruk, S., Goodman, A. E. & Geesey, G. G. (2000). Differentiation of chitinase-active and non-chitinase-active subpopulations of a marine bacterium during chitin degradation. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3566-3573.

Bayer, A. S., Eftekhar, F., Tu, J., Nast, C. C. & Speert, D. P. (1990). Oxygen-dependent up-regulation of mucoid exopolysaccharide (alginate) production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **58**, 1344-1349.

Becker, A., Kleickmann, A., Kuster, H., Keller, M., Arnold, W. & Puhler, A. (1993). Analysis of the *Rhizobium meliloti* genes *exoU*, *exoV*, *exoW*, *exoT*, and *exoI* involved in exopolysaccharide biosynthesis and nodule invasion: *exoU* and *exoW* probably encode glucosyltransferases. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 735-744.

Becker, A., Kuster, H., Niehaus, K. & 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**, 487-497.

Becker, A., Ruberg, S., Kuster, H., Roxlau, A. A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H. P., Walker, G. C. & Puhler, A. (1997). The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J Bacteriol* **179**, 1375-1384.

Becker, G., Klauck, E. & Hengge-Aronis, R. (1999). Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6439-6444.

Bélanger, L., Dimmick, K. A., Fleming, J. S. & Charles, T. C. (2009). Null mutations in *Sinorhizobium meliloti exoS* and *chvI* demonstrate the importance of this two-component regulatory system for symbiosis. *Molecular Microbiology* **74**, 1223-1237.

Bellaire, B. H., Elzer, P. H., Baldwin, C. L. & Roop, R. M., 2nd (1999). The siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid is not required for virulence of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun* **67**, 2615-2618.

Bellaire, B. H., Elzer, P. H., Baldwin, C. L. & Roop, R. M., 2nd (2003a). Production of the siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid is required for wild-type growth of *Brucella abortus* in the presence of erythritol under low-iron conditions *in vitro*. *Infect Immun* **71**, 2927-2832.

Bellaire, B. H., Elzer, P. H., Hagius, S., Walker, J., Baldwin, C. L. & Roop, R. M. (2003b). Genetic organization and iron-responsive regulation of the *Brucella abortus* 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis operon, a cluster of genes required for wild-type virulence in pregnant cattle. *Infection and Immunity* **71**, 1794-1803.

Bellaire, B. H., Roop, R. M., 2nd & Cardelli, J. A. (2005). Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infect Immun* **73**, 3702-3713.

Bellefontaine, A. F., Pierreux, C. E., Mertens, P., Vandenhaute, J., Letesson, J. J. & 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**, 945-960.

Berg, J. M. (1990). Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *J Biol Chem* **265**, 6513-6516.

Bernardini, M. L., Fontaine, A. & Sansonetti, P. J. (1990). The two-component regulatory system *ompR-envZ* controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **172**, 6274-6281.

Berrier, C., Besnard, M., Ajouz, B., Coulombe, A. & Ghazi, A. (1996). Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J Membr Biol* **151**, 175-187.

Bertram-Drogatz, P. A., Ruberg, S., Becker, A. & Puhler, A. (1997). The regulatory protein MucR binds to a short DNA region located upstream of the *mucR* coding region in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* **254**, 529-538.

Bertram-Drogatz, P. A., Quester, I., Becker, A. & 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**, 433-441.

Biemans-Oldehinkel, E., Mahmood, N. A. & Poolman, B. (2006). A sensor for intracellular ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10624-10629.

Bittinger, M. A. & Handelsman, J. (2000). Identification of genes in the RosR regulon of *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **182**, 1706-1713.

Bluschke, B., Volkmer-Engert, R. & Schneider, E. (2006). Topography of the surface of the signal-transducing protein EIIA(Glc) that interacts with the MalK subunits of the maltose ATP-binding cassette transporter (MalFGK2) of *Salmonella typhimurium. J Biol Chem* **281**, 12833-12840.

Boch, J., Kempf, B. & Bremer, E. (1994). Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**, 5364-5371.

Boehm, A., Steiner, S., Zaehringer, F. & other authors (2009). Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. *Mol Microbiol* **72**, 1500-1516.

Bolen, D. W. (2001). Protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Methods Mol Biol* **168**, 17-36.

Boles, B. R. & Horswill, A. R. (2008). Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* **4**, e1000052.

Bolshakova, T. N., Gabrielyan, T. R., Bourd, G. I. & Gershanovitch, V. N. (1978). Involvement of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in regulation of transcription of catabolic genes. *Eur J Biochem* **89**, 483-490.

Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N. D. & Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc* **214**, 159-173.

Boschiroli, M., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**, 58-64.

Boschiroli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V. & other authors (2002). The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1544-1549.

Bougdour, A. & Gottesman, S. (2007). ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12896-12901.

Bouhouche, N., Syvanen, M. & Kado, C. I. (2000). The origin of prokaryotic C_2H_2 zinc finger regulators. *Trends Microbiol* **8**, 77-81.

Boutte, C. C. & Crosson, S. (2011). The complex logic of stringent response regulation in *Caulobacter crescentus*: starvation signalling in an oligotrophic environment. *Mol Microbiol* **80**, 695-714.

Boutte, C. C., Henry, J. T. & Crosson, S. (2012). ppGpp and polyphosphate modulate cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **194**, 28-35.

Bowden, R. A., Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Bernard, S. & Dubray, G. (1995). Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun* **63**, 3945-3952.

Braun, A. C. & Elrod, R. P. (1946). Stages in the life history of *Phytomonas tumefaciens*. *J Bacteriol* **52**, 695-702.

Braun, W., Kraft, M., Mead, D. D. & Goodlow, R. J. (1952). The effect of penicillin on genetic changes and temporary modifications in populations of brucellae. *J Bacteriol* **64**, 41-47.

Briones, G., Inon de Iannino, N., Steinberg, M. & Ugalde, R. A. (1997). Periplasmic cyclic 1,2-beta-glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiology* **143 (Pt 4)**, 1115-1124.

Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P. S. & 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**, 4528-4535.

Brown, G. R., Sutcliffe, I. C., Bendell, D. & Cummings, S. P. (2000). The modification of the membrane of *Oceanomonas baumannii* when subjected to both osmotic and organic solvent stress. *FEMS Microbiol Lett* **189**, 149-154.

Brudzynski, K., Abubaker, K., Laurent, M. & Castle, A. (2011). Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Front Microbiol* **2**, 213.

Buddle, M. B. (1956). Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg (Lond)* **54**, 351-364.

Buelow, D. R. & Raivio, T. L. (2010). Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol* **75**, 547-566.

Cairney, J., Booth, I. R. & Higgins, C. F. (1985a). Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: *proU* encodes an osmotically induced betaine transport system. *J Bacteriol* **164**, 1224-1232.

Cairney, J., Booth, I. R. & Higgins, C. F. (1985b). *Salmonella typhimurium proP* gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. *J Bacteriol* **164**, 1218-1223.

Calamita, G., Kempf, B., Bonhivers, M., Bishai, W. R., Bremer, E. & Agre, P. (1998). Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3627-3631.

Calderon-Flores, A., Du Pont, G., Huerta-Saquero, A., Merchant-Larios, H., Servin-Gonzalez, L. & Duran, S. (2005). The stringent response is required for amino acid and nitrate utilization, nod factor regulation, nodulation, and nitrogen fixation in *Rhizobium etli. J Bacteriol* **187**, 5075-5083.

Campbell, N. A. (1995). *Biologie*. Bruxelles (Belgium).

Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V. & Oliveira, S. C. (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* **5**, 13.

Carmichael, L. E. & Bruner, D. W. (1968). Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet* **48**, 579-592.

Carmichael, L. E., Zoha, S. J. & Flores-Castro, R. (1984). Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. *Dev Biol Stand* **56**, 649-656.

Carrica, M. D., Fernandez, I., Marti, M. A., Paris, G. & Goldbaum, F. A. (2012). The NtrY/X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. *Mol Microbiol* **85**, 39-50.

Cashel, M. & Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* **221**, 838-841.

Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M. & Dénarié, J. (1979). Identification and characterization of large plasmid in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *Microbiology* **113**, 229-242.

Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-556.

Celli, J., Salcedo, S. P. & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1673-1678.

Celli, J. (2006). Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* **157**, 93-98.

Chan, R., Lam, J. S., Lam, K. & Costerton, J. W. (1984). Influence of culture conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **19**, 8-16.

Chang, W., Small, D. A., Toghrol, F. & Bentley, W. E. (2005). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC Genomics* **6**, 115.

Chang, W., Small, D. A., Toghrol, F. & Bentley, W. E. (2006). Global transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **188**, 1648-1659.

Chang, W. S., van de Mortel, M., Nielsen, L., Nino de Guzman, G., Li, X. & Halverson, L. J. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J Bacteriol* **189**, 8290-8299.

Chatterji, D., Fujita, N. & Ishihama, A. (1998). The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells* **3**, 279-287.

Chaulk, S. G., Smith Frieday, M. N., Arthur, D. C. & other authors (2011). ProQ is an RNA chaperone that controls ProP levels in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **50**, 3095-3106.

Chen, E. J., Sabio, E. A. & Long, S. R. (2008). The periplasmic regulator ExoR inhibits ExoS/ChvI two-component signalling in *Sinorhizobium meliloti. Mol Microbiol* **69**, 1290-1303.

Cheng, H. P. & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol* **180**, 20-26.

Cheung, K. J., Badarinarayana, V., Selinger, D. W., Janse, D. & Church, G. M. (2003). A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli. Genome Res* **13**, 206-215.

Chou, J. H., Greenberg, J. T. & Demple, B. (1993). Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J Bacteriol* **175**, 1026-1031.

Chowdhury, S., Maris, C., Allain, F. H. & Narberhaus, F. (2006). Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer. *Embo J* **25**, 2487-2497.

Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M. & Jenal, U. (2006). Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem* **281**, 32015-32024.

Christen, M., Kulasekara, H. D., Christen, B., Kulasekara, B. R., Hoffman, L. R. & Miller, S. I. (2010). Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science* **328**, 1295-1297.

Christman, M. F., Storz, G. & Ames, B. N. (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3484-3488.

Chuang, M. H., Wu, M. S., Lin, J. T. & Chiou, S. H. (2005). Proteomic analysis of proteins expressed by *Helicobacter pylori* under oxidative stress. *Proteomics* **5**, 3895-3901.

Ciaramella, M., Napoli, A. & Rossi, M. (2005). Another extreme genome: how to live at pH 0. *Trends Microbiol* **13**, 49-51.

Ciocchini, A. E., Roset, M. S., Inon de Iannino, N. & Ugalde, R. A. (2004). Membrane topology analysis of cyclic glucan synthase, a virulence determinant of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **186**, 7205-7213.

Cloeckaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G. & 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**, 3980-3987.

Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Nicolle, J. C., Dubray, G. & 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**, 1211-1219.

Close, T. J., Tait, R. C. & Kado, C. I. (1985). Regulation of Ti plasmid virulence genes by a chromosomal locus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **164**, 774-781.

Collander, R. (1937). The permeability of plant protoplasts to non-electrolytes. *Transactions of the Faraday Society* **33**, 985-990.

Collins, J. A., Irnov, I., Baker, S. & Winkler, W. C. (2007). Mechanism of mRNA destabilization by the *glmS* ribozyme. *Genes Dev* **21**, 3356-3368.

