

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**Étude de la régulation des systèmes de communication
intercellulaire chez la bactérie *Burkholderia thailandensis***

Par

Servane Le Guillouzer

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr. Charles Dozois (INRS-IAF)
Examineur externe	Dr. Louis-Charles Fortier (U. de Sherbrooke)
Examineur externe	Dr. Denis Faure (U. Paris-Saclay)
Directeur de recherche	Dr. Éric Déziel (INRS-IAF)

RÉSUMÉ

Les bactéries pathogènes s'adaptent aux variations des conditions environnementales auxquelles elles sont confrontées, en particulier, au cours du processus d'infection de l'hôte. La transition d'un mode de vie saprophyte à un cycle infectieux s'accompagne d'un remaniement spatio-temporel important des profils de transcription. Une question centrale est de comprendre comment la transcription est coordonnée au niveau du génome. Chez certaines bactéries, la modulation de la transcription du génome est corrélée aux fluctuations de la densité bactérienne *via* un système de communication intercellulaire, appelé *quorum sensing*. Les bactéries produisent des molécules de signalisation qui s'accumulent dans l'environnement au fur et à mesure de la croissance bactérienne. Ces signaux moléculaires, perceptibles par les bactéries d'une même population, fournissent une indication sur la densité cellulaire et déclenchent, dans toute la population, des cascades de régulation de l'expression des gènes permettant de synchroniser les activités bactériennes. Le *quorum sensing* intervient dans la modulation de nombreux processus cellulaires parmi lesquels figurent notamment la bioluminescence, la mobilité bactérienne, la compétence génétique, la sporulation, la conjugaison bactérienne, la biosynthèse d'antibiotiques ou encore le développement du biofilm. En outre, la communication intercellulaire joue un rôle crucial dans la régulation de la virulence bactérienne. En conséquence, la connaissance des mécanismes moléculaires du *quorum sensing* offre l'opportunité de développer de nouvelles approches thérapeutiques qui seraient anti-pathogénicité et qui permettraient, en théorie, de minimiser le phénomène de multirésistance associé à l'antibiothérapie actuelle. La thèse présentée ici porte sur la caractérisation des mécanismes de régulation des multiples systèmes de *quorum sensing* qui coexistent chez la bactérie *Burkholderia thailandensis*. *B. thailandensis* est considérée comme la version avirulente de *Burkholderia pseudomallei*, un agent pathogène humain hautement infectieux, et est donc couramment utilisée comme modèle de substitution. Les première et deuxième parties de cette thèse se concentrent sur l'établissement des interactions entre les systèmes de *quorum sensing* BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3, ainsi que sur l'étude du rôle des protéines régulatrices de type RsaM, nommées RsaM1 et RsaM2, dans la modulation de la biosynthèse des molécules de signalisation, appelées *N*-acyl-L-homosérine lactones (AHL). Les troisième et quatrième parties de cette thèse se concentrent sur l'élucidation des mécanismes de régulation de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* et de la production des molécules de signalisation putatives, nommées 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ), sur l'analyse fonctionnelle du système de *quorum sensing* hypothétique *hmq* et, enfin, sur l'approfondissement de la fonction du régulateur transcriptionnel de type LysR, appelé ScmR (*secondary metabolite regulator*), dans la modulation de l'expression génique *via* le *quorum sensing*.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les professeurs Charles Dozois, Louis-Charles Fortier et Denis Faure. Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Et merci également à Charles Dozois et à Louis-Charles Fortier pour toute l'aide que vous m'avez apportée au cours des différentes étapes de cette thèse, du début jusqu'à la fin !

Je tiens plus particulièrement à remercier mon directeur de thèse, le professeur Éric Déziel. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir accordée cette chance de pouvoir faire une thèse, je vous suis extrêmement reconnaissante, merci de m'avoir fait confiance ! Et merci de votre disponibilité, votre encadrement, votre patience, votre gentillesse et votre bienveillance ! J'ai vécu grâce à vous une expérience exceptionnelle que je n'oublierai jamais !

Un grand merci aux membres du laboratoire, j'ai passé de merveilleuses années avec vous, j'ai vraiment adoré l'ambiance ! Une très belle équipe ! Merci à Fabrice, Sophie, Audrey-Anne, Adeline, May, Pauline, Anissa, Arvin, Sarah, Ghizlane, Fadi, Soumaya, Laure, Germàn, Audrey, Benjamin, Thays, Nejia, Charles, Alison, Snizhana, Xavier, Ahmad, Annelise, Elyna, Marianne, Justine, Margaux, Juliet, Koyomi et François. Je tiens tout spécialement à remercier Carlos, merci surtout pour ton humour, j'ai tellement ri avec toi, tu m'as si souvent donné le sourire et tu as toujours été là pour moi !

Et évidemment un gros merci à Marie-Christine, je te dois énormément ! Tu as tellement contribué dans cette thèse, j'ai eu vraiment beaucoup de plaisir à travailler avec toi ! Merci pour ta sympathie, ta bonne humeur et ta générosité ! J'ai toujours pu compter sur toi et je ne l'oublierai pas. Merci également à Sylvain pour toute l'aide que tu as pu m'apporter dans mes analyses LC-MS/MS et merci à Florian pour les données RNA-Seq !

Je tiens également à remercier mes ami(e)s, Eleanor, Michaël, Cynthia, Amira, Daphnée, Dominic, Tamara, Alexia et Maryanne. Que dire de toutes ces années de folie que j'ai passées avec vous, vous figurez définitivement parmi les plus belles rencontres que j'ai faites ici ! Je remercie également Danny de m'avoir soutenue dans les bons comme dans les mauvais moments et merci tout simplement d'avoir été présent. Un merci très spécial à Stéphanie et à Clarisse, mes amies de toujours, merci d'être dans ma vie ! Je remercie également ma petite famille préférée, Céline, Guillaume, Lou et Gabrielle.

Enfin, je voudrais remercier ma mère, Marjo, mon père, Yann, et ma petite sœur, Anaëlle. Merci pour tout le soutien que vous m'avez apporté du début jusqu'à la fin, je pense que sans vous je n'y serai pas arrivée, c'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui, et, surtout, merci d'avoir toujours cru en moi. Un gros merci aussi à ma belle-mère, Christine, et à mon beau-père, Patrick. Et merci également à mon cher grand-père, opa.

*Aan mijn oma, Antje Ritmeester &
à ma grand-mère, Marie-Françoise Saint-Jalme*

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	III
TABLES DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX	XVII
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	XIX

1. INTRODUCTION	1
1.1. La communication intercellulaire bactérienne	1
1.1.1. Le <i>quorum sensing</i> est un mécanisme de régulation globale de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire	1
1.1.2. Le <i>quorum sensing</i> chez les bactéries à Gram positif : oligopeptides et systèmes de régulation à deux composants	3
1.1.3. Le <i>quorum sensing</i> implique communément des systèmes de régulation homologues au système LuxI/LuxR chez les bactéries à Gram négatif	4
1.1.3.1. Les systèmes de <i>quorum sensing</i> de type LuxI/LuxR utilisent des auto-inducteurs appartenant à la famille des AHL	5
1.1.3.2. Les synthases de type LuxI sont responsables de la production des AHL	8
1.1.3.3. Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR modulent l'expression des gènes cibles du <i>quorum sensing</i>	9
1.2. La communication intercellulaire chez la bactérie <i>P. aeruginosa</i>	13
1.2.1. <i>P. aeruginosa</i> est un pathogène opportuniste de l'Homme	13
1.2.2. La pathogénicité de <i>P. aeruginosa</i> est multifactorielle	13
1.2.3. Le <i>quorum sensing</i> joue un rôle déterminant dans la pathogénicité de <i>P. aeruginosa</i>	15
1.2.3.1. Les AHL sont les auto-inducteurs des systèmes <i>las</i> et <i>rhl</i>	16
1.2.3.1.1. Le système <i>las</i>	17
1.2.3.1.2. Le système <i>rhl</i>	19
1.2.3.1.3. Les systèmes <i>las</i> et <i>rhl</i> sont interdépendants	19
1.2.3.1.4. Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR orphelins QscR et VqsR	20
1.2.3.2. Le système <i>pqs</i> emploie des auto-inducteurs de la famille des HAQ	21
1.2.3.2.1. Le HHQ et le PQS sont les principaux auto-inducteurs du système <i>pqs</i>	21
1.2.3.2.2. Les HAQ dérivent de l'acide anthranilique	23
1.2.3.2.3. L'opéron <i>pqsABCDE</i> code les principales enzymes nécessaires à la biosynthèse des différentes HAQ identifiées chez <i>P. aeruginosa</i>	25
1.2.3.2.4. Le régulateur transcriptionnel MvfR contrôle positivement et directement l'expression de l'opéron <i>pqsABCDE</i> en association avec le HHQ ou le PQS	27
1.2.3.2.5. L'expression des gènes de virulence cibles du système <i>pqs</i> est sous le contrôle de la protéine PqsE	29
1.2.3.3. Les systèmes <i>las</i> , <i>rhl</i> et <i>pqs</i> de <i>P. aeruginosa</i> agissent de façon concertée via un réseau de régulation hiérarchisé	30
1.3. La communication intercellulaire chez les espèces bactériennes appartenant au genre <i>Burkholderia</i>	31
1.3.1. Le genre <i>Burkholderia</i>	31
1.3.2. Les espèces bactériennes du genre <i>Burkholderia</i> possèdent de multiples systèmes de <i>quorum sensing</i> qui utilisent des auto-inducteurs appartenant à la famille des AHL	32
1.3.2.1. Le <i>quorum sensing</i> au sein des membres du groupe <i>Pbe</i>	32
1.3.2.1.1. La 3OC ₁₂ -HSL est le principal auto-inducteur du système de <i>quorum sensing</i> BraI/BraR chez <i>B. kururiensis</i>	33

1.3.2.1.2. La protéine RsaL est un important répresseur de la biosynthèse de la 3OC ₁₂ -HSL chez <i>B. kururiensis</i>	34
1.3.2.2. Le <i>quorum sensing</i> au sein des membres du complexe <i>Bcc</i>	35
1.3.2.2.1. La C ₈ -HSL est le principal auto-inducteur du système CepI/CepR chez les bactéries appartenant au complexe <i>Bcc</i>	36
1.3.2.2.2. La protéine RsaM est un important répresseur de la biosynthèse de la C ₈ -HSL chez les bactéries appartenant au complexe <i>Bcc</i>	36
1.3.2.3. Le <i>quorum sensing</i> au sein des membres du groupe <i>Bptm</i>	39
1.3.2.3.1. Les membres du groupe <i>Bptm</i> sont génétiquement, physiologiquement et biochimiquement similaires mais présentent des modes de vie divergents	39
1.3.2.3.1.1. Les génomes de <i>B. thailandensis</i> , de <i>B. pseudomallei</i> et de <i>B. mallei</i> sont hautement conservés	39
1.3.2.3.1.2. Les différents styles de vie de <i>B. thailandensis</i> , de <i>B. pseudomallei</i> et de <i>B. mallei</i>	41
1.3.2.3.1.3. La pathogénicité de <i>B. pseudomallei</i> et de <i>B. mallei</i> est multifactorielle	42
1.3.2.3.1.4. <i>B. pseudomallei</i> et <i>B. mallei</i> : des armes biologiques potentielles	43
1.3.2.3.1.5. <i>B. thailandensis</i> : un modèle de substitution pour l'étude de <i>B. pseudomallei</i> et de <i>B. mallei</i>	43
1.3.2.3.2. Les systèmes de <i>quorum sensing</i> parmi les espèces bactériennes <i>B. thailandensis</i> , <i>B. pseudomallei</i> et <i>B. mallei</i>	44
1.3.2.3.2.1. Les systèmes de <i>quorum sensing</i> présents chez les membres du groupe <i>Bptm</i> emploient des auto-inducteurs de la famille des AHL	46
1.3.2.3.2.2. Les systèmes de <i>quorum sensing</i> présents chez les membres du groupe <i>Bptm</i> interviennent dans la pathogénicité bactérienne	53
1.3.2.3.3. Les systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1	53
1.3.2.3.3.1. Les systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1 sont homologues	53
1.3.2.3.3.2. La C ₈ -HSL est le principal auto-inducteur des systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1	55
1.3.2.3.3.4. Le système BtaI1/BtaR1 influence l'auto-agrégation bactérienne, le développement du biofilm, la production d'exopolysaccharides, l'inhibition de croissance contact-dépendant et la biosynthèse de l'acide oxalique	59
1.3.2.3.3.5. Les systèmes BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1 jouent un rôle dans la virulence bactérienne	62
1.3.2.3.4. Les systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2	63
1.3.2.3.4.1. Les systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2 sont homologues	63
1.3.2.3.4.2. La 3OHC ₁₀ -HSL est le principal auto-inducteur des systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2	64
1.3.2.3.4.3. Le système BtaI2/BtaR2 contrôle la biosynthèse d'antibiotiques de la famille des bactobolines	68
1.3.2.3.5. Les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3	71
1.3.2.3.5.1. Les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 sont homologues	71
1.3.2.3.5.2. La 3OHC ₈ -HSL est le principal auto-inducteur des systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3	72
1.3.2.3.5.3. Les systèmes BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 jouent un rôle dans la virulence bactérienne	75
1.3.2.3.6. Les systèmes de <i>quorum sensing</i> sont interdépendants au sein des membres du groupe <i>Bptm</i>	76
1.3.2.3.5.1. Interactions entre les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3	76
1.3.2.3.5.2. Interactions entre les systèmes BpsI/BpsR, BpsI2/BpsR2 et BpsI3/BpsR3	77
1.3.2.3.5.3. Interactions entre les systèmes BmaI1/BmaR1 et BmaI3/BmaR3	79
1.3.2.3.7. Les régulateurs transcriptionnels orphelins parmi les espèces bactériennes <i>B. thailandensis</i> , <i>B. pseudomallei</i> et <i>B. mallei</i>	79
1.3.2.3.8. Les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4, BpsR4 et BmaR4	81
1.3.2.3.8.1. BtaR4, BpsR4 et BmaR4 sont homologues	81

1.3.2.3.8.2.	<i>BtaR4</i> contrôle positivement et directement l'expression des gènes mal codant les enzymes responsables de la production de la malléilactone	83
1.3.2.3.9.	Les régulateurs transcriptionnels orphelins <i>BtaR5</i> , <i>BpsR5</i> et <i>BmaR5</i>	86
1.3.2.3.9.1.	<i>BtaR5</i> , <i>BpsR5</i> et <i>BmaR5</i> sont homologues	86
1.3.2.3.9.2.	<i>BtaR5</i> n'affecte pas les systèmes <i>BtaI1/BtaR1</i> , <i>BtaI2/BtaR2</i> et <i>BtaI3/BtaR3</i>	88
1.3.2.3.9.3.	<i>BpsR5</i> et <i>BmaR5</i> jouent un rôle dans la virulence bactérienne	88
1.3.3.	Les espèces bactériennes du genre <i>Burkholderia</i> produisent des molécules de signalisation putatives appartenant à la famille des HAQ via le système de <i>quorum sensing</i> hypothétique <i>hmq</i>	89
1.3.3.1.	Le système <i>hmq</i> utilise des signaux moléculaires putatifs structurellement analogues aux HAQ spécifiques de <i>P. aeruginosa</i>	89
1.3.3.1.1.	Identification de HMAQ parmi les membres du groupe <i>Bptm</i>	91
1.3.3.1.2.	Identification de HMAQ parmi les membres du complexe <i>Bcc</i>	92
1.3.3.2.	L'acide anthranilique est le précurseur des HMAQ	93
1.3.3.2.1.	Implication des voies métaboliques des anthranilate synthases PhnAB et TrpEG	95
1.3.3.2.2.	Implication de la voie métabolique de la kynurénine KynABU	95
1.3.3.2.3.	Le 6-FABA : un inhibiteur compétitif de l'acide anthranilique	96
1.3.3.3.	L'opéron <i>hmqABCDEFG</i> codant les principales protéines responsables de la biosynthèse des HMAQ est homologue à l'opéron <i>pqsABCDE</i> de <i>P. aeruginosa</i>	96
1.3.3.4.	Aucun homologue du gène <i>mvfR</i> codant le régulateur transcriptionnel MvfR n'est présent à proximité de l'opéron <i>hmqABCDEFG</i>	99
1.3.3.5.	L'expression de l'opéron <i>hmqABCDEFG</i> n'est pas sous le contrôle des HMAQ	101
1.3.3.6.	Lien entre le système <i>hmq</i> et les AHL au sein des membres du groupe <i>Bptm</i>	102
1.3.3.6.1.	Les AHL affectent la transcription de l'opéron <i>hmqABCDEFG</i>	102
1.3.3.6.2.	Le système <i>hmq</i> n'affecte pas la production des AHL	102
1.3.3.7.	Lien entre le système <i>hmq</i> et les AHL au sein des membres du complexe <i>Bcc</i>	102
1.3.3.7.1.	<i>B. ambifaria</i> possède deux systèmes de <i>quorum sensing</i> de type LuxI/LuxR	102
1.3.3.7.2.	Les AHL stimulent la transcription de l'opéron <i>hmqABCDEFG</i> ainsi que la production des HMAQ chez <i>B. ambifaria</i>	104
1.3.3.7.3.	Le système <i>hmq</i> réprime la production des AHL chez <i>B. ambifaria</i>	104
1.3.3.8.	Le système <i>hmq</i> contrôle des processus cellulaires potentiellement impliqués dans les associations hôte-pathogène chez les bactéries du genre <i>Burkholderia</i>	105
2.	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	107
2.1.	Hypothèse	107
2.2.	Objectifs	107
2.2.1.	Objectif général	107
2.2.2.	Objectifs spécifiques	107
3.	ARTICLES	108
3.1.	Présentation de l'article « The complex quorum sensing circuitry of <i>Burkholderia thailandensis</i> is both hierarchically and homeostatically organized »	108
3.1.1.	Abstract	109
3.1.2.	Importance	109
3.1.3.	Introduction	110
3.1.4.	Materials and methods	112
3.1.4.1.	Bacterial strains and culture conditions	112
3.1.4.2.	Construction of plasmids	113
3.1.4.3.	Construction of reporter strains	114
3.1.4.4.	LC-MS/MS quantification of AHLs	115
3.1.4.5.	Measurement of the activity of <i>btaI1-lux</i> , <i>btaI2-lux</i> , and <i>btaI3-lux</i> reporters	115
3.1.4.6.	Heterologous <i>E. coli</i> expression system for <i>BtaR2</i> regulation of <i>btaI2</i> expression	115
3.1.4.7.	Quantitative reverse transcription-PCR experiments	116
3.1.4.8.	Data analysis	117

3.1.5.	Results	117
3.1.5.1.	The <i>B. thailandensis</i> QS-1, QS-2, and QS-3 systems are successively activated	117
3.1.5.2.	The QS-1, QS-2, and QS-3 systems act in a coordinated way to finely modulate the synthesis of AHLs	119
3.1.5.3.	The <i>btaR1</i> , <i>btaR2</i> , and <i>btaR3</i> genes are QS-controlled	126
3.1.5.4.	The levels of expression of <i>btaI1</i> , <i>btaI2</i> , and <i>btaI3</i> are modulated by cognate and noncognate AHLs	127
3.1.6.	Discussion	133
3.1.7.	Conclusion	140
3.1.8.	Funding information	141
3.1.9.	Acknowledgments	141
3.1.10.	Présentation des résultats additionnels de l'article « The complex quorum sensing circuitry of <i>Burkholderia thailandensis</i> is both hierarchically and homeostatically organized »	141
3.1.10.1.	Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 n'affectent pas la croissance bactérienne	141
3.1.10.2.	Détermination de l'impact des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 sur la transcription du gène de référence <i>ndh</i>	142
3.1.10.3.	Les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 sont exclusivement responsables de la biosynthèse de la C ₈ -HSL, de la 3OHC ₁₀ -HSL et de la 3OHC ₈ -HSL	144
3.1.10.4.	Confirmation de l'effet des régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3 sur la production de la C ₈ -HSL, de la 3OHC ₁₀ -HSL et de la 3OHC ₈ -HSL	146
3.1.10.4.1.	Complémentation de la biosynthèse des AHL via l'utilisation des vecteurs d'expression constitutive des gènes <i>btaR1</i> , <i>btaR2</i> et <i>btaR3</i>	146
3.1.10.4.1.1.	Analyse de l'impact du régulateur transcriptionnel BtaR1 sur les concentrations en AHL lors de l'utilisation du plasmide <i>pME6000-btaR1</i>	147
3.1.10.4.1.2.	Analyse de l'impact du régulateur transcriptionnel BtaR2 sur les concentrations en AHL lors de l'utilisation du plasmide <i>pME6000-btaR2</i>	149
3.1.10.4.1.3.	Analyse de l'impact du régulateur transcriptionnel BtaR3 sur les concentrations en AHL lors de l'utilisation du plasmide <i>pME6000-btaR3</i>	151
3.1.10.4.2.	Comparaison de la biosynthèse des AHL chez les mutants transpositionnels <i>btaR1</i> -, <i>btaR2</i> - et <i>btaR3</i> - et chez les mutants délétionnels Δ <i>btaR1</i> , Δ <i>btaR2</i> et Δ <i>btaR3</i>	152
3.1.10.5.	Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 s'expriment de manière successive au cours de la croissance bactérienne	155
3.1.10.6.	Approfondissement du mécanisme de régulation du système BtaI1/BtaR1	156
3.1.10.6.1.	La transcription du gène <i>btaI1</i> est stimulée par le régulateur transcriptionnel BtaR1 à partir de la phase exponentielle et le régulateur transcriptionnel BtaR3 active l'expression du gène <i>btaI1</i> à partir de la phase stationnaire	156
3.1.10.6.2.	La C ₈ -HSL, la 3OHC ₁₀ -HSL et la 3OHC ₈ -HSL stimulent l'expression du gène <i>btaI1</i> au cours des différentes phases de la croissance bactérienne	158
3.1.10.7.	Approfondissement du mécanisme de régulation du système BtaI2/BtaR2	162
3.1.10.7.1.	La C ₈ -HSL, la 3OHC ₁₀ -HSL et la 3OHC ₈ -HSL stimulent l'expression du gène <i>btaI2</i> au cours des différentes phases de la croissance bactérienne	162
3.1.10.7.2.	Le régulateur transcriptionnel BtaR2 contrôle l'expression du gène <i>btaI2</i>	162
3.1.10.7.3.	L'expression des gènes <i>btaI2</i> et <i>btaR2</i> n'est pas sous le contrôle des régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3	163
3.1.10.8.	Approfondissement du mécanisme de régulation du système BtaI3/BtaR3	165
3.1.10.9.	Les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BtaR5 n'interviennent pas dans la modulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3	168
3.2.	Présentation de l'article « Two <i>rsaM</i> homologues encode central regulatory elements modulating quorum sensing in <i>Burkholderia thailandensis</i> »	171
3.2.1.	Abstract	172
3.2.2.	Importance	172
3.2.3.	Introduction	173

3.2.4.	Materials and methods	175
3.2.4.1.	Bacterial strains and culture conditions	175
3.2.4.2.	Construction of plasmids	176
3.2.4.3.	Construction of recombinant strains	177
3.2.4.4.	Construction of reporter strains	178
3.2.4.5.	LC-MS/MS quantification of AHLs	178
3.2.4.6.	Measurement of the activity of <i>btaI1-lux</i> , <i>btaI2-lux</i> , and <i>btaI3-lux</i> reporters	178
3.2.4.7.	Quantitative reverse transcription-PCR and reverse transcription-PCR experiments	179
3.2.4.8.	Data analysis	180
3.2.5.	Results	180
3.2.5.1.	The QS-1 and QS-2 gene clusters of <i>B. thailandensis</i> each carry an <i>rsaM</i> homologue	180
3.2.5.2.	RsaM1 mainly represses the QS-1 system and RsaM2 principally represses the QS-2 system	185
3.2.5.3.	RsaM1 negatively regulates the <i>btaR1</i> gene transcription but the transcription of the <i>btaR2</i> gene is not modulated by RsaM2	194
3.2.5.4.	The <i>rsaM1</i> and <i>rsaM2</i> genes are QS-controlled	196
3.2.5.5.	<i>rsaM1</i> and <i>rsaM2</i> are negatively autoregulated	200
3.2.6.	Discussion	201
3.2.7.	Conclusion	209
3.2.8.	Funding information	209
3.2.9.	Acknowledgments	209
3.2.10.	Présentation des résultats additionnels de l'article « Two <i>rsaM</i> homologues encode central regulatory elements modulating quorum sensing in <i>Burkholderia thailandensis</i> »	210
3.2.10.1.	Détermination de l'impact des protéines RsaM1 et RsaM2 sur la transcription du gène de référence <i>ndh</i>	210
3.2.10.2.	Détermination de l'effet des synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 sur la production de la C ₈ -HSL, de la 3OHC ₁₀ -HSL et de la 3OHC ₈ -HSL	211
3.2.10.2.1.	La synthase BtaI1 synthétise essentiellement de la C ₈ -HSL	211
3.2.10.2.2.	La synthase BtaI2 synthétise essentiellement de la 3OHC ₁₀ -HSL	212
3.2.10.2.3.	La synthase BtaI3 synthétise essentiellement de la 3OHC ₈ -HSL	214
3.3.	Présentation de l'article « The putative 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinoline signaling system in <i>Burkholderia thailandensis</i> modulates <i>N</i>-acyl-L-homoserine lactones biosynthesis, interspecies interactions, and virulence »	217
3.3.1.	Abstract	218
3.3.2.	Introduction	218
3.3.3.	Materials and methods	221
3.3.3.1.	Bacterial strains and culture conditions	221
3.3.3.2.	Construction of plasmids	223
3.3.3.3.	Construction of reporter strains	225
3.3.3.4.	Construction of recombinant strains	226
3.3.3.5.	Transposon mutagenesis and identification of the transposon insertion sites	226
3.3.3.6.	Quantitative reverse transcription-PCR experiments	226
3.3.3.7.	LC-MS/MS quantification of HMAQs, HAQs, and AHLs	227
3.3.3.8.	HMAQs and HAQs purification	228
3.3.3.9.	Measurement of the activity of <i>btaI1-lux</i> , <i>btaI2-lux</i> , <i>btaI3-lux</i> , and <i>hmqA-lux</i> reporters	228
3.3.3.10.	Preparation of total culture extracts	229
3.3.3.11.	Quantification of the activity of <i>hmqA-lacZ</i> and <i>pqsA-lacZ</i> reporters	229
3.3.3.12.	Phenotypic assays	229
3.3.3.13.	Infection of <i>D. melanogaster</i>	230
3.3.3.14.	Data analysis	230
3.3.4.	Results	231
3.3.4.1.	Expression of the <i>hmqABCDEFG</i> operon and HMAQs biosynthesis are repressed by AHL-mediated QS systems	231

3.3.4.2.	The HMAQ system activates AHLs biosynthesis but not the transcription of the AHL synthase-coding genes	234
3.3.4.3.	The LysR-type transcriptional regulator ScmR stimulates expression of the <i>hmqABCDEFG</i> operon and HMAQs biosynthesis	241
3.3.4.4.	HMAQs do not influence the <i>hmqABCDEFG</i> operon transcription	243
3.3.4.5.	HMAQs can act as signaling molecules in interspecies communication	248
3.3.4.6.	The HMAQ system influences colony morphology, biofilm and pellicle formation, swimming motility, siderophores production, and virulence in the fruit fly model <i>Drosophila melanogaster</i>	250
3.3.5.	Discussion	255
3.3.6.	Funding information	259
3.3.7.	Acknowledgments	259
3.3.8.	Présentation des résultats additionnels de l'article « The putative 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinoline signaling system in <i>Burkholderia thailandensis</i> modulates <i>N</i> -acyl-L-homoserine lactones biosynthesis, interspecies interactions, and virulence »	259
3.3.8.1.	Détermination de l'impact du système <i>hmq</i> sur la transcription du gène de référence <i>ndh</i>	259
3.3.8.2.	Les protéines RsaM1 et RsaM2 n'affectent pas le système <i>hmq</i>	260
3.3.8.3.	Étude de la fonction de la protéine HmqE	262
3.3.8.4.	Comparaison de la biosynthèse des HMAQ et de l'expression de l'opéron <i>hmqABCDEFG</i> parmi des souches cliniques et environnementales de <i>B. ambifaria</i>	265
3.3.8.5.	La bactérie <i>Burkholderia pyrrocinia</i> est capable de synthétiser des HMAQ	269
3.4.	Présentation de l'article « ScmR, a global regulator of gene expression, quorum sensing, pH homeostasis, and virulence in <i>Burkholderia thailandensis</i> »	273
3.4.1.	Abstract	274
3.4.2.	Introduction	274
3.4.3.	Materials and methods	277
3.4.3.1.	Bacterial strains and culture conditions	277
3.4.3.2.	Construction of plasmids	278
3.4.3.3.	Construction of reporter strains	279
3.4.3.4.	RNA isolation	279
3.4.3.5.	RNA-Seq libraries construction and sequencing	280
3.4.3.6.	RNA-Seq mapping and analyses	280
3.4.3.7.	Measurement of the activity of <i>btaI1-lux</i> , <i>btaI2-lux</i> , <i>btaI3-lux</i> , <i>hmqA-lux</i> , and <i>scmR-lux</i> reporters	281
3.4.3.8.	LC-MS/MS quantification of HMAQs and AHLs	281
3.4.3.9.	Quantitative reverse transcription-PCR and reverse transcription-PCR experiments	281
3.4.3.10.	Infection of <i>D. melanogaster</i>	282
3.4.3.11.	Data analysis	283
3.4.4.	Results	283
3.4.4.1.	The ScmR regulon comprises many QS-controlled genes	283
3.4.4.2.	ScmR modulates AHLs biosynthesis but not the transcription of the AHL synthase-coding genes	286
3.4.4.3.	ScmR contributes to pH homeostasis	290
3.4.4.4.	The <i>scmR</i> gene is QS-controlled	296
3.4.4.5.	<i>scmR</i> is negatively autoregulated	300
3.4.4.6.	ScmR represses virulence in the fruit fly model <i>D. melanogaster</i>	303
3.4.5.	Discussion	303
3.4.6.	Funding information	306
3.4.7.	Acknowledgments	306
3.4.8.	Présentation des résultats additionnels de l'article « ScmR, a global regulator of gene expression, quorum sensing, pH homeostasis, and virulence in <i>Burkholderia thailandensis</i> »	306
3.4.8.1.	Détermination de l'impact du régulateur transcriptionnel ScmR sur la transcription du gène de référence <i>ndh</i>	307
3.4.8.2.	Confirmation des données RNA-Seq	307

3.4.8.3. La lactate déshydrogénase putative LdhA n'est pas impliquée dans la modulation du pH dépendante du régulateur transcriptionnel ScmR	308
3.4.8.4. Le système <i>hmq</i> ne contrôle pas l'expression du gène <i>scmR</i>	310

ANNEXES	317
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	378

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Mécanisme de régulation de l'expression génique <i>via</i> le <i>quorum sensing</i> chez les bactéries à Gram positif.	4
Figure 1.2. Mécanisme de régulation de l'expression des gènes chez les bactéries à Gram négatif <i>via</i> les systèmes de <i>quorum sensing</i> de type LuxI/LuxR.	5
Figure 1.3. Structure chimique des AHL.	6
Figure 1.4. Exemples d'AHL retrouvées chez différentes bactéries à Gram négatif.	7
Figure 1.5. La synthase LasI est responsable de la production de la 3OC ₁₂ -HSL chez <i>P. aeruginosa</i> .	8
Figure 1.6. Exemples de boîte <i>lux</i> identifiées chez différentes bactéries à Gram négatif.	10
Figure 1.7. Le régulateur transcriptionnel LasR contrôle directement l'expression du gène <i>lasI</i> codant la synthase LasI responsable de la production de la 3OC ₁₂ -HSL chez <i>P. aeruginosa</i> .	11
Figure 1.8. Mécanisme de régulation de l'expression des gènes cibles du <i>quorum sensing</i> chez le pathogène de la pomme de terre <i>P. atrosepticum</i> .	12
Figure 1.9. Principaux facteurs de virulence cellulaires et extracellulaires de <i>P. aeruginosa</i> .	14
Figure 1.10. Mise en place séquentielle des différents facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> au cours du processus infectieux.	15
Figure 1.11. Exemples de gènes de virulence contrôlés par les systèmes <i>las</i> et/ou <i>rhl</i> .	16
Figure 1.12. La protéine RsaL est un répresseur du système <i>las</i> .	18
Figure 1.13. Interactions entre les systèmes <i>las</i> et <i>rhl</i> chez <i>P. aeruginosa</i> .	20
Figure 1.14. Structure chimique des HAQ.	22
Figure 1.15. Les différentes voies de biosynthèse de l'acide anthranilique chez <i>P. aeruginosa</i> .	24
Figure 1.16. Modèle hypothétique de la voie de biosynthèse du HHQ, du PQS et du HQNO à partir de l'acide anthranilique.	26
Figure 1.17. Le régulateur transcriptionnel MvfR contrôle positivement et directement l'expression de l'opéron <i>pqsABCDE</i> en association avec le HHQ ou le PQS.	28
Figure 1.18. Arbre phylogénétique basé sur l'ARNr 16S démontrant la diversité des espèces bactériennes qui appartiennent au genre <i>Burkholderia</i> .	31
Figure 1.19. Mécanisme de régulation hypothétique de la production de la 3OC ₁₂ -HSL <i>via</i> le système BraI/BraR chez <i>B. kururiensis</i> M130.	34
Figure 1.20. Modèle hypothétique de la régulation de la biosynthèse des AHL chez le pathogène du riz <i>P. fuscovaginae</i> .	37
Figure 1.21. Diagramme de Venn représentant la proportion de gènes dont la transcription est activée et/ou inhibée par la protéine RsaM ainsi que la proportion de gènes dont l'expression est stimulée et/ou réprimée par les systèmes PfvI/PfvR et PfsI/PfsR chez <i>P. fuscovaginae</i> UPB0736.	38
Figure 1.22. Mécanisme de régulation hypothétique de la production de la C ₈ -HSL <i>via</i> le système CepI/CepR chez les bactéries appartenant au complexe <i>Bcc</i> .	39
Figure 1.23. Localisation chromosomique (A) des gènes <i>btaI1/btaR1</i> , <i>btaI2/btaR2</i> et <i>btaI3/btaR3</i> de <i>B. thailandensis</i> E264, (B) des gènes <i>bpsI/bpsR</i> , <i>bpsI2/bpsR2</i> et <i>bpsI3/bpsR3</i> de <i>B. pseudomallei</i> K96243 ainsi que (C) des gènes <i>bmaI1/bmaR1</i> et <i>bmaI3/bmaR3</i> de <i>B. mallei</i> ATCC 23344.	45
Figure 1.24. Concentrations des principales AHL détectées par spectrométrie de masse chez <i>B. thailandensis</i> E264 au cours de la phase stationnaire de la croissance bactérienne.	47
Figure 1.25. Comparaison des proportions des différentes AHL identifiées par spectrométrie de masse chez <i>B. pseudomallei</i> KHW au cours des phases (A) exponentielle et (B) stationnaire de la croissance bactérienne.	49
Figure 1.26. Comparaison des proportions des différentes AHL identifiées <i>via</i> l'utilisation de biorapporteurs spécifiques chez les souches bactériennes (A) <i>B. mallei</i> GB8 et (B) <i>B. mallei</i> ATCC 23344 au cours de la phase stationnaire de la croissance bactérienne.	50
Figure 1.27. Concentrations des principales AHL détectées <i>via</i> l'utilisation de biorapporteurs spécifiques chez <i>B. mallei</i> ATCC 23344 dans des cultures bactériennes tamponnées (en présence de MOPS) ou non tamponnées (en absence de MOPS) au cours des phases exponentielle ou stationnaire de la croissance bactérienne.	51

Figure 1.28. Organisation structurale des gènes <i>btaI1/btaR1</i> chez <i>B. thailandensis</i> E264, <i>bpsI/bpsR</i> chez <i>B. pseudomallei</i> K96243 et <i>bmaI1/bmaR1</i> chez <i>B. mallei</i> ATCC 23344.	55
Figure 1.29. Répertoire des AHL synthétisées via la synthèse BpsI.	56
Figure 1.30. Le <i>quorum sensing</i> affecte la morphologie coloniale et l'auto-agrégation chez <i>B. thailandensis</i> E264.	60
Figure 1.31. Organisation structurale des gènes <i>btaI2/btaR2</i> chez <i>B. thailandensis</i> E264 et <i>bpsI2/bpsR2</i> chez <i>B. pseudomallei</i> K96243.	64
Figure 1.32. Répertoire des AHL synthétisées via la synthèse BpsI2.	66
Figure 1.33. Organisation structurale des gènes <i>bta</i> codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des bactobolines.	69
Figure 1.34. Structure chimique des différentes bactobolines identifiées chez <i>B. thailandensis</i> E264.	70
Figure 1.35. Organisation structurale des gènes <i>btaI3/btaR3</i> chez <i>B. thailandensis</i> E264, <i>bpsI3/bpsR3</i> chez <i>B. pseudomallei</i> K96243 et <i>bmaI3/bmaR3</i> chez <i>B. mallei</i> ATCC 23344.	72
Figure 1.36. Répertoire des AHL synthétisées via la synthèse BpsI3.	73
Figure 1.37. Répertoire des gènes sous le contrôle du <i>quorum sensing</i> chez <i>B. thailandensis</i> E264.	77
Figure 1.38. Interactions entre les systèmes de <i>quorum sensing</i> BpsI/BpsR, BpsI2/BpsR2 et BpsI3/BpsR3 chez <i>B. pseudomallei</i> K96243.	78
Figure 1.39. Résumé des systèmes de <i>quorum sensing</i> qui coexistent chez <i>B. thailandensis</i> E264.	80
Figure 1.40. Localisation chromosomique des gènes <i>btaR4</i> de <i>B. thailandensis</i> E264, <i>bpsR4</i> de <i>B. pseudomallei</i> K96243 et <i>bmaR4</i> de <i>B. mallei</i> ATCC 23344.	82
Figure 1.41. Structure chimique de la malléilactone chez <i>B. thailandensis</i> E264.	83
Figure 1.42. Organisation structurale des gènes <i>mal</i> codant les enzymes responsables de la production de la malléilactone.	84
Figure 1.43. Organisation structurale des gènes <i>btaR4</i> chez <i>B. thailandensis</i> E264, <i>bpsR4</i> chez <i>B. pseudomallei</i> K96243 et <i>bmaR4</i> chez <i>B. mallei</i> ATCC 23344	85
Figure 1.44. Localisation chromosomique des gènes <i>btaR5</i> de <i>B. thailandensis</i> E264, <i>bpsR5</i> de <i>B. pseudomallei</i> K96243 et <i>bmaR5</i> de <i>B. mallei</i> ATCC 23344.	87
Figure 1.45. Exemples de HMAQ et de HAQ spécifiques du système <i>hmq</i> .	90
Figure 1.46. Structure chimique de la principale HMAQ identifiée chez <i>B. thailandensis</i> E264.	91
Figure 1.47. Structure chimique de la principale HMAQ identifiée chez <i>B. ambifaria</i> HSJ1.	92
Figure 1.48. Représentation schématique de la biosynthèse des HMAQ à partir de l'acide anthranilique chez les espèces bactériennes du genre <i>Burkholderia</i> .	94
Figure 1.49. Organisation structurale de l'opéron <i>hmqABCDEFG</i> chez <i>B. thailandensis</i> E264.	96
Figure 1.50. Comparaison des opérons <i>pqsABCDE</i> chez <i>P. aeruginosa</i> PA14 et <i>hmqABCDEFG</i> chez <i>B. thailandensis</i> E264, chez <i>B. pseudomallei</i> K96243 et chez <i>B. ambifaria</i> AMMD.	99
Figure 1.51. Localisation du gène <i>scmR</i> au sein du génome de <i>B. thailandensis</i> E264.	100
Figure 1.52. Les systèmes CepI/CepR et CepI2/CepR2 et le système <i>hmq</i> sont interdépendants chez <i>B. ambifaria</i> HSJ1.	103
Figure 3.1. The QS-1, QS-2, and QS-3 systems are consecutively activated.	118
Figure 3.2. C ₈ -HSL production and expression from the <i>btaI1</i> promoter in the wild-type and QS mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	120
Figure 3.3. <i>btaI1</i> activation requires BtaR1 and C ₈ -HSL.	121
Figure 3.4. 3OHC ₁₀ -HSL production and expression from the <i>btaI2</i> promoter in the wild-type and QS mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	122
Figure 3.5. 3OHC ₈ -HSL production and expression from the <i>btaI3</i> promoter in the wild-type and QS mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	124
Figure 3.6. <i>btaI3</i> is activated by BtaR3 and 3OHC ₈ -HSL.	125
Figure 3.7. Effects of AHLs on the levels of expression of the <i>btaR1</i> , <i>btaR2</i> , and <i>btaR3</i> genes.	127
Figure 3.8. Activation of expression from the <i>btaI1</i> , <i>btaI2</i> , and <i>btaI3</i> promoters by AHLs.	129
Figure 3.9. Impact of 3OHC ₁₀ -HSL and 3OHC ₈ -HSL on activation of <i>btaI1</i> by BtaR3.	130
Figure 3.10. <i>btaI2</i> is directly activated by BtaR2 in response to 3OHC ₈ -HSL or 3OHC ₁₀ -HSL.	131
Figure 3.11. 3OHC ₈ -HSL activation of <i>btaI3</i> is dependent on C ₈ -HSL and 3OHC ₁₀ -HSL.	132
Figure 3.12. Impact of 3OHC ₁₀ -HSL and 3OHC ₈ -HSL on activation of <i>btaI3</i> by BtaR3.	132

Figure 3.13. Activation of expression from the <i>btaI3</i> promoter by AHLs.	133
Figure 3.14. Proposed interactions between the QS-1, QS-2, and QS-3 systems.	135
Figure 3.15. Genetic organization of the QS-1, QS-2, and QS-3 system genes in <i>B. thailandensis</i> E264.	137
Figure 3.16. Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 n'ont aucun impact sur la croissance bactérienne.	142
Figure 3.17. L'expression du gène de référence <i>ndh</i> est stable dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de <i>B. thailandensis</i> E264 supplémentées ou non supplémentées en AHL.	143
Figure 3.18. L'expression du gène de référence <i>ndh</i> est stable chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ de <i>B. thailandensis</i> E264.	144
Figure 3.19. Les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 sont exclusivement responsables de la biosynthèse des AHL.	145
Figure 3.20. Complémentation de la biosynthèse de la C ₈ -HSL, de la 3OHC ₁₀ -HSL et de la 3OHC ₈ -HSL via l'utilisation du vecteur d'expression constitutive du gène <i>btaR1</i> .	149
Figure 3.21. Complémentation de la biosynthèse de la C ₈ -HSL, de la 3OHC ₁₀ -HSL et de la 3OHC ₈ -HSL via l'utilisation du vecteur d'expression constitutive du gène <i>btaR2</i> .	150
Figure 3.22. Complémentation de la biosynthèse de la C ₈ -HSL, de la 3OHC ₁₀ -HSL et de la 3OHC ₈ -HSL via l'utilisation du vecteur d'expression constitutive du gène <i>btaR3</i> .	152
Figure 3.23. Impact des mutations transpositionnelles et délétionnelles des gènes <i>btaR1</i> , <i>btaR2</i> et <i>btaR3</i> sur la production des AHL.	154
Figure 3.24. Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 s'expriment de manière successive au cours de la croissance bactérienne.	156
Figure 3.25. L'expression du gène <i>btaI1</i> est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel BtaR1 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne.	157
Figure 3.26. Le régulateur transcriptionnel BtaR3 n'affecte pas l'expression des gènes <i>btaI1</i> et <i>btaR1</i> au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne.	158
Figure 3.27. La C ₈ -HSL, la 3OHC ₁₀ -HSL et la 3OHC ₈ -HSL activent l'expression du gène <i>btaI1</i> au cours des différentes phases de la croissance bactérienne.	159
Figure 3.28. Le régulateur transcriptionnel BtaR1 stimule l'expression du gène <i>btaI1</i> en association avec la C ₈ -HSL produite via la synthase BtaI1 au cours des différentes phases de la croissance bactérienne.	160
Figure 3.29. Régulation hypothétique de la transcription de <i>btaI1</i> via le complexe BtaR1/C ₈ -HSL.	161
Figure 3.30. La C ₈ -HSL, la 3OHC ₁₀ -HSL et la 3OHC ₈ -HSL activent l'expression du gène <i>btaI2</i> au cours des différentes phases de la croissance bactérienne.	162
Figure 3.31. L'expression du gène <i>btaI2</i> est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel BtaR2.	163
Figure 3.32. Les régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3 n'affectent pas l'expression des gènes <i>btaI2</i> et <i>btaR2</i> .	164
Figure 3.33. Régulation hypothétique de la transcription de <i>btaI3</i> via le complexe BtaR3/3OHC ₈ -HSL.	165
Figure 3.34. Effet de la 3OHC ₈ -HSL sur la transcription du gène <i>btaI3</i> dans des cultures de la souche sauvage et des mutants $\Delta btaR3$ et $\Delta btaI3$ de <i>B. thailandensis</i> E264.	166
Figure 3.35. Impact de la C ₈ -HSL, de la 3OHC ₁₀ -HSL et de la 3OHC ₈ -HSL sur la transcription du gène <i>btaI3</i> dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI3$ de <i>B. thailandensis</i> E264.	167
Figure 3.36. Les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BtaR5 n'affectent pas les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3.	170
Figure 3.37. <i>B. thailandensis</i> possesses two conserved RsaM-like proteins designated RsaM1 and RsaM2.	182
Figure 3.38. Confirmation of the genetic organization of the <i>rsaM1</i> and <i>rsaM2</i> genes.	183
Figure 3.39. AHLs are overproduced by <i>rsaM1</i> - and <i>rsaM2</i> - mutants.	184
Figure 3.40. Cell aggregation in the wild-type and the <i>rsaM1</i> - and <i>rsaM2</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	185
Figure 3.41. AHLs biosynthesis in the wild-type strain of <i>B. thailandensis</i> E264 and the $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$, and $\Delta btaI3$ mutants.	186
Figure 3.42. C ₈ -HSL biosynthesis and expression from the <i>btaI1</i> promoter in the wild-type and the <i>rsaM1</i> - and <i>rsaM2</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	188

Figure 3.43. 3OHC ₁₀ -HSL biosynthesis and expression from the <i>btaI2</i> promoter in the wild-type and the <i>rsaM1</i> - and <i>rsaM2</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	189
Figure 3.44. 3OHC ₈ -HSL biosynthesis and expression from the <i>btaI3</i> promoter in the wild-type and the <i>rsaM1</i> - and <i>rsaM2</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	191
Figure 3.45. AHL production profiles in the wild-type and the <i>rsaM1</i> - and <i>rsaM2</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	193
Figure 3.46. RsaM1 negatively regulates the transcription of <i>btaR1</i> but <i>btaR2</i> transcription is not modulated by RsaM2.	195
Figure 3.47. The impact of RsaM1 and RsaM2 on <i>btaI1</i> transcription.	196
Figure 3.48. QS positively regulates <i>rsaM1</i> transcription.	198
Figure 3.49. The transcription of <i>rsaM2</i> is activated by QS.	199
Figure 3.50. The <i>rsaM1</i> and <i>rsaM2</i> genes are negatively autoregulated.	200
Figure 3.51. Proposed involvement of RsaM1 and RsaM2 in the QS circuitry of <i>B. thailandensis</i> E264.	203
Figure 3.52. The biosynthesis of C ₈ -HSL and <i>btaI1</i> transcription are negatively regulated by BtaR2.	208
Figure 3.53. L'expression du gène de référence <i>ndh</i> est stable chez la souche sauvage et chez les mutants <i>rsaM1</i> - et <i>rsaM2</i> - de <i>B. thailandensis</i> E264.	210
Figure 3.54. La synthase BtaI1 est principalement responsable de la production de la C ₈ -HSL.	211
Figure 3.55. La synthase BtaI2 est essentiellement responsable de la production de la 3OHC ₁₀ -HSL.	213
Figure 3.56. Modèle hypothétique de la régulation de la biosynthèse de la C ₈ -HSL <i>via</i> le système BtaI2/BtaR2 chez <i>B. thailandensis</i> E264.	214
Figure 3.57. La synthase BtaI3 est principalement responsable de la production de la 3OHC ₈ -HSL.	215
Figure 3.58. The <i>pqsABCDE</i> and <i>hmqABCDEFG</i> operons are responsible for the biosynthesis of HAQs and HMAQs, respectively.	219
Figure 3.59. Expression of <i>hmqA</i> and HMAQ-C ₉ :2' biosynthesis are repressed by the AHL signaling systems of <i>B. thailandensis</i> E264.	232
Figure 3.60. HMAQs biosynthesis in the wild-type and QS mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	233
Figure 3.61. AHLs biosynthesis in the wild-type and the <i>hmqA</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	235
Figure 3.62. The HMAQ system stimulates the <i>B. thailandensis</i> E264 QS-1, QS-2, and QS-3 systems independently of HMAQs.	236
Figure 3.63. The main HMAQ synthesized by <i>B. thailandensis</i> , namely, HMAQ-C ₉ :2' has no impact on C ₈ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL, and 3OHC ₈ -HSL production.	238
Figure 3.64. Expression from the <i>btaI1</i> , <i>btaI2</i> , and <i>btaI3</i> promoters in the wild-type and the <i>hmqA</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	239
Figure 3.65. The transcription of the QS-1, QS-2, and QS-3 system genes is not modulated by the HMAQ system.	240
Figure 3.66. Activation of the <i>hmqABCDEFG</i> operon transcription and the production of HMAQs requires the LysR-type transcriptional regulator ScmR.	241
Figure 3.67. The <i>hmqA</i> promoter response to the ScmR transcriptional regulator and HMAQs.	242
Figure 3.68. ScmR does not complement the function of MvFR.	243
Figure 3.69. HMAQs are not involved in the regulation of the <i>hmqABCDEFG</i> operon transcription.	245
Figure 3.70. Expression of the <i>hmqA</i> gene in the wild-type and the <i>hmqG</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	246
Figure 3.71. Effects of AHLs on expression from the <i>hmqA</i> promoter in the wild-type and the <i>hmqA</i> -mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	247
Figure 3.72. Effects of HAQs on expression from the <i>hmqA</i> promoter of <i>B. thailandensis</i> E264.	248
Figure 3.73. HMAQs can act as molecular signals in interspecies communication.	249
Figure 3.74. Effects of HMAQs on expression from the <i>pqsA</i> promoter of <i>P. aeruginosa</i> PA14.	250
Figure 3.75. Effect of the HMAQ system on colony morphology.	251
Figure 3.76. Impact of the HMAQ system on biofilm and pellicle formation.	252
Figure 3.77. Swimming motility is positively controlled by the HMAQ system in <i>B. thailandensis</i> E264.	253
Figure 3.78. The biosynthesis of siderophores is negatively controlled by the HMAQ system in <i>B. thailandensis</i> E264.	254

Figure 3.79. Virulence of the wild-type strain and of the <i>hmqA</i> - mutant strain of <i>B. thailandensis</i> E264 toward the fruit fly <i>D. melanogaster</i> .	255
Figure 3.80. Hypothetical regulatory mechanisms directing expression of the <i>hmqABCDEFG</i> operon and HMAQs production and the phenotypic traits controlled by the HMAQ system in <i>B. thailandensis</i> E264.	256
Figure 3.81. L'expression du gène de référence <i>ndh</i> est stable chez la souche sauvage et chez les mutants <i>hmqA</i> - et <i>hmqG</i> - de <i>B. thailandensis</i> E264.	260
Figure 3.82. Effet des protéines RsaM1 et RsaM2 sur la transcription du gène <i>hmqA</i> et sur la production de la HMAQ-C ₉ :2' chez <i>B. thailandensis</i> E264.	261
Figure 3.83. Impact de la protéine HmqE sur la biosynthèse des HMAQ et des AHL.	264
Figure 3.84. Comparaison de la biosynthèse des HMAQ chez les souches cliniques <i>B. ambifaria</i> HSJ1 et <i>B. ambifaria</i> CEP0958 et chez les souches environnementales <i>B. ambifaria</i> MC40-6 et <i>B. ambifaria</i> PHP7.	266
Figure 3.85. Comparaison de la biosynthèse des AHL chez les souches cliniques <i>B. ambifaria</i> HSJ1 et <i>B. ambifaria</i> CEP0958 et chez les souches environnementales <i>B. ambifaria</i> MC40-6 et <i>B. ambifaria</i> PHP7.	267
Figure 3.86. Comparaison de l'expression de l'opéron <i>hmqABCDEFG</i> chez les souches cliniques <i>B. ambifaria</i> HSJ1 et <i>B. ambifaria</i> CEP0958 et chez les souches environnementales <i>B. ambifaria</i> MC40-6 et <i>B. ambifaria</i> PHP7.	269
Figure 3.87. La souche bactérienne <i>B. pyrocinia</i> CH-67 synthétise des HMAQ.	271
Figure 3.88. Numbers of ScmR-regulated genes and those QS-controlled in <i>B. thailandensis</i> E264 according to transcriptomic analyses obtained by RNA-Seq.	284
Figure 3.89. Expression from the <i>btaI1</i> , <i>btaI2</i> , and <i>btaI3</i> promoters in the wild-type and the <i>scmR</i> - mutant strains of <i>B. thailandensis</i> E264.	287
Figure 3.90. ScmR stimulates the HMAQ system in <i>B. thailandensis</i> E264.	288
Figure 3.91. ScmR affects the <i>B. thailandensis</i> E264 QS-1, QS-2, and/or QS-3 systems independently of its impact on the HMAQ system.	289
Figure 3.92. Effect of <i>scmR</i> inactivation on bacterial growth.	290
Figure 3.93. ScmR influences pH homeostasis.	291
Figure 3.94. Effect of pH on the transcription of several ScmR-regulated genes.	293
Figure 3.95. pH does not influence the ScmR-dependent modulation of the HMAQ system.	294
Figure 3.96. Involvement of pH in the ScmR-mediated control of AHLs production.	295
Figure 3.97. QS activates the transcription of <i>scmR</i> .	297
Figure 3.98. The promoter region of the ScmR-encoding gene contains a putative <i>lux</i> box sequence.	298
Figure 3.99. Examination of the genetic organization of the <i>scmR</i> gene.	299
Figure 3.100. The <i>scmR</i> gene is negatively autoregulated.	300
Figure 3.101. The <i>scmR</i> promoter response to the ScmR transcriptional regulator.	301
Figure 3.102. Effects of the <i>B. thailandensis</i> wild-type E264 strain and the <i>scmR</i> - mutant strain supernatants on expression from the <i>scmR</i> promoter.	302
Figure 3.103. Virulence of the wild-type strain and of the <i>scmR</i> - mutant strain of <i>B. thailandensis</i> E264 toward the fruit fly <i>D. melanogaster</i> .	303
Figure 3.104. L'expression du gène de référence <i>ndh</i> est stable dans des cultures de la souche sauvage et du mutant <i>scmR</i> - de <i>B. thailandensis</i> E264 supplémentées ou non supplémentées en HEPES.	307
Figure 3.105. Confirmation des données RNA-Seq.	308
Figure 3.106. Impact de la lactate déshydrogénase putative LdhA sur la croissance bactérienne.	309
Figure 3.107. Le système <i>hmq</i> n'affecte pas la transcription du gène <i>scmR</i> .	311

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Caractéristiques génomiques de <i>B. thailandensis</i> E264, de <i>B. pseudomallei</i> K96243 et de <i>B. mallei</i> ATCC 23344.	41
Tableau 1.2. Comparaison des proportions des différentes AHL identifiées par spectrométrie de masse chez les souches bactériennes <i>B. pseudomallei</i> H11, <i>B. pseudomallei</i> K96243 et <i>B. pseudomallei</i> KHW au cours de la phase stationnaire de la croissance bactérienne. D'après Gamage <i>et al.</i> (2011).	48
Tableau 1.3. Répertoire des AHL associées aux systèmes de <i>quorum sensing</i> présents chez les membres du groupe <i>Bptm</i> .	52
Tableau 1.4. Modèles d'infection utilisés pour tester l'implication du <i>quorum sensing</i> dans la virulence bactérienne parmi les membres du groupe <i>Bptm</i> .	53
Tableau 1.5. Homologies entre les systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1.	54
Tableau 1.6. Répertoire des AHL associées aux systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1.	58
Tableau 1.7. Processus cellulaires contrôlés <i>via</i> les systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1.	61
Tableau 1.8. Homologies entre les systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2.	64
Tableau 1.9. Répertoire des AHL associées aux systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2.	67
Tableau 1.10. Homologies entre les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3.	71
Tableau 1.11. Répertoire des AHL associées aux systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3.	75
Tableau 1.12. Processus cellulaires contrôlés <i>via</i> les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3.	76
Tableau 1.13. Homologies entre les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4, BpsR4 et BmaR4.	81
Tableau 1.14. Homologies entre les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR5, BpsR5 et BmaR5.	86
Tableau 1.15. Les protéines HmqA, HmqB, HmqC, HmqD et HmqE de <i>B. thailandensis</i> E264 sont respectivement homologues aux enzymes PqsA, PqsB, PqsC, PqsD et PqsE de <i>P. aeruginosa</i> PA14.	97
Tableau 1.16. Processus cellulaires sous le contrôle du système <i>hmq</i> .	106
Table 3.1. Bacterial strains used in this study.	112
Table 3.2. Plasmids used in this study.	114
Table 3.3. Primers used for PCR.	114
Table 3.4. Primers used for qRT-PCR.	116
Tableau 3.5. Souches utilisées pour les études de complémentation de la production des AHL.	146
Tableau 3.6. Plasmides utilisés pour les études de complémentation de la production des AHL.	147
Tableau 3.7. Amorces utilisées pour les études de complémentation de la production des AHL.	147
Tableau 3.8. Souches utilisées pour comparer l'effet des mutations transpositionnelles et délétionnelles des gènes <i>btaR1</i> , <i>btaR2</i> et <i>btaR3</i> sur la production des AHL.	153
Tableau 3.9. Souches utilisées pour étudier la modulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 <i>via</i> les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BtaR5.	169
Table 3.10. Bacterial strains used in this study.	175
Table 3.11. Plasmids used in this study.	177
Table 3.12. Primers used for PCR.	177
Table 3.13. Primers used for qRT-PCR and RT-PCR.	180
Table 3.14. Bacterial strains used in this study.	222
Table 3.15. Plasmids used in this study.	224
Table 3.16. Primers used for PCR.	225
Tableau 3.17. Primers used for qRT-PCR.	227
Tableau 3.18. Souches utilisées pour étudier la fonction de la protéine HmqE.	262
Tableau 3.19. Plasmides utilisés pour étudier la fonction de la protéine HmqE.	262
Tableau 3.20. Amorces utilisées pour étudier la fonction de la protéine HmqE.	263
Tableau 3.21. Souches cliniques et environnementales de <i>B. ambifaria</i> utilisées pour comparer la production des HMAQ.	265
Tableau 3.22. Souches cliniques et environnementales de <i>B. ambifaria</i> utilisées pour comparer la transcription de l'opéron <i>hmqABCDEFG</i> .	268
Tableau 3.23. Bacterial strains used in this study.	277

Table 3.24. Plasmids used in this study.	278
Table 3.25. Primers used for PCR.	279
Tableau 3.26. Primers used for qRT-PCR and RT-PCR.	282
Tableau 3.27. Souche utilisée pour étudier l'implication de la lactate déshydrogénase putative LdhA dans la modulation du pH dépendante du régulateur transcriptionnel ScmR.	308
Tableau 3.28. Impact de la lactate déshydrogénase putative LdhA sur le pH.	309
Tableau 3.29. Souches utilisées pour étudier l'impact du système <i>hmq</i> sur la transcription du gène <i>scmR</i>.	310

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta
°C	Degré Celsius
μM	Micromolaire
%	Pour cent
2-ABA	2-Aminobenzoylacétate
2-ABA-CoA	2-Aminobenzoylacétyl-CoA
3OC ₁₂ -ACP	3-Oxo-dodécanoyl-ACP
3OC ₆ -HSL	<i>N</i> -(3-Oxo-hexanoyl)-L-homosérine lactone
3OC ₈ -HSL	<i>N</i> -(3-Oxo-octanoyl)-L-homosérine lactone
3OC ₁₀ -HSL	<i>N</i> -(3-Oxo-décanoyl)-L-homosérine lactone
3OC ₁₂ -HSL	<i>N</i> -(3-Oxo-dodécanoyl)-L-homosérine lactone
3OC ₁₄ -HSL	<i>N</i> -(3-Oxo-tétradécanoyl)-L-homosérine lactone
3OC ₁₆ -HSL	<i>N</i> -(3-Oxo-hexadécanoyl)-L-homosérine lactone
3OHC ₄ -HSL	<i>N</i> -(3-Hydroxy-butanoyl)-L-homosérine lactone
3OHC ₆ -HSL	<i>N</i> -(3-Hydroxy-hexanoyl)-L-homosérine lactone
3OHC ₈ -HSL	<i>N</i> -(3-Hydroxy-octanoyl)-L-homosérine lactone
3OHC ₉ -HSL	<i>N</i> -(3-Hydroxy-nonanoyl)-L-homosérine lactone
3OHC ₁₀ -HSL	<i>N</i> -(3-Hydroxy-décanoyl)-L-homosérine lactone
3OHC ₁₂ -HSL	<i>N</i> -(3-Hydroxy-dodécanoyl)-L-homosérine lactone
5'-MAT	5'-Méthylthioadénosine
6-FABA	Acide 2-amino-6-fluorobenzoïque
7,8- <i>cis</i> -C ₁₄ -HSL	7,8- <i>cis</i> - <i>N</i> -(Tétradécanoyl)-L-homosérine lactone
7,8- <i>cis</i> -3OHC ₁₄ -HSL	7,8- <i>cis</i> - <i>N</i> -(3-Hydroxy-tétradécanoyl)-L-homosérine lactone
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Acyl-ACP	<i>Acyl-acyl carrier protein</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AHL	<i>N</i> -Acyl-L-homosérine lactone
AI	Auto-inducteur

AI-1	Auto-inducteur de type 1
AI-2	Auto-inducteur de type 2
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
<i>Bcc</i>	<i>Burkholderia cepacia complex</i>
<i>Bptm</i>	<i>Burkholderia pseudomallei-thailandensis-mallei</i>
<i>bsa</i>	<i>Burkholderia secretion apparatus</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
C ₄ -HSL	<i>N</i> -(Butanoyl)-L-homosérine lactone
C ₆ -HSL	<i>N</i> -(Hexanoyl)-L-homosérine lactone
C ₈ -HSL	<i>N</i> -(Octanoyl)-L-homosérine lactone
C ₁₀ -HSL	<i>N</i> -(Décanyol)-L-homosérine lactone
C ₁₂ -HSL	<i>N</i> -(Dodécanyol)-L-homosérine lactone
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>
CoA	Coenzyme A
DO ₆₀₀	Densité optique à 600 nm
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i>
EPS	Exopolysaccharide
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i>
ExoA	Exotoxine A
FAD	Flavine adénine dinucléotide
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HAQ	4-Hydroxy-2-alkylquinoline
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HHQ	4-Hydroxy-2-heptylquinoline
HMAQ	4-Hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinoline
HMHQ	4-Hydroxy-3-méthyl-2-hepténylquinoline
HMNQ	4-Hydroxy-3-méthyl-2-nonénylquinoline
HNQ	4-Hydroxy-2-nonylquinoline
HQNO	4-Hydroxy-2-heptylquinoline <i>N</i> -oxyde
HTH	Hélice-tour-hélice
<i>i.e.</i>	<i>id est</i>

IAF	Institut Armand-Frappier
INRS	Institut National de la Recherche Scientifique
kb	Kilobase
L	Litre
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Mb	Mégabase
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino) propane sulfonique
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
nmol	Nanomole
N-terminal	Amino-terminal
pb	Paire de bases
<i>Pbe</i>	<i>Plant-associated beneficial and environmental</i>
PCB	Polychlorobiphényle
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potentiel hydrogène
PQS	<i>Pseudomonas quinolone signal</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcription-PCR</i>
RNA-Seq	<i>RNA-Sequencing</i>
S	Svedberg
SAM	<i>S</i> -Adénosyl-L-méthionine
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SSTT	Système de sécrétion de type III
TCE	Trichloroéthylène
Tc ^R	Résistance à la tétracycline
T _m	<i>Melting temperature</i>
Tp ^R	Résistance à la triméthopime
URL	Unité relative de lumière

1. INTRODUCTION

1.1. La communication intercellulaire bactérienne

1.1.1. Le *quorum sensing* est un mécanisme de régulation globale de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire

Les bactéries sont exposées à de fréquentes modifications physico-chimiques de leur environnement. Elles peuvent également adopter différents styles de vie puisqu'elles sont capables de vivre à l'état planctonique libres ou bien à l'état de biofilm fixées sur un support biotique ou abiotique. Elles peuvent établir différents types d'interaction avec un hôte comme, par exemple, le commensalisme ou le parasitisme. L'ensemble de ces situations nécessite la synthèse de macromolécules particulières adaptées aux nouvelles conditions de vie rencontrées par les bactéries. Ce remaniement du contenu macromoléculaire bactérien implique un ajustement de l'expression du programme génétique. Il existe donc des mécanismes de régulation permettant aux bactéries de modifier l'expression de leurs gènes en fonction des conditions environnementales variées auxquelles elles peuvent être confrontées et des différents modes de vie qu'elles sont susceptibles d'adopter.

Parmi les mécanismes de régulation de l'expression génique décrits chez les bactéries figurent notamment le *quorum sensing* (Fuqua *et al.*, 1994). Il s'agit d'un mécanisme de régulation globale de l'expression des gènes en fonction de la densité bactérienne intervenant dans de nombreux processus cellulaires, qui incluent la mobilité bactérienne (*Yersinia enterocolitica*), la bioluminescence (*Vibrio fischeri*), le développement du biofilm (*Staphylococcus aureus*), la biosynthèse d'antibiotiques (*Pectobacterium carotovorum*), la compétence génétique (*Streptococcus pneumoniae*), la sporulation (*Bacillus subtilis*), la conjugaison bactérienne (*Agrobacterium tumefaciens*), et, en particulier, la pathogénicité (*Pseudomonas aeruginosa*). Ce système de communication intercellulaire implique des molécules de signalisation, nommées auto-inducteurs (AI), qui sont produites en réponse aux fluctuations de la densité bactérienne. Ces signaux moléculaires s'accumulent dans l'environnement au fur et à mesure de la croissance bactérienne jusqu'à atteindre une concentration singulière à laquelle ils déclenchent, de manière synchrone dans l'ensemble de la population bactérienne, la modulation de l'expression de gènes spécifiques. Le *quorum sensing* assure, ainsi, la coordination des fonctions biologiques permettant aux bactéries d'agir

en communautés multicellulaires et, par conséquent, de répondre collectivement à des stimuli environnementaux.

Les molécules de signalisation qui interviennent dans la régulation de l'expression génique *via* le *quorum sensing* sont typiquement des oligopeptides chez les bactéries à Gram positif (Dunny *et al.*, 1997). Chez les bactéries à Gram négatif, les *N*-acyl-L-homosérine lactones (AHL) sont les mieux connues et les plus répandues (Fuqua *et al.*, 1998). Ces signaux moléculaires, anciennement appelés auto-inducteurs de type 1 (AI-1), sont, en général, spécifiques d'une espèce bactérienne et sont, de ce fait, principalement impliqués dans la communication intra-espèces (Antunes *et al.*, 2009). Toutefois, ils peuvent également intervenir dans la communication entre des espèces bactériennes différentes. Ils permettent, par exemple, aux bactéries pathogènes opportunistes *P. aeruginosa* et *Burkholderia cenocepacia* de développer des biofilms mixtes afin d'optimiser la colonisation des poumons de patients atteints de fibrose kystique (Riedel *et al.*, 2001). Des molécules de signalisation communes aux bactéries à Gram positif et à Gram négatif, appelées auto-inducteurs de type 2 (AI-2), sont, en revanche, essentiellement impliquées dans la communication inter-espèces (Surette *et al.*, 1999, Vendeville *et al.*, 2005, Xavier *et al.*, 2003). Elles sont, pour cette raison, considérées comme un langage universel des bactéries : l'espéranto bactérien (Winans, 2002). Le *quorum sensing* permet, par conséquent, aux bactéries appartenant à une même espèce ou bien à des espèces différentes d'interagir entre elles. Ce système de communication intercellulaire peut également intervenir dans les interactions hôte-pathogène définissant, ainsi, un nouveau type de communication : la communication inter-règnes (Hughes *et al.*, 2008, Rumbaugh, 2007).

Selon les espèces bactériennes, les systèmes de régulation du *quorum sensing* diffèrent. Ainsi, on retrouve communément des systèmes de régulation à deux composants chez les bactéries à Gram positif (Chang *et al.*, 1998). Chez les bactéries à Gram négatif, on retrouve fréquemment des systèmes de régulation homologues au système LuxI/LuxR caractéristique de la bactérie marine bioluminescente *V. fischeri* (Eberhard *et al.*, 1981, Engebrecht *et al.*, 1983, Engebrecht *et al.*, 1984). Ces systèmes interviennent généralement dans la communication intra-espèces. Il existe également des systèmes hybrides communs aux bactéries à Gram positif et à Gram négatif qui interviennent essentiellement dans la communication inter-espèces (Bassler *et al.*, 1997). Si ces systèmes de régulation diffèrent selon les espèces bactériennes, la modulation de l'expression génique *via* le *quorum sensing* s'effectue généralement selon le même modèle : il implique une molécule de signalisation, un

mécanisme permettant la production de cette molécule de signalisation et un régulateur transcriptionnel couplant l'expression des gènes cibles du *quorum sensing* avec la densité bactérienne par sa liaison au signal moléculaire.

1.1.2. Le *quorum sensing* chez les bactéries à Gram positif : oligopeptides et systèmes de régulation à deux composants

Chez les bactéries à Gram positif, la modulation de l'expression génique *via* le *quorum sensing* implique communément des systèmes de régulation à deux composants (**Fig. 1.1**). Ces systèmes de communication intercellulaire utilisent généralement des oligopeptides comme auto-inducteurs qui dérivent d'un précurseur protéique faisant l'objet de modifications post-traductionnelles et sont exportés dans l'environnement, où ils s'accumulent au cours de la croissance bactérienne, *via* un transporteur ABC (*ATP binding cassette*) (Kleerebezem *et al.*, 1997). Ces auto-inducteurs, lorsqu'ils atteignent un seuil critique de concentration, sont détectés spécifiquement par une protéine histidine kinase (*i.e.* le senseur d'un système à deux composants) qui, en conséquence, s'auto-phosphoryle et transfère son groupement phosphate à un régulateur de réponse spécifique (*i.e.* l'effecteur d'un système à deux composants), contrôlant l'expression des gènes cibles du *quorum sensing* en fonction de la densité de la population bactérienne (Kleerebezem *et al.*, 1997). Parmi ces gènes figurent, en particulier, le locus du précurseur protéique responsable de la production des oligopeptides, créant, ainsi, une boucle d'auto-induction typique des systèmes de *quorum sensing* (**Fig. 1.1**).