Colmenero Jde, D., Queipo-Ortuno, M. I., Maria Reguera, J., Angel Suarez-Munoz, M., Martin-Carballino, S. & Morata, P. (2002). Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach. *Diagn Microbiol Infect Dis* **42**, 159-167.

Comerci, D. J., Martinez-Lorenzo, M. J., Sieira, R., Gorvel, J. P. & Ugalde, R. A. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* **3**, 159-168.

Conde-Alvarez, R., Arce-Gorvel, V., Iriarte, M. & other authors (2012). The Lipopolysaccharide Core of *Brucella abortus* Acts as a Shield Against Innate Immunity Recognition. *PLoS Pathog* **8**, e1002675.

Copin, R., Vitry, M. A., Hanot Mambres, D. & other authors (2012). *In situ* microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathog* **8**, e1002575.

Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C. & Vinckx, T. (2011). Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* **3**, 540-549.

Costanzo, A. & Ades, S. E. (2006). Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, by guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp). *J Bacteriol* **188**, 4627-4634.

Costanzo, A., Nicoloff, H., Barchinger, S. E., Banta, A. B., Gourse, R. L. & Ades, S. E. (2008). ppGpp and DksA likely regulate the activity of the extracytoplasmic stress factor sigmaE in *Escherichia coli* by both direct and indirect mechanisms. *Mol Microbiol* **67**, 619-632.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.

Csonka, L. N. (1981). Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium. Mol Gen Genet* **182**, 82-86.

Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**, 121-147.

Culham, D. E., Vernikovska, Y., Tschowri, N., Keates, R. A., Wood, J. M. & Boggs, J. M. (2008). Periplasmic loops of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli* are sensitive to osmolality. *Biochemistry* **47**, 13584-13593.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G. & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep* **7**, 385-389.

Dahl, J. L., Kraus, C. N., Boshoff, H. I. & other authors (2003). The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10026-10031.

Dalebroux, Z. D. & Swanson, M. S. (2012). ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat Rev Microbiol* **10**, 203-212.

Danese, P. N., Pratt, L. A. & Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**, 3593-3596.

Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 317-364, table of contents.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.

de Barsy, M., Jamet, A., Filopon, D. & other authors (2011). Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cell Microbiol* **13**, 1044-1058.

de Boer, M., Broekhuizen, C. P. & Postma, P. W. (1986). Regulation of glycerol kinase by enzyme IIIGlc of the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Bacteriol* **167**, 393-395.

de Iannino, N. I., Briones, G., Iannino, F. & Ugalde, R. A. (2000). Osmotic regulation of cyclic 1,2-beta-glucan synthesis. *Microbiology* **146 (Pt 7)**, 1735-1742.

de Jong, M. F., Sun, Y. H., den Hartigh, A. B., van Dijl, J. M. & 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**, 1378-1396.

De Las Penas, A., Connolly, L. & Gross, C. A. (1997). The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol* **24**, 373-385.

de Mendoza, D., Klages Ulrich, A. & Cronan, J. E., Jr. (1983). Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. *J Biol Chem* **258**, 2098-2101.

Delamarche, C., Thomas, D., Rolland, J. P., Froger, A., Gouranton, J., Svelto, M., Agre, P. & Calamita, G. (1999). Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J Bacteriol* **181**, 4193-4197.

Delory, M., Hallez, R., Letesson, J. & 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**, 7707-7710.

Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrate, P. & other authors (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **3**, 487-497.

Delrue, R. M., Deschamps, C., Leonard, S. & other authors (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* **7**, 1151-1161.

DelVecchio, V., Kapatral, V., Redkar, R. & other authors (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 443-448.

Denness, L., McKenna, J. F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M., Mansfield, J., Zipfel, C. & Hamann, T. (2011). Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **156**, 1364-1374.

Denoel, P. A., Vo, T. K., Weynants, V. E., Tibor, A., Gilson, D., Zygmunt, M. S., Limet, J. N. & Letesson, J. J. (1997). Identification of the major T-cell antigens present in the *Brucella melitensis* B115 protein preparation, Brucellergene OCB. *J Med Microbiol* **46**, 801-806.

Detilleux, P. G., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. (1991). Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in Vero cells. *Am J Vet Res* **52**, 1658-1664.

Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W. (2006). How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 939-1031.

Dickstein, R., Bisseling, T., Reinhold, V. & Ausubel, F. (1988). Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. *Genes Dev* **2**, 677-687.

Dietrich, L. E. & Kiley, P. J. (2011). A shared mechanism of SoxR activation by redox-cycling compounds. *Mol Microbiol* **79**, 1119-1122.

DiGiuseppe, P. A. & Silhavy, T. J. (2003). Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system. *J Bacteriol* **185**, 2432-2440.

Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. & Bakker, E. P. (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150**, 348-357.

Djordjevic, S., Goudreau, P. N., Xu, Q., Stock, A. M. & West, A. H. (1998). Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1381-1386.

Doherty, D., Leigh, J. A., Glazebrook, J. & Walker, G. C. (1988). *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *J Bacteriol* **170**, 4249-4256.

Donati, A. J., Jeon, J. M., Sangurdekar, D., So, J. S. & Chang, W. S. (2011). Genome-wide transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to paraquat-mediated oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* **77**, 3633-3643.

Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1991). Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**, 4310-4317.

Dorman, C. J., Chatfield, S., Higgins, C. F., Hayward, C. & Dougan, G. (1989). Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium: ompR* mutants are attenuated *in vivo*. *Infect Immun* **57**, 2136-2140.

Dorrell, N., Li, S. R., Everest, P. H., Dougan, G. & Wren, B. W. (1998a). Construction and characterisation of a **Yersinia enterocolitica** O:8 *ompR* mutant. *FEMS Microbiol Lett* **165**, 145-151.

Dorrell, N., Spencer, S., Foulonge, V., Guigue-Talet, P., O'Callaghan, D. & Wren, B. W. (1998b). Identification, cloning and initial characterisation of FeuPQ in *Brucella suis*: a new sub-family of two-component regulatory systems. *FEMS Microbiol Lett* **162**, 143-150.

Dorrell, N., Guigue-Talet, P., Spencer, S., Foulonge, V., O'Callaghan, D. & Wren, B. W. (1999). Investigation into the role of the response regulator NtrC in the metabolism and virulence of *Brucella suis*. *Microb Pathog* **27**, 1-11.

Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X. & Tang, J. L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10995-11000.

Dozot, M., Boigegrain, R., Delrue, R., Hallez, R., Ouahrani-Bettache, S., Danese, I., Letesson, J., De Bolle, X. & 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**, 1791-1802.

Dozot, M., Poncet, S., Nicolas, C., Copin, R., Bouraoui, H., Maze, A., Deutscher, J., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2010). Functional characterization of the incomplete phosphotransferase system (PTS) of the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS One* **5**, e12679.

Drees, K. P., Neilson, J. W., Betancourt, J. L., Quade, J., Henderson, D. A., Pryor, B. M. & Maier, R. M. (2006). Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert, Chile. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7902-7908.

Drenkard, E. & Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**, 740-743.

Dricot, A., Rual, J., Lamesch, P. & other authors (2004). Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res* **14**, 2201-2206.

Dukan, S. & Nystrom, T. (1999). Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **274**, 26027-26032.

Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R. & Jin, D. J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**, 1084-1096.

Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B. & Collins, J. J. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli. Mol Syst Biol* **3**, 91.

Edwards, A. N., Patterson-Fortin, L. M., Vakulskas, C. A. & other authors (2011). Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Mol Microbiol* **80**, 1561-1580.

Eisenberg, T., Hamann, H. P., Kaim, U. & other authors (2012). Isolation of Potentially Novel *Brucella* spp. from Frogs. *Appl Environ Microbiol* **78**, 3753-3755.

Ekaza, E., Guilloteau, L., Teyssier, J., Liautard, J. P. & 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. & Kohler, S. (2001). Characterization of *Brucella suis clpB* and *clpAB* mutants and participation of the genes in stress responses. *J Bacteriol* **183**, 2677-2681.

Elzer, P. H., Phillips, R. W., Kovach, M. E., Peterson, K. M. & Roop, R. M., 2nd (1994). Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect Immun* **62**, 4135-4139.

Endley, S., McMurray, D. & 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**, 2454-2462.

Epstein, W. & Schultz, S. G. (1965). Cation Transport in *Escherichia coli:* V. Regulation of cation content. *J Gen Physiol* **49**, 221-234.

Epstein, W., Whitelaw, V. & Hesse, J. (1978). A K^+ transport ATPase in *Escherichia coli. J Biol Chem* **253**, 6666-6668.

Farrell, I. D. & Robertson, L. (1967). The sensitivity of the biotypes of *Brucella abortus* to three antibiotics used in selective media, and the description of a new biotype. *J Hyg (Lond)* **65**, 165-172.

Faulkner, M. J. & Helmann, J. D. Peroxide stress elicits adaptive changes in bacterial metal ion homeostasis. *Antioxid Redox Signal* **15**, 175-189.

Fazli, M., O'Connell, A., Nilsson, M., Niehaus, K., Dow, J. M., Givskov, M., Ryan, R. P. & Tolker-Nielsen, T. (2011). The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol* **82**, 327-341.

Feller, G. & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol* **1**, 200-208.

Fernandez-Prada, C. M., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Schurig, G. G., Hadfield, T. L. & Hoover, D. L. (2001). Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis. Infect Immun* **69**, 4407-4416.

Fernandez-Prada, C. M., Zelazowska, E. B., Nikolich, M., Hadfield, T. L., Roop, R. M., 2nd, Robertson, G. L. & Hoover, D. L. (2003). Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* **71**, 2110-2119.

Ferooz, J., Lemaire, J., Delory, M., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2011a). RpoE1, an extracytoplasmic function sigma factor, is a repressor of the flagellar system in *Brucella melitensis*. *Microbiology* **157**, 1263-1268.

Ferooz, J., Lemaire, J. & Letesson, J. J. (2011b). Role of FlbT in flagellin production in *Brucella melitensis. Microbiology* **157**, 1253-1262.

Flemming, H.-C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Micro*, 1-11.

Fong, J. C., Syed, K. A., Klose, K. E. & Yildiz, F. H. (2010). Role of *Vibrio* polysaccharide (*vps*) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology* **156**, 2757-2769.

Forst, S., Comeau, D., Norioka, S. & Inouye, M. (1987). Localization and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**, 16433-16438.

Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. & Cloeckaert, A. (2007). *Brucella ceti sp. nov.* and *Brucella pinnipedialis sp. nov.* for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2688-2693.

Foster, J. W. (1993). The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J Bacteriol* **175**, 1981-1987.

Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieille, C., Michaux-Charachon, S. & 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**, 1297-1303.

Fox, J. E. (2004). Chemical communication threatened by endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* **112**, 648-653.

Francez-Charlot, A., Frunzke, J., Reichen, C., Ebneter, J. Z., Gourion, B. & Vorholt, J. A. (2009). Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3467-3472.

Freer, E., Moreno, E., Moriyon, I., Pizarro-Cerda, J., Weintraub, A. & Gorvel, J. P. (1996). Brucella-*Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *J Bacteriol* **178**, 5867-5876.

Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S. & other authors (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* **7**, 687-698.

Frossard, S. M., Khan, A. A., Warrick, E. C., Gately, J. M., Hanson, A. D., Oldham, M. L., Sanders, D. A. & Csonka, L. N. (2012). Identification of a Third Osmoprotectant Transport System OsmU in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **194**, 3861-3871.