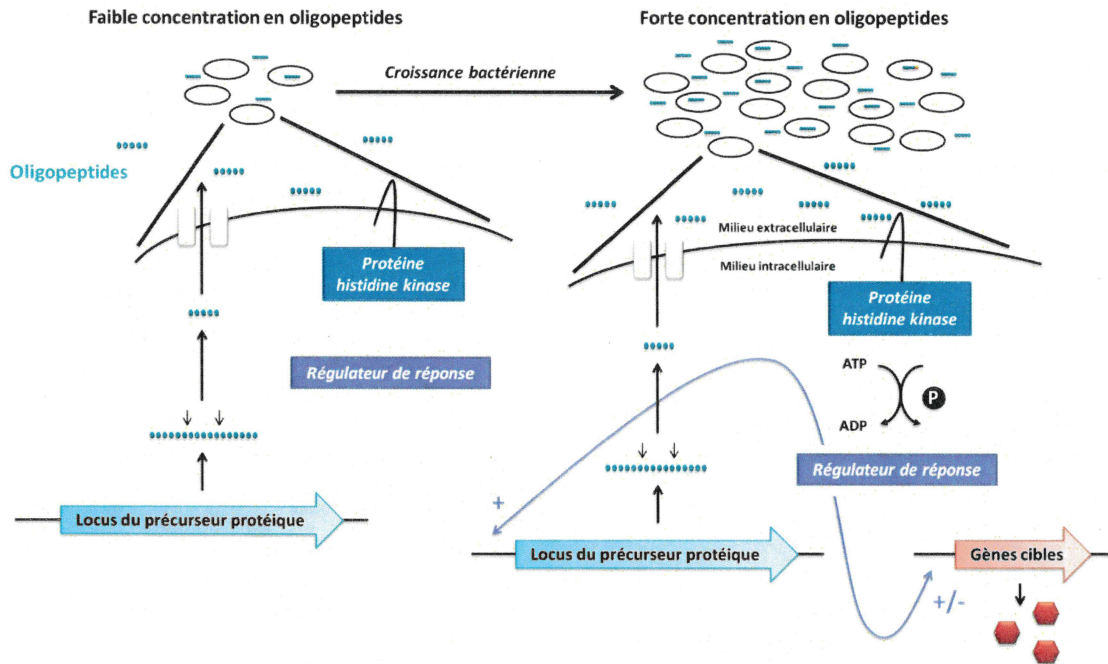


Figure 1.1. Mécanisme de régulation de l'expression génique via le *quorum sensing* chez les bactéries à Gram positif.

1.1.3. Le *quorum sensing* implique communément des systèmes de régulation homologues au système LuxI/LuxR chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif, la modulation de l'expression génique via le *quorum sensing* est essentiellement attribuée à des systèmes de régulation qui possèdent des homologies avec le système LuxI/LuxR spécifique de *V. fischeri* (Fig. 1.2). Ces systèmes de communication intercellulaire utilisent des AHL comme auto-inducteurs qui fournissent une indication sur la densité de la population bactérienne. Ces auto-inducteurs sont typiquement produits par une synthase spécifique de la famille des synthases de type LuxI et s'accumulent dans l'environnement au fur et à mesure de la croissance bactérienne jusqu'à atteindre un seuil critique de concentration (Fuqua *et al.*, 2002). Ils interagissent, en conséquence, spécifiquement avec un régulateur transcriptionnel de la famille des régulateurs transcriptionnels de type LuxR qui contrôle, en fonction de la densité de la population bactérienne, l'expression des gènes cibles du *quorum sensing* parmi lesquels figurent, notamment, le gène *luxI*, codant la synthase LuxI, résultant en une boucle d'auto-induction caractéristique des systèmes de *quorum sensing* (Fuqua *et al.*, 2002). Notons, par ailleurs, que

le gène *luxR*, codant le régulateur transcriptionnel LuxR, est généralement localisé à proximité du gène *luxI* (Fig. 1.2).

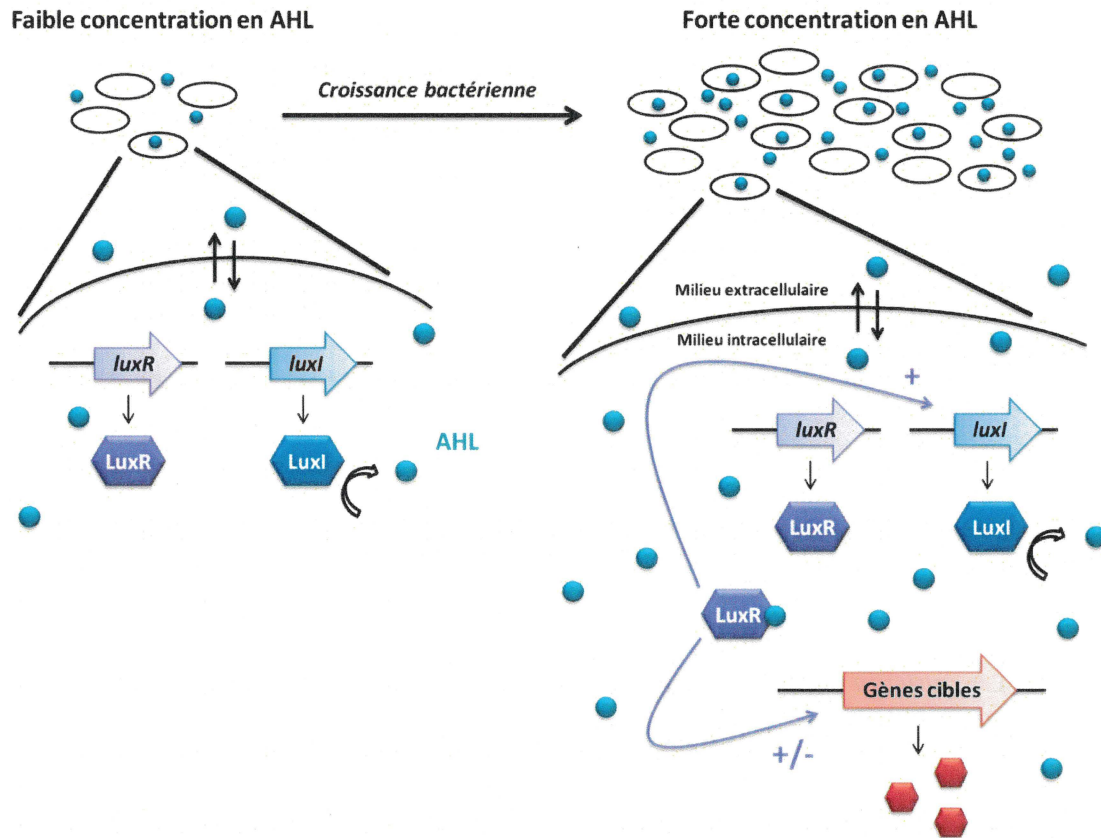


Figure 1.2. Mécanisme de régulation de l'expression des gènes chez les bactéries à Gram négatif via les systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR. D'après Le Berre *et al.* (2006).

Ainsi, les systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR, chez les bactéries à Gram négatif, impliquent trois acteurs principaux spécifiques qui sont communément une AHL, une synthase homologue à LuxI et un régulateur transcriptionnel homologue à LuxR.

1.1.3.1. Les systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR utilisent des auto-inducteurs appartenant à la famille des AHL

Les différents systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR, chez les bactéries à Gram négatif, utilisent fréquemment comme auto-inducteurs des AHL spécifiques qui présentent des structures chimiques variées (Fuqua *et al.*, 2002). Les différences structurales

entre les AHL reposent, en particulier, sur la longueur et/ou la substitution de la chaîne acyle qui les compose (Fig. 1.3).

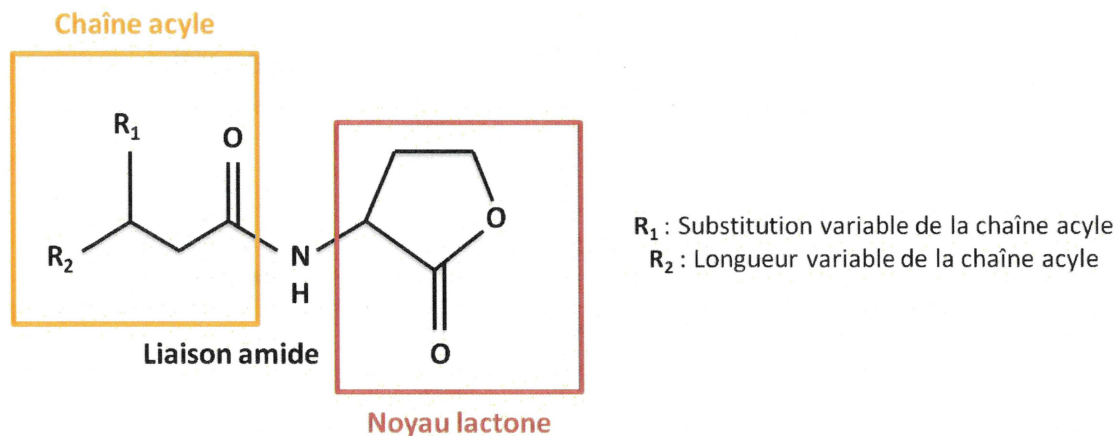


Figure 1.3. Structure chimique des AHL.

Les AHL sont constituées d'un noyau lactone et d'une chaîne acyle connectés par l'intermédiaire d'une liaison amide. Cette chaîne acyle peut être différenciellement substituée par un groupement hydroxyle, un atome d'oxygène ou d'hydrogène en position 3 et sa longueur peut varier de 4 à 18 carbones (Fuqua *et al.*, 2002). Certaines AHL possèdent également une insaturation au niveau de la chaîne acyle comme, par exemple, la 7,8-*cis-N*-(3-hydroxy-tétradécenoyl)-L-homosérine lactone (7,8-*cis*-3OHC₁₄-HSL) spécifique de *Rhizobium leguminosarum* (Gray *et al.*, 1996, Schripsema *et al.*, 1996) et la 7,8-*cis-N*-(tétradécenoyl)-L-homosérine lactone (7,8-*cis*-C₁₄-HSL) spécifique de *Rhodobacter sphaeroides* (Puskas *et al.*, 1997).

Les différences structurales entre les AHL assurent, d'une manière générale, la spécificité des différents systèmes de *quorum sensing*. Celles-ci peuvent varier d'une espèce bactérienne à l'autre, voire même au sein d'une même bactérie (Fig. 1.4).

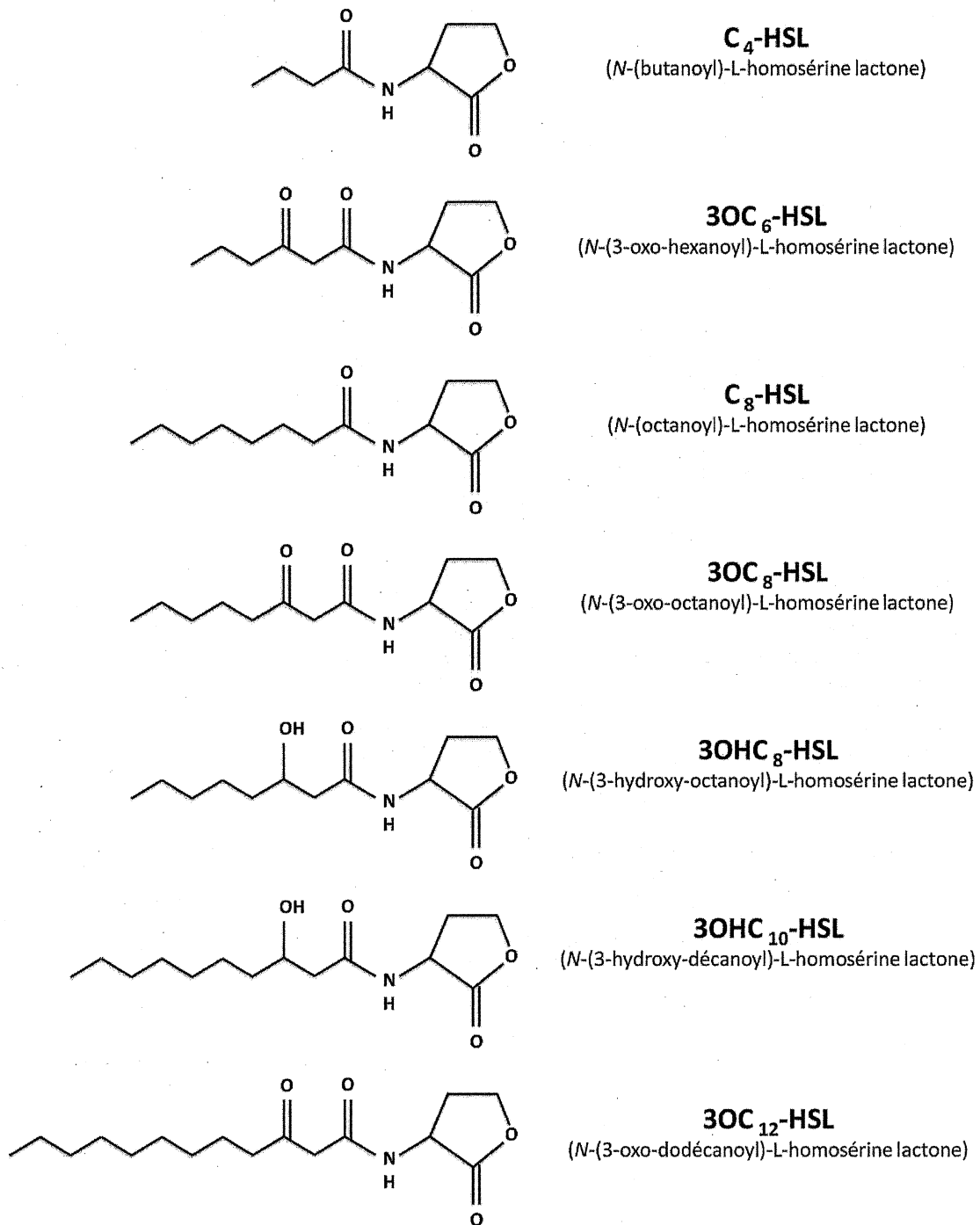


Figure 1.4. Exemples d'AHL retrouvées chez différentes bactéries à Gram négatif.

La *N*-(butanoyl)-L-homosérine lactone (C₄-HSL) et la *N*-(3-oxo-dodécanoyl)-L-homosérine lactone (3OC₁₂-HSL) sont les principales AHL synthétisées par *P. aeruginosa* (Pearson *et al.*, 1994, Pearson *et al.*, 1995). La bactérie phytopathogène *P. carotovorum* produit essentiellement de la *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homosérine lactone (3OC₆-HSL) (Pirhonen *et al.*, 1993), tandis que la *N*-(3-oxo-octanoyl)-L-homosérine lactone (3OC₈-HSL) est la principale AHL produite par la bactérie phytopathogène *A. tumefaciens* (Hwang *et al.*, 1994). *Burkholderia thailandensis* synthétise essentiellement de la *N*-(octanoyl)-L-homosérine lactone (C₈-HSL), de la *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₈-HSL) et de la *N*-(3-hydroxy-décanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₁₀-HSL) (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009).

Les AHL sont capables de diffuser de manière passive à travers les membranes bactériennes et sont, de ce fait, présentes en concentration égale à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (Fuqua *et al.*, 2002). Toutefois, certaines AHL peuvent également être transportées activement au niveau de l'enveloppe bactérienne comme, par exemple, la 3OC₁₂-HSL, qui à la différence de la C₄-HSL, est sécrétée dans l'environnement par des pompes à efflux de type MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* (Evans *et al.*, 1998, Pearson *et al.*, 1999).

1.1.3.2. Les synthèses de type LuxI sont responsables de la production des AHL

Les synthèses de type LuxI catalysent la biosynthèse des AHL (More *et al.*, 1996, Parsek *et al.*, 1999, Schaefer *et al.*, 1996). Celles-ci sont formées à partir d'un précurseur commun, la S-adénosyl-L-méthionine (SAM), et d'une *acyl-acyl carrier protein* (acyl-ACP) spécifique (Fig. 1.5).

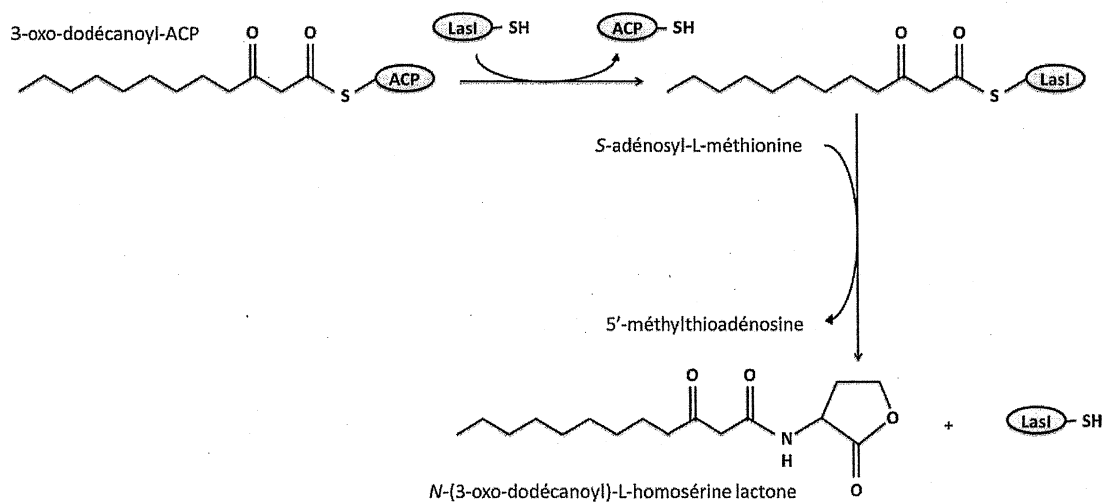


Figure 1.5. La synthase LasI est responsable de la production de la 3OC₁₂-HSL chez *P. aeruginosa*. La production de la 3OC₁₂-HSL est catalysée par la synthase LasI, constitutive du système de *quorum sensing las* de *P. aeruginosa*, à partir de la SAM et de la 3-oxo-dodécanoyl-ACP (3OC₁₂-ACP), un intermédiaire du métabolisme des acides gras. Cette réaction de synthèse induit la libération d'une molécule de 5'-méthylthioadénosine (5'-MAT).

Les synthèses de type LuxI sont généralement associées à la production d'une unique AHL. Certaines d'entre elles peuvent, néanmoins, intervenir dans la biosynthèse de différentes AHL. Ces synthèses, le plus souvent, produisent une AHL, de façon majoritaire, de même qu'une ou plusieurs AHL additionnelles, moins abondamment. À titre d'exemple,

les synthases BtaI1 et BtaI3 produisent exclusivement de la C₈-HSL et de la 3OHC₈-HSL, respectivement, alors que la synthase BtaI2 synthétise principalement de la 3OHC₁₀-HSL ainsi que, dans une moindre mesure, de la 3OHC₈-HSL chez *B. thailandensis* (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009).

Les synthases d' AHL appartiennent, pour la plupart d'entre elles, à la famille des synthases de type LuxI (Fuqua *et al.*, 2002). Cependant, des synthases ne présentant aucune homologie de séquence avec la synthase LuxI spécifique de *V. fischeri* ont été décrites chez plusieurs bactéries à Gram négatif (Bassler *et al.*, 1994, Gilson *et al.*, 1995, Hanzelka *et al.*, 1999, Laue *et al.*, 2000, Milton *et al.*, 2001). Citons, par exemple, les synthases LuxM (*Vibrio harveyi*), AinS (*V. fischeri*) et VanM (*Vibrio anguillarum*) ainsi que la synthase HdtS (*Pseudomonas fluorescens*).

1.1.3.3. Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR modulent l'expression des gènes cibles du *quorum sensing*

Les régulateurs transcriptionnels du *quorum sensing*, chez les bactéries à Gram négatif, sont typiquement homologues au régulateur transcriptionnel LuxR spécifique de *V. fischeri* (Fuqua *et al.*, 2002). Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR sont constitués, d'une manière générale, de deux domaines fonctionnellement différents : un domaine N-terminal impliqué dans la liaison à l' AHL et un domaine C-terminal responsable de la liaison à l'ADN grâce à la présence d'un motif protéique hélice-tour-hélice (HTH) de fixation à l'ADN constitué de deux hélices α reliées par une boucle (Hanzelka *et al.*, 1999, Henikoff *et al.*, 1990, Stevens *et al.*, 1999). Ces régulateurs transcriptionnels sont capables d'interagir de façon réversible ou bien irréversiblement avec les AHL (Welch *et al.*, 2000, Zhu *et al.*, 2001). Ils se lient sous forme dimérique spécifiquement à l'ADN au niveau d'une séquence nucléotidique conservée de la région promotrice des gènes contrôlés *via* le *quorum sensing*, appelée boîte *lux* (Devine *et al.*, 1989, Eglund *et al.*, 1999, Fuqua *et al.*, 1994). Cette boîte contient une séquence d'ADN palindromique d'une vingtaine de paires de bases située à une quarantaine de paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (Fig. 1.6).

<i>cep</i> box	CCCTGTAAGAGTTACCAGTT	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
<i>las</i> box	ACCTGCGAGAACTGGCAGGT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>lux</i> box	ACCTGTAGGATCGTACAGGT	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>rhl</i> box	CCCTACCAGATCTGGCAGGT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>sol</i> box	CCCTGTCAATCCTGACACTT	<i>Ralstonia solanacearum</i>

Figure 1.6. Exemples de boîte *lux* identifiées chez différentes bactéries à Gram négatif.

Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR présentent différents modes de fonctionnement selon qu'ils se dimérisent en présence et/ou en absence d'AHL (Fuqua *et al.*, 2002, Fuqua *et al.*, 2001, Patankar *et al.*, 2009, Tsai *et al.*, 2010, Whitehead *et al.*, 2001). Cette dimérisation est indispensable pour permettre la fixation de ces régulateurs transcriptionnels à la boîte *lux* et, de ce fait, l'activation et/ou l'inhibition de l'expression des gènes cibles du *quorum sensing* (Luo *et al.*, 1999, Stevens *et al.*, 1997, Zhu *et al.*, 1999). Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR, la plupart du temps, se dimérisent et se lient à l'ADN exclusivement en présence d'AHL (Fig. 1.7). Ces régulateurs transcriptionnels constituent communément des activateurs de l'expression des gènes sous le contrôle du *quorum sensing* (Fuqua *et al.*, 2002). Citons, par exemple, les régulateurs transcriptionnels LasR (*P. aeruginosa*), TraR (*A. tumefaciens*), CarR (*P. carotovorum*), LuxR (*V. fischeri*) ou encore TofR (*Burkholderia glumae*).

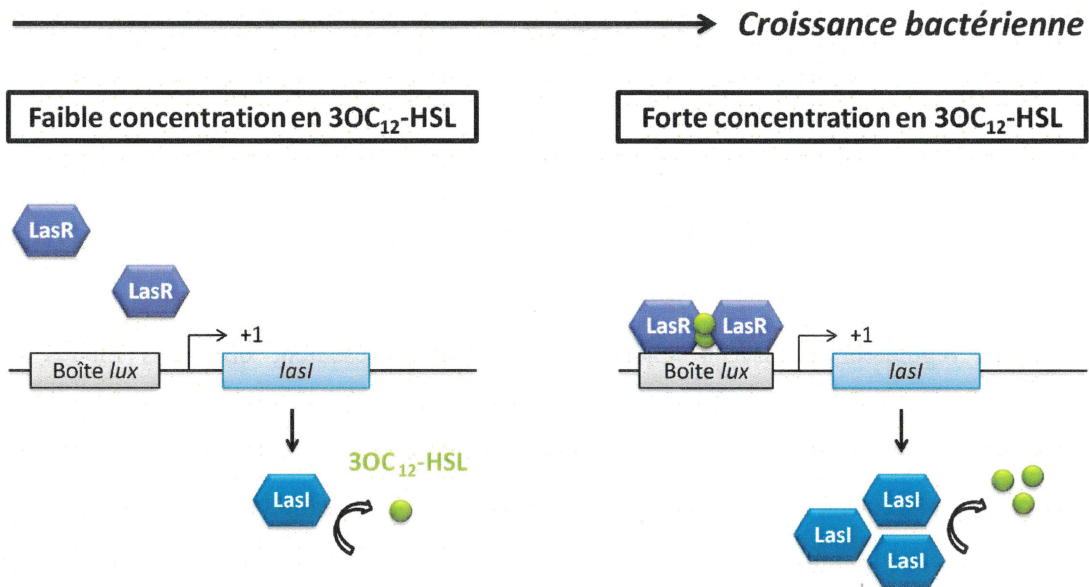


Figure 1.7. Le régulateur transcriptionnel LasR contrôle directement l'expression du gène *lasI* codant la synthèse LasI responsable de la production de la 3OC₁₂-HSL chez *P. aeruginosa*.

À une faible densité cellulaire, le régulateur transcriptionnel LasR, constitutif du système de *quorum sensing* *las* de *P. aeruginosa*, est présent sous forme de monomères. La 3OC₁₂-HSL, produite par la synthèse LasI (Pearson *et al.*, 1994), est synthétisée de façon constitutive à des concentrations faibles. À une forte densité cellulaire, cette AHL se lie spécifiquement au régulateur transcriptionnel LasR. Cette association est responsable de la dimérisation du régulateur transcriptionnel LasR lui permettant d'activer l'expression du gène *lasI*, qui code la synthèse LasI, en interagissant avec la région promotrice de ce gène par l'intermédiaire d'une boîte *lux* (Seed *et al.*, 1995). La 3OC₁₂-HSL est alors produite à de fortes concentrations.

En revanche, certains régulateurs transcriptionnels de type LuxR se dimérisent et se lient à l'ADN uniquement en absence d'AHL. Ces régulateurs transcriptionnels constituent typiquement des inhibiteurs de l'expression des gènes contrôlés *via* le *quorum sensing* (Tsai *et al.*, 2010). Citons, par exemple, les régulateurs transcriptionnels EsaR (*Pantoea stewartii*), VirR (*Pectobacterium atrosepticum*), SpnR (*Serratia marcescens*) ou encore YenR (*Y. enterocolitica*). Il existe, néanmoins, des exceptions à l'image du régulateur transcriptionnel RhlR qui se comporte à la fois comme un activateur lorsqu'il se dimérise en présence de C₄-HSL produite par la synthèse RhlI et stimule, par exemple, l'expression du gène *rhlI* et de l'opéron *rhlAB*, et comme un inhibiteur lorsqu'il se dimérise en absence de C₄-HSL et réprime, par exemple, la transcription du gène *rhlR* et de l'opéron *rhlAB* chez *P. aeruginosa* (Medina *et al.*, 2003a, Medina *et al.*, 2003b).

Les AHL induisent généralement la dimérisation et, donc, l'activation des régulateurs transcriptionnels de type LuxR responsable de leur association à la boîte *lux* (Fuqua *et al.*, 2002). C'est notamment le cas pour les régulateurs transcriptionnels qui agissent en présence

d'AHL (Fig. 1.8). Toutefois, les AHL peuvent provoquer la monomérisation et, par conséquent, l'inactivation de certains régulateurs transcriptionnels de type LuxR résultant en leur dissociation de la boîte *lux* (Tsai *et al.*, 2010). C'est notamment le cas pour les régulateurs transcriptionnels qui agissent en absence d'AHL (Fig. 1.8).

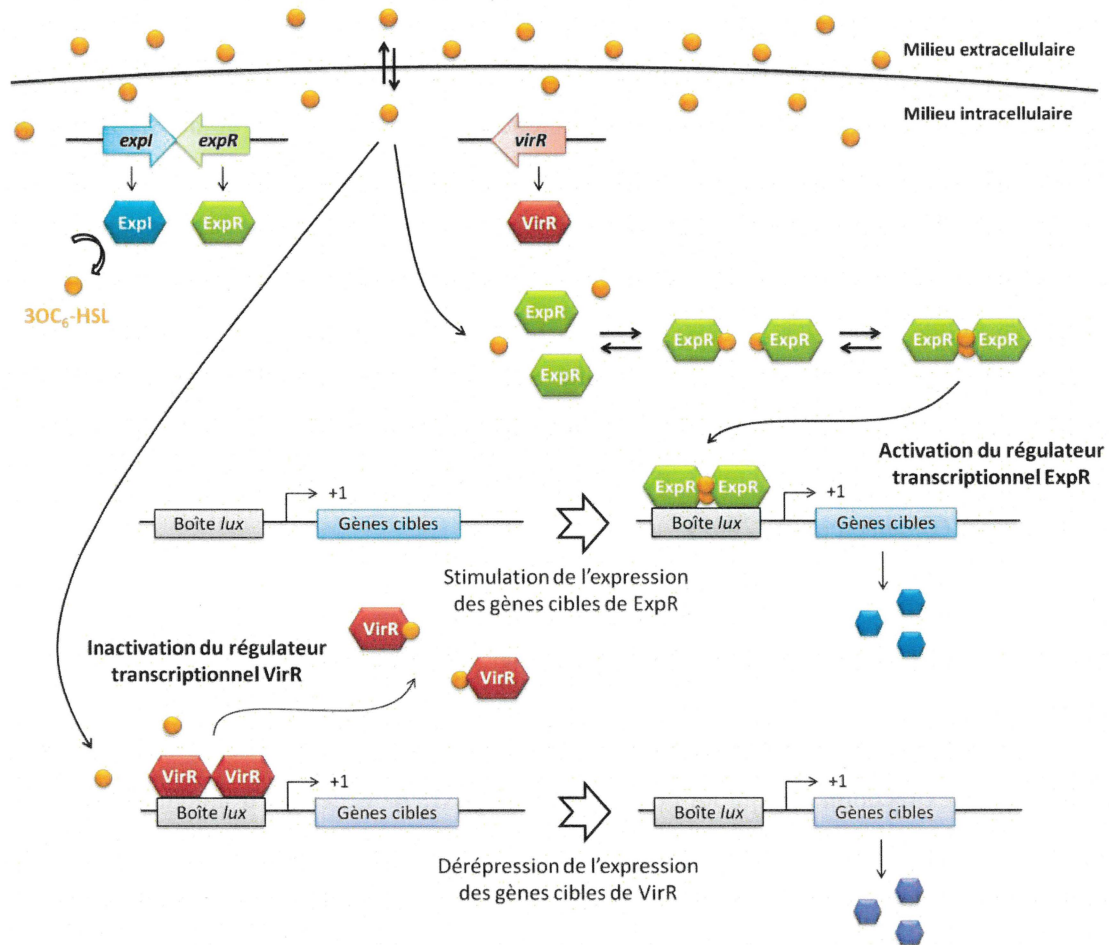


Figure 1.8. Mécanisme de régulation de l'expression des gènes cibles du quorum sensing chez le pathogène de la pomme de terre *P. atrosepticum*.

P. atrosepticum possède une synthèse de type LuxI, appelée ExpI, qui synthétise essentiellement de la 3OC₆-HSL (Chatterjee *et al.*, 2005). Cette AHL interagit avec le régulateur transcriptionnel de type LuxR, appelé ExpR, induisant sa dimérisation et sa liaison à l'ADN et, en conséquence, l'activation de l'expression des gènes cibles du quorum sensing parmi lesquels figurent, notamment, le gène *expl*, qui code la synthèse ExpI, résultant en une boucle d'auto-induction typique des systèmes de quorum sensing (Liu *et al.*, 2008). Par ailleurs, la 3OC₆-HSL interagit avec un autre régulateur transcriptionnel de type LuxR, appelé VirR, ce qui entraîne, au contraire, sa monomérisation et sa dissociation de l'ADN et, donc, la levée de l'inhibition exercée sur l'expression des gènes cibles du quorum sensing, qui incluent, en particulier, les gènes de virulence essentiels à la pathogénicité de *P. atrosepticum* (Monson *et al.*, 2013). L'hypothèse est que le régulateur transcriptionnel VirR bloque la production des facteurs de virulence tels que les enzymes dégradatives des parois pectocellulosiques de la pomme de terre, à savoir, les pectinases, les cellulases et les protéases jusqu'à ce que *P. atrosepticum* soit en nombre suffisant pour pouvoir surmonter les réactions de défense de la pomme de terre qui peuvent être déclenchées en réponse à la décomposition des parois pectocellulosiques.

1.2. La communication intercellulaire chez la bactérie *P. aeruginosa*

1.2.1. *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste de l'Homme

P. aeruginosa est une bactérie versatile et ubiquitaire rencontrée dans des milieux très variés comme, par exemple, les sols ainsi que les eaux douces, usées et marines (Stover *et al.*, 2000). Elle est également capable d'infecter un large spectre d'hôtes tels que les insectes (*Drosophila melanogaster*), les mammifères (*Mus musculus*), les protozoaires (*Dictyostelium discoideum*), les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) et les plantes (*Arabidopsis thaliana*). Chez l'Homme, *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste puisqu'elle peut interagir avec un hôte, soit comme commensal à la surface de la peau et des muqueuses chez les sujets sains, soit comme pathogène chez les sujets aux défenses immunitaires altérées tels que les individus immunodéprimés (Costerton, 2001, Lyczak *et al.*, 2000). Elle constitue une des causes majeures de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de fibrose kystique (Govan *et al.*, 1996), et elle est, par ailleurs, fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales en raison, notamment, de sa résistance naturelle à de nombreux antiseptiques et antibiotiques (Emerson *et al.*, 2002).

1.2.2. La pathogénicité de *P. aeruginosa* est multifactorielle

La pathogénicité de *P. aeruginosa* est attribuée à de multiples facteurs de virulence cellulaires et extracellulaires qui lui permettent de survivre dans des environnements variés et de coloniser divers types d'hôtes (de Kievit *et al.*, 2000, Van Delden *et al.*, 1998). Ces facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes de l'infection de l'hôte : ils interviennent dans l'attachement de la bactérie ou dans la multiplication et dans l'invasion de l'hôte (**Fig. 1.9**).