Fugier, E., Salcedo, S. P., de Chastellier, C., Pophillat, M., Muller, A., Arce-Gorvel, V., Fourquet, P. & Gorvel, J. P. (2009). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for *Brucella* replication. *PLoS Pathog* **5**, e1000487.

Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.

Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**, 4169-4182.

Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* **13**, 150-159.

Garin-Bastuji, B., Bowden, R. A., Dubray, G. & Limet, J. N. (1990). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* **28**, 2169-2174.

Garrett, E. S., Perlegas, D. & Wozniak, D. J. (1999). Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *J Bacteriol* **181**, 7401-7404.

Garwin, J. L., Klages, A. L. & Cronan, J. E., Jr. (1980). Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis. *J Biol Chem* **255**, 3263-3265.

Gatewood, M. L. & Jones, G. H. (2010). (p)ppGpp inhibits polynucleotide phosphorylase from *streptomyces* but not from *Escherichia coli* and increases the stability of bulk mRNA in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **192**, 4275-4280.

Gee, J. M., Valderas, M. W., Kovach, M. E., Grippe, V. K., Robertson, G. T., Ng, W. L., Richardson, J. M., Winkler, M. E. & Roop, R. M., 2nd (2005). The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect Immun* **73**, 2873-2880.

Georgopapadakou, N. H., Smith, S. A. & Sykes, R. B. (1982). Mode of action of azthreonam. *Antimicrob Agents Chemother* **21**, 950-956.

Giaever, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I. & Strom, A. R. (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli. J Bacteriol* **170**, 2841-2849.

Gibson, K. E., Campbell, G. R., Lloret, J. & Walker, G. C. (2006). CbrA is a stationary-phase regulator of cell surface physiology and legume symbiosis in *Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol* **188**, 4508-4521.

Gilbert, P., Das, J. & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**, 160-167.

Gilles-Gonzalez, M. A., Ditta, G. S. & Helinski, D. R. (1991). A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti. Nature* **350**, 170-172.

Giuliodori, A. M., Di Pietro, F., Marzi, S., Masquida, B., Wagner, R., Romby, P., Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (2010). The *cspA* mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. *Mol Cell* **37**, 21-33.

Glazebrook, J. & Walker, G. (1989). A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* **56**, 661-672.

Glenn, S., Gurich, N., Feeney, M. & Gonzalez, J. (2007). The ExpR/Sin Quorum Sensing System Controls Succinoglycan Production in *Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol*.

Godefroid, M. (2010). Characterization of the clumping phenotype displayed by a Quorum sensing deficient strain in *Brucella melitensis* 16M and research of genes involved in its exopolysaccharide biosynthesis. Namur, Belgium: FUNDP.

Godefroid, M., Svensson, M. V., Cambier, P., Uzureau, S., Mirabella, A., De Bolle, X., Van Cutsem, P., Widmalm, G. & Letesson, J.-J. (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **59**, 364-377.

Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J. & Letesson, J. J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* **66**, 5485-5493.

Godfroid J., A.-M. (2003). Brucellose bovine. *Principale maladies infectieuses et parasitaires du bétail*, 869-889.

Goldstein, I. J., Hollerman, C. E. & Smith, E. E. (1965). Protein-Carbohydrate Interaction. Ii. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin a with Polysaccharides. *Biochemistry* **4**, 876-883.

Goldstein, J., Hoffman, T., Frasch, C., Lizzio, E. F., Beining, P. R., Hochstein, D., Lee, Y. L., Angus, R. D. & Golding, B. (1992). Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli,* suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infect Immun* **60**, 1385-1389.

Gonzalez Carrero, M. I., Sangari, F. J., Aguero, J. & Garcia Lobo, J. M. (2002). *Brucella abortus* strain 2308 produces brucebactin, a highly efficient catecholic siderophore. *Microbiology* **148**, 353-360.

González, D., Grilló, M.-J., De Miguel, M.-J. & other authors (2008). Brucellosis Vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* Lipopolysaccharide Rough Mutants Defective in Core and O-Polysaccharide Synthesis and Export. *PLoS ONE* **3**, e2760.

González, J. E., York, G. M. & Walker, G. C. (1996). *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene* **179**, 141-146.

González, J. E., Semino, C. E., Wang, L. X., Castellano-Torres, L. E. & Walker, G. C. (1998). Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13477-13482.

Gonzalez-Flecha, B. & Demple, B. (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 13681-13687.

Gorke, B. & Stulke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**, 613-624.

Gorvel, J. P. & Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**, 281-297.

Goswami, M., Mangoli, S. H. & Jawali, N. (2006). Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 949-954.

Goudreau, P. N. & Stock, A. M. (1998). Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. *Curr Opin Microbiol* **1**, 160-169.

Gralla, J. D. & Vargas, D. R. (2006). Potassium glutamate as a transcriptional inhibitor during bacterial osmoregulation. *Embo J* **25**, 1515-1521.

Green, J. & Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* **2**, 954-966.

Gross, A., Spiesser, S., Terraza, A., Rouot, B., Caron, E. & Dornand, J. (1998). Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Infect Immun* **66**, 1309-1316.

Groussaud, P., Shankster, S. J., Koylass, M. S. & Whatmore, A. M. (2007). Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. *J Med Microbiol* **56**, 1512-1518.

Gu, M. & Imlay, J. A. (2011). The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Mol Microbiol* **79**, 1136-1150.

Gutknecht, R., Beutler, R., Garcia-Alles, L. F., Baumann, U. & Erni, B. (2001). The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. *Embo J* **20**, 2480-2486.

Guvener, Z. T. & Harwood, C. S. (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol Microbiol* **66**, 1459-1473.

Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A. & other authors (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 USA* **99**, 12375-12380.

Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. & Bremer, E. (1995). The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **246**, 783-786.

Haine, V., Dozot, M., Dornand, J., Letesson, J.-J. & De Bolle, X. (2006). NnrA is required for full virulence and regulates several *Brucella melitensis* denitrification genes. *Journal of Bacteriology* **188**, 1615-1619.

Hallez, R., Bellefontaine, A. F., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2004). Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **12**, 361-365.

Hallez, R., Mignolet, J., Van Mullem, V., Wery, M., Vandenhaute, J., Letesson, J. J., Jacobs-Wagner, C. & De Bolle, X. (2007). The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. *Embo J* **26**, 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. & 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**, 2715-2726.

Hamann, K., Zimmann, P. & Altendorf, K. (2008). Reduction of turgor is not the stimulus for the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**, 2360-2367.

Hammer, B. K. & Bassler, B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **50**, 101-104.

Han, Y., Zhou, D., Pang, X. & other authors (2005). Comparative transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in response to hyperosmotic and high-salinity stress. *Res Microbiol* **156**, 403-415.

Harms, C., Domoto, Y., Celik, C., Rahe, E., Stumpe, S., Schmid, R., Nakamura, T. & Bakker, E. P. (2001). Identification of the ABC protein SapD as the subunit that confers ATP dependence to the K^+-uptake systems Trk(H) and Trk(G) from *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **147**, 2991-3003.

Harold, F. M. (1990). To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms. *Microbiol Rev* **54**, 381-431.

Harwood, J. P., Gazdar, C., Prasad, C., Peterkofsky, A., Curtis, S. J. & Epstein, W. (1976). Involvement of the glucose enzymes II of the sugar phosphotransferase system in the regulation of adenylate cyclase by glucose in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **251**, 2462-2468.

Hay, I. D., Gatland, K., Campisano, A., Jordens, J. Z. & Rehm, B. H. (2009). Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Appl Environ Microbiol* **75**, 6022-6025.

Heermann, R., Lippert, M. L. & Jung, K. (2009a). Domain swapping reveals that the N-terminal domain of the sensor kinase KdpD in *Escherichia coli* is important for signaling. *BMC Microbiol* **9**, 133.

Heermann, R., Weber, A., Mayer, B., Ott, M., Hauser, E., Gabriel, G., Pirch, T. & Jung, K. (2009b). The universal stress protein UspC scaffolds the KdpD/KdpE signaling cascade of *Escherichia coli* under salt stress. *J Mol Biol* **386**, 134-148.

Heermann, R. & Jung, K. (2010). The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **304**, 97-106.

Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 263-273.

Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N. & Fischer, D. (1993). Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli. J Bacteriol* **175**, 259-265.

Hense, B., Kuttler, C., Muller, J., Rothballer, M., Hartmann, A. & Kreft, J. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* **5**, 230-239.

Hernandez, V. J. & Bremer, H. (1991). *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*. *J Biol Chem* **266**, 5991-5999.

Heyde, M. & Portalier, R. (1990). Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **57**, 19-26.

Hoang, H. H., Becker, A. & Gonzalez, J. E. (2004). The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J Bacteriol* **186**, 5460-5472.

Hoang, H. H., Gurich, N. & Gonzalez, J. E. (2008). Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **190**, 861-871.

Hocking, J., Priyadarshini, R., Takacs, C. N., Costa, T., Dye, N. A., Shapiro, L., Vollmer, W. & Jacobs-Wagner, C. (2012). Osmolality-Dependent Relocation of Penicillin-Binding Protein PBP2 to the Division Site in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **194**, 3116-3127.

Hoe, N. P. & Goguen, J. D. (1993). Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* **175**, 7901-7909.

Hong, P. C., Tsolis, R. M. & Ficht, T. A. (2000). Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infection and Immunity* **68**, 4102-4107.

Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E. & Foster, S. J. (2001). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**, 3744-3754.

Houot, L. & Watnick, P. I. (2008). A Novel Role for Enzyme I of the *Vibrio cholerae* Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System in Regulation of Growth in a Biofilm. *Journal of Bacteriology* **190**, 311-320.

House, B., Kus, J. V., Prayitno, N., Mair, R., Que, L., Chingcuanco, F., Gannon, V., Cvitkovitch, D. G. & Barnett Foster, D. (2009). Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 virulence. *Microbiology* **155**, 2907-2918.

Hozbor, D. F., Pich Otero, A. J., Lodeiro, A. R., Del Papa, M. F., Pistorio, M. & Lagares, A. (2004). The symbiotic defect in a *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant can be overcome by expression of other surface polysaccharides. *Res Microbiol* **155**, 855-860.

Hunke, S., Keller, R. & Muller, V. S. (2012). Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett* **326**, 12-22.

Iibuchi, R., Hara-Kudo, Y., Hasegawa, A. & Kumagai, S. (2010). Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. *J Food Prot* **73**, 1506-1510.

Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**, 395-418.

Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* **77**, 755-776.

Ionescu, M. & Belkin, S. (2009). Overproduction of exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 *rpoS* mutant in response to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* **75**, 483-492.

Jacob, F., Perrin, D., Sanchez, C. & Monod, J. (1960). The operon: a group of genes with expression coordinated by an operator. *CRAcad Sci* **250**, 1727-1729.

Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**, 111-120.

Jain, N., Rodriguez, A. C., Kimsawatde, G., Seleem, M. N., Boyle, S. M. & Sriranganathan, N. (2011). Effect of *entF* deletion on iron acquisition and erythritol metabolism by *Brucella abortus* 2308. *FEMS Microbiol Lett* **316**, 1-6.

Jain, V., Kumar, M. & Chatterji, D. (2006). ppGpp: stringent response and survival. *J Microbiol* **44**, 1-10.

James, P. E., Grinberg, O. Y., Michaels, G. & Swartz, H. M. (1995). Intraphagosomal oxygen in stimulated macrophages. *J Cell Physiol* **163**, 241-247.

Janczarek, M. & Skorupska, A. (2007). The *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 867-881.

Janczarek, M., Kutkowska, J., Piersiak, T. & Skorupska, A. (2010). *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* rosR is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Microbiology* **10**, 284.

Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int J Mol Sci* **12**, 7898-7933.

Janczarek, M. & Skorupska, A. (2011). Modulation of *rosR* Expression and Exopolysaccharide Production in *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* by Phosphate and Clover Root Exudates. *Int J Mol Sci* **12**, 4132-4155.

Jang, S. & Imlay, J. A. (2010). Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. *Mol Microbiol* **78**, 1448-1467.

Jannasch, H. W. & Mottl, M. J. (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* **229**, 717-725.

Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T. & Blanco, C. (1992). Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol* **174**, 5027-5035.

Jenal, U. & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**, 385-407.

Jenkins, D. E., Schultz, J. E. & Matin, A. (1988). Starvation-induced cross protection against heat or H_2O_2 challenge in *Escherichia coli. J Bacteriol* **170**, 3910-3914.

Jenkins, D. E., Chaisson, S. A. & Matin, A. (1990). Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 2779-2781.

Jeon, J. M., Lee, H. I., Donati, A. J., So, J. S., Emerich, D. W. & Chang, W. S. (2011). Whole-genome expression profiling of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydrogen peroxide. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 1472-1481.

Jiang, X., Leonard, B., Benson, R. & Baldwin, C. L. (1993). Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* **151**, 309-319.

Jimenez de Bagues, M. P., Loisel-Meyer, S., Liautard, J. P. & Jubier-Maurin, V. (2007). Different roles of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis*: Cytochrome c oxidase, but not ubiquinol oxidase, is required for persistence in mice. *Infect Immun* **75**, 531-535.

Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V. & Nystrom, T. (2002). Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* **16**, 1260-1270.

Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M. & Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110**, 551-561.

Jones, K., Kobayashi, H., Davies, B., Taga, M. & Walker, G. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**, 619-633.

Jovanovich, S. B., Martinell, M., Record, M. T., Jr. & Burgess, R. R. (1988). Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**, 534-539.

Jubier-Maurin, V., Rodrigue, A., Ouahrani-Bettache, S., Layssac, M., Mandrand-Berthelot, M. A., Kohler, S. & Liautard, J. P. (2001). Identification of the *nik* gene cluster of *Brucella suis*: regulation and contribution to urease activity. *J Bacteriol* **183**, 426-434.

Jung, H. (1998). Topology and function of the Na^+/proline transporter of *Escherichia coli*, a member of the Na^+/solute cotransporter family. *Biochim Biophys Acta* **1365**, 60-64.

Jung, H. (2001). Towards the molecular mechanism of Na(+)/solute symport in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1505**, 131-143.

Jung, H., Hilger, D. & Raba, M. (2012). The Na(+)/L-proline transporter PutP. *Front Biosci* **17**, 745-759.

Jung, K., Veen, M. & Altendorf, K. (2000). K^+ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 40142-40147.

Jung, K., Hamann, K. & Revermann, A. (2001). K^+ stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**, 40896-40902.

Kahl-McDonagh, M. M., Elzer, P. H., Hagius, S. D. & other authors (2006). Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine* **24**, 5169-5177.

Kang, Y., Durfee, T., Glasner, J. D., Qiu, Y., Frisch, D., Winterberg, K. M. & Blattner, F. R. (2004). Systematic mutagenesis of the *Escherichia coli* genome. *J Bacteriol* **186**, 4921-4930.

Kanjee, U., Gutsche, I., Alexopoulos, E. & other authors (2011). Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *Embo J* **30**, 931-944.

Karatan, E. & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 310-347.

Karp, G. (2004). *Biologie cellulaire et moléculaire*. Bruxelles (Belgium).

Keates, R. A., Culham, D. E., Vernikovska, Y. I., Zuiani, A. J., Boggs, J. M. & Wood, J. M. (2010). Transmembrane helix I and periplasmic loop 1 of *Escherichia coli* ProP are involved in osmosensing and osmoprotectant transport. *Biochemistry* **49**, 8847-8856.

Keating, D. H. (2007). The *Sinorhizobium meliloti* ExoR protein is required for the downregulation of *lpsS* transcription and succinoglycan biosynthesis in response to divalent cations. *FEMS Microbiol Lett* **267**, 23-29.

Keller, M., Roxlau, A., Weng, W. M., Schmidt, M., Quandt, J., Niehaus, K., Jording, D., Arnold, W. & Puhler, A. (1995). Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 267-277.

Kim, J. A. & Mayfield, J. (2000). Identification of *Brucella abortus* OxyR and its role in control of catalase expression. *J Bacteriol* **182**, 5631-5633.

Kim, J. A., Sha, Z. & Mayfield, J. E. (2000). Regulation of *Brucella abortus* catalase. *Infect Immun* **68**, 3861-3866.

Kim, S., Watarai, M., Kondo, Y., Erdenebaatar, J., Makino, S. & 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**, 3020-3027.

Kim, S., Watanabe, K., Suzuki, H. & Watarai, M. (2005). Roles of *Brucella abortus* SpoT in morphological differentiation and intramacrophagic replication. *Microbiology* **151**, 1607-1617.

Kimata, K., Inada, T., Tagami, H. & Aiba, H. (1998). A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **29**, 1509-1519.

Kirisits, M. J., Prost, L., Starkey, M. & Parsek, M. R. (2005). Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4809-4821.

Klinkert, B. & Narberhaus, F. (2009). Microbial thermosensors. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2661-2676.

Kobayashi, K., Mizuno, M., Fujikawa, M. & Mizutani, Y. (2011). Protein conformational changes of the oxidative stress sensor, SoxR, upon redox changes of the [2Fe-2S] cluster probed with ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* **50**, 9468-9474.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. & Collins, J. J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**, 797-810.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G. & Collins, J. J. (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* **135**, 679-690.

Kohler, S., Teyssier, J., Cloeckaert, A., Rouot, B. & Liautard, J. P. (1996). Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol Microbiol* **20**, 701-712.

Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M. & Liautard, J.-P. (2002). 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 USA* **99**, 15711-15716.

Kohler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M. & Liautard, J. (2003). What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol* **11**, 215-219.

Köhler, S., Ekaza, E., Paquet, J.-Y., Walravens, K., Teyssier, J., Godfroid, J. & Liautard, J.-P. (2002). Induction of *dnaK* through its native heat shock promoter is necessary for intramacrophagic replication of *Brucella suis*. *Infection and Immunity* **70**, 1631-1634.

Koutsolioutsou, A., Pena-Llopis, S. & Demple, B. (2005). Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2746-2752.

Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-802.

Kramer, R. (2010). Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. *Chem Rec* **10**, 217-229.

Kramer, R., Nicklisch, S. & Ott, V. (2010). Use of liposomes to study cellular osmosensors. *Methods Mol Biol* **606**, 21-30.

Kreutzer, D. L. & Robertson, D. C. (1979). Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect Immun* **23**, 819-828.

Krulwich, T. A., Ito, M., Gilmour, R. & Guffanti, A. A. (1997). Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in alkaliphilic strains of *Bacillus*. *Extremophiles* **1**, 163-169.

Kung, C., Martinac, B. & Sukharev, S. (2010). Mechanosensitive channels in microbes. *Annu Rev Microbiol* **64**, 313-329.

Kunte, H. J., Crane, R. A., Culham, D. E., Richmond, D. & Wood, J. M. (1999). Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **181**, 1537-1543.

Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M. & Kornberg, A. (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli. J Biol Chem* **272**, 21240-21243.

Laffler, T. & Gallant, J. A. (1974). Stringent control of protein synthesis in *E. coli*. *Cell* **3**, 47-49.

Laimins, L. A., Rhoads, D. B., Altendorf, K. & Epstein, W. (1978). Identification of the structural proteins of an ATP-driven potassium transport system in *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3216-3219.

Laimins, L. A., Rhoads, D. B. & Epstein, W. (1981). Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 464-468.

Lamark, T., Rokenes, T. P., McDougall, J. & Strom, A. R. (1996). The complex *bet* promoters of *Escherichia coli:* regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J Bacteriol* **178**, 1655-1662.

Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**, 181-189.

Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E. & other authors (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res* **6**, 1519-1529.

Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* **8**, 60-66.

Lapaque, N., Takeuchi, O., Corrales, F., Akira, S., Moriyon, I., Howard, J. C. & Gorvel, J. P. (2006). Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol* **8**, 401-413.

Laub, M. T., Biondi, E. G. & Skerker, J. M. (2007). Phosphotransfer profiling: systematic mapping of two-component signal transduction pathways and phosphorelays. *Methods Enzymol* **423**, 531-548.

Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., Van Brussel, A. A., Carlson, R. W. & Kijne, J. W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol Microbiol* **59**, 1704-1713.

Lavin, J. L., Binnewies, T. T., Pisabarro, A. G., Ussery, D. W., Garcia-Lobo, J. M. & Oguiza, J. A. (2010). Differences in two-component signal transduction proteins among the genus *Brucella*: implications for host preference and pathogenesis. *Vet Microbiol* **144**, 478-483.

Lee, A. K., Detweiler, C. S. & Falkow, S. (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* **182**, 771-781.

Lee, C. R., Cho, S. H., Yoon, M. J., Peterkofsky, A. & Seok, Y. J. (2007a). *Escherichia coli* enzyme IIANtr regulates the K^+ transporter TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4124-4129.

Lee, E. R., Baker, J. L., Weinberg, Z., Sudarsan, N. & Breaker, R. R. (2010). An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* **329**, 845-848.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H_2O_2 by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**, 363-367.

Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**, 485-499.

Lee, J. W., Soonsanga, S. & Helmann, J. D. (2007b). A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8743-8748.

Lee, S. J. & Gralla, J. D. (2004). Osmo-regulation of bacterial transcription via poised RNA polymerase. *Mol Cell* **14**, 153-162.

Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R. & Jeffers, A. K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* **175**, 7512-7518.

Leigh, J. A., Signer, E. R. & Walker, G. C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6231-6235.

Leigh, J. A., Reed, J. W., Hanks, J. F., Hirsch, A. M. & Walker, G. C. (1987). *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* **51**, 579-587.

Leigh, J. A. & Lee, C. C. (1988). Characterization of polysaccharides of *Rhizobium meliloti exo* mutants that form ineffective nodules. *J Bacteriol* **170**, 3327-3332.

Lemke, J. J., Sanchez-Vazquez, P., Burgos, H. L., Hedberg, G., Ross, W. & Gourse, R. L. (2011). Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5712-5717.

Lengeler, J. W. & Jahreis, K. (2009). Bacterial PEP-dependent carbohydrate: phosphotransferase systems couple sensing and global control mechanisms. *Contrib Microbiol* **16**, 65-87.

Leonard, S., Ferooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X. & 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**, 131-141.

Leonardo, M. R. & Forst, S. (1996). Re-examination of the role of the periplasmic domain of EnvZ in sensing of osmolarity signals in *Escherichia coli. Mol Microbiol* **22**, 405-413.

Lesley, J. A. & Shapiro, L. (2008). SpoT regulates DnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus. J Bacteriol* **190**, 6867-6880.

Lestrate, P., Delrue, R. M., Danese, I. & other authors (2000). Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis. Mol Microbiol* **38**, 543-551.

Lestrate, P., Dricot, A., Delrue, R., Lambert, C., Martinelli, V., De Bolle, X., Letesson, J. & Tibor, A. (2003). Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun* **71**, 7053-7060.