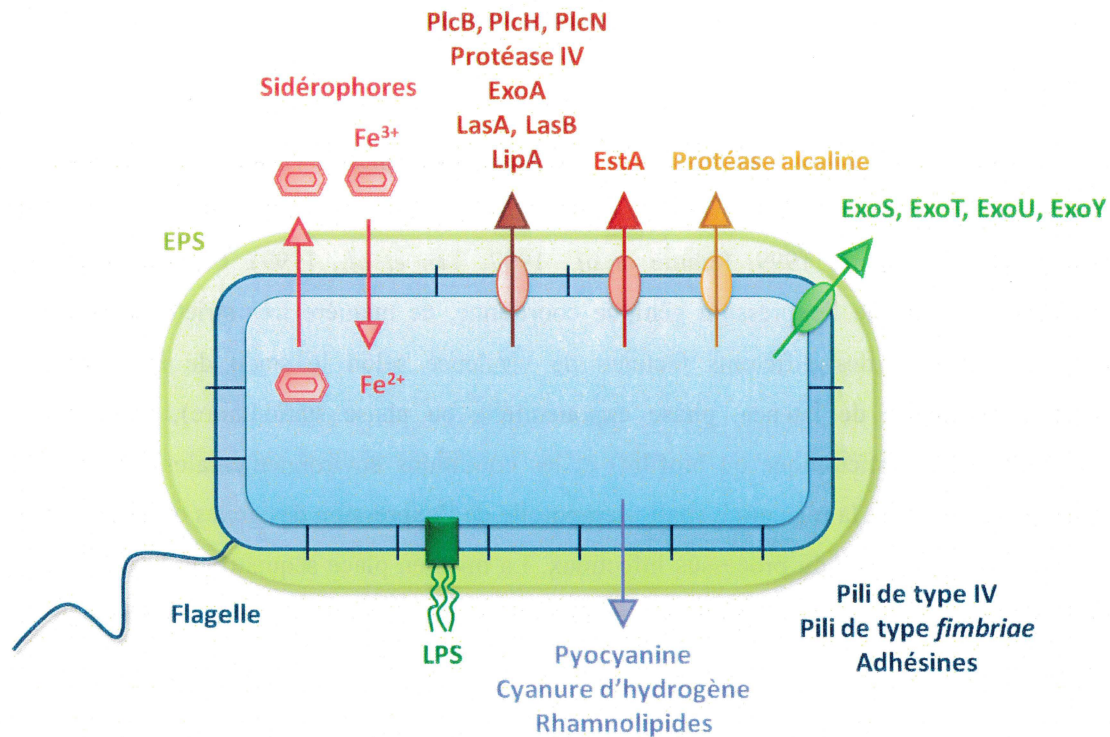


Figure 1.9. Principaux facteurs de virulence cellulaires et extracellulaires de *P. aeruginosa*.

Les facteurs de virulence cellulaires incluent, notamment, le flagelle, les pili de type IV, les pili de type *fimbriae*, les adhésines, le lipopolysaccharide (LPS) et les exopolysaccharides (EPS). Ils interviennent principalement dans la mobilité et dans l'adhésion de la bactérie. Les facteurs de virulence extracellulaires incluent, notamment, des toxines telles que l'exotoxine A (ExoA), des exoenzymes (ExoS, ExoT, ExoU et ExoY), des enzymes protéolytiques telles que la protéase staphylolytique LasA, l'élastase LasB, la protéase IV et la protéase alcaline, des enzymes lipolytiques telles que la lipase LipA, l'estérase EstA et les phospholipases C (PlcN, PlcB et PlcH), des hémolysines telles que les rhamnolipides, le cyanure d'hydrogène, des sidérophores tels que la pyoverdine et la pyochéline et des phénazines telles que la pyocyanine. Ils sont principalement impliqués dans la dissémination de la bactérie et dans la perturbation ou la destruction des défenses de l'hôte. D'après Van Delden *et al.* (1998).

La pathogénicité de *P. aeruginosa* repose non seulement sur la multiplicité des facteurs de virulence qu'elle possède mais également sur la coordination très stricte de l'expression des différents gènes de virulence au cours du processus infectieux. De nombreux mécanismes de régulation de l'expression génique ont été décrits chez *P. aeruginosa*, toutefois, il apparaît que le *quorum sensing* intervient principalement dans la modulation de l'expression des gènes de virulence de cette bactérie (Antunes *et al.*, 2010, Le Berre *et al.*, 2006, Ruimy *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 2003).

1.2.3. Le *quorum sensing* joue un rôle déterminant dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, l'expression de la majorité des gènes de virulence est modulée, en fonction de la densité cellulaire, via le *quorum sensing* (Cao *et al.*, 2001, Jander *et al.*, 2000, Mahajan-Miklos *et al.*, 1999, Rahme *et al.*, 1997, Tan *et al.*, 1999). Ce mécanisme de régulation globale de l'expression génique coordonne, de manière très stricte, la synthèse et/ou la sécrétion des différents facteurs de virulence selon le stade de la croissance bactérienne (phase de latence, phase exponentielle ou phase stationnaire), le mode de développement (planctonique ou biofilm) et les conditions environnementales. Le *quorum sensing* assure, ainsi, la régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes de virulence de *P. aeruginosa* au cours du processus infectieux. La mise en place séquentielle des différents facteurs de virulence qui en résulte est essentielle à une infection optimale et adéquate de l'hôte (Fig. 1.10).

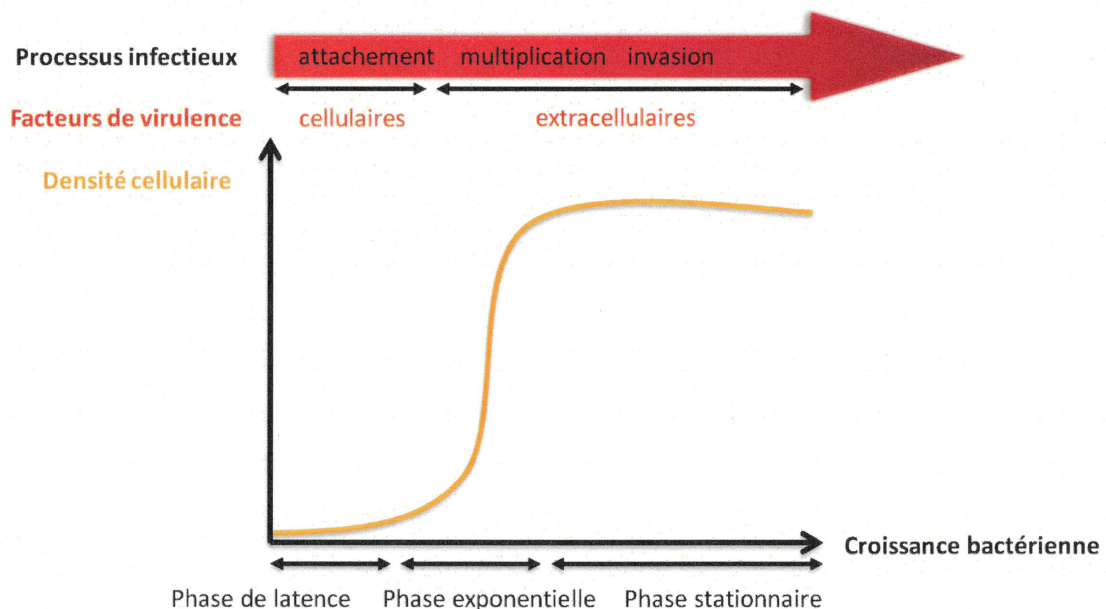


Figure 1.10. Mise en place séquentielle des différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa* au cours du processus infectieux.

Les facteurs de virulence cellulaires qui sont impliqués dans l'attachement de la bactérie interviennent dans les étapes précoces de l'infection de l'hôte. À l'inverse, les facteurs de virulence extracellulaires qui sont impliqués dans la multiplication et dans l'invasion de l'hôte interviennent dans les étapes tardives du processus infectieux. D'après Lautier *et al.* (2005).

De nombreux systèmes de communication intercellulaire ont été caractérisés chez *P. aeruginosa*. Parmi eux figurent notamment les systèmes de *quorum sensing las*, *rhl* et *pqs* (Diggle *et al.*, 2006a, Dubern *et al.*, 2008, Jimenez *et al.*, 2012, Le Berre *et al.*, 2006, Ruimy *et al.*, 2004). Ces systèmes de régulation impliquent des auto-inducteurs différents : les systèmes *las* et *rhl* utilisent des auto-inducteurs appartenant à la famille des AHL, alors que le système *pqs* emploie des auto-inducteurs qui appartiennent à la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ).

1.2.3.1. Les AHL sont les auto-inducteurs des systèmes *las* et *rhl*

Les systèmes *las* et *rhl* interviennent dans la modulation de l'expression de 6 à 11% des gènes de *P. aeruginosa* (Hentzer *et al.*, 2003, Schuster *et al.*, 2003, Wagner *et al.*, 2003, Whiteley *et al.*, 1999) qui incluent de nombreux gènes de virulence cellulaires et surtout extracellulaires (Fig. 1.11).

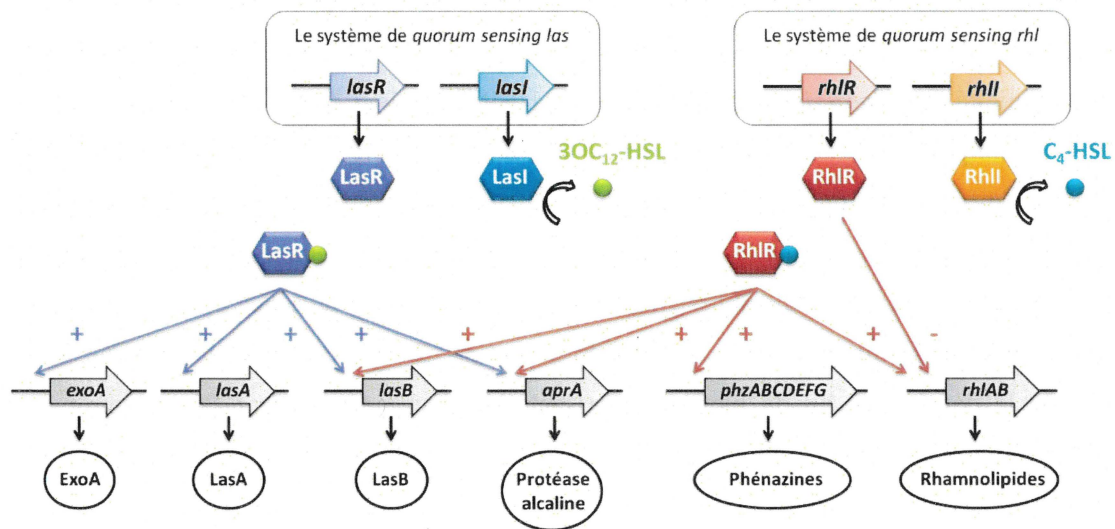


Figure 1.11. Exemples de gènes de virulence contrôlés par les systèmes *las* et/ou *rhl*.
D'après Ruimy *et al.* (2004).

Les systèmes *las* et *rhl* jouent un rôle clé dans l'optimisation de l'expression de ces gènes de virulence puisque l'absence du système *las* et/ou du système *rhl* se traduit par une forte altération de la synthèse et/ou de la sécrétion des facteurs de virulence et résulte en une réduction drastique du pouvoir pathogène de *P. aeruginosa* (Lesprit *et al.*, 2003, Pearson *et*

al., 2000, Rumbaugh *et al.*, 1999, Smith *et al.*, 2002, Tan *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 1996, Wu *et al.*, 2001).

1.2.3.1.1. Le système *las*

Le système *las* est composé de la synthase LasI, qui synthétise de la 3OC₁₂-HSL (cf. la **Figure 1.4** présentée à la section 1.1.3.1), et du régulateur transcriptionnel LasR. Ce régulateur transcriptionnel, en association avec la 3OC₁₂-HSL, module l'expression de nombreux gènes de virulence tels que les gènes *lasA* et *lasB*, codant respectivement la protéase staphylolytique LasA et l'élastase LasB (Gambello *et al.*, 1991, Gambello *et al.*, 1993, Passador *et al.*, 1993, Pearson *et al.*, 1997, Toder *et al.*, 1991) (cf. la **Figure 1.11** présentée à la section 1.2.3.1). Outre les gènes de virulence, le complexe LasR/3OC₁₂-HSL contrôle positivement et directement l'expression du gène *lasI*, qui code la synthase LasI, créant, ainsi, une boucle de rétroaction positive du système *las* (Seed *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'expression du gène *lasI* est contrôlée négativement et indirectement *via* le complexe LasR/3OC₁₂-HSL par l'intermédiaire de la protéine RsaL responsable d'une boucle de rétroaction négative du système *las* (**Fig. 1.12**). La protéine RsaL joue un rôle crucial dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* (de Kievit *et al.*, 1999, Rampioni *et al.*, 2006, Rampioni *et al.*, 2007a, Rampioni *et al.*, 2007b, Rampioni *et al.*, 2009, Venturi *et al.*, 2011). Cette protéine réprime, directement ou bien indirectement, la synthèse et/ou la sécrétion de nombreux facteurs de virulence comme, par exemple, la pyocyanine, les rhamnolipides et le cyanure d'hydrogène nécessaires à l'établissement d'une infection aiguë telle que chez les individus immunodéprimés (Furukawa *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2003). En outre, la protéine RsaL stimule le développement du biofilm favorisant l'établissement d'une infection chronique telle que chez les patients atteints de fibrose kystique (Furukawa *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2000).

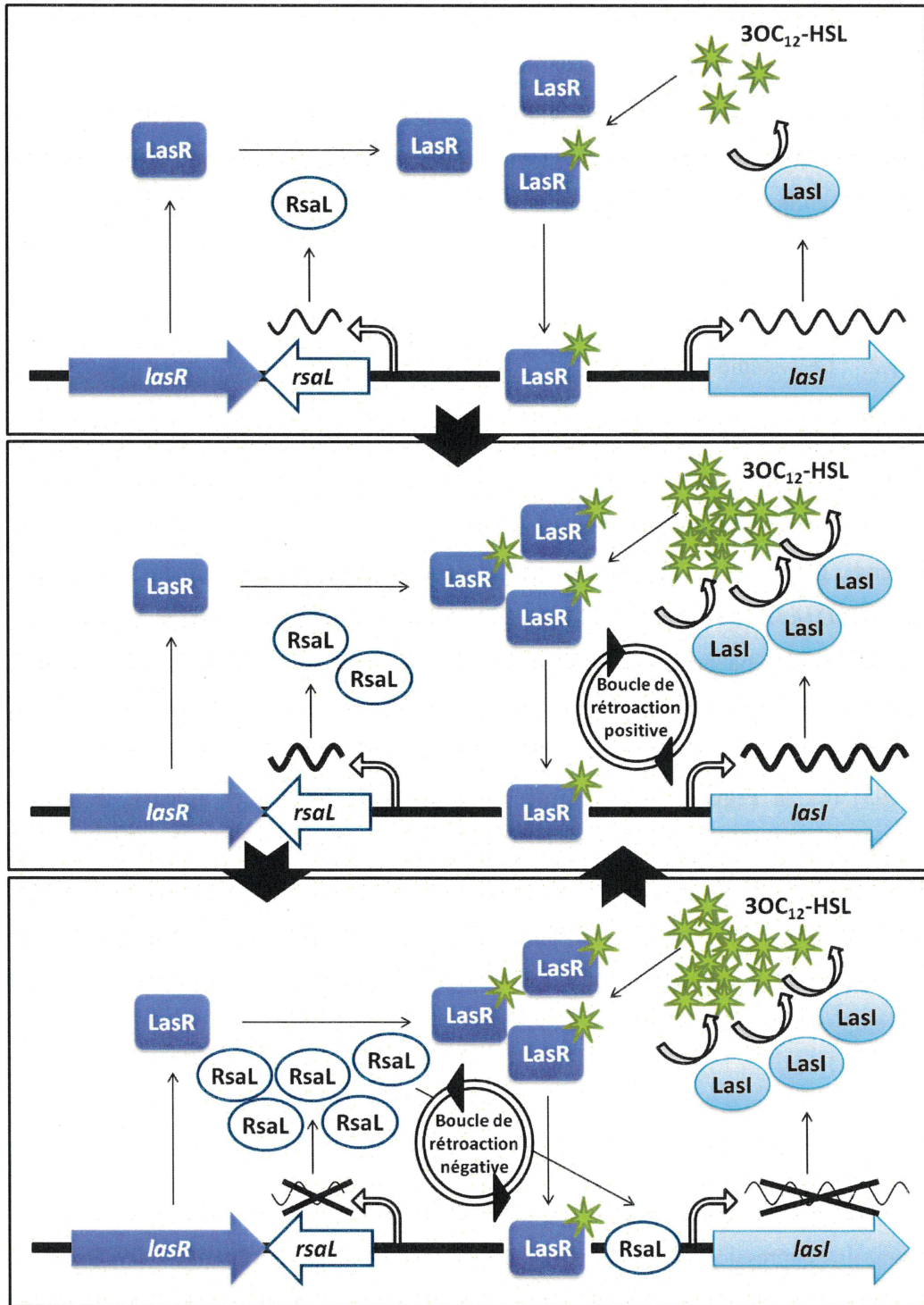


Figure 1.12. La protéine RsaL est un répresseur du système *las*.

Le complexe LasR/3OC₁₂-HSL stimule directement l'expression du gène *lasI*, qui code la synthèse LasI responsable de la biosynthèse de la 3OC₁₂-HSL, induisant, de ce fait, une boucle de rétroaction positive du système *las*. Par ailleurs, le complexe LasR/3OC₁₂-HSL active la transcription du gène *rsaL*, codant la protéine RsaL, et cette protéine inhibe la transcription du gène *lasI* assurant, en conséquence, une production homéostatique de la 3OC₁₂-HSL. En outre, l'expression du gène *rsaL* est auto-régulée négativement. Ainsi, le complexe LasR/3OC₁₂-HSL réprime indirectement l'expression du gène *lasI* par l'intermédiaire de la protéine RsaL, résultant en une boucle de rétroaction négative du système *las*. D'après Venturi *et al.* (2011).

D'autres espèces bactériennes du genre *Pseudomonas* possèdent également un homologue du gène *rsaL* comme, par exemple, les bactéries *Pseudomonas fuscovaginae* et *Pseudomonas putida* chez lesquelles la protéine RsaL constitue pareillement un répresseur du *quorum sensing* (Bertani *et al.*, 2004, Dubern *et al.*, 2006, Mattiuzzo *et al.*, 2011, Rampioni *et al.*, 2012, Steidle *et al.*, 2002, Venturi *et al.*, 2011) (cf. la **Figure 1.20** présentée à la section 1.3.2.2.2).

1.2.3.1.2. Le système *rhl*

Le système *rhl* est composé de la synthase RhlI, qui synthétise de la C₄-HSL (cf. la **Figure 1.4** présentée à la section 1.1.3.1), et du régulateur transcriptionnel RhlR. Ce régulateur transcriptionnel, en association ou non avec la C₄-HSL, module l'expression de nombreux gènes de virulence parmi lesquels figurent, notamment, les opérons *phzA1B1C1D1E1F1G1* et *phzA2B2C2D2E2F2G2*, qui codent les enzymes nécessaires à la production des phénazines, ainsi que l'opéron *rhlAB*, codant les enzymes nécessaires à la biosynthèse des rhamnolipides (Brint *et al.*, 1995, Latifi *et al.*, 1996, Latifi *et al.*, 1995, Medina *et al.*, 2003b, Ochsner *et al.*, 1995, Pearson *et al.*, 1995, Pessi *et al.*, 2000, Winson *et al.*, 1995) (cf. la **Figure 1.11** présentée à la section 1.2.3.1). Par ailleurs, le régulateur transcriptionnel RhlR stimule, en présence de C₄-HSL, l'expression du gène *rhlI*, qui code la synthase RhlI, induisant, en conséquence, une boucle de rétroaction positive du système *rhl* (Latifi *et al.*, 1995, Ochsner *et al.*, 1994) et réprime, en absence de C₄-HSL, l'expression du gène *rhlR*, codant le régulateur transcriptionnel RhlR, résultant en une boucle de rétroaction négative du système *rhl* (Medina *et al.*, 2003a).

1.2.3.1.3. Les systèmes *las* et *rhl* sont interdépendants

L'expression des gènes *rhlI* et *rhlR* est activée *via* le complexe LasR/3OC₁₂-HSL induisant une expression successive des systèmes *las* et *rhl* (Gilbert *et al.*, 2009, Latifi *et al.*, 1996, Pesci *et al.*, 1997) et la 3OC₁₂-HSL est capable de dissocier les homodimères de RhlR (Ventre *et al.*, 2003) (**Fig. 1.13**). De plus, le complexe RhlR/C₄-HSL stimule la transcription du gène *lasI* (Dekimpe *et al.*, 2009) et la C₄-HSL est capable, dans une moindre mesure, d'induire la formation des homodimères de LasR (Pearson *et al.*, 1997) (**Fig. 1.13**).

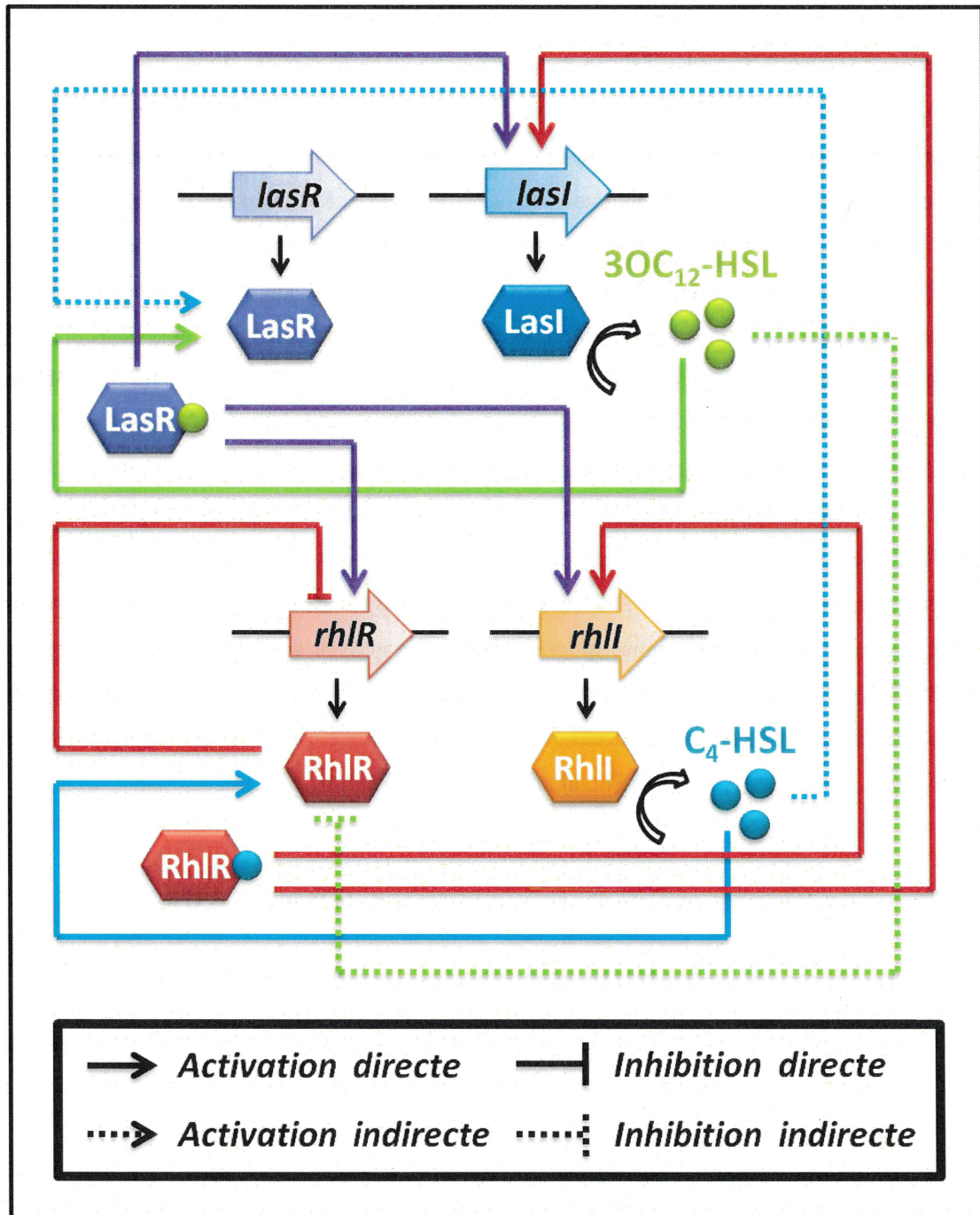


Figure 1.13. Interactions entre les systèmes *las* et *rhl* chez *P. aeruginosa*.
 D'après Dekimpe *et al.* (2009).

1.2.3.1.4. Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR orphelins QscR et VqsR

D'autres régulateurs transcriptionnels de type LuxR ont été identifiés chez *P. aeruginosa* parmi lesquels figurent, en particulier, les régulateurs transcriptionnels orphelins

QscR (*quorum sensing control repressor*) et VqsR (*virulence and quorum sensing regulator*), qui sont essentiels à la pathogénicité de *P. aeruginosa* (Juhás *et al.*, 2005, Le Berre *et al.*, 2006, Patankar *et al.*, 2009, Venturi, 2006). Ces régulateurs transcriptionnels ne sont pas, à proprement parler, constitutifs d'un système de *quorum sensing* et ne possèdent pas d'auto-inducteur propre. Toutefois, le régulateur transcriptionnel QscR est capable d'interagir avec la 3OC₁₂-HSL et active, entre autres, l'expression du gène *qscR* (Ha *et al.*, 2012, Ledgham *et al.*, 2003). Le régulateur transcriptionnel QscR inhibe également les systèmes *las* et *rhl* en formant des hétérodimères respectivement avec les régulateurs transcriptionnels LasR et RhlR empêchant, ainsi, l'activation de l'expression des gènes contrôlés par les complexes LasR/3OC₁₂-HSL et RhlR/C₄-HSL (Chugani *et al.*, 2001, Ledgham *et al.*, 2003, Lequette *et al.*, 2006). Le régulateur transcriptionnel VqsR, en revanche, n'interagit pas avec la 3OC₁₂-HSL et réprime directement l'expression du gène *qscR*, codant le régulateur transcriptionnel QscR, stimulant, de ce fait, indirectement l'expression des gènes sous le contrôle des systèmes *las* et *rhl* (Juhás *et al.*, 2004, Liang *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'expression du gène *vqsR*, qui code le régulateur transcriptionnel VqsR, est activée directement par le complexe LasR/3OC₁₂-HSL (Li *et al.*, 2007). *In fine*, les régulateurs transcriptionnels orphelins QscR et VqsR contribuent à l'expression successive des systèmes *las* et *rhl* chez *P. aeruginosa* (Juhás *et al.*, 2005, Le Berre *et al.*, 2006, Patankar *et al.*, 2009, Venturi, 2006).

1.2.3.2. Le système *pqs* emploie des auto-inducteurs de la famille des HAQ

1.2.3.2.1. Le HHQ et le PQS sont les principaux auto-inducteurs du système *pqs*

Le système *pqs* utilise des auto-inducteurs appartenant à la famille des HAQ (Fig. 1.14). *P. aeruginosa* synthétise une cinquantaine de HAQ (Déziel *et al.*, 2004, Lépine *et al.*, 2003, Lépine *et al.*, 2004). Néanmoins, le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) et le 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline, appelé *Pseudomonas quinolone signal* (PQS), constituent les principaux auto-inducteurs du système *pqs* (Déziel *et al.*, 2004, Pesci *et al.*, 1999, Xiao *et al.*, 2006a).

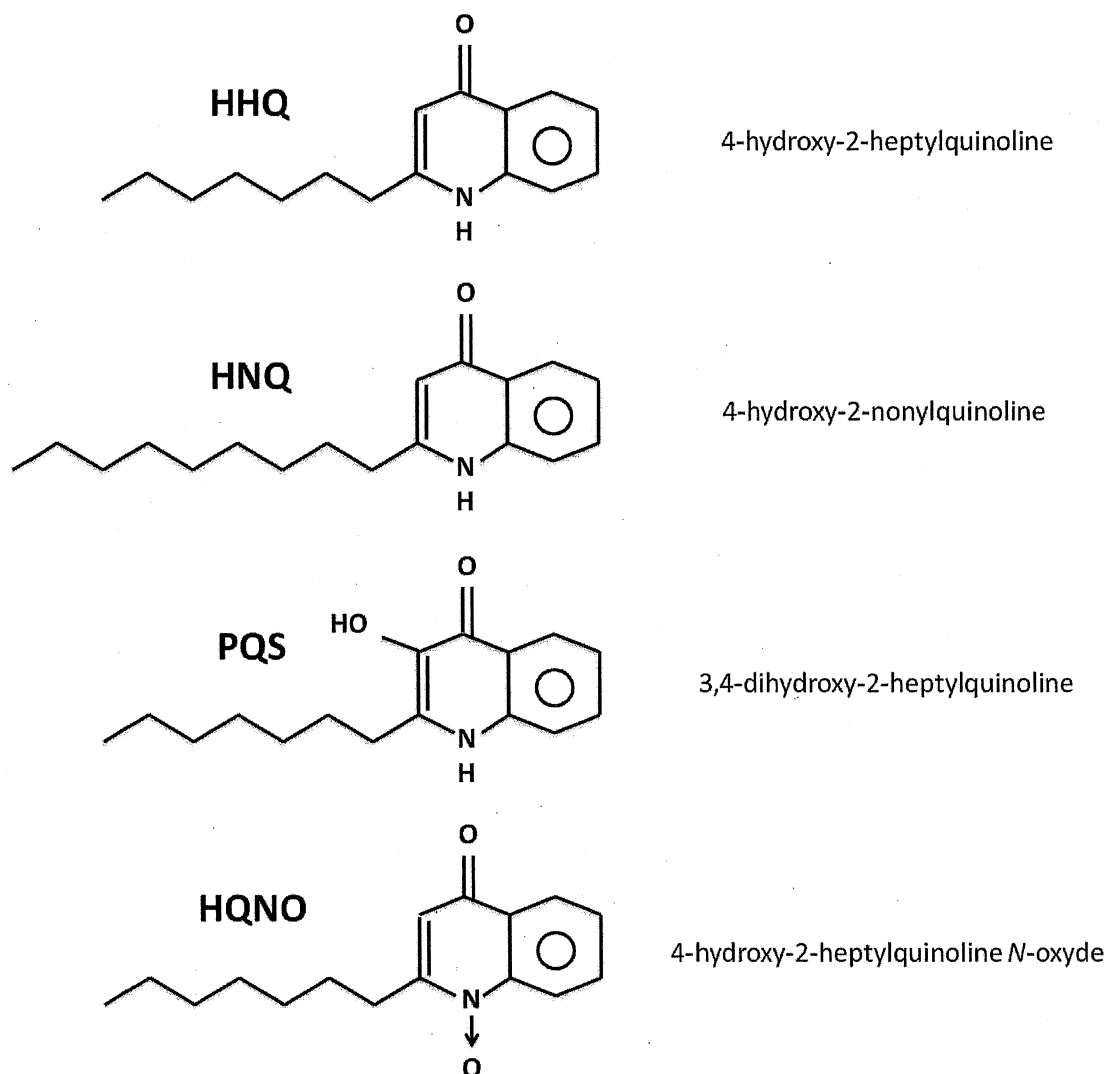


Figure 1.14. Structure chimique des HAQ.

Les HAQ présentent des analogies de structure avec les antibiotiques de la famille des quinolones (Heeb *et al.*, 2011). Elles se distinguent généralement par la longueur et/ou l'insaturation, en position 1', de la chaîne alkyle qui les compose. Citons, par exemple, le HHQ et le 4-hydroxy-2-nonylquinoline (HNQ). Ces HAQ peuvent également être hydroxylées comme, par exemple, le PQS ou *N*-oxydées à l'image du 4-hydroxy-2-heptylquinoline *N*-oxyde (HQNO). D'après Déziel *et al.* (2004).

Outre leur rôle dans la communication intercellulaire chez *P. aeruginosa*, de nombreuses fonctions additionnelles ont été attribuées aux HAQ (Heeb *et al.*, 2011). Elles sont reconnues, notamment, pour leurs propriétés antimicrobiennes (Déziel *et al.*, 2004), de même que pour leur propriétés anti-respiratoires (Fugere *et al.*, 2014, Hoffman *et al.*, 2006, Mitchell *et al.*, 2010). Ces propriétés peuvent fournir un avantage compétitif vis-à-vis d'espèces bactériennes, telles que la bactérie à Gram positif *S. aureus*, qui colonisent une même niche écologique comme, par exemple, les poumons de patients atteints de fibrose

kystique où l'on retrouve fréquemment *P. aeruginosa*. Les HAQ possèdent également des activités immunomodulatrices qui leur permettent d'interférer avec les réponses du système immunitaire de l'Homme (Hooi *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2010, Skindersoe *et al.*, 2009). Toutes ces fonctions sont nécessaires à l'établissement d'une infection optimale et adéquate et confèrent au système *pqs* un rôle essentiel au cours du processus infectieux.

1.2.3.2.2. Les HAQ dérivent de l'acide anthranilique

L'acide anthranilique constitue le précurseur des différentes HAQ produites par *P. aeruginosa* (Calfée *et al.*, 2001, Cao *et al.*, 2001, Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002). L'acide anthranilique est synthétisé, soit à partir de l'acide chorismique *via* les voies métaboliques des anthranilate synthases PhnAB et TrpEG, soit à partir du tryptophane *via* la voie métabolique de la kynurénine KynABU (Essar *et al.*, 1990a, Essar *et al.*, 1990b, Farrow *et al.*, 2007, Kurnasov *et al.*, 2003, Palmer *et al.*, 2013) (**Fig. 1.15**).

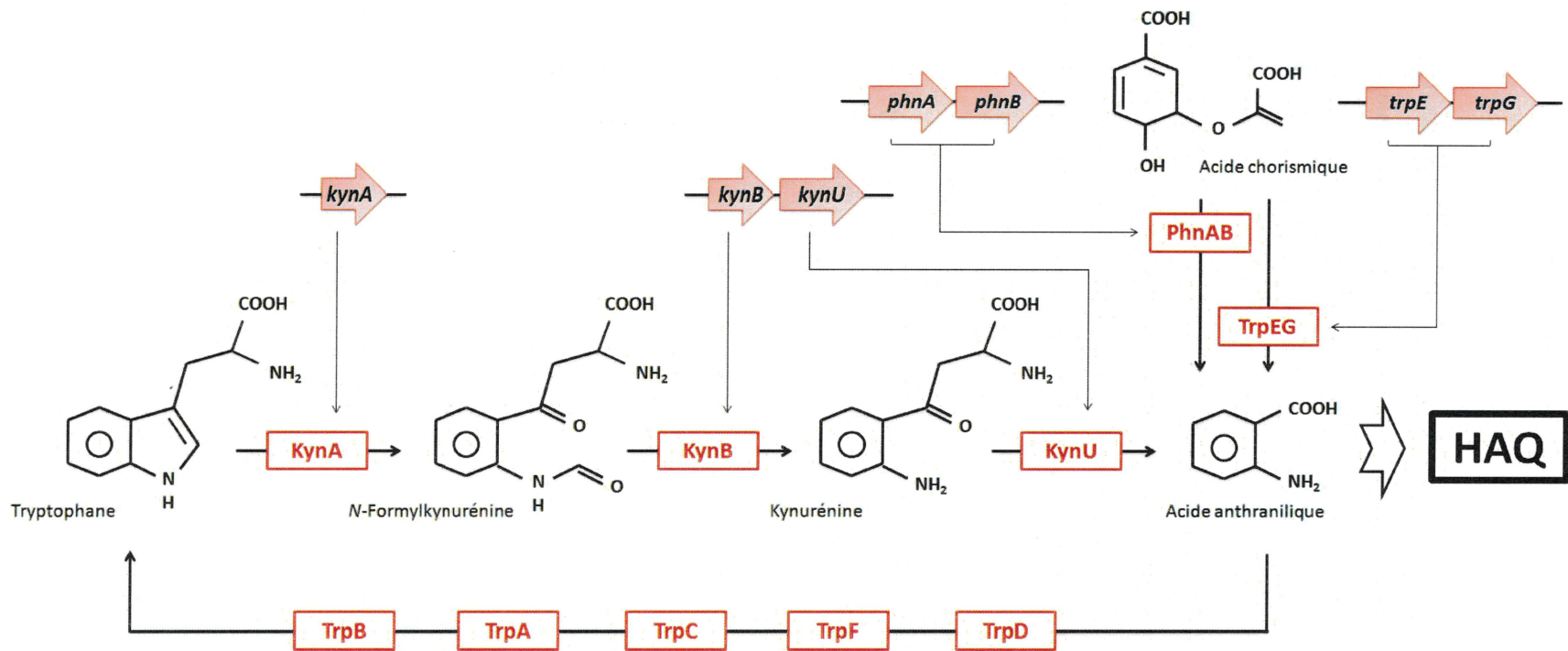


Figure 1.15. Les différentes voies de biosynthèse de l'acide anthranilique chez *P. aeruginosa*.