Letesson, J. J., Lestrate, P., Delrue, R. M. & other authors (2002). Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug". *Vet Microbiol* **90**, 317-328.

Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2004). *Brucella* Virulence : a matter of control In *Brucella Molecular and Cellular Biology*. Edited by I. Lopez-Goni & I. Moriyon. Universidad de Navarra, Pamplona (Spain).

Levina, N., Totemeyer, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A. & 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**, 1730-1737.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. (1994). H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.

Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* **5**, 48-56.

Li, Y., Moe, P. C., Chandrasekaran, S., Booth, I. R. & Blount, P. (2002). Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from *Escherichia coli. Embo J* **21**, 5323-5330.

Lin, J. & Ficht, T. A. (1995). Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infection and Immunity* **63**, 1409-1414.

Lippert, K. & Galinski, E. A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solute : protection against heating, freezing ans drying. *Applied Microbiolohy and Biotechnology* **37**, 61-65.

Liu, Z., Stirling, F. R. & Zhu, J. (2007). Temporal Quorum-Sensing Induction Regulates *Vibrio cholerae* Biofilm Architecture. *Infection and Immunity* **75**, 122-126.

Lloret, J., Wulff, B. B., Rubio, J. M., Downie, J. A., Bonilla, I. & Rivilla, R. (1998). Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1024-1028.

Loh, J. T., Gupta, S. S., Friedman, D. B., Krezel, A. M. & Cover, T. L. (2010). Analysis of protein expression regulated by the *Helicobacter pylori* ArsRS two-component signal transduction system. *J Bacteriol* **192**, 2034-2043.

Loisel-Meyer, S., Jimenez de Bagues, M. P., Kohler, S., Liautard, J. P. & Jubier-Maurin, V. (2005). Differential use of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis* for *in vitro* and intramacrophagic multiplication. *Infect Immun* **73**, 7768-7771.

Loisel-Meyer, S., Jimenez de Bagues, M. P., Basseres, E., Dornand, J., Kohler, S., Liautard, J. P. & Jubier-Maurin, V. (2006). Requirement of *norD* for *Brucella suis* virulence in a murine model of *in vitro* and *in vivo* infection. *Infect Immun* **74**, 1973-1976.

Lopez, C. S., Heras, H., Ruzal, S. M., Sanchez-Rivas, C. & Rivas, E. A. (1998). Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium. *Curr Microbiol* **36**, 55-61.

Lucero, N. E., Escobar, G. I., Ayala, S. M. & Jacob, N. (2005). Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol* **54**, 457-461.

Luttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I. S., Jung, K. & Gorke, B. (2009). Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in *Escherichia coli. Mol Microbiol* **72**, 978-994.

Lux, R., Jahreis, K., Bettenbrock, K., Parkinson, J. S. & Lengeler, J. W. (1995). Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11583-11587.

Ly, A., Henderson, J., Lu, A., Culham, D. E. & 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**, 296-306.

Mah, T. F. & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**, 34-39.

Mandal, M., Boese, B., Barrick, J. E., Winkler, W. C. & Breaker, R. R. (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* **113**, 577-586.

Mandal, M. & Breaker, R. R. (2004). Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 29-35.

Mansilla, M. C., Cybulski, L. E., Albanesi, D. & de Mendoza, D. (2004). Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J Bacteriol* **186**, 6681-6688.

Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D., Koch, M., Howe, J., Brandenburg, K. & 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**, 5631-5639.

Marchesini, M. I., Herrmann, C. K., Salcedo, S. P., Gorvel, J. P. & Comerci, D. J. (2011). In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol* **13**, 1261-1274.

Marcus, E. A., Moshfegh, A. P., Sachs, G. & Scott, D. R. (2005). The periplasmic alpha-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *J Bacteriol* **187**, 729-738.

Marijuan, P. C., Navarro, J. & del Moral, R. (2010). On prokaryotic intelligence: strategies for sensing the environment. *Biosystems* **99**, 94-103.

Marketon, M. M., Glenn, S. A., Eberhard, A. & Gonzalez, J. E. (2003). Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol* **185**, 325-331.

Markovitz, A. (1964). Regulatory Mechanisms for Synthesis of Capsular Polysaccharide in Mucoid Mutants of *Escherichia Coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 239-246.

Martin, D. W., Baumgartner, J. E., Gee, J. M., Anderson, E. S. & Roop, R. M. (2012). SodA is a major metabolic antioxidant in *Brucella abortus* 2308 that plays a significant, but limited, role in the virulence of this strain in the mouse model. *Microbiology* **158**, 1767-1774.

Martinez, M., Ugalde, R. A. & Almiron, M. (2005). Dimeric *Brucella abortus* Irr protein controls its own expression and binds haem. *Microbiology* **151**, 3427-3433.

Martinez, M., Ugalde, R. A. & Almiron, M. (2006). Irr regulates brucebactin and 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis, and is implicated in the oxidative stress resistance and intracellular survival of *Brucella abortus*. *Microbiology* **152**, 2591-2598.

Martinez-Nunez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillen, F., Moreno, E., Guzman-Verri, C. & Chaves-Olarte, E. (2010). The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **192**, 5603-5608.

Mascher, T., Helmann, J. D. & Unden, G. (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 910-938.

Matsukawa, M. & Greenberg, E. P. (2004). Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**, 4449-4456.

Mcdonald, W. L., Jamaludin, R., Mackereth, G. & other authors (2006). Characterization of a *Brucella* sp. Strain as a Marine-Mammal Type despite Isolation from a Patient with Spinal Osteomyelitis in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 4363-4370.

McElhaney, R. N. (1975). Membrane lipid, not polarized water, is responsible for the semipermeable properties of living cells. *Biophys J* **15**, 777-784.

McIntosh, M., Krol, E. & Becker, A. (2008). Competitive and cooperative effects in quorum-sensing-regulated galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol* **190**, 5308-5317.

McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E. T. & Epstein, W. (1994). Interdependence of K^+ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli. J Biol Chem* **269**, 1911-1917.

McNeill, K. & Hamilton, I. R. (2003). Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* **221**, 25-30.

Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**, 114-122.

Meador, V. P. & Deyoe, B. L. (1989). Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet Pathol* **26**, 513-515.

Measures, J. C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**, 398-400.

Melin, M., Trzcinski, K., Meri, S., Kayhty, H. & Vakevainen, M. (2010). The capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* is more important than the genetic background for resistance to complement. *Infect Immun* **78**, 5262-5270.

Mellies, J., Wise, A. & Villarejo, M. (1995). Two different *Escherichia coli proP* promoters respond to osmotic and growth phase signals. *J Bacteriol* **177**, 144-151.

Mendrygal, K. E. & Gonzalez, J. E. (2000). Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol* **182**, 599-606.

Menscher, E. A., Caswell, C. C., Anderson, E. S. & Roop, R. M., 2nd (2012). Mur regulates the gene encoding the manganese transporter MntH in *Brucella abortus* 2308. *J Bacteriol* **194**, 561-566.

Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007). The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65**, 876-895.

Merritt, J. H., Brothers, K. M., Kuchma, S. L. & O'Toole, G. A. (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J Bacteriol* **189**, 8154-8164.

Meury, J. (1994). Immediate and transient inhibition of the respiration of *Escherichia coli* under hyperosmotic shock. *FEMS Microbiol Lett* **121**, 281-286.

Mignolet, J., Van der Henst, C., Nicolas, C., Deghelt, M., Dotreppe, D., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2010). PdhS, an old-pole-localized histidine kinase, recruits the fumarase FumC in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **192**, 3235-3239.

Mikkelsen, H., Ball, G., Giraud, C. & Filloux, A. (2009). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS One* **4**, e6018.

Miller, K. J. & Wood, J. M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**, 101-136.

Miller, M. & Bassler, B. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165-199.

Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J. & other authors (2006). The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13962-13967.

Mirabella, A., Yanez Villanueva, R. M., Delrue, R. M., Uzureau, S., Zygmunt, M. S., Cloeckaert, A., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2012). The two-component system PrlS/PrlR of *Brucella melitensis* is required for persistence in mice and appears to respond to ionic strength. *Microbiology*.

Mitrophanov, A. Y. & Groisman, E. A. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* **22**, 2601-2611.

Mizuno, T. & Mizushima, S. (1990). Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol Microbiol* **4**, 1077-1082.

Mocca, B. & Wang, W. (2012). Bacterium-generated nitric oxide hijacks host tumor necrosis factor alpha signaling and modulates the host cell cycle in vitro. *J Bacteriol* **194**, 4059-4068.

Moe, P. C., Blount, P. & Kung, C. (1998). Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol Microbiol* **28**, 583-592.

Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 255-261.

Monod, J. (1942). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes: University of Paris.

Monson, E. K., Ditta, G. S. & Helinski, D. R. (1995). The oxygen sensor protein, FixL, of *Rhizobium meliloti.* Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation, and signal transduction. *J Biol Chem* **270**, 5243-5250.

Moorthy, S. & Watnick, P. I. (2004). Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol* **52**, 573-587.

Moreno, E., Berman, D. T. & Boettcher, L. A. (1981). Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun* **31**, 362-370.

Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & 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**, 3569-3576.

Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* **22**, 255-275.

Moreno, E. & Moriyon, I. (2002). *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1-3.

Moreno, E. & Moriyón, I. (2006). The Prokaryotes. **5**, 315-456.

Morgan, W. J. & Corbel, M. J. (1976). Recommendations for the description of species and biotypes of the genus *Brucella*. *Dev Biol Stand* **31**, 27-37.

Moris, M., Braeken, K., Schoeters, E., Verreth, C., Beullens, S., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2005). Effective symbiosis between *Rhizobium etli* and *Phaseolus vulgaris* requires the alarmone ppGpp. *J Bacteriol* **187**, 5460-5469.

Morita, M. T., Tanaka, Y., Kodama, T. S., Kyogoku, Y., Yanagi, H. & Yura, T. (1999). Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* **13**, 655-665.

Mueller, K. & Gonzalez, J. E. (2011). Complex regulation of symbiotic functions is coordinated by MucR and quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol* **193**, 485-496.

Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G. & Hengge-Aronis, R. (1996a). The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli. Embo J* **15**, 1333-1339.

Muffler, A., Traulsen, D. D., Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1996b). Posttranscriptional osmotic regulation of the sigma(s) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli. J Bacteriol* **178**, 1607-1613.

Mulcahy, H. & Lewenza, S. (2011). Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *PLoS One* **6**, e23307.

Muller, C., Bang, I. S., Velayudhan, J., Karlinsey, J., Papenfort, K., Vogel, J. & Fang, F. C. (2009). Acid stress activation of the sigma(E) stress response in *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. *Mol Microbiol* **71**, 1228-1238.

Muller, P., Keller, M., Weng, W. M., Quandt, J., Arnold, W. & Puhler, A. (1993). Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti exoYFQ* operon: ExoY is homologous to sugar transferases and ExoQ represents a transmembrane protein. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 55-65.

Murray, K. D. & Bremer, H. (1996). Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli. J Mol Biol* **259**, 41-57.

Nadratowska-Wesolowska, B., Slominska-Wojewodzka, M., Lyzen, R., Wegrzyn, A., Szalewska-Palasz, A. & Wegrzyn, G. (2010). Transcription regulation of the *Escherichia coli pcnB* gene coding for poly(A) polymerase I: roles of ppGpp, DksA and sigma factors. *Mol Genet Genomics* **284**, 289-305.

Nagai, H., Yuzawa, H. & Yura, T. (1991). Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of sigma 32 synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10515-10519.

Nagarajan, T., Vanderleyden, J. & Tripathi, A. K. (2007). Identification of salt stress inducible genes that control cell envelope related functions in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol Genet Genomics* **278**, 43-51.

Nakashima, K., Sugiura, A., Momoi, H. & Mizuno, T. (1992). Phosphotransfer signal transduction between two regulatory factors involved in the osmoregulated *kdp* operon in *Escherichia coli. Mol Microbiol* **6**, 1777-1784.

Nam, T. W., Cho, S. H., Shin, D. & other authors (2001). The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *Embo J* **20**, 491-498.

Nam, T. W., Jung, H. I., An, Y. J., Park, Y. H., Lee, S. H., Seok, Y. J. & Cha, S. S. (2008). Analyses of Mlc-IIBGlc interaction and a plausible molecular mechanism of Mlc inactivation by membrane sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3751-3756.

Naroeni, A. & 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**, 1640-1644.

Navarro Llorens, J. M., Tormo, A. & Martinez-Garcia, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 476-495.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. & Schaechter, M. (1990). *Physiology of the bacterial cell : a molecular approach*: Sinauer associates Inc., Sunderland, Massachusetts (USA).

Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F. & other authors (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **334**, 982-986.

Niemeyer, D. & Becker, A. (2001). The molecular weight distribution of succinoglycan produced by *Sinorhizobium meliloti* is influenced by specific tyrosine phosphorylation and ATPase activity of the cytoplasmic domain of the ExoP protein. *J Bacteriol* **183**, 5163-5170.

Nikaido, H. & Rosenberg, E. Y. (1983). Porin channels in *Escherichia coli:* studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J Bacteriol* **153**, 241-252.

Nishijima, S., Asami, Y., Uetake, N., Yamagoe, S., Ohta, A. & Shibuya, I. (1988). Disruption of the *Escherichia coli cls* gene responsible for cardiolipin synthesis. *J Bacteriol* **170**, 775-780.

Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol* **8**, 11-26.

Novotny, M. J., Frederickson, W. L., Waygood, E. B. & Saier, M. H., Jr. (1985). Allosteric regulation of glycerol kinase by enzyme IIIglc of the phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium. J Bacteriol* **162**, 810-816.

Nystrom, T., Larsson, C. & Gustafsson, L. (1996). Bacterial defense against aging: role of the *Escherichia coli* ArcA regulator in gene expression, readjusted energy flux and survival during stasis. *Embo J* **15**, 3219-3228.

O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. & 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**, 1210-1220.

O'Hara, B. P., Norman, R. A., Wan, P. T., Roe, S. M., Barrett, T. E., Drew, R. E. & Pearl, L. H. (1999). Crystal structure and induction mechanism of AmiC-AmiR: a ligand-regulated transcription antitermination complex. *Embo J* **18**, 5175-5186.

Ojeda, J. F., Martinson, D., Menscher, E. & Roop, R. M., 2nd (2012). The *bhuQ* gene encodes a heme oxygenase that contributes to the ability of *Brucella abortus* 2308 to use heme as an iron source and is regulated by Irr. *J Bacteriol* **194**, 4052-4058.

Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A. L., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Goodfellow, M. & Bull, A. T. (2009). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek* **95**, 121-133.

Ong, C. J., Wong, M. L. & Smit, J. (1990). Attachment of the adhesive holdfast organelle to the cellular stalk of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **172**, 1448-1456.

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

Ostrander, D. B. & Gorman, J. A. (1999). The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. *J Bacteriol* **181**, 2527-2534.

Osumi, T. & Saier, M. H., Jr. (1982). Regulation of lactose permease activity by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system: evidence for direct binding of the glucose-specific enzyme III to the lactose permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1457-1461.

Otto, K. & Silhavy, T. J. (2002). Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2287-2292.

Ozga, D. A., Lara, J. C. & Leig, J. A. (1994). The regulation of exopolysaccharide production is important at two levels of nodule development in *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 758-765.

Palomino, M. M., Sanchez-Rivas, C. & Ruzal, S. M. (2009). High salt stress in *Bacillus subtilis*: involvement of PBP4* as a peptidoglycan hydrolase. *Res Microbiol* **160**, 117-124.

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **6**, 91-99.

Pappas, G. (2010). The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36**, S8-S11.

Park, Y. H., Lee, B. R., Seok, Y. J. & Peterkofsky, A. (2006). *In vitro* reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli. J Biol Chem* **281**, 6448-6454.

Parkinson, J. S. (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**, 857-871.

Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W. & Gourse, R. L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* **118**, 311-322.

Paul, B. J., Berkmen, M. B. & Gourse, R. L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7823-7828.

Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H. & Jenal, U. (2007). Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J Biol Chem* **282**, 29170-29177.

Paulsen, I., Seshadri, R., Nelson, K. & other authors (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13148-13153.

Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**, 5756-5767.

Pellock, B. J., Teplitski, M., Boinay, R. P., Bauer, W. D. & Walker, G. C. (2002). A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol* **184**, 5067-5076.

Perraud, A. L., Weiss, V. & Gross, R. (1999). Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**, 115-120.

Perry, M. B. & Bundle, D. R. (1990). Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. *Infect Immun* **58**, 1391-1395.

Peter, H., Burkovski, A. & Kramer, R. (1998). Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum. J Biol Chem* **273**, 2567-2574.

Petersen, E., Chaudhuri, P., Gourley, C., Harms, J. & Splitter, G. (2011). *Brucella melitensis* cyclic di-GMP phosphodiesterase BpdA controls expression of flagellar genes. *J Bacteriol* **193**, 5683-5691.

Pflock, M., Kennard, S., Delany, I., Scarlato, V. & Beier, D. (2005). Acid-induced activation of the urease promoters is mediated directly by the ArsRS two-component system of *Helicobacter pylori. Infect Immun* **73**, 6437-6445.

Phadtare, S. & Severinov, K. (2010). RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biol* **7**, 788-795.

Phaff, H. J. (1963). Cell Wall of Yeasts. *Annu Rev Microbiol* **17**, 15-30.

Phillips, R. W., Elzer, P. H. & 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**, 227-284.

Phillips, R. W., Elzer, P. H., Robertson, G. T., Hagius, S. D., Walker, J. V., Fatemi, M. B., Enright, F. M. & 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**, 165-167.

Phillips, R. W. & 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**, 5911-5913.

Pikuta, E. V., Hoover, R. B. & Tang, J. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol* **33**, 183-209.

Pirch, T., Landmeier, S. & Jung, H. (2003). Transmembrane domain II of the Na^+/proline transporter PutP of *Escherichia coli* forms part of a conformationally flexible, cytoplasmic exposed aqueous cavity within the membrane. *J Biol Chem* **278**, 42942-42949.

Plate, L. & Marletta, M. A. (2012). Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network. *Mol Cell* **46**, 449-460.

Pocard, J. A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M. C. & Le Rudulier, D. (1997). Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology* **143 (Pt 4)**, 1369-1379.

Pomposiello, P. J., Bennik, M. H. & Demple, B. (2001). Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* **183**, 3890-3902.

Pomposiello, P. J., Koutsolioutsou, A., Carrasco, D. & Demple, B. (2003). SoxRS-regulated expression and genetic analysis of the *yggX* gene of *Escherichia coli. J Bacteriol* **185**, 6624-6632.

Poolman, B., Blount, P., Folgering, J. H., Friesen, R. H., Moe, P. C. & van der Heide, T. (2002). How do membrane proteins sense water stress? *Mol Microbiol* **44**, 889-902.

Porte, F., Liautard, J. P. & Kohler, S. (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**, 4041-4047.

Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. & 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**, 1481-1490.

Posadas, D. M., Ruiz-Ranwez, V., Bonomi, H. R., Martin, F. A. & Zorreguieta, A. (2012). BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cell Microbiol* **14**, 965-982.

Postma, P. W., Epstein, W., Schuitema, A. R. & Nelson, S. O. (1984). Interaction between IIIGlc of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and glycerol kinase of *Salmonella typhimurium. J Bacteriol* **158**, 351-353.

Potrykus, K. & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* **62**, 35-51.

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. & Lejeune, P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli. J Bacteriol* **181**, 5993-6002.

Principe, A., Jofre, E., Alvarez, F. & Mori, G. (2009). Role of a serine-type D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase on the survival of *Ochrobactrum* sp. 11a under ionic and hyperosmotic stress. *FEMS Microbiol Lett* **295**, 261-273.

Qi, Z., Hamza, I. & O'Brian, M. R. (1999). Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13056-13061.

Racher, K. I., Voegele, R. T., Marshall, E. V. & other authors (1999). Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry* **38**, 1676-1684.

Racher, K. I., Culham, D. E. & Wood, J. M. (2001). Requirements for osmosensing and osmotic activation of transporter ProP from *Escherichia coli. Biochemistry* **40**, 7324-7333.

Rafie-Kolpin, M., Essenberg, R. C. & 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**, 5274-5283.

Raivio, T. L., Popkin, D. L. & Silhavy, T. J. (1999). The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J Bacteriol* **181**, 5263-5272.

Rambow-Larsen, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E. & 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**, 3274-3282.

Ramirez, R. M., Prince, W. S., Bremer, E. & Villarejo, M. (1989). *In vitro* reconstitution of osmoregulated expression of *proU* of *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1153-1157.

Ramos-Morales, F. (2012). Acidic pH: Enemy or ally for enteric bacteria? *Virulence* **3**, 103-106.

Rasmussen, B. (2000). Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature* **405**, 676-679.

Ray, P. D., Huang, B. W. & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **24**, 981-990.

Reaves, M. L. & Rabinowitz, J. D. (2011). Characteristic phenotypes associated with *ptsN*-null mutants in *Escherichia coli* K-12 are absent in strains with functional *ilvG*. *J Bacteriol* **193**, 4576-4581.

Reddy, P. S., Raghavan, A. & Chatterji, D. (1995). Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol Microbiol* **15**, 255-265.

Reed, J. W., Glazebrook, J. & 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**, 3789-3794.

Reeves, P. R., Hobbs, M., Valvano, M. A. & other authors (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol* **4**, 495-503.

Rest, R. F. & Robertson, D. C. (1975). Characterization of the electron transport system in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **122**, 139-144.

Reuber, T. L. & Walker, G. C. (1993). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti. Cell* **74**, 269-280.

Reuhs, B. L., Williams, M. N., Kim, J. S., Carlson, R. W. & Cote, F. (1995). Suppression of the Fix^- phenotype of *Rhizobium meliloti exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J Bacteriol* **177**, 4289-4296.

Rkenes, T. P., Lamark, T. & Strom, A. R. (1996). DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation. *J Bacteriol* **178**, 1663-1670.

Roberson, E. B. & Firestone, M. K. (1992). Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1284-1291.

Robertson, G. & Roop, R. (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**, 690-700.

Rogers, E. A., Terekhova, D., Zhang, H. M., Hovis, K. M., Schwartz, I. & Marconi, R. T. (2009). Rrp1, a cyclic-di-GMP-producing response regulator, is an important regulator of *Borrelia burgdorferi* core cellular functions. *Mol Microbiol* **71**, 1551-1573.

Rolan, H. G. & Tsolis, R. M. (2007). Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus virB* mutant colonization. *Infect Immun* **75**, 2965-2973.