Les gènes *phnA* et *phnB* codent respectivement les sous-unités α et β de l'antranilate synthase PhnAB constitutive de la voie métabolique PhnAB responsable de la biosynthèse de l'acide anthranilique, à partir de l'acide chorismique, nécessaire à la production des diverses HAQ retrouvées chez *P. aeruginosa*. Les gènes *trpE* et *trpG* codent respectivement les sous-unités α et β de l'antranilate synthase TrpEG constitutive de la voie métabolique TrpEG qui intervient aussi, à partir de l'acide chorismique, dans la biosynthèse de l'acide anthranilique. L'acide anthranilique provenant de la voie métabolique TrpEG constitue également un intermédiaire de la production du tryptophane. Les gènes *kynA*, *kynB* et *kynU* codent respectivement la tryptophane 2,3-dioxygénase KynA, la kynurénine formamidase KynB et la kynuréninase KynU de la voie métabolique KynABU impliquée dans la dégradation du tryptophane en acide anthranilique. D'après Heeb *et al.* (2011).

1.2.3.2.3. L'opéron *pqsABCDE* code les principales enzymes nécessaires à la biosynthèse des différentes HAQ identifiées chez *P. aeruginosa*

Une mutagenèse transpositionnelle aléatoire du génome de *P. aeruginosa* PAO1 a permis d'identifier les gènes codant les principales enzymes impliquées dans la biosynthèse des HAQ (Gallagher *et al.*, 2002). Parmi ces gènes figurent notamment les gènes *pqsA*, *pqsB*, *pqsC*, *pqsD* et *pqsE* qui sont regroupés au sein d'un opéron, appelé *pqsABCDE* (Gallagher *et al.*, 2002, McGrath *et al.*, 2004). D'autres gènes, localisés ailleurs sur le génome de *P. aeruginosa* PAO1, codent des enzymes qui interviennent également dans la production des HAQ. Ces gènes incluent, en particulier, les gènes *pqsH* et *pqsL* (D'Argenio *et al.*, 2002, Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002, Lépine *et al.*, 2004). Tous ces gènes participent à la biosynthèse des différentes HAQ spécifiques de *P. aeruginosa*, à partir de l'acide anthranilique (**Fig. 1.16**).

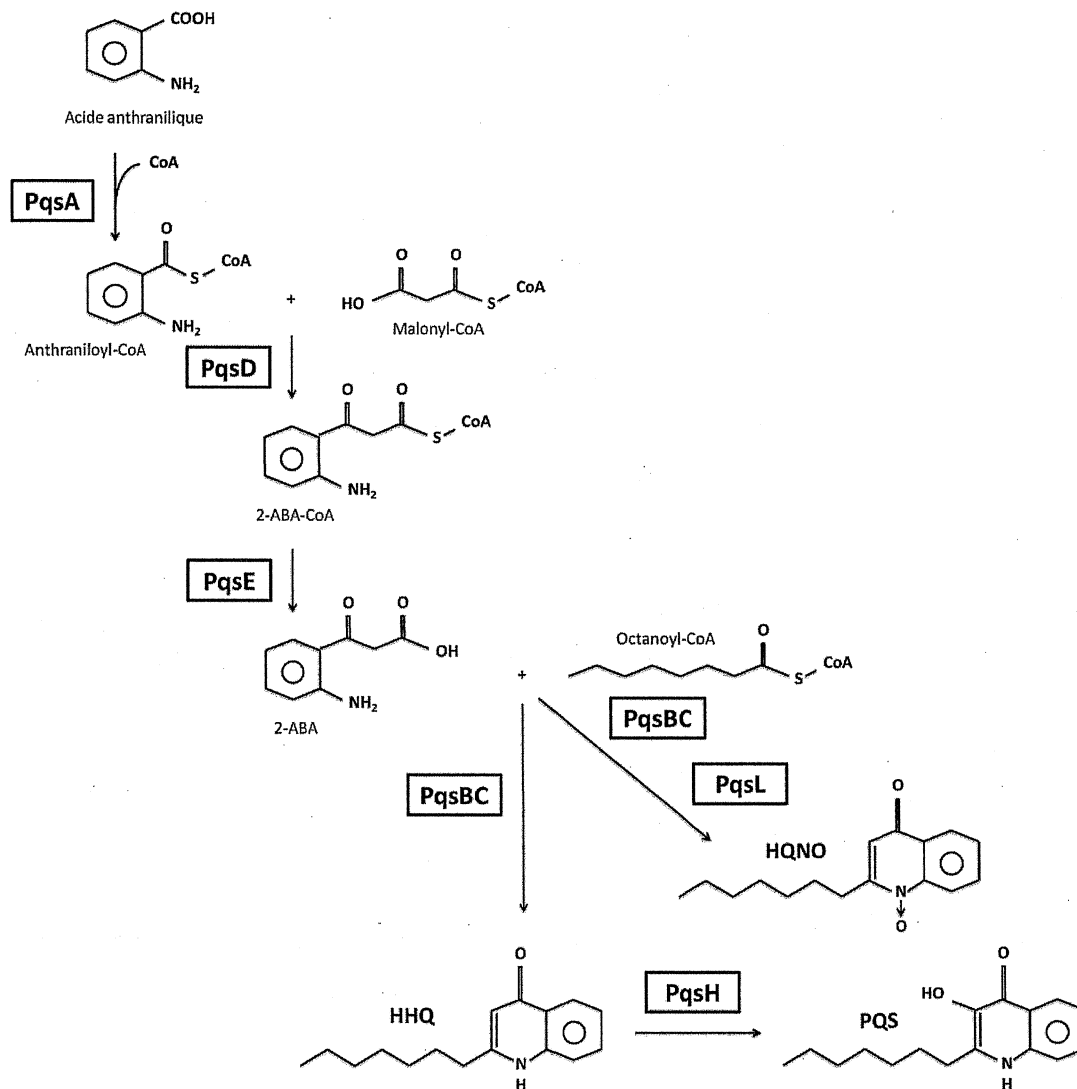


Figure 1.16. Modèle hypothétique de la voie de biosynthèse du HHQ, du PQS et du HQNO à partir de l'acide anthranilique.

Chez *P. aeruginosa*, les enzymes PqsA, PqsD et PqsE catalysent la production des différents intermédiaires de la voie de biosynthèse des HAQ telles que le HHQ, le PQS et le HQNO, qui sont synthétisés à partir de l'acide anthranilique. L'activation de l'acide anthranilique en anthraniloyl-CoA est catalysée par l'anthranilate coenzyme A ligase PqsA (Coleman *et al.*, 2008). PqsD intervient dans la production du 2-aminobenzoylacétyl-CoA (2-ABA-CoA) issu de la condensation de l'anthraniloyl-CoA et d'une molécule de malonyl-CoA, un intermédiaire de la biosynthèse des acides gras (Zhang *et al.*, 2008). PqsE agit comme une thioestérase et catalyse la conversion du 2-ABA-CoA en 2-aminobenzoylacétate (2-ABA) *via* une réaction d'hydrolyse (Drees *et al.*, 2015). Les enzymes PqsB et PqsC assurent la production du HHQ à partir de la condensation du 2-ABA avec une molécule d'octanoyl-CoA, un intermédiaire de la β -oxydation (Dulcey *et al.*, 2013). Le PQS est issu de l'hydroxylation du HHQ qui est catalysée par la mono-oxygénase FAD-dépendante PqsH (Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002). PqsL, une mono-oxygénase FAD-dépendante, synthétise les HAQ *N*-oxydes, telles que le HQNO (D'Argenio *et al.*, 2002, Lépine *et al.*, 2004). D'après Drees *et al.* (2015).

Les protéines PqsA, PqsB, PqsC et PqsD sont essentielles à la biosynthèse des HAQ puisque l'inactivation des gènes *pqsA*, *pqsB*, *pqsC* ou *pqsD* se traduit par une suppression de

la production du HHQ et du PQS (Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002). L'absence de la protéine PqsE, en revanche, n'affecte la production ni du HHQ ni du PQS et n'est donc vraisemblablement pas indispensable à la biosynthèse des HAQ (Déziel *et al.*, 2005, Drees *et al.*, 2015, Farrow *et al.*, 2008, Gallagher *et al.*, 2002, Hazan *et al.*, 2010). L'hypothèse est que des thioestérases alternatives interviennent dans la production du HHQ et du PQS pour compenser l'absence de PqsE (Drees *et al.*, 2015). Toutefois, la surexpression du gène *pqsE* résulte en une boucle de rétroaction négative du système *pqs* caractérisée par une forte baisse de la biosynthèse des HAQ, de même qu'une diminution importante de la transcription de l'opéron *pqsABCDE* via un mécanisme de régulation indéterminé (Folch *et al.*, 2013, Hazan *et al.*, 2010, Rampioni *et al.*, 2016, Rampioni *et al.*, 2010).

1.2.3.2.4. Le régulateur transcriptionnel MvfR contrôle positivement et directement l'expression de l'opéron *pqsABCDE* en association avec le HHQ ou le PQS

L'expression de l'opéron *pqsABCDE*, ainsi que la biosynthèse des HAQ, sont essentiellement sous le contrôle d'un régulateur transcriptionnel de type LysR, appelé MvfR (*multiple virulence factor regulator*) (Cao *et al.*, 2001, Déziel *et al.*, 2005, Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002, McGrath *et al.*, 2004, Wade *et al.*, 2005). L'inactivation du gène *mvfR* (*pqsR*), codant le régulateur transcriptionnel MvfR (PqsR), et localisé à proximité des gènes *pqsA*, *pqsB*, *pqsC*, *pqsD* et *pqsE*, se manifeste par une réduction drastique de la transcription de l'opéron *pqsABCDE* corrélée à une abolition de la production des HAQ (Fig. 1.17).

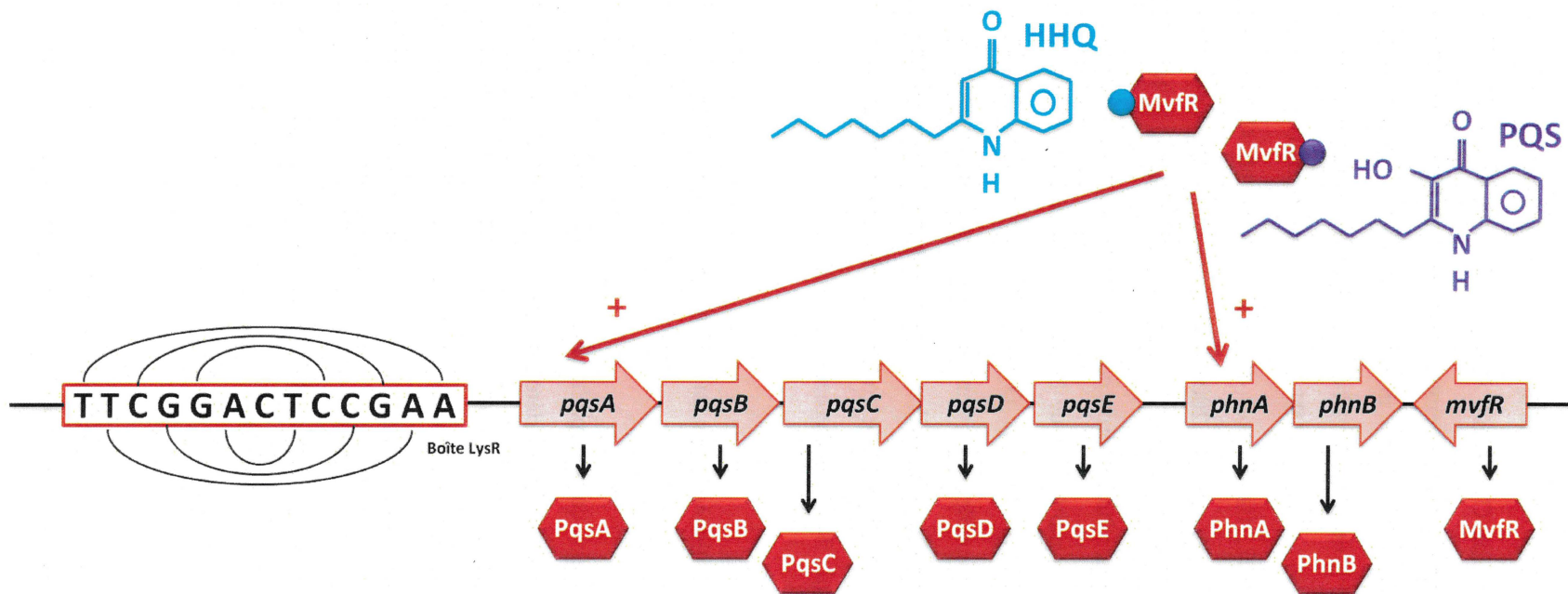


Figure 1.17. Le régulateur transcriptionnel MvfR contrôle positivement et directement l'expression de l'opéron *pqsABCDE* en association avec le HHQ ou le PQS. D'après Xiao *et al.* (2006b).

MvfR est constitué de deux domaines fonctionnellement différents : un domaine N-terminal responsable de la liaison à l'ADN contenant un motif protéique hélice-tour-hélice (HTH) de fixation à l'ADN et un domaine C-terminal impliqué dans la liaison aux HAQ (Maddocks *et al.*, 2008). Les HAQ, et plus particulièrement le HHQ et le PQS, interagissent de manière spécifique avec MvfR (**Fig. 1.17**). Cette interaction provoque un changement conformationnel optimisant, de ce fait, l'affinité de MvfR à l'égard de la région promotrice de l'opéron *pqsABCDE* au niveau d'une séquence d'ADN présentant une symétrie dyadique, appelée boîte LysR (Diggle *et al.*, 2007, Fletcher *et al.*, 2007, Ilangovan *et al.*, 2013, Rampioni *et al.*, 2016, Wade *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 2006a, Xiao *et al.*, 2006b). Cette boîte, constituée d'une dizaine de paires de bases, est située à une quarantaine de paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription de l'opéron *pqsABCDE* (Xiao *et al.*, 2006b). Le HHQ et le PQS agissent donc tels des co-inducteurs de MvfR, engendrant, en conséquence, une boucle de rétroaction positive du système *pqs* (**Fig. 1.17**). Par ailleurs, MvfR, en association avec le HHQ ou le PQS, contrôle positivement et directement l'expression de l'opéron *phnAB* codant l'anthranilate synthase PhnAB qui intervient dans la production de l'acide anthranilique nécessaire à la biosynthèse de toutes les HAQ identifiées chez *P. aeruginosa* (Cao *et al.*, 2001, Déziel *et al.*, 2005, Gallagher *et al.*, 2002).

1.2.3.2.5. L'expression des gènes de virulence cibles du système *pqs* est sous le contrôle de la protéine PqsE

Le système *pqs* joue un rôle crucial dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. À titre d'exemple, le HHQ et le PQS sont communément détectés dans les poumons de patients atteints de fibrose kystique chez lesquels *P. aeruginosa* est responsable d'infections chroniques ou bien parmi les individus immunodéprimés tels que les grands brûlés chez lesquels *P. aeruginosa* provoque des infections aiguës témoignant de l'implication de ces auto-inducteurs dans la virulence bactérienne (Collier *et al.*, 2002, Machan *et al.*, 1992, Murray *et al.*, 2007). En outre, de nombreux modèles d'infection ont permis de démontrer expérimentalement l'importance du système *pqs* dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* (Calfee *et al.*, 2001, Déziel *et al.*, 2005, Gallagher *et al.*, 2002, Hazan *et al.*, 2010, Rampioni *et al.*, 2010, Xiao *et al.*, 2006a).

Le système *pqs* contrôle l'expression d'une large gamme de gènes de virulence comme, par exemple, les opérons *phzA1B1C1D1E1F1G1*, *phzA2B2C2D2E2F2G2*, *rhlAB* et

hcnABC, qui codent respectivement les enzymes nécessaires à la biosynthèse des phénazines, des rhamnolipides et du cyanure d'hydrogène ou encore les gènes *lecA* et *lecB*, codant respectivement les lectines LecA et LecB impliquées dans la formation du biofilm chez *P. aeruginosa* et donc essentielles à l'établissement des interactions hôte-pathogène (Cao *et al.*, 2001, Déziel *et al.*, 2005, Diggle *et al.*, 2003, Gallagher *et al.*, 2002). La protéine PqsE est considérée comme l'effecteur du système *pqs* et contrôle la synthèse et/ou la sécrétion de l'ensemble des facteurs de virulence cibles du système *pqs* via un mécanisme de modulation encore inconnu (Farrow *et al.*, 2008, Folch *et al.*, 2013, Guo *et al.*, 2014, Haussler *et al.*, 2008, Hazan *et al.*, 2010, Rampioni *et al.*, 2016, Rampioni *et al.*, 2010).

1.2.3.3. Les systèmes *las*, *rhl* et *pqs* de *P. aeruginosa* agissent de façon concertée via un réseau de régulation hiérarchisé

Les systèmes *las*, *rhl* et *pqs* coopèrent de manière dynamique et interviennent successivement dans la régulation de l'expression des gènes de virulence cellulaires et extracellulaires de *P. aeruginosa* qui sont, ainsi, exprimés différemment au cours des étapes précoces et tardives du processus infectieux (Juhás *et al.*, 2005, Le Berre *et al.*, 2006, Venturi, 2006). Les systèmes *las* et *rhl* agissent directement sur l'expression de l'opéron *pqsABCDE* et indirectement via le régulateur transcriptionnel MvfR (Brouwer *et al.*, 2014, Gilbert *et al.*, 2009, McGrath *et al.*, 2004, McKnight *et al.*, 2000, Wade *et al.*, 2005, Wurtzel *et al.*, 2012, Xiao *et al.*, 2006b). L'expression du gène *pqsH*, qui code la mono-oxygénase FAD-dépendante PqsH responsable de la conversion du HHQ en PQS chez *P. aeruginosa* (cf. la **Figure 1.16** présentée à la section 1.2.3.2.3), est également sous le contrôle des régulateurs transcriptionnels LasR et RhlR assurant une production successive de ces auto-inducteurs (Dekimpe *et al.*, 2009, Déziel *et al.*, 2004, Diggle *et al.*, 2003, Gallagher *et al.*, 2002, Lépine *et al.*, 2003). En revanche, ni la biosynthèse des AHL produites via les synthases LasI et RhlI, ni l'expression des gènes *lasI* et *rhlI* ne sont sous le contrôle du système *pqs* (Déziel *et al.*, 2005).

À l'heure actuelle, les systèmes *las*, *rhl* et *pqs* figurent parmi les systèmes de communication intercellulaire les mieux compris et les plus étudiés (Diggle *et al.*, 2006a, Dubern *et al.*, 2008, Jimenez *et al.*, 2012, Le Berre *et al.*, 2006, Ruimy *et al.*, 2004). Pour cette raison, la bactérie *P. aeruginosa* constitue un modèle de référence pour l'analyse de réseaux de régulation complexes chez d'autres espèces bactériennes.

1.3. La communication intercellulaire chez les espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia*

1.3.1. Le genre *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* englobe des espèces bactériennes écologiquement, métaboliquement et morphologiquement diversifiées qui colonisent une large gamme d'habitats incluant les sols, les eaux, les insectes, les plantes ou encore les animaux (Coenye *et al.*, 2003, Compant *et al.*, 2008, Depoorter *et al.*, 2016, Eberl *et al.*, 2016, Vial *et al.*, 2007, Yabuuchi *et al.*, 1992) (Fig. 1.18). Il existe des bactéries non pathogènes parmi lesquelles figurent notamment les membres du groupe *Pbe* (*plant-associated beneficial and environmental*), des agents zoopathogènes tels que les membres du complexe *Bcc* (*Burkholderia cepacia complex*) et les membres du groupe *Bptm* (*Burkholderia pseudomallei-thailandensis-mallei*) ainsi que des agents phytopathogènes comme, par exemple, les espèces bactériennes *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia andropogonis* et *Burkholderia caryophylli* (Eberl *et al.*, 2016) (Fig. 1.18).

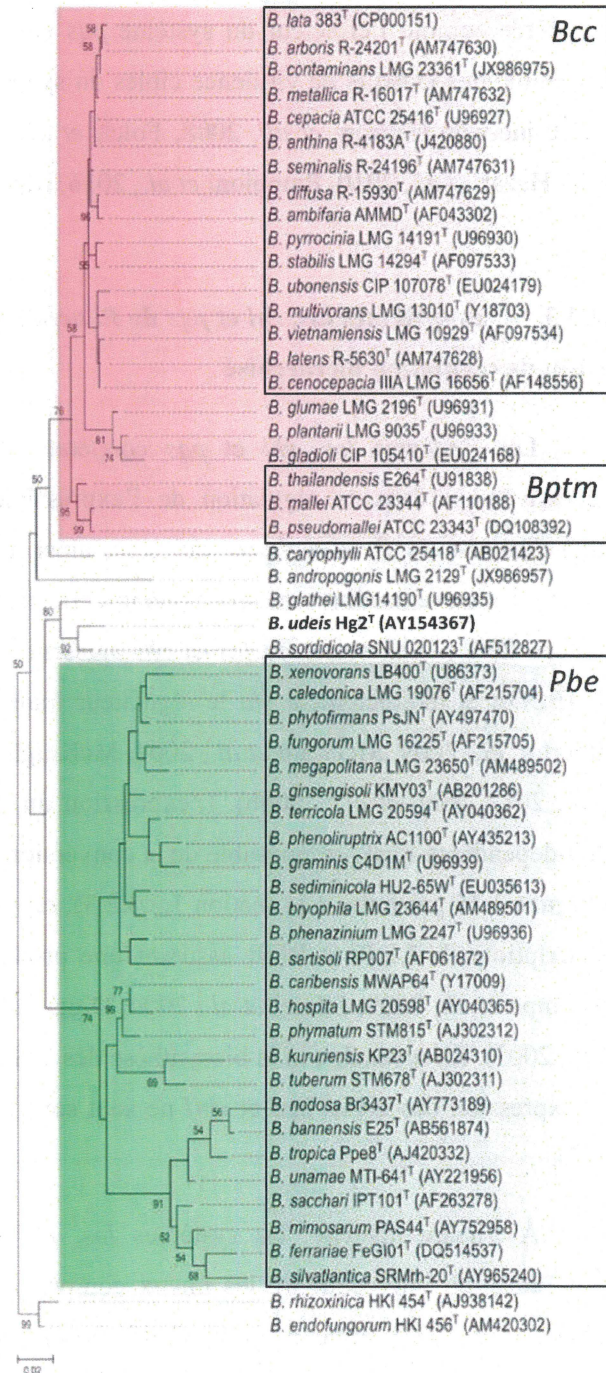


Figure 1.18. Arbre phylogénétique basé sur l'ARNr 16S démontrant la diversité des espèces bactériennes qui appartiennent au genre *Burkholderia*. D'après Eberl *et al.* (2016).

1.3.2. Les espèces bactériennes du genre *Burkholderia* possèdent de multiples systèmes de *quorum sensing* qui utilisent des auto-inducteurs appartenant à la famille des AHL

1.3.2.1. Le *quorum sensing* au sein des membres du groupe *Pbe*

Les bactéries constitutives du groupe *Pbe* sont essentiellement isolées de l'environnement. Elles sont notamment présentes dans les sols où elles interviennent dans la dégradation de composés récalcitrants (les polychlorobiphényles [PCB], les trichloroéthylènes [TCE], les hydrocarbures aromatiques polycycliques [HAP] *etc.*) et, en particulier, au niveau de la rhizosphère des plantes (Coenye *et al.*, 2004, Eberl *et al.*, 2016, Goris *et al.*, 2004, Perez-Pantoja *et al.*, 2013, Suarez-Moreno *et al.*, 2012, Vanlaere *et al.*, 2008). Certaines d'entre elles sont, par ailleurs, capables d'induire la formation de nodules chez les légumineuses, de produire des molécules antifongiques, de fixer l'azote atmosphérique et de promouvoir la croissance des plantes (Caballero-Mellado *et al.*, 2004, Caballero-Mellado *et al.*, 2007, Eberl *et al.*, 2016, Onofre-Lemus *et al.*, 2009, Reis *et al.*, 2004, Suarez-Moreno *et al.*, 2012, Vandamme *et al.*, 2007). Par conséquent, la compréhension des mécanismes de régulation sous-jacents constitue un enjeu majeur pouvant aboutir à des applications biotechnologiques dans de nombreux domaines tels que le biocontrôle, la biofertilisation ou encore la bioremédiation.

La communication intercellulaire, chez les membres du groupe *Pbe*, intervient dans de nombreux processus cellulaires parmi lesquelles figurent la dégradation de composés aromatiques, la colonisation des plantes, la production d'exopolysaccharides et la formation du biofilm (Coutinho *et al.*, 2013, Suarez-Moreno *et al.*, 2012, Suarez-Moreno *et al.*, 2010). Les membres du groupe *Pbe*, à l'image de la bactérie *Burkholderia kururiensis* (cf. la **Figure 1.18** présentée à la section 1.3.1), disposent globalement d'un unique système de *quorum sensing*: le système BraI/BraR. Ce système de régulation est homologue au système LuxI/LuxR et emploie, de ce fait, des auto-inducteurs appartenant à la famille des AHL. D'autre part, certains membres du groupe *Pbe* tels que les espèces bactériennes *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia graminis* ou encore *Burkholderia phytofirmans* contiennent un système de *quorum sensing* supplémentaire (Suarez-Moreno *et al.*, 2012, Suarez-Moreno *et al.*, 2010). Les membres du groupe *Pbe* possèdent aussi des régulateurs transcriptionnels de type LuxR orphelins qui ne sont pas, à proprement parler, constitutifs d'un système de

quorum sensing et, pour cette raison, ne possèdent pas d'auto-inducteur propre (Suarez-Moreno *et al.*, 2012, Suarez-Moreno *et al.*, 2010).

1.3.2.1.1. La 3OC₁₂-HSL est le principal auto-inducteur du système de *quorum sensing* BraI/BraR chez *B. kururiensis*

La synthase BraI est responsable de la biosynthèse de la 3OC₁₂-HSL chez *B. kururiensis* M130 puisque l'inactivation du gène *braI* résulte en une abolition de la production de cette AHL (Suarez-Moreno *et al.*, 2008). BraI catalyse la synthèse d'autres AHL parmi lesquelles figurent notamment la 3OC₆-HSL, la 3OC₈-HSL ainsi que la *N*-(3-oxo-décanoyl)-L-homosérine lactone (3OC₁₀-HSL) (Suarez-Moreno *et al.*, 2008). Le régulateur transcriptionnel BraR, conjointement avec la 3OC₁₂-HSL, contrôle positivement et directement l'expression du gène *braI*, créant, ainsi, une boucle de rétroaction positive du système BraI/BraR (Fig. 1.19). En effet, Suarez-Moreno *et al.* (2008) ont rapporté que l'inactivation du gène *braR* provoque une réduction drastique de la biosynthèse de la 3OC₁₂-HSL chez *B. kururiensis* M130. BraR agit en association avec des AHL additionnelles comme, par exemple, la *N*-(3-oxo-tétradécanoyl)-L-homosérine lactone (3OC₁₄-HSL) et la *N*-(3-oxo-hexadécanoyl)-L-homosérine lactone (3OC₁₆-HSL) (Suarez-Moreno *et al.*, 2008, Suarez-Moreno *et al.*, 2010).

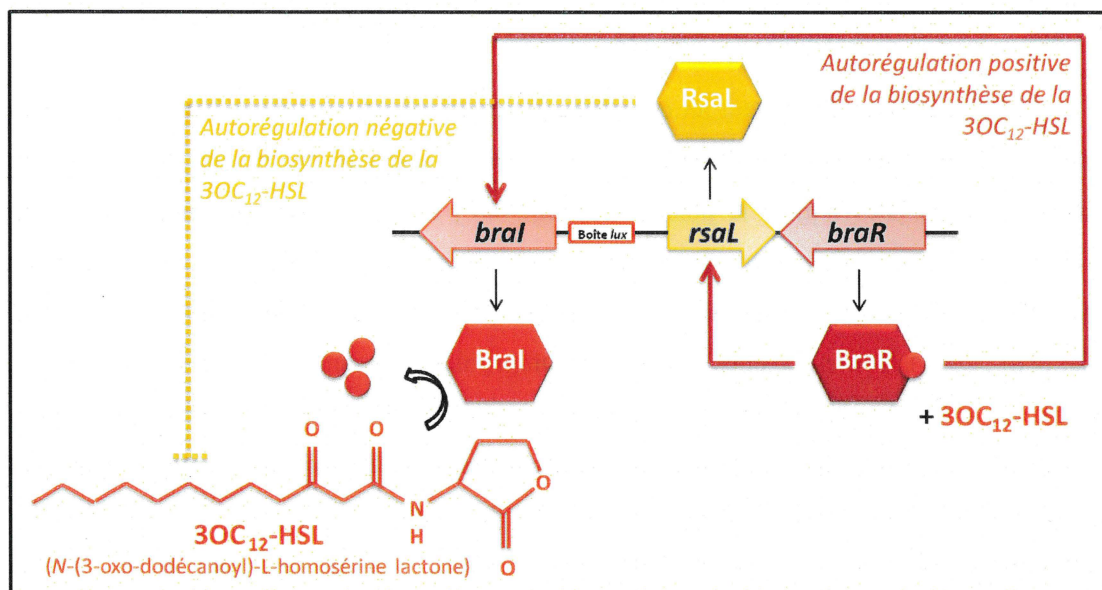


Figure 1.19. Mécanisme de régulation hypothétique de la production de la 3OC₁₂-HSL via le système BraI/BraR chez *B. kururiensis* M130.

La région promotrice du gène *braI* de *B. kururiensis* M130 contient une boîte *lux* putative (CACCTATCCAGGTAGGTAGGTA) susceptible d'être reconnue spécifiquement par le régulateur transcriptionnel BraR (Suarez-Moreno *et al.*, 2010).

1.3.2.1.2. La protéine RsaL est un important répresseur de la biosynthèse de la 3OC₁₂-HSL chez *B. kururiensis*

Les gènes *braI* et *braR* sont transcrits dans la même direction et sont séparés par un homologue du gène *rsaL* codant une protéine régulatrice de type RsaL initialement caractérisée chez *P. aeruginosa* (cf. la Figure 1.12 présentée à la section 1.2.3.1.1), et que l'on retrouve de manière ubiquitaire parmi les membres du groupe *Pbe* (Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012) (Fig. 1.19). Chez *B. kururiensis* M130, RsaL joue un rôle essentiel dans la modulation du système BraI/BraR puisque l'absence de cette protéine se traduit par une surproduction de la 3OC₁₂-HSL (Suarez-Moreno *et al.*, 2008). Les concentrations de cette AHL sont de l'ordre du nM dans des cultures de la souche sauvage tandis qu'elles sont de l'ordre du µM dans des cultures du mutant *rsaL*- (Suarez-Moreno *et al.*, 2008). L'hypothèse est que RsaL se comporte comme un interrupteur permettant d'allumer ou bien d'éteindre instantanément le système BraI/BraR lorsque les conditions environnementales l'exigent (Suarez-Moreno *et al.*, 2008). Par ailleurs, Suarez-Moreno *et al.* (2008) ont démontré que le complexe BraR/3OC₁₂-HSL contrôle positivement et directement la transcription du gène *rsaL* possiblement responsable d'une boucle de rétroaction négative du système BraI/BraR (Fig. 1.19).

1.3.2.2. Le *quorum sensing* au sein des membres du complexe *Bcc*

Les bactéries appartenant au complexe *Bcc* sont rencontrées dans des milieux variés tels les sols et, plus particulièrement, au sein de la rhizosphère des plantes (le riz [*Oryza sativa*], le maïs [*Zea mays*], le pois [*Pisum sativum*] *etc.*) où elles sont susceptibles, par exemple, de promouvoir leur croissance et constituent, en conséquence, des candidats attractifs pour des applications biotechnologiques (Coenye *et al.*, 2003, Eberl *et al.*, 2016, Vial *et al.*, 2011). Toutefois, elles représentent un problème en santé publique (Chiarini *et al.*, 2006). En effet, les bactéries appartenant au complexe *Bcc* sont des agents pathogènes opportunistes responsables d'infections pulmonaires éventuellement mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique ou chez les individus souffrant de la granulomatose septique chronique (Eberl, 2006b, Eberl *et al.*, 2016, Mahenthalingam *et al.*, 2005a, Mahenthalingam *et al.*, 2005b, Venturi *et al.*, 2004). De plus, elles sont résistantes à de nombreux antibiotiques et antiseptiques (Nzula *et al.*, 2002).

La communication intercellulaire, chez les membres du complexe *Bcc*, intervient dans de nombreux processus cellulaires parmi lesquels figurent, en particulier, la pathogénicité (Aguilar *et al.*, 2003a, Aguilar *et al.*, 2003b, Baldwin *et al.*, 2004, Bernier *et al.*, 2003, Chapalain *et al.*, 2013, Eberl, 2006b, Huber *et al.*, 2001, Inhülsen, 2011, Kooi *et al.*, 2006, Kothe *et al.*, 2003, Lewenza *et al.*, 1999, Lewenza *et al.*, 2001, Riedel *et al.*, 2003, Sokol *et al.*, 2003, Sousa *et al.*, 2017, Venturi *et al.*, 2004, Vial *et al.*, 2007, Wopperer *et al.*, 2006). Les membres du complexe *Bcc*, à l'image de la bactérie *Burkholderia multivorans* (cf. la **Figure 1.18** présentée à la section 1.3.1), possèdent généralement un unique système de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR utilisant des auto-inducteurs qui appartiennent à la famille des AHL : le système CepI/CepR. Par ailleurs, certains membres du complexe *Bcc* comme, par exemple, les espèces bactériennes *B. cenocepacia*, *Burkholderia vietnamiensis* ou encore *Burkholderia ambifaria* disposent d'un système de *quorum sensing* supplémentaire (Baldwin *et al.*, 2004, Chapalain *et al.*, 2017, Conway *et al.*, 2002, Eberl, 2006b, Gotschlich *et al.*, 2001, Lutter *et al.*, 2001, Malott *et al.*, 2005, Malott *et al.*, 2007, Venturi *et al.*, 2004, Yao *et al.*, 2002). Les membres du complexe *Bcc* contiennent également des régulateurs transcriptionnels orphelins (Inhülsen, 2011, Malott *et al.*, 2009, O'Grady *et al.*, 2012).

1.3.2.2.1. La C₈-HSL est le principal auto-inducteur du système CepI/CepR chez les bactéries appartenant au complexe *Bcc*

Le système CepI/CepR est composé de la synthase CepI, qui catalyse la synthèse de la C₈-HSL, et du régulateur transcriptionnel CepR, qui contrôle positivement et directement l'expression du gène *cepI* en association avec la C₈-HSL *via* une boîte *lux* putative (ACCCTGTAAGAGTTACCAGTTA) présente dans la région promotrice de ce gène, créant, ainsi, une boucle de rétroaction positive du système CepI/CepR (Aguilar *et al.*, 2003a, Chambers *et al.*, 2006, Conway *et al.*, 2002, Eberl, 2006b, Gotschlich *et al.*, 2001, Huber *et al.*, 2001, Lewenza *et al.*, 1999, Lewenza *et al.*, 2001, Lutter *et al.*, 2001, O'Grady *et al.*, 2009, Venturi *et al.*, 2004, Wei *et al.*, 2011, Weingart *et al.*, 2005) (cf. la **Figure 1.22** présentée à la section 1.3.2.2.2). En outre, la transcription du gène *cepR* est contrôlée négativement et directement *via* le complexe CepR/C₈-HSL responsable d'une boucle de rétroaction négative du système CepI/CepR (Lewenza *et al.*, 2001, Malott *et al.*, 2005, Malott *et al.*, 2007) (cf. la **Figure 1.22** présentée à la section 1.3.2.2.2).

1.3.2.2.2. La protéine RsaM est un important répresseur de la biosynthèse de la C₈-HSL chez les bactéries appartenant au complexe *Bcc*

Les protéines de type RsaM représentent, à l'instar des protéines de type RsaL, des inhibiteurs majeurs de la biosynthèse des AHL (Mattiuzzo *et al.*, 2011, Venturi *et al.*, 2011) (**Fig. 1.20**).

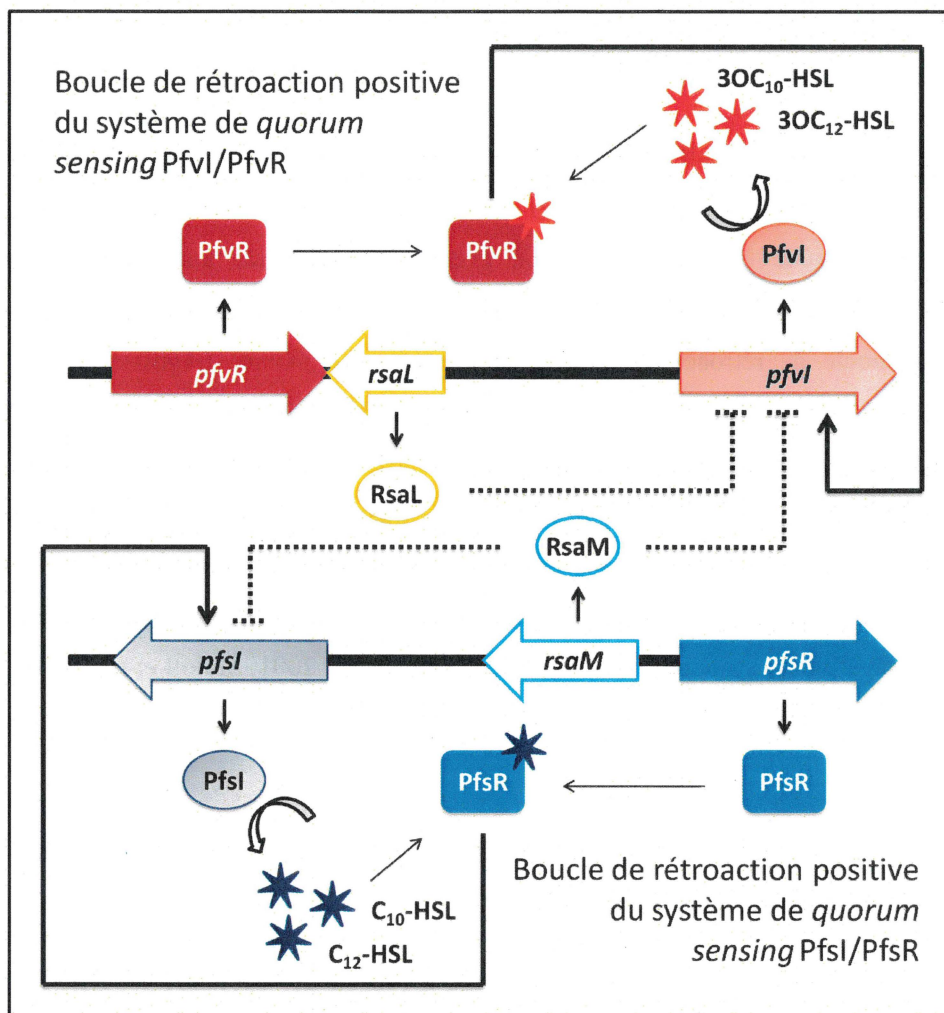


Figure 1.20. Modèle hypothétique de la régulation de la biosynthèse des AHL chez le pathogène du riz *P. fuscovaginae*.

P. fuscovaginae possède deux systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR : les systèmes PfvI/PfvR et PfsI/PfsR. Le régulateur transcriptionnel PfvR active directement l'expression du gène *pfvI* en interagissant avec la région promotrice de ce gène (Mattiuzzo *et al.*, 2011). Cette interaction nécessite des AHL telles que la 3OC₁₀-HSL et la 3OC₁₂-HSL, qui sont produites par l'intermédiaire de la synthase PfvI. Le système PfvI/PfvR contient également une protéine de type RsaL qui inhibe la transcription du gène *pfvI* via un mécanisme de régulation encore inconnu (Mattiuzzo *et al.*, 2011). Le régulateur transcriptionnel PfsR interagit avec la région promotrice du gène *pfsI* et stimule directement la transcription de ce gène (Mattiuzzo *et al.*, 2011). Cette interaction requiert des AHL comme, par exemple, la *N*-(décanyl)-L-homosérine lactone (C₁₀-HSL) et la *N*-(dodécanyl)-L-homosérine lactone (C₁₂-HSL), qui sont synthétisées par l'intermédiaire de la synthase PfsI. Le système PfsI/PfsR contient également une protéine de type RsaM qui réprime l'expression des gènes *pfsI* et *pfvI* via un mécanisme de modulation indéterminé (Mattiuzzo *et al.*, 2011). D'après Venturi *et al.* (2011).

D'autre part, une analyse transcriptomique comparative de la souche sauvage et d'un mutant *rsaM*- de *P. fuscovaginae* UPB0736 a permis de mettre en exergue que la protéine RsaM constitue un régulateur global de l'expression génique (Uzelac *et al.*, 2017). Il apparaît que cette protéine affecte la transcription d'une large variété de gènes parmi lesquels figurent, entre autres, des gènes cibles du *quorum sensing* (Fig. 1.21).

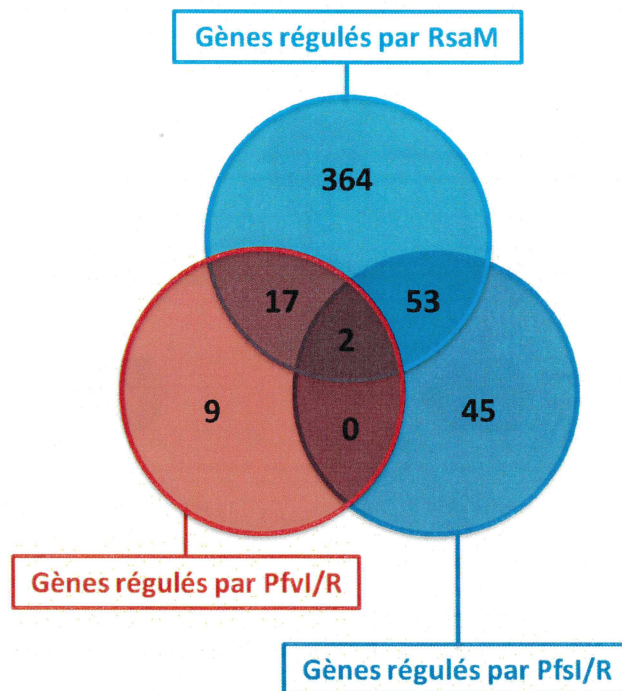


Figure 1.21. Diagramme de Venn représentant la proportion de gènes dont la transcription est activée et/ou inhibée par la protéine RsaM ainsi que la proportion de gènes dont l'expression est stimulée et/ou réprimée par les systèmes PfvI/PfvR et PfsI/PfsR chez *P. fuscovaginae* UPB0736. D'après Uzelac *et al.* (2017).

Chez les espèces bactériennes du genre *Burkholderia*, les protéines de type RsaM ont été notamment décrites pour leur rôle dans la régulation de processus cellulaires sous le contrôle du *quorum sensing* (Chen *et al.*, 2012). Chez *B. cenocepacia* H111, RsaM est un important répresseur de la biosynthèse de la C₈-HSL (Inhülsen, 2011). Toutefois, le mécanisme de régulation sous-jacent est encore inconnu (**Fig. 1.22**). Selon les travaux préliminaire de Inhülsen (2011), RsaM stimule la transcription des gènes *cepI* et *cepR*, de même que l'expression du gène *cepR2*, codant le régulateur transcriptionnel de type LuxR orphelin CepR2. En outre, des recherches bioinformatiques indiquent que la séquence en acides aminés de RsaM ne présente aucune homologie significative avec des protéines fonctionnellement caractérisées et suggèrent, donc, que cette protéine appartient à une nouvelle classe de régulateurs transcriptionnels (Michalska *et al.*, 2014). Notons, également, que la transcription du gène *rsaM* est contrôlée *via* le *quorum sensing* chez *B. cenocepacia* K56-2 (O'Grady *et al.*, 2009, Wei *et al.*, 2011). En effet, le complexe CepR/C₈-HSL active directement l'expression du gène *rsaM* par l'intermédiaire d'une boîte *lux* putative (ACGCTGTCATACTTGTCAGGTT) présente dans la région promotrice de ce gène (**Fig. 1.22**).

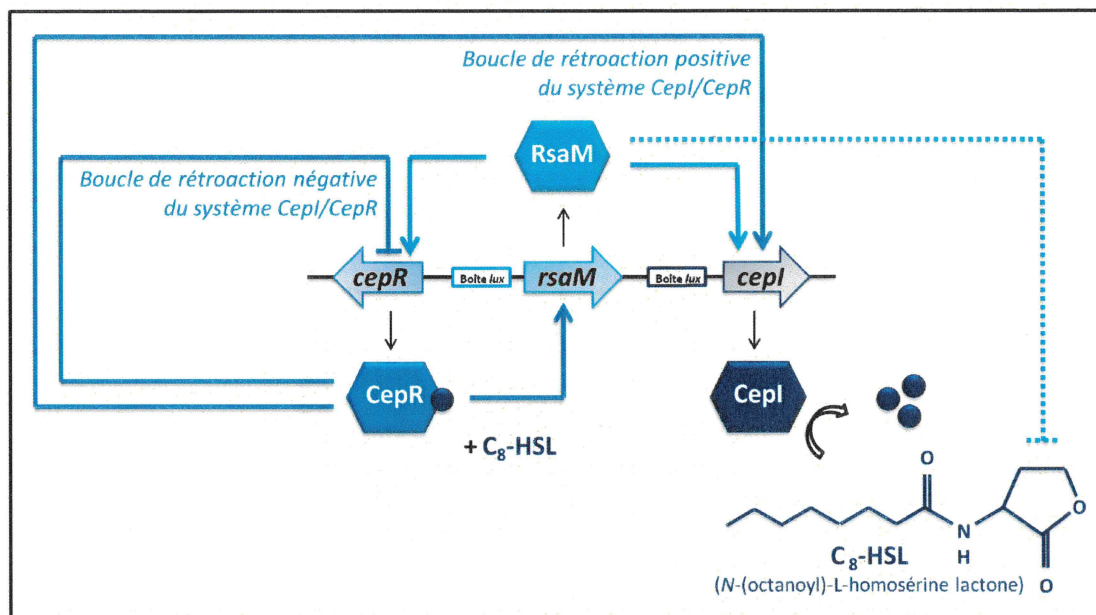


Figure 1.22. Mécanisme de régulation hypothétique de la production de la C₈-HSL via le système CepI/CepR chez les bactéries appartenant au complexe Bcc.

Les gènes *cepI* et *cepR* sont transcrits dans la même direction et sont séparés par un homologue du gène *rsaM* codant une protéine régulatrice de type RsaM initialement caractérisée chez *P. fuscovaginae* (Mattiuzzo *et al.*, 2011, Uzelac *et al.*, 2017, Venturi *et al.*, 2011), et que l'on retrouve de manière ubiquitaire parmi les membres du complexe Bcc (Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012).

1.3.2.3. Le quorum sensing au sein des membres du groupe *Bptm*

1.3.2.3.1. Les membres du groupe *Bptm* sont génétiquement, physiologiquement et biochimiquement similaires mais présentent des modes de vie divergents

Le groupe *Bptm* est composé des espèces bactériennes pathogènes *Burkholderia pseudomallei* et *Burkholderia mallei* ainsi que de la bactérie non pathogène *Burkholderia thailandensis* (Majerczyk *et al.*, 2013a).

1.3.2.3.1.1. Les génomes de *B. thailandensis*, de *B. pseudomallei* et de *B. mallei* sont hautement conservés

B. thailandensis et *B. pseudomallei* dérivent d'un ancêtre commun (Ong *et al.*, 2004). Leurs génomes sont hautement conservés (Yu *et al.*, 2006). Elles possèdent approximativement 85% de gènes communs (Yu *et al.*, 2006). Les quelques gènes spécifiques qu'elles possèdent sont présents dans des îlots génomiques ou dans des séquences codantes homologues qui contiennent des répétitions de séquences simples entraînant la formation de

pseudogènes (Holden *et al.*, 2004, Yu *et al.*, 2006). Les autres différences génomiques incluent l'acquisition de déterminants de virulence chez *B. pseudomallei*, 4 inversions génomiques à grande échelle, ainsi que des facteurs conférant des capacités métaboliques divergentes (Yu *et al.*, 2006). À titre d'exemple, *B. thailandensis* peut assimiler l'arabinose, ce qui n'est pas le cas de *B. pseudomallei* (Smith *et al.*, 1997).

B. mallei aurait évolué à partir d'un isolat de *B. pseudomallei* suite à une infection animale (Godoy *et al.*, 2003, Ong *et al.*, 2004). L'expansion des séquences d'insertion génomique aurait ensuite facilité de nombreux événements de délétions responsables de l'évolution réductrice du génome de *B. mallei* (Godoy *et al.*, 2003, Nierman *et al.*, 2004). En effet, *B. mallei* a perdu plus de 1000 gènes vis-à-vis de *B. pseudomallei*. L'hypothèse est que de nombreux gènes nécessaires à la survie dans l'environnement ont été perdus, tandis que ceux qui sont importants pour la survie dans l'hôte ont été maintenus compte tenu que *B. mallei* a été exclusivement isolée à partir d'animaux infectés (Gregory *et al.*, 2008, Nierman *et al.*, 2004). Comparativement à *B. thailandensis* et à *B. pseudomallei*, *B. mallei* possède peu de gènes spécifiques, suggérant que l'hôte n'offre pas beaucoup de possibilités d'acquisition de gènes (Losada *et al.*, 2010). Notons, néanmoins, que le génome de *B. mallei* présente une grande plasticité en raison de nombreuses séquences d'insertion génomique, à l'origine de la réduction du génome de *B. mallei*, et de nombreuses répétitions de séquences simples qui facilitent les recombinaisons homologues (Losada *et al.*, 2010, Nierman *et al.*, 2004).

B. thailandensis, *B. pseudomallei* et *B. mallei* possèdent deux chromosomes (**Tableau 1.1**). Le chromosome I code des fonctions principales associées au métabolisme central ainsi qu'à la croissance cellulaire (Holden *et al.*, 2004, Nierman *et al.*, 2004, Yu *et al.*, 2006). Citons, par exemple, la biosynthèse des macromolécules, le métabolisme des acides aminés, la chimiotaxie ou encore la mobilité. Le chromosome II code des fonctions secondaires associées à l'adaptation et à la survie aux différentes niches écologiques (Holden *et al.*, 2004, Nierman *et al.*, 2004, Yu *et al.*, 2006). Citons, par exemple, la protection osmotique, l'acquisition du fer, la régulation ou encore le métabolisme secondaire.

Tableau 1.1. Caractéristiques génomiques de *B. thailandensis* E264, de *B. pseudomallei* K96243 et de *B. mallei* ATCC 23344.

	<i>B. thailandensis</i>	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>
Chromosome I			
Nombre de gènes	3343	3529	3047
Taille	3 809 201 pb	4 074 542 pb	3 510 148 pb
Teneur en GC	67,3%	67,7%	68,2%
Chromosome II			
Nombre de gènes	2370	2406	2044
Taille	2 914 771 pb	3 173 005 pb	2 325 379 pb
Teneur en GC	68,1%	68,5%	69,0%

1.3.2.3.1.2. Les différents styles de vie de *B. thailandensis*, de *B. pseudomallei* et de *B. mallei*

B. thailandensis et *B. pseudomallei* sont des bactéries saprophytes retrouvées fréquemment dans les sols (*i.e.* les boues et les sédiments) et les eaux (*i.e.* les marigots, les rizières, les eaux stagnantes et les berges) dans les régions tropicales et subtropicales du monde comme, par exemple, le sud-est de l'Asie, le nord de l'Australie, l'Amérique du Sud, le Moyen-Orient et quelques régions en Afrique (Brett *et al.*, 1998, Cheng *et al.*, 2005a, Wiersinga *et al.*, 2006). *B. pseudomallei* est, par ailleurs, un pathogène opportuniste responsable de la mélioïdose chez l'Homme et chez d'autres mammifères (*i.e.* le mouton, la chèvre, le cheval, le porc, le singe et les rongeurs), une maladie affaiblissante éventuellement mortelle et endémique dans le sud-est de l'Asie et dans le nord de l'Australie (Cheng *et al.*, 2005a, Raja *et al.*, 2005, Wiersinga *et al.*, 2012, Wiersinga *et al.*, 2006). Parmi les facteurs favorisant ou aggravant le développement de la mélioïdose figurent notamment l'infection rénale chronique, l'alcoolisme, la fibrose kystique, le déficit immunitaire et, en particulier, le diabète (Currie *et al.*, 2010, Holland *et al.*, 2002, O'Carroll *et al.*, 2003, Suputtamongkol *et al.*, 1999). La mélioïdose se manifeste le plus souvent par la formation d'abcès sur les organes internes. Toutefois, une pneumonie est rapportée pour environ la moitié des cas aigus et subaigus (Leelarasamee, 2004). Elle se contracte par inhalation, par ingestion ou *via* des lésions cutanées souillées par de la terre ou de l'eau contaminée (Wiersinga *et al.*, 2012). Elle peut provoquer une infection aiguë sévère ou persister pendant des mois, voire jusqu'à des années sous une forme latente (Lazar Adler *et al.*, 2009). Les formes asymptomatiques et

localisées de la mélioïdose ont des taux de mortalité inférieurs à 10%. Cependant, le taux de mortalité de la mélioïdose septicémique disséminée (impliquant plusieurs organes) est de 90% (Leelarasamee, 2004). Le diagnostic et le traitement de la mélioïdose sont difficiles en raison des divers symptômes qu'elle présente et de la multirésistance intrinsèque de *B. pseudomallei* attribuée à la présence de nombreuses pompes à efflux (Podnecky *et al.*, 2015). Un traitement efficace implique un régime antibiotique oral et intraveineux de plusieurs semaines (Leelarasamee, 2004). Dans les régions où elle est endémique, l'incidence de la mélioïdose augmente et elle représente désormais la troisième cause la plus fréquente de décès d'une maladie infectieuse après le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) et la tuberculose dans le nord-est de la Thaïlande (Limmathurotsakul *et al.*, 2010).

Alors qu'elle peut être retrouvée dans les régions endémiques de *B. thailandensis* et de *B. pseudomallei*, *B. mallei* présente un mode de vie nettement différent. En effet, *B. mallei* est une bactérie zoopathogène obligatoire exclusivement isolée à partir d'animaux infectés (DeShazer *et al.*, 2005). Elle est l'agent étiologique de la morve (Waag *et al.*, 2005, Whitlock *et al.*, 2007) et infecte les équidés (*i.e.* les chevaux, les ânes et les zèbres) ainsi que les solipèdes (*i.e.* les chevaux, les mulets et les ânes) chez lesquels elle est responsable d'infections aiguës (DeShazer *et al.*, 2005). Elle peut également provoquer des infections chroniques chez l'Homme (*e.g.* les vétérinaires, les travailleurs d'abattoir, les scientifiques de laboratoire) (DeShazer *et al.*, 2005). *B. mallei* présente un tropisme pour les mêmes organes que *B. pseudomallei*, à savoir le foie, les poumons et la rate, dans des organismes modèles de laboratoire (Fritz *et al.*, 2000, Fritz *et al.*, 1999, Gauthier *et al.*, 2001, Hoppe *et al.*, 1999, Lever *et al.*, 2003, West *et al.*, 2008).

1.3.2.3.1.3. La pathogénicité de *B. pseudomallei* et de *B. mallei* est multifactorielle

B. pseudomallei et *B. mallei* possèdent de multiples facteurs de survie et/ou de virulence. Parmi les facteurs de survie figurent la réponse aux stress, la mobilité et la chimiotaxie, la résistance aux antibiotiques ou encore le métabolisme secondaire (Holden *et al.*, 2004). Les métabolites secondaires incluent des sidérophores tels que la malléobactine (Franke *et al.*, 2013) et des antibiotiques tels que les bactobolines qui peuvent fournir un avantage compétitif vis-à-vis d'autres espèces bactériennes colonisant une même niche écologique (Carr *et al.*, 2011, Chandler *et al.*, 2012a, Chandler *et al.*, 2012b, Duerkop *et al.*, 2009, Seyedsayamdost *et al.*, 2010) ainsi que des molécules cytotoxiques comme, par

exemple, la malléilactone (Biggins *et al.*, 2012, Truong *et al.*, 2015), la thailandamide (Ishida *et al.*, 2010) et les rhamnolipides (Dubeau *et al.*, 2009). Parmi les facteurs de virulence figurent des polysaccharides capsulaires et des lipopolysaccharides, des pili de type IV et des pili de type *fimbriae*, des adhésines qui sont susceptibles d'influencer les interactions hôte-pathogène, des systèmes de sécrétion de type III et des systèmes de sécrétion de type VI ou encore des enzymes extracellulaires comme, par exemple, les phospholipases C qui peuvent décomposer les tissus de l'hôte (DeShazer *et al.*, 2001, Galyov *et al.*, 2010, Holden *et al.*, 2004, Schell *et al.*, 2007, Ulrich *et al.*, 2004a). Notons, également, que le *quorum sensing* joue un rôle important dans la pathogénicité de *B. pseudomallei* et de *B. mallei*. Il intervient, entre autres, dans leur mode de vie intracellulaire, dans leur échappement aux réponses immunitaires de l'hôte et dans leur persistance *in vivo* (Horton *et al.*, 2013, Majerczyk *et al.*, 2013b).

1.3.2.3.1.4. *B. pseudomallei* et *B. mallei* : des armes biologiques potentielles

B. pseudomallei et *B. mallei* sont classés comme des agents de catégorie B dans la liste des agents de bioterrorisme du CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) compte tenu qu'elles sont hautement infectieuses, qu'elles provoquent des maladies humaines sévères et qu'elles sont résistantes à de nombreux antibiotiques tels que la pénicilline, l'ampicilline et les aminosides (Cheng *et al.*, 2005b, Rotz *et al.*, 2002, Wiersinga *et al.*, 2006). De plus, il n'existe, à ce jour, aucune option de vaccination.

1.3.2.3.1.5. *B. thailandensis* : un modèle de substitution pour l'étude de *B. pseudomallei* et de *B. mallei*

Bien qu'étroitement apparentée aux pathogènes humains *B. pseudomallei* et *B. mallei* (cf. la **Figure 1.18** présentée à la section 1.3.1), *B. thailandensis* ne constitue pas un pathogène de l'Homme et, pour cette raison, sa manipulation ne requiert pas un laboratoire disposant d'un confinement biosécuritaire de niveau 3 contrairement à *B. pseudomallei* et à *B. mallei* (Brett *et al.*, 1997, Brett *et al.*, 1998, Wuthiekanun *et al.*, 1996, Yu *et al.*, 2006). *B. thailandensis* est donc couramment utilisée comme modèle de substitution pour l'étude de *B. pseudomallei* et de *B. mallei* afin de faciliter et d'accélérer l'expérimentation (Haraga *et al.*, 2008, Hasselbring *et al.*, 2011, Pilatova *et al.*, 2012, West *et al.*, 2008). En revanche, *B.*

thailandensis est infectieuse chez un large éventail d'organismes modèles de laboratoire (e.g. les insectes [*Galleria mellonella*], les mammifères [*Mesocricetus auratus*], les protozoaires [*D. discoideum*], les nématodes [*C. elegans*] et les plantes [*Pereskia aculeata*]) (Brett *et al.*, 1997, Chandler *et al.*, 2009, Haraga *et al.*, 2008, Hasselbring *et al.*, 2011, Ishida *et al.*, 2010, Jeddelloh *et al.*, 2003, Mao *et al.*, 2017, Molchanova *et al.*, 2015, Pilatova *et al.*, 2012, Wand *et al.*, 2011, West *et al.*, 2008).

1.3.2.3.2. Les systèmes de *quorum sensing* parmi les espèces bactériennes *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. mallei*

Les membres du groupe *Bptm* disposent de multiples systèmes de *quorum sensing* qui figurent actuellement parmi les systèmes de communication intercellulaire les plus complexes que l'on peut retrouver chez les bactéries (Majerczyk *et al.*, 2013a). Trois systèmes de *quorum sensing* coexistent chez *B. thailandensis* : les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 (Ulrich *et al.*, 2004d). Les synthases de type LuxI, BtaI1, BtaI2 et BtaI3, sont codés par les gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3*, respectivement (**Fig. 1.23A**). Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR, BtaR1, BtaR2 et BtaR3, sont codés par les gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3*, respectivement (**Fig. 1.23A**). Par ailleurs, *B. pseudomallei* possède pareillement trois systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR : les systèmes BpsI/BpsR, BpsI2/BpsR2 et BpsI3/BpsR3 (Ulrich *et al.*, 2004b). Les gènes *bpsI*, *bpsI2* et *bpsI3* codent respectivement les synthases BpsI, BpsI2 et BpsI3, tandis que les gènes *bpsR*, *bpsR2* et *bpsR3* codent respectivement les régulateurs transcriptionnels BpsR, BpsR2 et BpsR3 (**Fig. 1.23B**). *B. mallei*, en revanche, possède seulement deux systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR : les systèmes BmaI1/BmaR1 et BmaI3/BmaR3 (Ulrich *et al.*, 2004c). Les gènes *bmaI1* et *bmaI3* codent respectivement les synthases BmaI1 et BmaI3, alors que les gènes *bmaR1* et *bmaR3* codent respectivement les régulateurs transcriptionnels BmaR1 et BmaR3 (**Fig. 1.23C**).

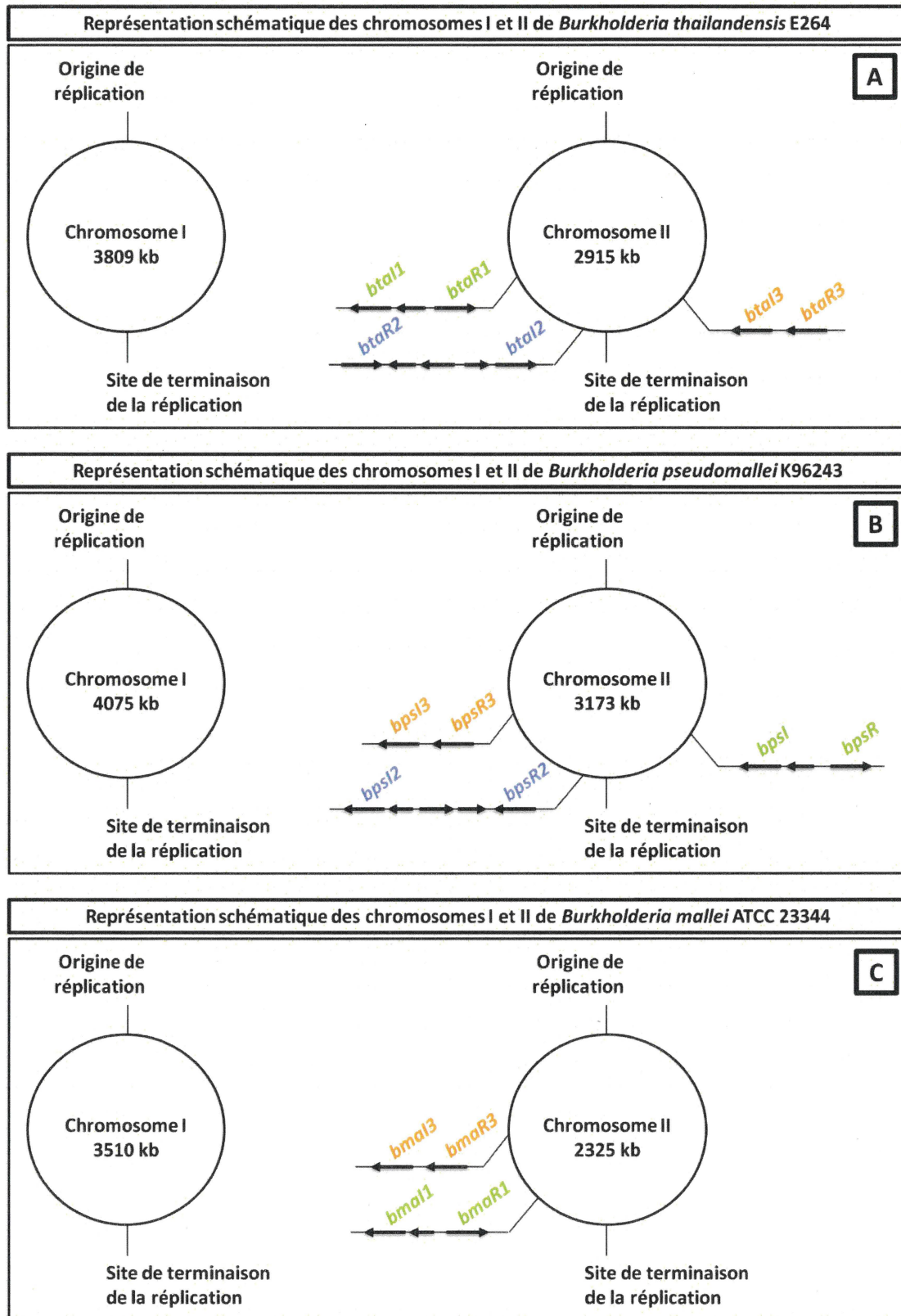


Figure 1.23. Localisation chromosomique (A) des gènes *btaI1/btaR1*, *btaI2/btaR2* et *btaI3/btaR3* de *B. thailandensis* E264, (B) des gènes *bpsI/bpsR*, *bpsI2/bpsR2* et *bpsI3/bpsR3* de *B. pseudomallei* K96243 ainsi que (C) des gènes *bmaI1/bmaR1* et *bmaI3/bmaR3* de *B. mallei* ATCC 23344.

1.3.2.3.2.1. Les systèmes de quorum sensing présents chez les membres du groupe *Bptm* emploient des auto-inducteurs de la famille des AHL

Les systèmes de *quorum sensing* présents au sein des membres du groupe *Bptm* utilisent des auto-inducteurs qui appartiennent à la famille des AHL. Les AHL produites chez *B. thailandensis*, chez *B. pseudomallei* et chez *B. mallei* peuvent être différentes d'une espèce bactérienne à l'autre, ainsi qu'au sein d'une même espèce bactérienne. Ces différences s'expliquent, entre autres, par la sensibilité et la spécificité des techniques employées pour la détection des AHL. À titre d'exemple, Ulrich *et al.* (2004d) ont rapporté que la souche bactérienne *B. thailandensis* DW503 produit des AHL, à savoir de la *N*-(hexanoyl)-L-homosérine lactone (C₆-HSL), de la C₈-HSL et de la C₁₀-HSL. Toutefois, l'utilisation de biorapporteurs spécifiques pour l'identification des AHL retrouvées chez *B. thailandensis* DW503 implique que d'autres auto-inducteurs pourraient être synthétisés *via* les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 (Ulrich *et al.*, 2004d). En outre, une mutation, affectant une pompe à efflux de type AmrAB-OprA et ayant pour but d'accroître la sensibilité aux antibiotiques et, ainsi, de faciliter les manipulations génétiques, est présente dans le génome de *B. thailandensis* DW503 (Burtnick *et al.*, 2001). L'hypothèse est que cette mutation est susceptible d'impacter le métabolisme et/ou le transport des AHL ayant pour conséquence de biaiser les interprétations relatives à l'effet des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3, entre autres, sur la production de ces auto-inducteurs, et ce, aussi bien qualitativement que quantitativement (Chandler *et al.*, 2009). En effet, les analyses, par spectrométrie de masse, des AHL produites chez la souche bactérienne *B. thailandensis* E264 révèlent que la C₈-HSL, la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL sont, en fait, les principales AHL synthétisées *via* les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 (cf. la **Figure 1.4** présentée à la section 1.1.3.1). Notons, également, que *B. thailandensis* E264 produit, de façon majoritaire, de la 3OHC₁₀-HSL ainsi que de la C₈-HSL et de la 3OHC₈-HSL, moins abondamment (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Majerczyk *et al.*, 2014a) (**Fig. 1.24**).

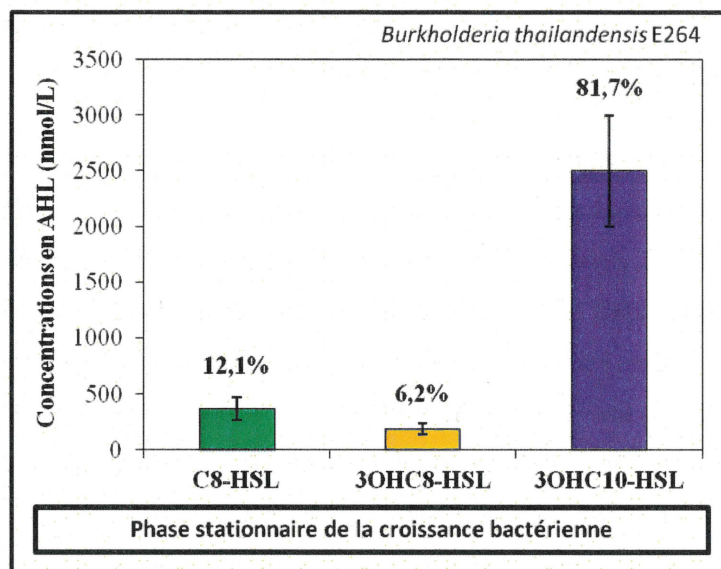


Figure 1.24. Concentrations des principales AHL détectées par spectrométrie de masse chez *B. thailandensis* E264 au cours de la phase stationnaire de la croissance bactérienne. D'après Majerczyk *et al.* (2014a).