Romantsov, T., Helbig, S., Culham, D. E., Gill, C., Stalker, L. & Wood, J. M. (2007). Cardiolipin promotes polar localization of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli. Mol Microbiol* **64**, 1455-1465.

Romantsov, T., Stalker, L., Culham, D. E. & Wood, J. M. (2008). Cardiolipin controls the osmotic stress response and the subcellular location of transporter ProP in *Escherichia coli. J Biol Chem* **283**, 12314-12323.

Roop, R. M., 2nd, Gee, J. M., Robertson, G. T., Richardson, J. M., Ng, W. L. & Winkler, M. E. (2003). *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu Rev Microbiol* **57**, 57-76.

Roset, M. S., Ciocchini, A. E., Ugalde, R. A. & Inon de Iannino, N. (2006). The *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *J Bacteriol* **188**, 5003-5013.

Rossetti, C. A., Galindo, C. L., Garner, H. R. & Adams, L. G. (2011). Transcriptional profile of the intracellular pathogen *Brucella melitensis* following HeLa cells infection. *Microb Pathog* **51**, 338-344.

Roth, W. G., Porter, S. E., Leckie, M. P., Porter, B. E. & Dietzler, D. N. (1985). Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth inhibition of osmotically upshocked *Escherichia coli. Biochem Biophys Res Commun* **126**, 442-449.

Rotter, C., Muhlbacher, S., Salamon, D., Schmitt, R. & Scharf, B. (2006). Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol* **188**, 6932-6942.

Rubenhagen, R., Morbach, S. & Kramer, R. (2001). The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K^+. *Embo J* **20**, 5412-5420.

Rüberg, S., Pühler, A. & Becker, A. (1999). Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology (Reading, Engl)* **145 (Pt 3)**, 603-611.

Rungrassamee, W., Ryan, K. C., Maroney, M. J. & Pomposiello, P. J. (2009). The PqrR transcriptional repressor of *Pseudomonas aeruginosa* transduces redox signals via an iron-containing prosthetic group. *J Bacteriol* **191**, 6709-6721.

Russell, N. J. (1989). Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *J Bioenerg Biomembr* **21**, 93-113.

Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F. & Dow, J. M. (2006a). Cyclic Di-GMP Signaling in Bacteria: Recent Advances and New Puzzles. *Journal of Bacteriology* **188**, 8327-8334.

Ryan, R. P., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C. S., Armitage, J. P. & Dow, J. M. (2006b). Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 5989-5994.

Ryan, R. P., Tolker-Nielsen, T. & Dow, J. M. (2012). When the PilZ don't work: effectors for cyclic di-GMP action in bacteria. *Trends Microbiol* **20**, 235-242.

Sakuragi, Y. & Kolter, R. (2007). Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 5383-5386.

Samartino, L. E., Traux, R. E. & Enright, F. M. (1994). Invasion and replication of *Brucella abortus* in three different trophoblastic cell lines. *Zentralbl Veterinarmed B* **41**, 229-236.

Sands, M. K. & Roberts, R. B. (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **63**, 505-511.

Sangari, F. & Aguero, J. (1991). Mutagenesis of *Brucella abortus:* comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb Pathog* **11**, 443-446.

Sangari, F. J., Seoane, A., Rodriguez, M. C., Aguero, J. & 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**, 774-780.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**, 1140-1154.

Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* **4**, 219.

Schiller, D., Rubenhagen, R., Kramer, R. & Morbach, S. (2004). The C-terminal domain of the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* is directly involved in sensing K^+ as an osmotic stimulus. *Biochemistry* **43**, 5583-5591.

Schirmer, T. & Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* **7**, 724-735.

Schleper, C., Puhler, G., Kuhlmorgen, B. & Zillig, W. (1995). Life at extremely low pH. *Nature* **375**, 741-742.

Schniederberend, M., Zimmann, P., Bogdanov, M., Dowhan, W. & Altendorf, K. (2009). Influence of K^+-dependent membrane lipid composition on the expression of the *kdpFABC* operon in *Escherichia coli. Biochim Biophys Acta* **1798**, 32-39.

Scholz, H. C., Hubalek, Z., Nesvadbova, J. & other authors (2008a). Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg Infect Dis* **14**, 1316-1317.

Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedlacek, I. & other authors (2008b). *Brucella microti sp. nov.*, isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 375-382.

Scholz, H. C., Nockler, K., Gollner, C. & other authors (2010). *Brucella inopinata sp. nov.*, isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 801-808.

Schreiber, F., Beutler, M., Enning, D., Lamprecht-Grandio, M., Zafra, O., Gonzalez-Pastor, J. E. & de Beer, D. (2011). The role of nitric-oxide-synthase-derived nitric oxide in multicellular traits of *Bacillus subtilis* 3610: biofilm formation, swarming, and dispersal. *BMC Microbiol* **11**, 111.

Schwan, W. R., Lehmann, L. & McCormick, J. (2006). Transcriptional activation of the *Staphylococcus aureus putP* gene by low-proline-high osmotic conditions and during infection of murine and human tissues. *Infect Immun* **74**, 399-409.

Schwan, W. R. (2009). Survival of uropathogenic *Escherichia coli* in the murine urinary tract is dependent on OmpR. *Microbiology* **155**, 1832-1839.

Schweder, T., Lee, K. H., Lomovskaya, O. & Matin, A. (1996). Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (sigma s) by ClpXP protease. *J Bacteriol* **178**, 470-476.

Seaver, L. C. & Imlay, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli. J Bacteriol* **183**, 7173-7181.

Seok, Y. J., Koo, B. M., Sondej, M. & Peterkofsky, A. (2001). Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 385-393.

Seyfzadeh, M., Keener, J. & Nomura, M. (1993). *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11004-11008.

Sha, Z., Stabel, T. J. & Mayfield, J. E. (1994). *Brucella abortus* catalase is a periplasmic protein lacking a standard signal sequence. *J Bacteriol* **176**, 7375-7377.

Shabala, L., Bowman, J., Brown, J., Ross, T., McMeekin, T. & Shabala, S. (2009). Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotica. *Environ Microbiol* **11**, 137-148.

Shi, R., McDonald, L., Cui, Q., Matte, A., Cygler, M. & Ekiel, I. (2011). Structural and mechanistic insight into covalent substrate binding by *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1302-1307.

Shu, C. J. & Zhulin, I. B. (2002). ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* **27**, 3-5.

Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Romling, U. (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**, 1123-1134.

Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature Biotechology* **1**, 784-791.

Simon R, P. U., Pühler A (1983). A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature Biotechology* **1**, 784-791.

Simonato, F., Campanaro, S., Lauro, F. M., Vezzi, A., D'Angelo, M., Vitulo, N., Valle, G. & Bartlett, D. H. (2006). Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *J Biotechnol* **126**, 11-25.

Singh, A., Wyant, T., Anaya-Bergman, C., Aduse-Opoku, J., Brunner, J., Laine, M. L., Curtis, M. A. & Lewis, J. P. (2011). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect Immun* **79**, 4533-4542.

Sleator, R. D. & Hill, C. (2001). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews* **26**, 49-71.

Sohn, A. H., Probert, W. S., Glaser, C. A., Gupta, N., Bollen, A. W., Wong, J. D., Grace, E. M. & McDonald, W. C. (2003). Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis* **9**, 485-488.

Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grillo, M. J., Moreno, E., Moriyon, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P. & 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**, 125-138.

Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B. & Schmitt, R. (2000). VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *Journal of Bacteriology* **182**, 782-788.

Southey-Pillig, C. J., Davies, D. G. & Sauer, K. (2005). Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**, 8114-8126.

Spira, B., Silberstein, N. & Yagil, E. (1995). Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of Escherichia coli starved for Pi. *J Bacteriol* **177**, 4053-4058.

Stabel, T. J., Sha, Z. & Mayfield, J. E. (1994). Periplasmic location of *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase. *Vet Microbiol* **38**, 307-314.

Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A. & Celli, J. (2008). *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **9**, 678-694.

Steele, K. H., Baumgartner, J. E., Valderas, M. W. & Roop, R. M., 2nd (2010). Comparative study of the roles of AhpC and KatE as respiratory antioxidants in *Brucella abortus* 2308. *J Bacteriol* **192**, 4912-4922.

Stent, G. S. & Brenner, S. (1961). A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**, 2005-2014.

Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* **452**, 22-25.

Stewart, L. M., Bakker, E. P. & Booth, I. R. (1985). Energy coupling to K^+ uptake via the Trk system in *Escherichia coli:* the role of ATP. *J Gen Microbiol* **131**, 77-85.

Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138.

Stewart, P. S. (2003). Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* **185**, 1485-1491.

Stewart, P. S. & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**, 199-210.

Stirling, D. A., Hulton, C. S., Waddell, L., Park, S. F., Stewart, G. S., Booth, I. R. & Higgins, C. F. (1989). Molecular characterization of the *proU* loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betaine transport systems. *Mol Microbiol* **3**, 1025-1038.

Stoenner, H. G. & Lackman, D. B. (1957). A preliminary report on a *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida Thomas*. *J Am Vet Med Assoc* **130**, 411-412.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187-209.

Su, J., Gong, H., Lai, J., Main, A. & Lu, S. (2009). The potassium transporter Trk and external potassium modulate *Salmonella enterica* protein secretion and virulence. *Infect Immun* **77**, 667-675.

Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H. & Breaker, R. R. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**, 411-413.

Sukharev, S. (1999). Mechanosensitive channels in bacteria as membrane tension reporters. *Faseb J* **13 Suppl**, S55-61.

Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F. R. & Kung, C. (1994). A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* **368**, 265-268.

Sumner, J. B. & Howell, S. F. (1936). Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol* **32**, 227-237.

Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3-9.

Swartz, T. E., Tseng, T. S., Frederickson, M. A. & other authors (2007). Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* **317**, 1090-1093.

Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S. & other authors (2002). Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **70**, 3004-3011.

Tanaka, Y., Kimata, K. & Aiba, H. (2000). A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli:* membrane sequestration of a global repressor Mlc. *Embo J* **19**, 5344-5352.

Tartaglia, L. A., Storz, G. & Ames, B. N. (1989). Identification and molecular analysis of *oxyR*-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *J Mol Biol* **210**, 709-719.

Teitzel, G. M. & Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2313-2320.

Teixeira-Gomes, A. P., Cloeckaert, A. & Zygmunt, M. S. (2000). Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity* **68**, 2954-2961.

Tellstrom, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Kuster, H. & Niehaus, K. (2006). The Lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* Suppresses Defense-Associated Gene Expression in Cell Cultures of the Host Plant *Medicago truncatula*. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**, 825-837.

Tempest, D. W., Meers, J. L. & Brown, C. M. (1970). Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools. *J Gen Microbiol* **64**, 171-185.

Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L. F., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4158-4163.

Terwagne, M. (2011). On the regulation of *Brucella melitensis* virulence through flagellin synthesis and self-quorum quenching. Namur, Belgium: FUNDP.

Tkacz, J. S., Cybulska, E. B. & Lampen, J. O. (1971). Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A. *J Bacteriol* **105**, 1-5.

Tomlinson, A. D. & Fuqua, C. (2009). Mechanisms and regulation of polar surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens. Curr Opin Microbiol* **12**, 708-714.

Torres, M. A., Jones, J. D. & Dangl, J. L. (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **37**, 1130-1134.