Valade *et al.* (2004) ont rapporté que la C₁₀-HSL est l'unique AHL retrouvée chez la souche bactérienne *B. pseudomallei* 008 via l'utilisation de biorapporteurs spécifiques. En revanche, des analyses, par spectrométrie de masse, ont permis de mettre en exergue que la souche bactérienne *B. pseudomallei* DD503 synthétise de la C₈-HSL, de la 3OHC₈-HSL, de la C₁₀-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL ainsi que de la 3OC₁₄-HSL (Ulrich *et al.*, 2004b), tandis que la souche bactérienne *B. pseudomallei* PP844 synthétise de la C₈-HSL, de la 3OC₈-HSL, de la 3OHC₈-HSL, de la C₁₀-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL de même que de la *N*-(3-hydroxy-dodécanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₁₂-HSL) (Lumjiaktase *et al.*, 2006). Similairement, Gamage *et al.* (2011) ont démontré que les systèmes BpsI/BpsR, BpsI2/BpsR2 et BpsI3/BpsR3, chez les souches bactériennes *B. pseudomallei* H11, *B. pseudomallei* K96243 et *B. pseudomallei* KHW, produisent notamment de la C₈-HSL, de la 3OHC₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL (Tableau 1.2).

Tableau 1.2. Comparaison des proportions des différentes AHL identifiées par spectrométrie de masse chez les souches bactériennes *B. pseudomallei* H11, *B. pseudomallei* K96243 et *B. pseudomallei* KHW au cours de la phase stationnaire de la croissance bactérienne. D'après Gamage *et al.* (2011).

	H11	K96243	KHW
C ₈ -HSL (<i>N</i> -(octanoyl)-L-homosérine lactone)	95,3%	95,6%	96,1%
3OHC ₈ -HSL (<i>N</i> -(3-hydroxy-octanoyl)-L-homosérine lactone)	0,2%	3,4%	1,7%
C ₁₀ -HSL (<i>N</i> -(décanyol)-L-homosérine lactone)	0,4%	0,0%	0,0%
3OHC ₁₀ -HSL (<i>N</i> -(3-hydroxy-décanyol)-L-homosérine lactone)	3,9%	1,0%	2,2%
3OHC ₁₂ -HSL (<i>N</i> -(3-hydroxy-dodécanyol)-L-homosérine lactone)	0,2%	0,0%	0,0%

Outre les techniques employées pour identifier les AHL produites *via* les systèmes de *quorum sensing* présents au sein des membres du groupe *Bptm*, d'autres facteurs sont susceptibles d'influencer la détection des AHL tels que les conditions de culture et, plus particulièrement, les phases de la croissance bactérienne sélectionnées pour effectuer l'extraction des AHL. En effet, des variations dans les profils de biosynthèse des AHL identifiées chez *B. pseudomallei* KHW ont été observées au cours des différentes phases de la croissance bactérienne puisque la 3OHC₁₀-HSL constitue la principale AHL produite pendant la phase exponentielle, alors que la C₈-HSL est essentiellement synthétisée pendant la phase stationnaire (Gamage *et al.*, 2011) (Fig. 1.25). D'autre part, Horton *et al.* (2013) ont démontré, par spectrométrie de masse, que la 3OHC₁₀-HSL est l'AHL majoritairement produite chez la souche bactérienne *B. pseudomallei* MSHR520 au cours de la transition entre les phases exponentielle et stationnaire, et Majerczyk *et al.* (2014b) ont mis en évidence *via* l'utilisation de biorapporteurs spécifiques que la souche bactérienne *B. pseudomallei* 1026b synthétise principalement de la 3OHC₁₀-HSL et, dans une moindre mesure, de la C₈-HSL et de la 3OHC₈-HSL pendant la phase stationnaire de la croissance bactérienne.

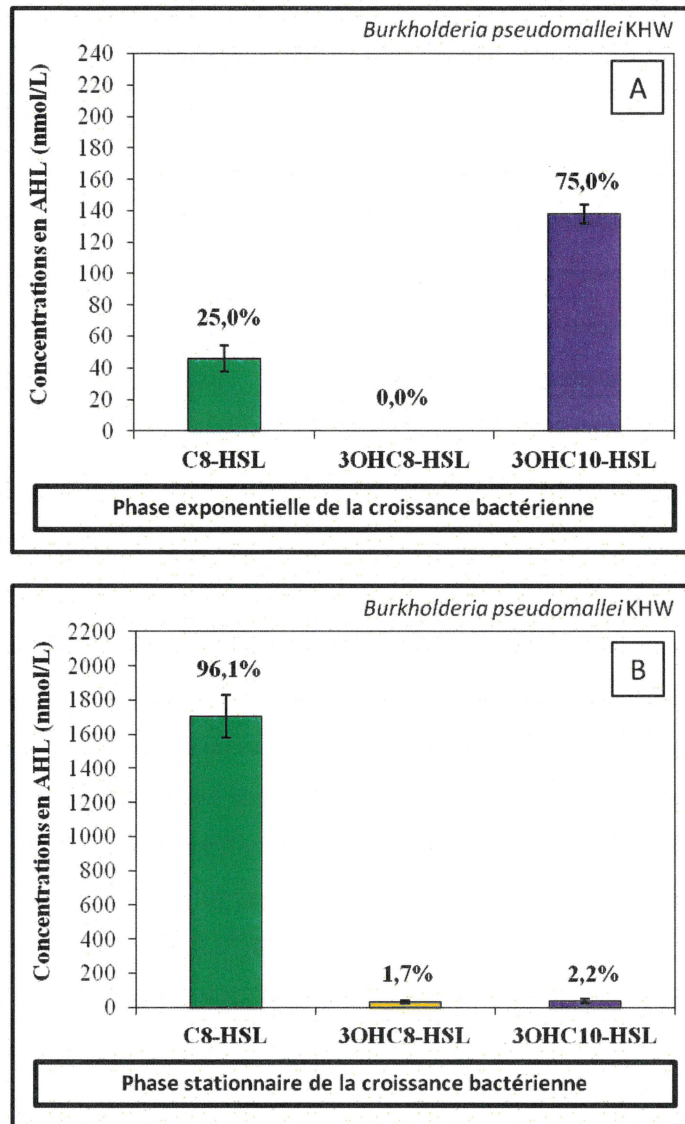


Figure 1.25. Comparaison des proportions des différentes AHL identifiées par spectrométrie de masse chez *B. pseudomallei* KHW au cours des phases (A) exponentielle et (B) stationnaire de la croissance bactérienne.

D'après Gamage *et al.* (2011).

Majerczyk *et al.* (2013b) ont mis en évidence *via* l'utilisation de biorapporteurs spécifiques que la bactérie *B. mallei* GB8, une souche virulente provenant d'un cheval, synthétise essentiellement de la C₈-HSL et, dans une moindre mesure, de la 3OHC₈-HSL, qui sont produites à partir des phases exponentielle et stationnaire de la croissance bactérienne, respectivement (**Fig. 1.26A**). Il apparaît, par ailleurs, que la bactérie *B. mallei* ATCC 23444, une souche virulente isolée chez un homme (Nierman *et al.*, 2004), synthétise, de façon

majoritaire, de la C₈-HSL ainsi que de la 3OHC₈-HSL, moins abondamment (Majerczyk *et al.*, 2013b) (**Fig. 1.26B**).

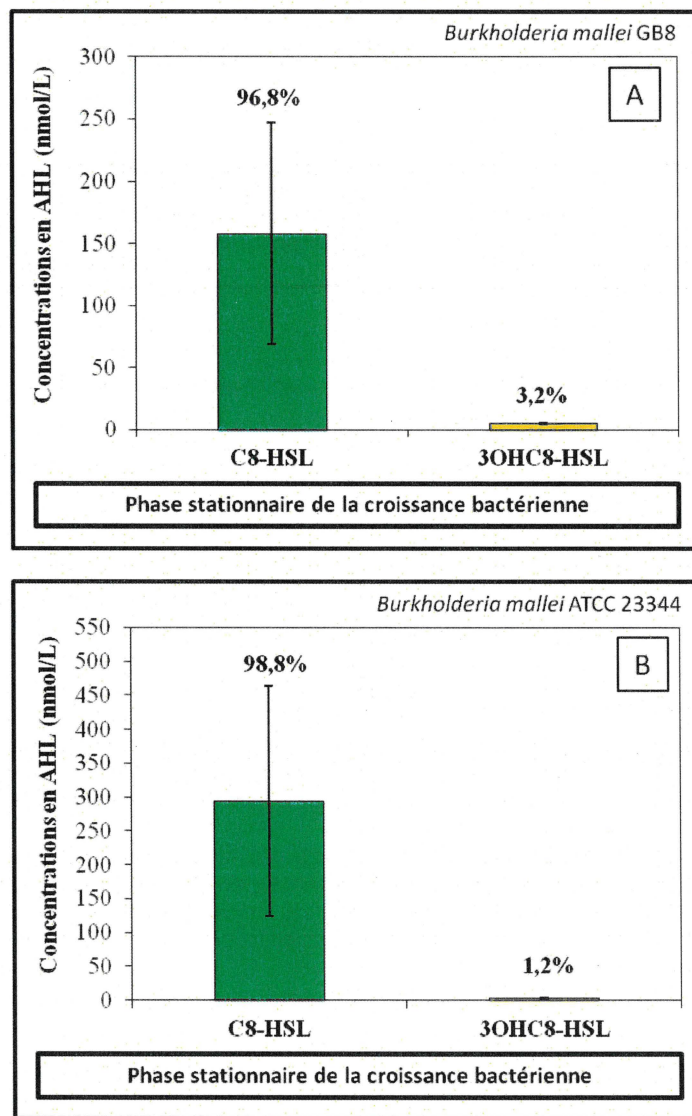


Figure 1.26. Comparaison des proportions des différentes AHL identifiées *via* l'utilisation de biorapporteurs spécifiques chez les souches bactériennes (A) *B. mallei* GB8 et (B) *B. mallei* ATCC 23344 au cours de la phase stationnaire de la croissance bactérienne. D'après Majerczyk *et al.* (2013b).

Notons, également, que des variations ont été observées dans les proportions des AHL synthétisées *via* les systèmes BmaI1/BmaR1 et BmaI3/BmaR3 chez *B. mallei* ATCC 23344 (**Fig. 1.27**). Ces observations ont été attribuées aux diverses conditions de culture choisies pour la réalisation des extractions d'AHL comme, par exemple, la présence ou l'absence

d'acide 3-(*N*-morpholino) propane sulfonique (MOPS), un composé organique zwitterionique essentiel au maintien d'un pH physiologique et assurant, en conséquence, l'intégrité des AHL (Duerkop *et al.*, 2008, Duerkop *et al.*, 2007). En effet, les AHL sont stables lorsque les conditions sont neutres et acides, tandis que des conditions alcalines provoquent l'hydrolyse des AHL (Byers *et al.*, 2002, Yates *et al.*, 2002).

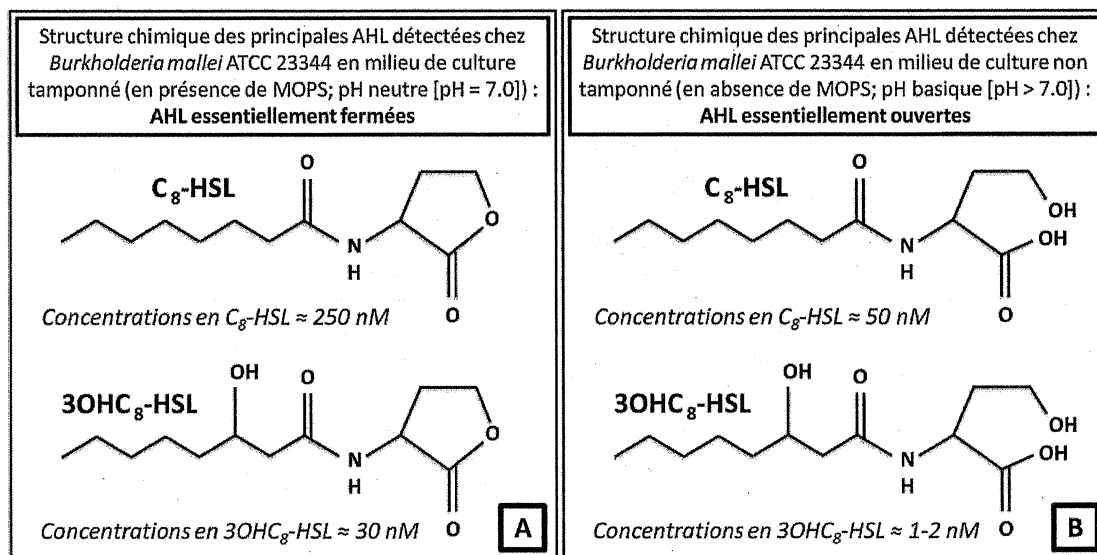


Figure 1.27. Concentrations des principales AHL détectées via l'utilisation de biorapporteurs spécifiques chez *B. mallei* ATCC 23344 dans des cultures bactériennes tamponnées (en présence de MOPS) ou non tamponnées (en absence de MOPS) au cours des phases exponentielle ou stationnaire de la croissance bactérienne.

(A) Les AHL présenteraient essentiellement une structure fermée, et ne seraient donc pas, pour la plupart d'entre elles, dégradées en milieu de culture tamponné (*i.e.* en présence de MOPS; pH neutre [pH ≈ 7.0]). D'après Duerkop *et al.* (2008). (B) Les AHL présenteraient essentiellement une structure ouverte, et seraient donc, pour la plupart d'entre elles, dégradées en milieu de culture non tamponné (*i.e.* en absence de MOPS; pH basique [pH > 7.0]). D'après Duerkop *et al.* (2007).

Toutes les AHL associées aux systèmes de *quorum sensing* présents chez les espèces bactériennes *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. mallei* sont répertoriées dans le **Tableau 1.3**.

Tableau 1.3. Répertoire des AHL associées aux systèmes de *quorum sensing* présents chez les membres du groupe *Bptm*.

Souche bactérienne	AHL*	Référence
<i>B. thailandensis</i> DW503	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL	(Ulrich, 2004, Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
<i>B. thailandensis</i> E264	3OHC ₄ -HSL, C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, 3OHC ₉ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₂ -HSL	(Chandler <i>et al.</i> , 2009, Duerkop <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. pseudomallei</i> 008	C ₁₀ -HSL	(Valade <i>et al.</i> , 2004)
<i>B. pseudomallei</i> 1026b	C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2014b)
<i>B. pseudomallei</i> DD503	C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL, 3OC ₁₄ -HSL	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
<i>B. pseudomallei</i> H11	C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₂ -HSL	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. pseudomallei</i> K96243	C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL, C ₁₂ -HSL	(Gamage <i>et al.</i> , 2011, Ramli <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. pseudomallei</i> KHW	C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL	(Gamage <i>et al.</i> , 2011, Song <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₂ -HSL	(Horton <i>et al.</i> , 2013)
<i>B. pseudomallei</i> PP844	C ₈ -HSL, 3OC ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₀ -HSL, 3OHC ₁₂ -HSL	(Lumjiaktase <i>et al.</i> , 2006)
<i>B. mallei</i> ATCC 23344	C ₆ -HSL, C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL, C ₁₀ -HSL	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2013b, Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)
<i>B. mallei</i> GB8	C ₈ -HSL, 3OHC ₈ -HSL	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2013b)

*3OHC₄-HSL, *N*-(3-hydroxy-butanoyl)-L-homosérine lactone; C₆-HSL, *N*-(hexanoyl)-L-homosérine lactone; C₈-HSL, *N*-(octanoyl)-L-homosérine lactone; 3OC₈-HSL, *N*-(3-oxo-octanoyl)-L-homosérine lactone; 3OHC₈-HSL, *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homosérine lactone; 3OHC₉-HSL, *N*-(3-hydroxy-nonanoyl)-L-homosérine lactone; C₁₀-HSL, *N*-(décanoyl)-L-homosérine lactone; 3OHC₁₀-HSL, *N*-(3-hydroxy-décanoyl)-L-homosérine lactone; C₁₂-HSL, *N*-(dodécanoyl)-L-homosérine lactone; 3OHC₁₂-HSL, *N*-(3-hydroxy-dodécanoyl)-L-homosérine lactone; 3OC₁₄-HSL, *N*-(3-oxo-tétradécanoyl)-L-homosérine lactone.

1.3.2.3.2.2. *Les systèmes de quorum sensing présents chez les membres du groupe Bptm interviennent dans la pathogénicité bactérienne*

Une analyse transcriptomique a permis de mettre en exergue que le *quorum sensing* contrôle l'expression d'une large gamme de gènes codant les enzymes nécessaires à la biosynthèse de métabolites secondaires chez les souches bactériennes *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* 1026b et *B. mallei* GB8 (Majerczyk *et al.*, 2014a, Majerczyk *et al.*, 2014b). Parmi ces métabolites secondaires figurent des facteurs de survie et/ou de virulence susceptibles d'intervenir dans l'établissement des interactions hôte-pathogène comme, par exemple, la thailandamide, les bactobolines ou encore la malléilactone. De plus, de nombreux modèles d'infection ont permis de mettre en exergue le rôle crucial de la communication intercellulaire dans la virulence bactérienne au sein des membres du groupe *Bptm* (Biggins *et al.*, 2012, Song *et al.*, 2005, Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c, Valade *et al.*, 2004) (**Tableau 1.4**).

Tableau 1.4. Modèles d'infection utilisés pour tester l'implication du *quorum sensing* dans la virulence bactérienne parmi les membres du groupe *Bptm*.

Souche bactérienne	Modèle d'infection	Référence
<i>B. thailandensis</i> E264	<i>M. musculus</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
	<i>C. elegans</i> , <i>D. discoideum</i>	(Biggins <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. pseudomallei</i> 008	<i>M. musculus</i>	(Valade <i>et al.</i> , 2004)
<i>B. pseudomallei</i> DD503	<i>M. musculus</i> , <i>M. auratus</i>	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
<i>B. pseudomallei</i> KHW	<i>C. elegans</i>	(Song <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	<i>M. musculus</i>	(Horton <i>et al.</i> , 2013)
<i>B. mallei</i> ATCC 23344	<i>M. musculus</i> , <i>M. auratus</i>	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)
	<i>M. musculus</i>	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2013b)
<i>B. mallei</i> GB8	<i>M. musculus</i>	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2013b)

1.3.2.3.3. *Les systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1*

1.3.2.3.3.1. *Les systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1 sont homologues*

Le système BtaI1/BtaR1 est composé de la synthase BtaI1 et du régulateur transcriptionnel BtaR1 (Ulrich *et al.*, 2004d) (**Tableau 1.5**). Par ailleurs, la synthase BpsI et le

régulateur transcriptionnel BpsR composent le système BpsI/BpsR (Ulrich *et al.*, 2004b) (**Tableau 1.5**), alors que la synthase BmaI et le régulateur transcriptionnel BmaR1 composent le système BmaI/BmaR1 (Ulrich *et al.*, 2004c) (**Tableau 1.5**).

Tableau 1.5. Homologies entre les systèmes BtaI/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI/BmaR1.

Gène	Protéine	Souche bactérienne	Identité (Similarité)*
<i>btaI</i> (ou BTH_III1512)	BtaI	<i>B. thailandensis</i> E264	100%
<i>bpsI</i> (ou BPSS0885)	BpsI	<i>B. pseudomallei</i> K96243	97% (98%)
<i>bmaI</i> (ou BMAA1347)	BmaI	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	97% (97%)
<i>btaR1</i> (ou BTH_III1510)	BtaR1	<i>B. thailandensis</i> E264	100%
<i>bpsR</i> (ou BPSS0887)	BpsR	<i>B. pseudomallei</i> K96243	99% (99%)
<i>bmaR1</i> (ou BMAA1345)	BmaR1	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	99% (99%)

*Les homologies de séquence entre les protéines de type LuxI (*i.e.* les synthases BtaI, BpsI et BmaI) et les protéines de type LuxR (*i.e.* les régulateurs transcriptionnels BtaR1, BpsR et BmaR1) ont été déterminées *via* l'utilisation de l'outil bioinformatique « Protein BLAST » (ou blastp) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Les gènes *btaI* et *btaR1* sont localisés à proximité l'un de l'autre au sein du génome de *B. thailandensis* E264 similairement aux gènes *bpsI* et *bpsR* de *B. pseudomallei* K96243 ainsi qu'aux gènes *bmaI* et *bmaR1* de *B. mallei* ATCC 23344 (**Fig. 1.28**). Ces gènes sont transcrits dans des directions opposées et sont séparés par un homologue du gène *rsaM* codant potentiellement une protéine régulatrice de type RsaM initialement caractérisée chez *P. fuscovaginae* (cf. la **Figure 1.20** présentée à la section 1.3.2.2.2). La fonction de cette protéine n'a pas encore été investiguée chez aucun des membres du groupe *Bptm*.

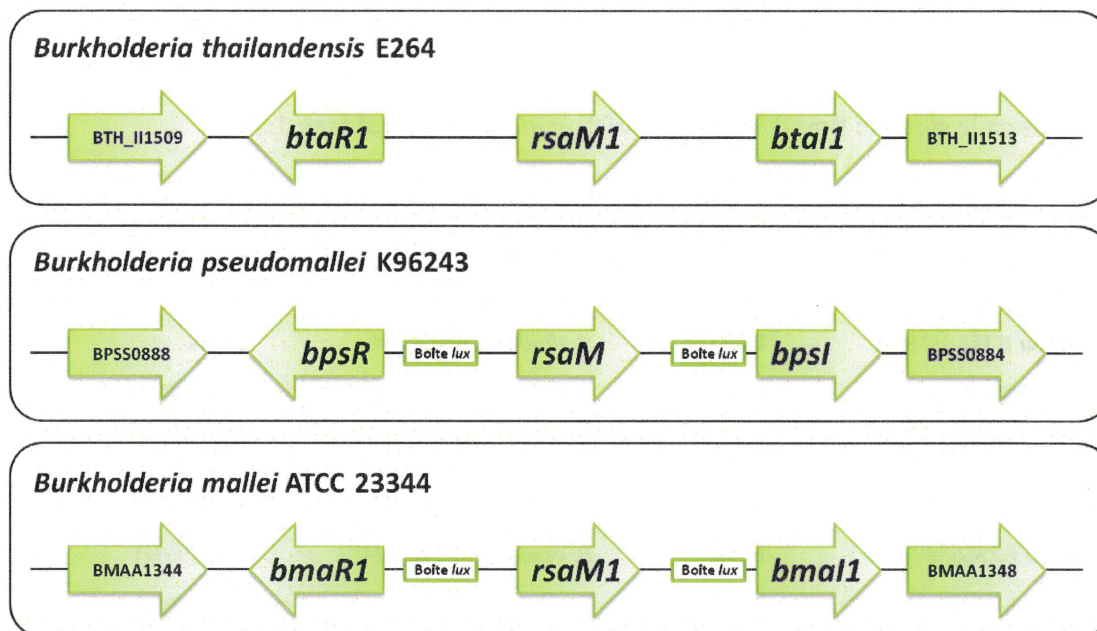


Figure 1.28. Organisation structurale des gènes *btaI/btaR1* chez *B. thailandensis* E264, *bpsI/bpsR* chez *B. pseudomallei* K96243 et *bmaI/bmaR1* chez *B. mallei* ATCC 23344.

La région promotrice des gènes *bpsR* de *B. pseudomallei* KHW et *bmaR1* de *B. mallei* ATCC 23344 contient une boîte *lux* putative (CGCTGTCATACTTGCTAGGT) susceptible d'être reconnue spécifiquement par les régulateurs transcriptionnels BpsR et BmaR1, respectivement (Song *et al.*, 2005). Par ailleurs, une boîte *lux* putative (CCCTGTAAGGGTAAACAGTT) susceptible d'être reconnue spécifiquement par les régulateurs transcriptionnels BpsR et BmaR1 est présente dans la région promotrice des gènes *bpsI* de *B. pseudomallei* KHW et *bmaI1* de *B. mallei* ATCC 23344, respectivement (Duerkop *et al.*, 2007, Kiratisin *et al.*, 2008, Song *et al.*, 2005). Aucune boîte *lux* potentiellement reconnue de manière spécifique par le régulateur transcriptionnel BtaR1 n'a été identifiée dans la région promotrice des gènes *btaR1* et *btaI1* de *B. thailandensis* E264.

1.3.2.3.3.2. La C₈-HSL est le principal auto-inducteur des systèmes *BtaI1/BtaR1*, *BpsI/BpsR* et *BmaI1/BmaR1*

L'utilisation de biorapporteurs spécifiques pour l'identification des AHL retrouvées chez la souche sauvage et chez le mutant *btaI1*- de *B. thailandensis* DW503 a permis de déterminer que la synthase BtaI1 catalyse la synthèse de la C₈-HSL (Ulrich *et al.*, 2004d). En outre, Chandler *et al.* (2009) ont réexaminé le profil de biosynthèse des AHL chez la souche sauvage et chez le mutant Δ *btaI1* de *B. thailandensis* E264 et ont confirmé par spectrométrie de masse que la synthase BtaI1 synthétise exclusivement de la C₈-HSL, donc considérée comme le principal auto-inducteur du système BtaI1/BtaR1.

Les synthases BpsI de *B. pseudomallei* 1026b, de *B. pseudomallei* KHW et de *B. pseudomallei* MSHR520 ont toutes en commun de produire de la C₈-HSL ainsi que de la 3OHC₈-HSL (Gamage *et al.*, 2011, Horton *et al.*, 2013, Ulrich *et al.*, 2004b) (Fig. 1.27). Considérant que Gamage *et al.* (2011) ont rapporté que la C₈-HSL est l'AHL majoritairement

produite *via* la synthase BpsI de *B. pseudomallei* KHW, tandis que Horton *et al.* (2013) ont observé que cette AHL est exclusivement synthétisée *via* la synthase BpsI de *B. pseudomallei* MSHR520, la C₈-HSL représente le principal auto-inducteur du système BpsI/BpsR. D'autres AHL telles que la 3OHC₁₀-HSL sont, par ailleurs, synthétisées *via* les synthases BpsI de *B. pseudomallei* 1026b et de *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011, Ulrich *et al.*, 2004b) (Fig. 1.29).

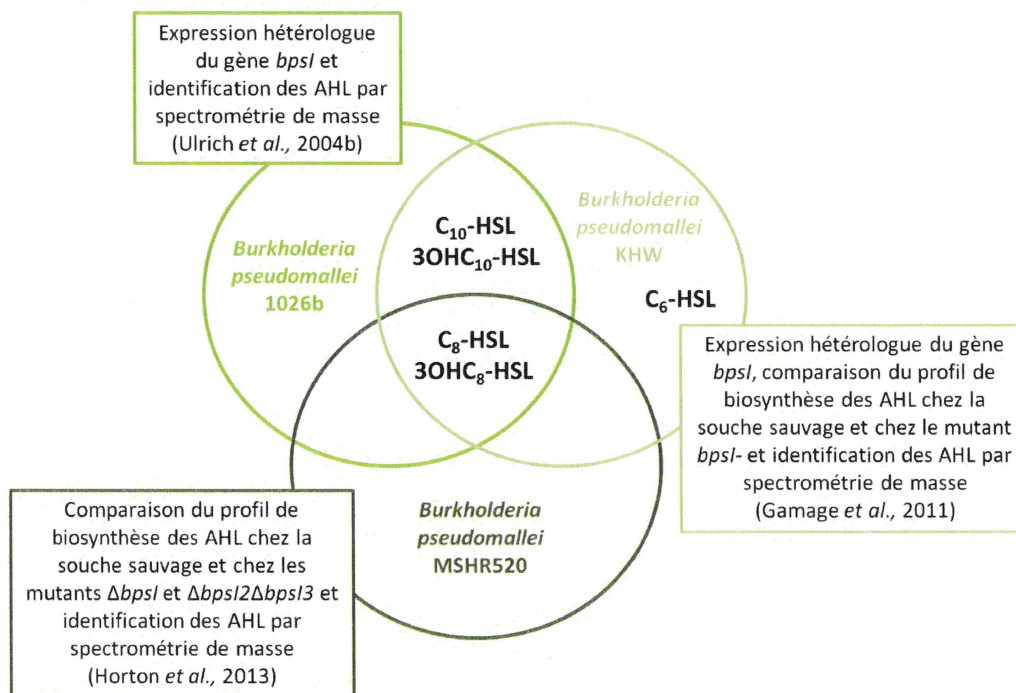


Figure 1.29. Répertoire des AHL synthétisées *via* la synthase BpsI.

L'expression hétérologue du gène *bmaI1* a permis de déterminer que la synthase BmaI1 de *B. mallei* ATCC 23344 synthétise de la C₈-HSL, de la 3OHC₈-HSL et de la C₁₀-HSL (Ulrich *et al.*, 2004c). Ces AHL ont été identifiées par spectrométrie de masse (Ulrich *et al.*, 2004c). De plus, l'étude comparative du profil de biosynthèse des AHL chez la souche sauvage et chez le mutant *bmaI1*- de *B. mallei* ATCC 23344 *via* l'utilisation de biorapporteurs spécifiques indique que la synthase BmaI1 synthétise essentiellement de la C₈-HSL ainsi que de la 3OHC₈-HSL, moins abondamment (Duerkop *et al.*, 2007). Similairement, Majerczyk *et al.* (2013b) ont démontré que la C₈-HSL est l'AHL majoritairement produite *via* la synthase BmaI1 de *B. mallei* GB8. Ainsi, la C₈-HSL constitue le principal auto-inducteur du système BmaI1/BmaR1.

D'après les travaux préliminaires de Ulrich *et al.* (2004d), BtaR1 n'affecte pas la biosynthèse de la C₈-HSL chez *B. thailandensis* DW503. Il n'empêche que l'analyse transcriptomique de Majerczyk *et al.* (2014a) montre que le régulateur transcriptionnel BtaR1 de *B. thailandensis* E264 stimule l'expression du gène *btaI1*, suggérant une auto-régulation positive du système BtaI1/BtaR1. L'hypothèse est que BtaR1, en association avec la C₈-HSL, interagit spécifiquement avec la région promotrice de *btaI1* au niveau d'une boîte *lux*. Des études réalisées chez les souches bactériennes *B. pseudomallei* KHW et *B. pseudomallei* K96243 indiquent effectivement que le complexe BpsR/C₈-HSL active directement la transcription du gène *bpsI* (Gamage *et al.*, 2011, Kiratisin *et al.*, 2008). Cependant, la C₈-HSL ne constitue pas l'unique ligand du régulateur transcriptionnel BpsR puisque des AHL alternatives telles que la 3OHC₈-HSL sont également capables d'activer l'expression de *bpsI* (Gamage *et al.*, 2011, Kiratisin *et al.*, 2008). Par ailleurs, la transcription du gène *bpsR* est auto-régulée positivement *via* le complexe BpsR/C₈-HSL chez *B. pseudomallei* KHW (Song *et al.*, 2005), et Lumjiaktase *et al.* (2006) ont démontré que BpsR est un activateur de la biosynthèse de la C₈-HSL puisque l'inactivation de *bpsR* résulte en une abolition de la production de cette AHL chez *B. pseudomallei* PP844. À ce jour, il n'existe aucune étude démontrant l'implication de BmaR1 dans la modulation de la biosynthèse de la C₈-HSL. Toutefois, Duerkop *et al.* (2007) rapportent que le régulateur transcriptionnel BmaR1 de *B. mallei* ATCC 23344 contrôle positivement et directement l'expression du gène *bmaI1* conjointement avec la C₈-HSL. Cette AHL, en revanche, ne semble pas avoir d'effet sur la transcription du gène *bmaR1* chez *B. mallei* GB8 (Majerczyk *et al.*, 2014b).

Toutes les AHL associées aux systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1 chez diverses souches bactériennes de *B. thailandensis*, de *B. pseudomallei* et de *B. mallei*, respectivement, sont répertoriées dans le **Tableau 1.6**.

Tableau 1.6. Répertoire des AHL associées aux systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1.

AHL	LuxI	LuxR	Souche bactérienne	Référence
C ₆ -HSL	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	BmaI1		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2008)
C ₈ -HSL	BtaI1		<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
	BtaI1		<i>B. thailandensis</i> E264	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
		BpsR	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Kiratisin <i>et al.</i> , 2008)
	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Song <i>et al.</i> , 2005)
	BpsI	BpsR	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	(Horton <i>et al.</i> , 2013)
	BpsI	BpsR	<i>B. pseudomallei</i> PP844	(Lumjiaktase <i>et al.</i> , 2006)
	BmaI1		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)
	BmaI1	BmaR1	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2007)
	BmaI1		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2008)
	BmaI1		<i>B. mallei</i> GB8	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2013b)
	3OC ₈ -HSL		BpsR	<i>B. pseudomallei</i> K96243
BpsI		BpsR	<i>B. pseudomallei</i> PP844	(Lumjiaktase <i>et al.</i> , 2006)
3OHC ₈ -HSL	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	BpsI	BpsR	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	(Horton <i>et al.</i> , 2013)
	BmaI1		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)
	BmaI1	BmaR1	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2007)
	BmaI1		<i>B. mallei</i> GB8	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2013b)
C ₁₀ -HSL	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> 008	(Valade <i>et al.</i> , 2004)
	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
		BpsR	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Kiratisin <i>et al.</i> , 2008)
	BpsI	BpsR	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	BmaI1		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)
	BmaR1	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2007)	
3OHC ₁₀ -HSL	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	BpsI		<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
C ₁₂ -HSL		BmaR1	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2007)

1.3.2.3.3.4. Le système *BtaII/BtaRI* influence l'auto-agrégation bactérienne, le développement du biofilm, la production d'exopolysaccharides, l'inhibition de croissance contact-dépendant et la biosynthèse de l'acide oxalique

Des études phénotypiques réalisées chez *B. thailandensis* DW503 suggèrent que le *quorum sensing* intervient dans de nombreux processus cellulaires tels que l'activité lipolytique, la biosynthèse des sidérophores, la morphologie coloniale, la mobilité bactérienne, la production d'hémolysines, ainsi que le métabolisme et/ou le transport du carbone (Ulrich, 2004, Ulrich *et al.*, 2004d). En revanche, ni l'activité protéolytique, ni la biosynthèse des phospholipases ne sont régulées *via* le *quorum sensing* chez *B. thailandensis* DW503 (Ulrich *et al.*, 2004d). Chez *B. thailandensis* E264, Chandler *et al.* (2009) ont démontré que le *quorum sensing* influence non seulement la morphologie coloniale mais également l'auto-agrégation bactérienne (Fig. 1.30). De plus, Chandler *et al.* (2009) ont confirmé l'implication du *quorum sensing* dans la mobilité bactérienne chez *B. thailandensis* E264. Cependant, les mécanismes de régulation sous-jacents sont encore inconnus. Selon les travaux préliminaires de Ulrich *et al.* (2004d), le *quorum sensing* n'affecte ni la biosynthèse des flagelles ni la production des pili chez *B. thailandensis* DW503, alors que l'analyse transcriptomique de Majerczyk *et al.* (2014a) indique que l'expression de nombreux gènes codant des protéines flagellaires et des protéines de chimiotaxie est modulée en fonction de la densité cellulaire chez *B. thailandensis* E264. Il apparaît, par ailleurs, que le *quorum sensing*, chez *B. thailandensis* E264, n'a aucun impact sur le métabolisme et/ou le transport du carbone, de l'azote et du phosphore et n'est indispensable ni pour la biosynthèse d'hémolysines, ni pour l'activité protéolytique (Chandler *et al.*, 2009). En outre, Chandler *et al.* (2009) ont rapporté que la virulence bactérienne n'est pas sous le contrôle du *quorum sensing* chez *B. thailandensis* E264.