Toulokhonov, I., Artsimovitch, I. & Landick, R. (2001). Allosteric control of RNA polymerase by a site that contacts nascent RNA hairpins. *Science* **292**, 730-733.

Traxler, M. F., Zacharia, V. M., Marquardt, S., Summers, S. M., Nguyen, H. T., Stark, S. E. & Conway, T. (2011). Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the 'feast to famine' gradient in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **79**, 830-845.

Tropp, B. E. (1997). Cardiolipin synthase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1348**, 192-200.

Tsatskis, Y., Khambati, J., Dobson, M., Bogdanov, M., Dowhan, W. & Wood, J. M. (2005). The osmotic activation of transporter ProP is tuned by both its C-terminal coiled-coil and osmotically induced changes in phospholipid composition. *J Biol Chem* **280**, 41387-41394.

Ugalde, R. (1999). Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect* **1**, 1211-1219.

Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2007). Mutations of the Quorum Sensing-Dependent Regulator VjbR Lead to Drastic Surface Modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol* **189**, 6035-6047.

Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X. & Letesson, J. J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res* **9**, 3200-3217.

Valderas, M. W., Alcantara, R. B., Baumgartner, J. E., Bellaire, B. H., Robertson, G. T., Ng, W. L., Richardson, J. M., Winkler, M. E. & Roop, R. M., 2nd (2005). Role of HdeA in acid resistance and virulence in *Brucella abortus* 2308. *Vet Microbiol* **107**, 307-312.

van der Heide, T. & Poolman, B. (2000). Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7102-7106.

van der Heide, T., Stuart, M. C. & Poolman, B. (2001). On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *Embo J* **20**, 7022-7032.

Vargas, C., Kallimanis, A., Koukkou, A. I., Calderon, M. I., Canovas, D., Iglesias-Guerra, F., Drainas, C., Ventosa, A. & Nieto, J. J. (2005). Contribution of chemical changes in membrane lipids to the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Syst Appl Microbiol* **28**, 571-581.

Velasco, J., Bengoechea, J. A., Brandenburg, K., Lindner, B., Seydel, U., Gonzalez, D., Zahringer, U., Moreno, E. & Moriyon, I. (2000). *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect Immun* **68**, 3210-3218.

Vemulapalli, T. H., Vemulapalli, R., Schurig, G. G., Boyle, S. M. & Sriranganathan, N. (2006). Role in virulence of a *Brucella abortus* protein exhibiting lectin-like activity. *Infect Immun* **74**, 183-191.

Viadas, C., Rodríguez, M. C., Sangari, F. J., Gorvel, J.-P., García-Lobo, J. M. & López-Goñi, I. (2010). Transcriptome Analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS Two-Component Regulatory System. *PLoS ONE* **5**, e10216.

Vida, T. A. & Emr, S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779-792.

Vijaranakul, U., Nadakavukaren, M. J., de Jonge, B. L., Wilkinson, B. J. & Jayaswal, R. K. (1995). Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. *J Bacteriol* **177**, 5116-5121.

Villadsen, I. S. & Michelsen, O. (1977). Regulation of PRPP and nucleoside tri and tetraphosphate pools in *Escherichia coli* under conditions of nitrogen starvation. *J Bacteriol* **130**, 136-143.

Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M. & D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **56**, 958-970.

Voelkner, P., Puppe, W. & Altendorf, K. (1993). Characterization of the KdpD protein, the sensor kinase of the K(+)-translocating Kdp system of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **217**, 1019-1026.

Vogt, S. L., Green, C., Stevens, K. M., Day, B., Erickson, D. L., Woods, D. E. & Storey, D. G. (2011). The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. *Infect Immun* **79**, 4094-4104.

Vogt, S. L. & Raivio, T. L. (2012). Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol Lett* **326**, 2-11.

Walderhaug, M. O., Polarek, J. W., Voelkner, P., Daniel, J. M., Hesse, J. E., Altendorf, K. & Epstein, W. (1992). KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J Bacteriol* **174**, 2152-2159.

Waldminghaus, T., Fippinger, A., Alfsmann, J. & Narberhaus, F. (2005). RNA thermometers are common in alpha- and gamma-proteobacteria. *Biol Chem* **386**, 1279-1286.

Waldminghaus, T., Heidrich, N., Brantl, S. & Narberhaus, F. (2007). FourU: a novel type of RNA thermometer in Salmonella. *Mol Microbiol* **65**, 413-424.

Wang, C., Kemp, J., Da Fonseca, I. O., Equi, R. C., Sheng, X., Charles, T. C. & Sobral, B. W. S. (2010). *Sinorhizobium meliloti* 1021 Loss-of-Function Deletion Mutation in *chvI* and Its Phenotypic Characteristics. *MPMI* **23**, 153-160.

Wang, L. C., Morgan, L. K., Godakumbura, P., Kenney, L. J. & Anand, G. S. (2012). The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm. *Embo J* **31**, 2648-2659.

Wang, X. & Zhao, X. (2009). Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1395-1402.

Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K. & Shirahata, T. (2002). Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**, 341-355.

Watarai, M. (2004). Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains. *Microbes Infect* **6**, 93-100.

Watnick, P. I. & Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae El Tor* biofilm. *Mol Microbiol* **34**, 586-595.

Weber, A. & Jung, K. (2002). Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA macroarrays. *J Bacteriol* **184**, 5502-5507.

Weeks, J. N., Galindo, C. L., Drake, K. L., Adams, G. L., Garner, H. R. & Ficht, T. A. (2010). *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiology* **10**, 167.

Wegener, C., Tebbe, S., Steinhoff, H. J. & Jung, H. (2000). Spin labeling analysis of structure and dynamics of the Na(+)/proline transporter of *Escherichia coli. Biochemistry* **39**, 4831-4837.

Wells, D., Chen, E., Fisher, R. & Long, S. (2007). ExoR is genetically coupled to the ExoS-ChvI two-component system and located in the periplasm of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **64**, 647-664.

Wells, D. H. & Long, S. R. (2002). The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affects multiple aspects of symbiosis. *Mol Microbiol* **43**, 1115-1127.

Wen, Y., Feng, J., Scott, D. R., Marcus, E. A. & Sachs, G. (2007). The *HP0165-HP0166* two-component system (ArsRS) regulates acid-induced expression of *HP1186* alpha-carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori* by activating the pH-dependent promoter. *J Bacteriol* **189**, 2426-2434.

West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C. & other authors (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* **472**, 476-480.

Whatmore, A. M., Dawson, C. E., Groussaud, P., Koylass, M. S., King, A. C., Shankster, S. J., Sohn, A. H., Probert, W. S. & McDonald, W. L. (2008). Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection. *Emerging Infect Dis* **14**, 517-518.

White, D. G., Goldman, J. D., Demple, B. & Levy, S. B. (1997). Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS,* or *robA* in *Escherichia coli. J Bacteriol* **179**, 6122-6126.

Wilksch, J. J., Yang, J., Clements, A. & other authors (2011). MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog* **7**, e1002204.

Williams, A. E., Keppie, J. & Smith, H. (1962). The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. III. Foetal erythritol a cause of the localisation of *Brucella abortus* in pregnant cows. *Br J Exp Pathol* **43**, 530-537.

Winkler, W. C., Cohen-Chalamish, S. & Breaker, R. R. (2002). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15908-15913.

Winkler, W. C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J. E. & Breaker, R. R. (2003). An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat Struct Biol* **10**, 701-707.

Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A. & Breaker, R. R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**, 281-286.

Wolfe, A. J., Parikh, N., Lima, B. P. & Zemaitaitis, B. (2008). Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR. *J Bacteriol* **190**, 2314-2322.

Wood, J. M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 230-262.

Wood, J. M., Culham, D. E., Hillar, A., Vernikovska, Y. I., Liu, F., Boggs, J. M. & Keates, R. A. (2005). A structural model for the osmosensor, transporter, and osmoregulator ProP of *Escherichia coli. Biochemistry* **44**, 5634-5646.

Wood, J. M. (2006). Osmosensing by Bacteria. *Science's STKE* **2006**, pe43.

Wood, J. M. (2007). Bacterial osmosensing transporters. *Methods Enzymol* **428**, 77-107.

Wu, Q., Pei, J., Turse, C. & Ficht, T. A. (2006). Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. *BMC Microbiology* **6**, 102.

Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G. & Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* **266**, 5980-5990.

Yamanaka, K., Mitta, M. & Inouye, M. (1999). Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock *cspA* mRNA of *Escherichia coli. J Bacteriol* **181**, 6284-6291.

Yanagi, M. & Yamasato, K. (1993). Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett* **107**, 115-120.

Yanez-Villanueva, R.-M. (2009). Caractérisation du système à deux composants PrlS et PrlR de *Brucella melitensis*. Namur, Belgium: FUNDP.

Yao, S. Y., Luo, L., Har, K. J., Becker, A., Ruberg, S., Yu, G. Q., Zhu, J. B. & Cheng, H. P. (2004). *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *J Bacteriol* **186**, 6042-6049.

Yeung, A. T., Torfs, E. C., Jamshidi, F., Bains, M., Wiegand, I., Hancock, R. E. & Overhage, J. (2009). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol* **191**, 5592-5602.

Yildiz, F. H. & Schoolnik, G. K. (1999). *Vibrio cholerae* O1 *El Tor*: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4028-4033.

York, G. M. & Walker, G. C. (1997). The *Rhizobium meliloti exoK* gene and *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. *Mol Microbiol* **25**, 117-134.

York, G. M. & Walker, G. C. (1998a). The succinyl and acetyl modifications of succinoglycan influence susceptibility of succinoglycan to cleavage by the *Rhizobium meliloti* glycanases ExoK and ExsH. *J Bacteriol* **180**, 4184-4191.

York, G. M. & Walker, G. C. (1998b). The *Rhizobium meliloti* ExoK and ExsH glycanases specifically depolymerize nascent succinoglycan chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4912-4917.

Zanotti, G. & Cendron, L. (2010). Functional and structural aspects of *Helicobacter pylori* acidic stress response factors. *IUBMB Life* **62**, 715-723.

Zhan, H. J., Levery, S. B., Lee, C. C. & Leigh, J. A. (1989). A second exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain SU47 that can function in root nodule invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 3055-3059.

Zhan, H. J., Lee, C. C. & Leigh, J. A. (1991). Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J Bacteriol* **173**, 7391-7394.

Zhang, L. & Mah, T. F. (2008). Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol* **190**, 4447-4452.

Zhang, X., Ren, J., Li, N., Liu, W. & Wu, Q. (2009). Disruption of the *BMEI0066* gene attenuates the virulence of *Brucella melitensis* and decreases its stress tolerance. *Int J Biol Sci* **5**, 570-577.

Zhao, G., Weatherspoon, N., Kong, W., Curtiss, R., 3rd & Shi, Y. (2008). A dual-signal regulatory circuit activates transcription of a set of divergent operons in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20924-20929.

Zheng, M., Aslund, F. & Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**, 1718-1721.

Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D. & Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* **181**, 4639-4643.

Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A. & Storz, G. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**, 4562-4570.

Zoha, S. J. & Carmichael, L. E. (1981). Properties of *Brucella canis* surface antigens associated with colonial mucoidiness. *Cornell Vet* **71**, 428-438.

Zygmunt, M. S., Maquart, M., Bernardet, N., Doublet, B. & Cloeckaert, A. (2010). Novel IS711-Specific Chromosomal Locations Useful for Identification and Classification of Marine Mammal *Brucella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 3765-3769.