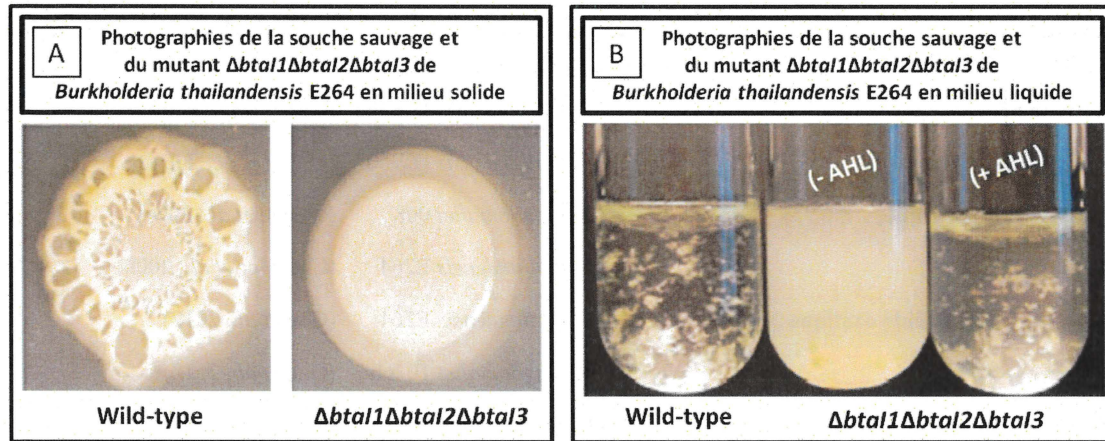


Figure 1.30. Le quorum sensing affecte la morphologie coloniale et l'auto-agrégation chez *B. thailandensis* E264.

(A) Chez *B. thailandensis* E264, Chandler *et al.* (2009) ont observé que les colonies du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$, déficient dans la biosynthèse des AHL, présentent une apparence lisse contrastant avec l'aspect rugueux des colonies de la souche sauvage en milieu solide, attestant que le quorum sensing contrôle la morphologie coloniale. (B) Il apparaît, par ailleurs, que les AHL favorisent la formation d'agrégats en milieu liquide, démontrant l'implication du quorum sensing dans l'auto-agrégation bactérienne chez *B. thailandensis* E264 (Chandler *et al.*, 2009).

Parmi les activités biologiques attribuées au système BtaI1/BtaR1 de *B. thailandensis* E264 figurent notamment l'inhibition de croissance contact-dépendant médiée via le système de sécrétion de type VI par l'entremise de toxines ainsi que d'anti-toxines, l'auto-agrégation bactérienne, la production d'exopolysaccharides, le développement du biofilm ou encore la biosynthèse de l'acide oxalique nécessaire au maintien d'un pH homéostatique (Chandler *et al.*, 2009, Goo *et al.*, 2012, Majerczyk *et al.*, 2014a, Majerczyk *et al.*, 2016, Tseng *et al.*, 2016) (Tableau 1.7).

Tableau 1.7. Processus cellulaires contrôlés via les systèmes BtaI1/BtaR1, BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1.

Processus cellulaire	Souche bactérienne	Référence
Activité hémolytique	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
Activité lipolytique	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
Activité protéolytique	<i>B. pseudomallei</i> 008	(Valade <i>et al.</i> , 2004)
Auto-agrégation	<i>B. thailandensis</i> E264	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
Biosynthèse de l'acide oxalique	<i>B. thailandensis</i> E264	(Goo <i>et al.</i> , 2012)
	<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Goo <i>et al.</i> , 2012)
Biosynthèse des sidérophores	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Song <i>et al.</i> , 2005)
Développement du biofilm	<i>B. thailandensis</i> E264	(Tseng <i>et al.</i> , 2016)
	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Ramli <i>et al.</i> , 2012)
	<i>B. pseudomallei</i> PP844	(Mongkolrob <i>et al.</i> , 2015)
Inhibition de croissance contact-dépendant	<i>B. thailandensis</i> E264	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2016)
Métabolisme et/ou transport du carbone	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
Mobilité	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
	<i>B. pseudomallei</i> 008	(Ooi <i>et al.</i> , 2013)
Morphologie coloniale	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
	<i>B. pseudomallei</i> 008	(Ooi <i>et al.</i> , 2013)
Production d'exopolysaccharides	<i>B. thailandensis</i> E264	(Tseng <i>et al.</i> , 2016)
	<i>B. pseudomallei</i> 008	(Ooi <i>et al.</i> , 2013)
	<i>B. pseudomallei</i> PP844	(Mongkolrob <i>et al.</i> , 2015)
Production des phospholipases	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Song <i>et al.</i> , 2005)
Réponse au stress oxydatif	<i>B. pseudomallei</i> PP844	(Lumjiaktase <i>et al.</i> , 2006)
Résistance aux antibiotiques	<i>B. pseudomallei</i> PP844	(Mongkolrob <i>et al.</i> , 2015)
Virulence	<i>B. pseudomallei</i> 008	(Valade <i>et al.</i> , 2004)
	<i>B. pseudomallei</i> DD503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Song <i>et al.</i> , 2005)
	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)

1.3.2.3.3.5. Les systèmes BpsI/BpsR et BmaI1/BmaR1 jouent un rôle dans la virulence bactérienne

Chez *B. pseudomallei* 008, le système BpsI/BpsR contrôle la virulence bactérienne, la morphologie coloniale, l'activité protéolytique, la production d'exopolysaccharides et la mobilité bactérienne (Ooi *et al.*, 2013, Valade *et al.*, 2004) (**Tableau 1.7**). Ulrich *et al.* (2004b) ont également démontré, en réalisant des tests d'infection chez plusieurs organismes modèles de laboratoire (cf. le **Tableau 1.4** présenté à la section 1.3.2.3.2.2), que le système BpsI/BpsR influence la pathogénicité de *B. pseudomallei* DD503. En revanche, la biosynthèse des protéases, des lipases et des phospholipases ne sont pas sous le contrôle du *quorum sensing* chez *B. pseudomallei* DD503 (Ulrich *et al.*, 2004b). L'hypothèse est que le système BpsI/BpsR n'intervient pas dans la pathogénicité de *B. pseudomallei* DD503 en modulant la synthèse et/ou la sécrétion de ces facteurs de virulence potentiels (Ulrich *et al.*, 2004b). Similairement, Song *et al.* (2005) ont démontré que le système BpsI/BpsR n'a pas d'impact sur la production des protéases et des lipases chez *B. pseudomallei* KHW. Toutefois, la biosynthèse des phospholipases est régulée *via* le système BpsI/BpsR de *B. pseudomallei* KHW (Song *et al.*, 2005) (**Tableau 1.7**). D'autres activités biologiques telles que la production des sidérophores, le développement du biofilm et la virulence bactérienne ont été attribuées au système BpsI/BpsR de *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011, Song *et al.*, 2005) (**Tableau 1.7**). Par ailleurs, le système BpsI/BpsR affecte la réponse au stress oxydatif, la production d'exopolysaccharides, la résistance aux antibiotiques ou encore le développement du biofilm chez *B. pseudomallei* PP844 (Lumjiaktase *et al.*, 2006, Mongkolroob *et al.*, 2015) (**Tableau 1.7**). Cependant, le rôle du *quorum sensing* dans la pathogénicité de *B. pseudomallei* PP844 n'a pas encore été investigué. Chez *B. pseudomallei* MSHR520, Horton *et al.* (2013) rapportent que le *quorum sensing* n'est pas nécessaire pour le développement des infections aiguës, et suggèrent, en conséquence, une implication dans l'établissement des infections chroniques.

Des tests d'infection, effectués chez plusieurs organismes modèles de laboratoire (cf. le **Tableau 1.4** présenté à la section 1.3.2.3.2.2), ont permis de mettre en exergue l'importance du système BmaI1/BmaR1 dans la pathogénicité de *B. mallei* ATCC 23344 (Ulrich *et al.*, 2004c) (**Tableau 1.7**). Toutefois, les mécanismes de régulation sous-jacents restent à déterminer puisque le *quorum sensing* n'a aucun effet sur la production des polysaccharides capsulaires, l'activité hémolytique et la biosynthèse des protéases, des lipases ainsi que des phospholipases (Ulrich *et al.*, 2004c). Notons, néanmoins, que Majerczyk *et al.*

(2013b) ont réinvestigé le rôle du *quorum sensing* dans la pathogénicité de *B. mallei* ATCC 23344, et ont observé que le *quorum sensing* n'est pas impliqué dans la virulence bactérienne chez *B. mallei* ATCC 23344. En outre, Majerczyk *et al.* (2013b) ont démontré que la pathogénicité de *B. mallei* GB8 n'est pas sous le contrôle du *quorum sensing*.

L'ensemble de ces considérations indique donc que les processus cellulaires sous le contrôle du *quorum sensing* parmi les membres du groupe *Bptm* diffèrent d'une espèce bactérienne à l'autre, et peuvent aussi varier au sein d'une même espèce bactérienne. L'hypothèse est que la modulation des processus cellulaires *via* le *quorum sensing* est dépendante des conditions environnementales variées auxquelles les bactéries *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. mallei* peuvent être confrontées et des différents modes de vie qu'elles sont susceptibles d'adopter. À titre d'exemple, *B. pseudomallei* 008 est une souche clinique isolée en Europe (Valade *et al.*, 2004), alors que les souches cliniques *B. pseudomallei* K96243, *B. pseudomallei* KHW et *B. pseudomallei* PP844 proviennent d'Asie (Holden *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2005, Utaisincharoen *et al.*, 2001). D'autres régulateurs transcriptionnels et/ou post-transcriptionnels spécifiques et globaux sont, par ailleurs, susceptibles d'influencer la modulation de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire chez les membres du groupe *Bptm* comme, par exemple, le facteur sigma RpoS (Mongkolroob *et al.*, 2015, Wongtrakoongate *et al.*, 2012).

1.3.2.3.4. Les systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2

1.3.2.3.4.1. Les systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2 sont homologues

Le système BtaI2/BtaR2 est constitué de la synthase BtaI2 ainsi que du régulateur transcriptionnel BtaR2 (Ulrich *et al.*, 2004d) (**Tableau 1.8**), tandis que le système BpsI2/BpsR2 est constitué de la synthase BpsI2 ainsi que du régulateur transcriptionnel BpsR2 (Ulrich *et al.*, 2004b) (**Tableau 1.8**).

Tableau 1.8. Homologies entre les systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2.

Gène	Protéine	Souche bactérienne	Identité (Similarité)
<i>btaI2</i> (ou BTH_II1227)	BtaI2	<i>B. thailandensis</i> E264	100%
<i>bpsI2</i> (ou BPSS1180)	BpsI2	<i>B. pseudomallei</i> K96243	92% (94%)
<i>btaR2</i> (ou BTH_II1231)	BtaR2	<i>B. thailandensis</i> E264	100%
<i>bpsR2</i> (ou BPSS1176)	BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> K96243	95% (96%)

Les gènes *btaI2* et *btaR2* sont transcrits dans la même direction et ne sont pas localisés l'un à côté de l'autre au sein du génome de *B. thailandensis* E264 similairement aux gènes *bpsI2* et *bpsR2* de *B. pseudomallei* K96243 (**Fig. 1.31**). Ces gènes sont, entre autres, séparés par un homologue du gène *rsaM* codant potentiellement une protéine régulatrice de type RsaM initialement caractérisée chez *P. fuscovaginae* (cf. la **Figure 1.20** présentée à la section 1.3.2.2.2). La fonction de cette protéine n'a pas encore été investiguée chez aucun des membres du groupe *Bptm*.

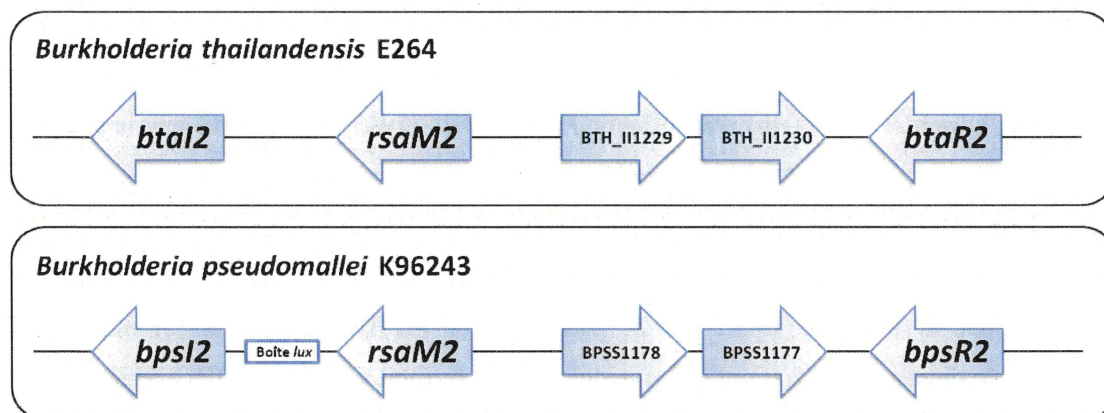


Figure 1.31. Organisation structurale des gènes *btaI2/btaR2* chez *B. thailandensis* E264 et *bpsI2/bpsR2* chez *B. pseudomallei* K96243.

La région promotrice du gène *bpsI2* de *B. pseudomallei* K96243 contient une boîte *lux* putative (CGCTGTCATACTTGCTAGGT) susceptible d'être reconnue spécifiquement par le régulateur transcriptionnel BpsR2 (Kiratisin *et al.*, 2008). En revanche, aucune boîte *lux* potentiellement reconnue de manière spécifique par le régulateur transcriptionnel BtaR2 n'a été identifiée dans la région promotrice du gène *btaI2* de *B. thailandensis* E264.

1.3.2.3.4.2. La 3OHC₁₀-HSL est le principal auto-inducteur des systèmes *BtaI2/BtaR2* et *BpsI2/BpsR2*

L'étude comparative du profil de biosynthèse des AHL chez la souche sauvage et chez le mutant *btaI2*- de *B. thailandensis* DW503 via l'utilisation de biorapporteurs spécifiques a

permis de déterminer que la synthase BtaI2 est responsable de la production de la C₁₀-HSL (Ulrich *et al.*, 2004d). Toutefois, Duerkop *et al.* (2009) ont démontré que l'inactivation du gène *btaI2* de *B. thailandensis* E264 résulte en une abolition de la production de la 3OHC₁₀-HSL, donc considérée comme le principal auto-inducteur du système BtaI2/BtaR2. Par ailleurs, de la 3OHC₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL ont été détectées par spectrométrie de masse dans des cultures d'un mutant $\Delta btaI1\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 (Duerkop *et al.*, 2009). Ainsi, la synthase BtaI2 catalyse la synthèse autant de la 3OHC₈-HSL que de la 3OHC₁₀-HSL. Celle-ci n'intervient pas, en revanche, dans la biosynthèse de la C₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2009).

Les travaux préliminaires de Ulrich *et al.* (2004b) révèlent que la synthase BpsI2 de *B. pseudomallei* 1026b produit notamment de la 3OHC₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 1.32**). Subséquemment, Gamage *et al.* (2011) ont démontré que la synthase BpsI2 de *B. pseudomallei* KHW synthétise essentiellement de la 3OHC₁₀-HSL et représente, donc, le principal auto-inducteur du système BpsI2/BpsR2. En outre, la synthase BpsI2 de *B. pseudomallei* KHW intervient dans la production d' AHL additionnelles telles que la 3OHC₈-HSL (Gamage *et al.*, 2011) (**Fig. 1.32**). Il apparaît, néanmoins, que les synthases BpsI2 de *B. pseudomallei* 1026b et de *B. pseudomallei* KHW produisent des AHL spécifiques (Gamage *et al.*, 2011, Ulrich *et al.*, 2004b). Par ailleurs, Horton *et al.* (2013) ont observé que la synthase BpsI2 de *B. pseudomallei* MSHR520 synthétise des AHL communes aux synthases BpsI2 de *B. pseudomallei* 1026b et de *B. pseudomallei* KHW parmi lesquelles figurent la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 1.32**). Cependant, la 3OHC₁₀-HSL est l' AHL majoritairement produite par la synthase BpsI2 de *B. pseudomallei* MSHR520 (Horton *et al.*, 2013). L'ensemble de ces considérations indique donc que la biosynthèse de la 3OHC₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL est une caractéristique commune aux synthases BpsI2 de *B. pseudomallei* 1026b, de *B. pseudomallei* KHW et de *B. pseudomallei* MSHR520, tandis que d'autres AHL peuvent être produites spécifiquement selon les souches bactériennes (Gamage *et al.*, 2011, Horton *et al.*, 2013, Ulrich *et al.*, 2004b).

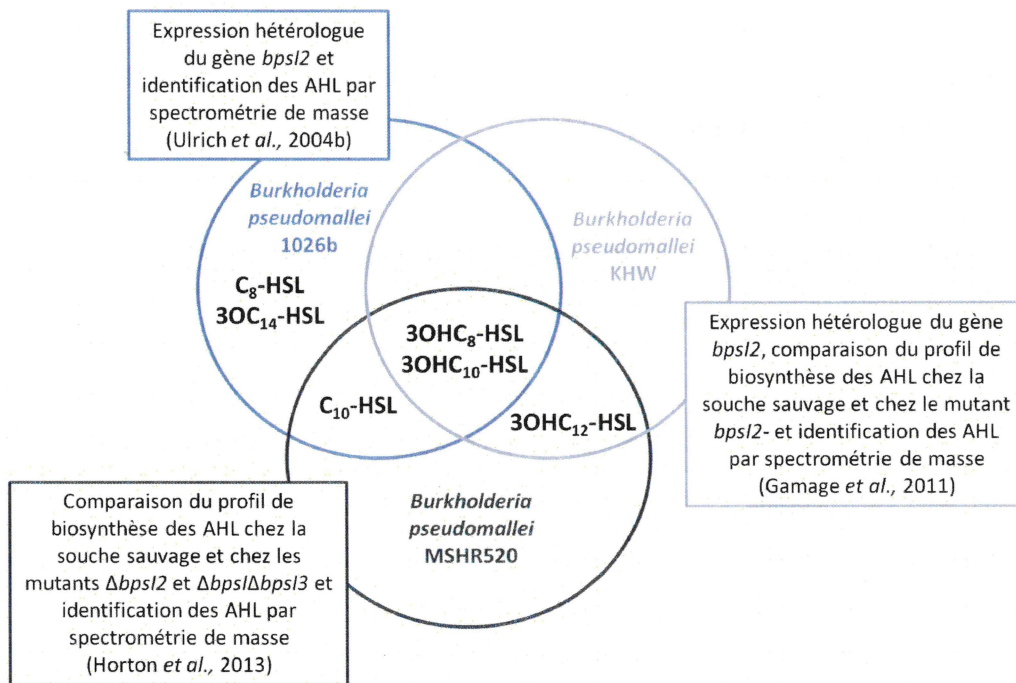


Figure 1.32. Répertoire des AHL synthétisées *via* la synthase BpsI2.

Le régulateur transcriptionnel BtaR2 de *B. thailandensis* E264 contrôle positivement et directement l'expression du gène *btaI2* et, de ce fait, constitue vraisemblablement un activateur de la biosynthèse de la 3OHC₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL (Duerkop *et al.*, 2009, Majerczyk *et al.*, 2014a). De plus, Duerkop *et al.* (2009) ont démontré que l'activation de l'expression du gène *btaI2* *via* le régulateur transcriptionnel BtaR2 implique notamment la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL et les données RNA-Seq (*RNA-Sequencing*) de Majerczyk *et al.* (2014a) indiquent que la transcription du gène *btaR2* est stimulée par la 3OHC₈-HSL chez *B. thailandensis* E264, révélant une auto-régulation positive du système BtaI2/BtaR2. Similairement, Gamage *et al.* (2011) ont observé que la transcription du gène *bpsI2* est activée essentiellement *via* la 3OHC₁₀-HSL, ainsi que *via* d'autres AHL telles que la 3OHC₈-HSL, et est contrôlée positivement et directement par le régulateur transcriptionnel BpsR2 de *B. pseudomallei* KHW. Par ailleurs, les régulateurs transcriptionnels BpsR2 de *B. pseudomallei* KHW et de *B. pseudomallei* K96243 sont capables d'activer, dans une moindre mesure, la transcription de *bpsI2* en association avec la C₈-HSL (Gamage *et al.*, 2011, Kiratisin *et al.*, 2008), alors que le régulateur transcriptionnel BtaR2 de *B. thailandensis* E264 n'interagit pas avec la C₈-HSL pour stimuler l'expression de *btaI2* (Duerkop *et al.*, 2009). Ainsi, BtaR2 et BpsR2 présentent des modes de fonctionnement certes semblables mais non identiques.

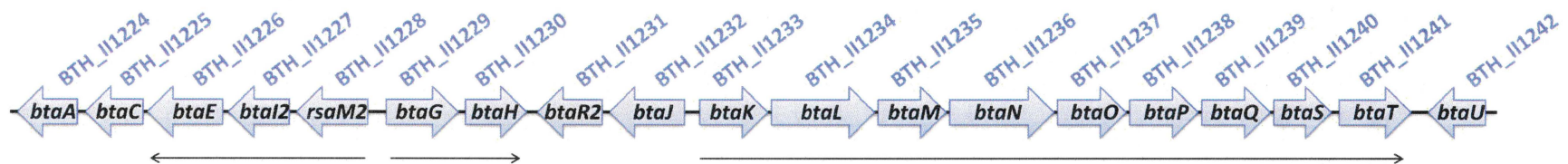
Toutes les AHL associées aux systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2 chez diverses souches bactériennes de *B. thailandensis* et de *B. pseudomallei*, respectivement, sont répertoriées dans le **Tableau 1.9**.

Tableau 1.9. Répertoire des AHL associées aux systèmes BtaI2/BtaR2 et BpsI2/BpsR2.

AHL	LuxI	LuxR	Souche bactérienne	Référence
C ₆ -HSL		BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Kiratisin <i>et al.</i> , 2008)
C ₈ -HSL	BpsI2		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
		BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Kiratisin <i>et al.</i> , 2008)
		BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
3OC ₈ -HSL		BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Kiratisin <i>et al.</i> , 2008)
3OHC ₈ -HSL	BtaI2	BtaR2	<i>B. thailandensis</i> E264	(Duerkop <i>et al.</i> , 2009)
		BpsI2	<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	BpsI2	BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	BpsI2		<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	(Horton <i>et al.</i> , 2013)
C ₁₀ -HSL	BtaI2		<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
		BtaR2	<i>B. thailandensis</i> E264	(Duerkop <i>et al.</i> , 2009)
	BpsI2		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
		BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Kiratisin <i>et al.</i> , 2008)
		BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
BpsI2		<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	(Horton <i>et al.</i> , 2013)	
3OHC ₁₀ -HSL	BtaI2	BtaR2	<i>B. thailandensis</i> E264	(Duerkop <i>et al.</i> , 2009)
		BpsI2	<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	BpsI2	BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	BpsI2		<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	(Horton <i>et al.</i> , 2013)
C ₁₂ -HSL		BtaR2	<i>B. thailandensis</i> E264	(Duerkop <i>et al.</i> , 2009)
3OHC ₁₂ -HSL	BpsI2	BpsR2	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
			<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	(Horton <i>et al.</i> , 2013)
3OC ₁₄ -HSL	BpsI2		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)

1.3.2.3.4.3. *Le système BtaI2/BtaR2 contrôle la biosynthèse d'antibiotiques de la famille des bactobolines*

Chez *B. thailandensis* E264, les gènes *btaI2* et *btaR2* sont entourés de part et d'autre par des gènes, appelés *bta*, que l'on retrouve également sur le génome de *B. pseudomallei* K96243 (Fig. 1.33). Ces gènes codent les enzymes impliquées dans la biosynthèse d'antibiotiques de la famille des bactobolines (Carr *et al.*, 2011, Duerkop *et al.*, 2009, Seyedsayamdost *et al.*, 2010).



Gène	Nom	Opéron	Description (d'après Burkholderia.com)
BTH_II1224	<i>btaA</i>		CmaB
BTH_II1225	<i>btaC</i>		phosphopantetheine-containing protein
BTH_II1226	<i>btaE</i>	BTH_II1226 - BTH_II1228	peptide synthetase
BTH_II1227	<i>btaI2</i>	BTH_II1226 - BTH_II1228	<i>N</i> -acyl homoserine lactone synthase
BTH_II1228	<i>rsaM2</i>	BTH_II1226 - BTH_II1228	hypothetical protein
BTH_II1229	<i>btaG</i>	BTH_II1229 - BTH_II1230	sodium/hydrogen exchanger
BTH_II1230	<i>btaH</i>	BTH_II1229 - BTH_II1230	hypothetical protein
BTH_II1231	<i>btaR2</i>		ATP-dependent transcription regulator LuxR
BTH_II1232	<i>btaJ</i>		oligopeptidase A
BTH_II1233	<i>btaK</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	peptide synthetase
BTH_II1234	<i>btaL</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	JamP
BTH_II1235	<i>btaM</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	JamP
BTH_II1236	<i>btaN</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	nonribosomal peptide synthetase
BTH_II1237	<i>btaO</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	thio-template mechanism natural product synthetase
BTH_II1238	<i>btaP</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	polyketide synthase
BTH_II1239	<i>btaQ</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	acetyltransferase
BTH_II1240	<i>btaS</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	thioesterase II
BTH_II1241	<i>btaT</i>	BTH_II1233 - BTH_II1241	Bcr/CfIA family protein drug resistance transporter
BTH_II1242	<i>btaU</i>		TauD/TfdA family dioxygenase

Figure 1.33. Organisation structurale des gènes *bta* codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des bactobolines.
 Les flèches noires indiquent que les gènes sont potentiellement organisés en opéron d'après Burkholderia.com.

Les bactobolines produites par *B. thailandensis* E264 présentent des structures chimiques diverses (**Fig. 1.34**). Celles-ci sont actives contre des bactéries à Gram positif telles que *B. subtilis*, *S. aureus* ou encore *Streptococcus pyogenes* et procureraient, de ce fait, un avantage compétitif vis-à-vis d'espèces bactériennes qui colonisent une même niche écologique (Carr *et al.*, 2011, Chandler *et al.*, 2012a, Chandler *et al.*, 2012b, Duerkop *et al.*, 2009, Seyedsayamdost *et al.*, 2010). Le système BtaI2/BtaR2, chez *B. thailandensis* E264, contrôle positivement et directement la transcription des gènes *bta* et, de ce fait, la production des bactobolines (Duerkop *et al.*, 2009, Majerczyk *et al.*, 2014a). D'autres bactéries à Gram négatif comme, par exemple, *P. carotovorum*, *Pseudomonas aureofaciens* et *B. vietnamiensis* régulent pareillement la biosynthèse d'antibiotiques *via* le *quorum sensing* (Bainton *et al.*, 1992, McGowan *et al.*, 1995, Park *et al.*, 2001, Pierson *et al.*, 1994).

- Bactoboline A** : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CHCl}_2$
- Bactoboline B** : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{L-Ala}$, $R_3 = \text{CHCl}_2$
- Bactoboline C** : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CHCl}_2$
- Bactoboline D** : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{L-Ala}$, $R_3 = \text{CHCl}_2$
- Bactoboline E** : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{L-Ala-L-Ala}$, $R_3 = \text{CHCl}_2$
- Bactoboline F** : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{L-Ala-L-Ala}$, $R_3 = \text{CHCl}_2$
- Bactoboline G** : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_2\text{Cl}$
- Bactoboline H** : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{L-Ala}$, $R_3 = \text{CH}_2\text{Cl}$

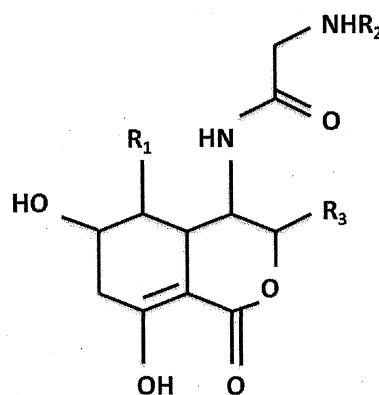


Figure 1.34. Structure chimique des différentes bactobolines identifiées chez *B. thailandensis* E264. D'après Carr *et al.* (2011).

Les travaux préliminaires de Ulrich *et al.* (2004d) suggèrent, par ailleurs, que le système BtaI2/BtaR2, chez *B. thailandensis* DW503, intervient dans la production d'hémolysines, dans l'activité lipolytique ainsi que dans le métabolisme et/ou le transport du carbone. En outre, Ulrich *et al.* (2004b) ont démontré, en réalisant des tests d'infection chez plusieurs organismes modèles de laboratoire (cf. le **Tableau 1.4** présenté à la section 1.3.2.3.2.2), que le système BpsI2/BpsR2 contrôle la pathogénicité de *B. pseudomallei* DD503. Cependant, puisqu'aucun homologue du système BpsI2/BpsR2 n'est présent chez *B. mallei*, la modulation, *via* le *quorum sensing*, de la production des facteurs de survie et/ou de virulence nécessaires aux associations hôte-pathogène impliquerait d'avantage les systèmes BpsI/BpsR et BpsI3/BpsR3 chez *B. pseudomallei* (Duerkop *et al.*, 2009).

1.3.2.3.5. Les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3

1.3.2.3.5.1. Les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 sont homologues

Le système BtaI3/BtaR3 est composé de la synthase BtaI3 et du régulateur transcriptionnel BtaR3 (Ulrich *et al.*, 2004d) (**Tableau 1.10**). Par ailleurs, la synthase BpsI3 et le régulateur transcriptionnel BpsR3 composent le système BpsI3/BpsR3 (Ulrich *et al.*, 2004b) (**Tableau 1.10**), alors que la synthase BmaI3 et le régulateur transcriptionnel BmaR3 composent le système BmaI3/BmaR3 (Ulrich *et al.*, 2004c) (**Tableau 1.10**).

Tableau 1.10. Homologies entre les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3.

Gène	Protéine	Souche bactérienne	Identité (Similarité)
<i>btaI3</i> (ou BTH_II0804)	BtaI3	<i>B. thailandensis</i> E264	100%
<i>bpsI3</i> (ou BPSS1570)	BpsI3	<i>B. pseudomallei</i> K96243	92% (95%)
<i>bmaI3</i> (ou BMAA1577)	BmaI3	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	92% (95%)
<i>btaR3</i> (ou BTH_II0805)	BtaR3	<i>B. thailandensis</i> E264	100%
<i>bpsR3</i> (ou BPSS1569)	BpsR3	<i>B. pseudomallei</i> K96243	96% (97%)
<i>bmaR3</i> (ou BMAA1576)	BmaR3	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	96% (97%)

Les gènes *btaI3* et *btaR3* sont adjacents sur le génome de *B. thailandensis* E264 et sont transcrits dans la même direction similairement aux gènes *bpsI3* et *bpsR3* de *B. pseudomallei* K96243 ainsi qu'aux gènes *bmaI3* et *bmaR3* de *B. mallei* ATCC 23344 (**Fig. 1.35**).

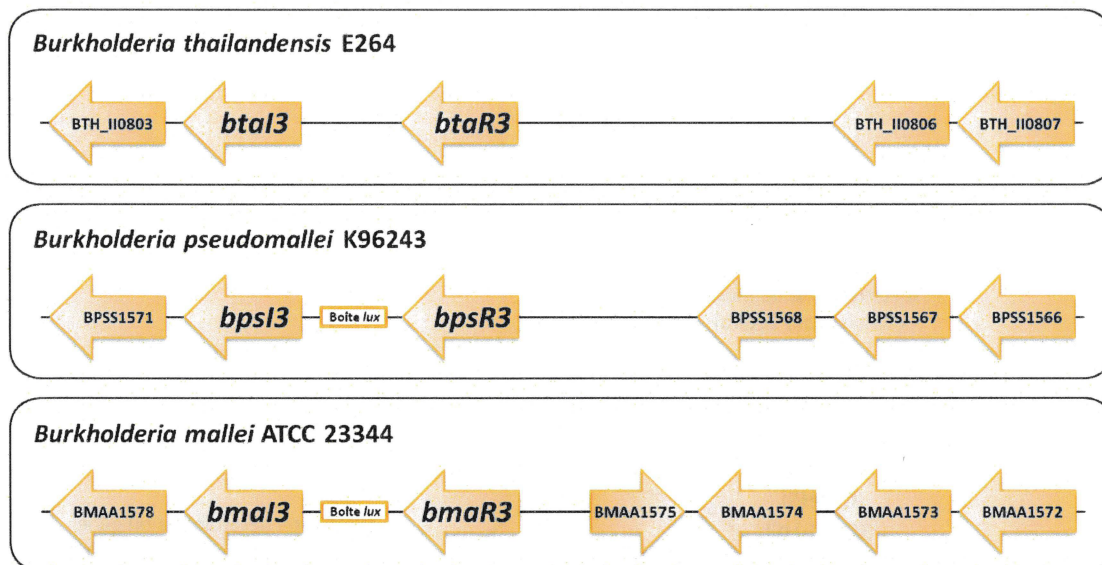


Figure 1.35. Organisation structurale des gènes *btaI3/btaR3* chez *B. thailandensis* E264, *bpsI3/bpsR3* chez *B. pseudomallei* K96243 et *bmaI3/bmaR3* chez *B. mallei* ATCC 23344.

La région promotrice des gènes *bpsI3* et *bmaI3* possède une boîte *lux* putative (TCGTGTCGCGCAACAGCC) susceptible d'être reconnue spécifiquement par les régulateurs transcriptionnels BpsR3 et BmaR3, respectivement (Kiratisin *et al.*, 2008). En revanche, aucune boîte *lux* potentiellement reconnue de manière spécifique par le régulateur transcriptionnel BtaR3 n'a été identifiée dans la région promotrice du gène *btaI3*.

1.3.2.3.5.2. La 3OHC₈-HSL est le principal auto-inducteur des systèmes *BtaI3/BtaR3*, *BpsI3/BpsR3* et *BmaI3/BmaR3*

L'utilisation de biorapporteurs spécifiques pour l'identification des AHL retrouvées chez la souche sauvage et chez le mutant *btaI3*- de *B. thailandensis* DW503 a permis de déterminer que la synthase BtaI3 catalyse la synthèse de la C₆-HSL (Ulrich *et al.*, 2004d), tandis que Chandler *et al.* (2009) ont démontré par spectrométrie de masse que la synthase BtaI3 de *B. thailandensis* E264 synthétise exclusivement de la 3OHC₈-HSL, donc considérée comme le principal auto-inducteur du système BtaI3/BtaR3.

Par ailleurs, la 3OHC₈-HSL constitue le principal auto-inducteur du système BpsI3/BpsR3 puisque (i) la 3OHC₈-HSL est la seule AHL commune aux synthèses BpsI3 de *B. pseudomallei* 1026b, de *B. pseudomallei* KHW et de *B. pseudomallei* MSHR520 (Gamage *et al.*, 2011, Horton *et al.*, 2013, Ulrich *et al.*, 2004b); (ii) la 3OHC₈-HSL représente l'AHL majoritairement produite via la synthase BpsI3 de *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011); (iii) la synthase BpsI3 de *B. pseudomallei* MSHR520 synthétise exclusivement de la 3OHC₈-HSL (Horton *et al.*, 2013) (**Fig. 1.36**). Toutefois, les synthèses BpsI3 de *B. pseudomallei* 1026b et de *B. pseudomallei* KHW interviennent dans la biosynthèse d'autres

AHL comme, par exemple, la 3OHC₁₀-HSL (Gamage *et al.*, 2011, Ulrich *et al.*, 2004b) (Fig. 1.36).

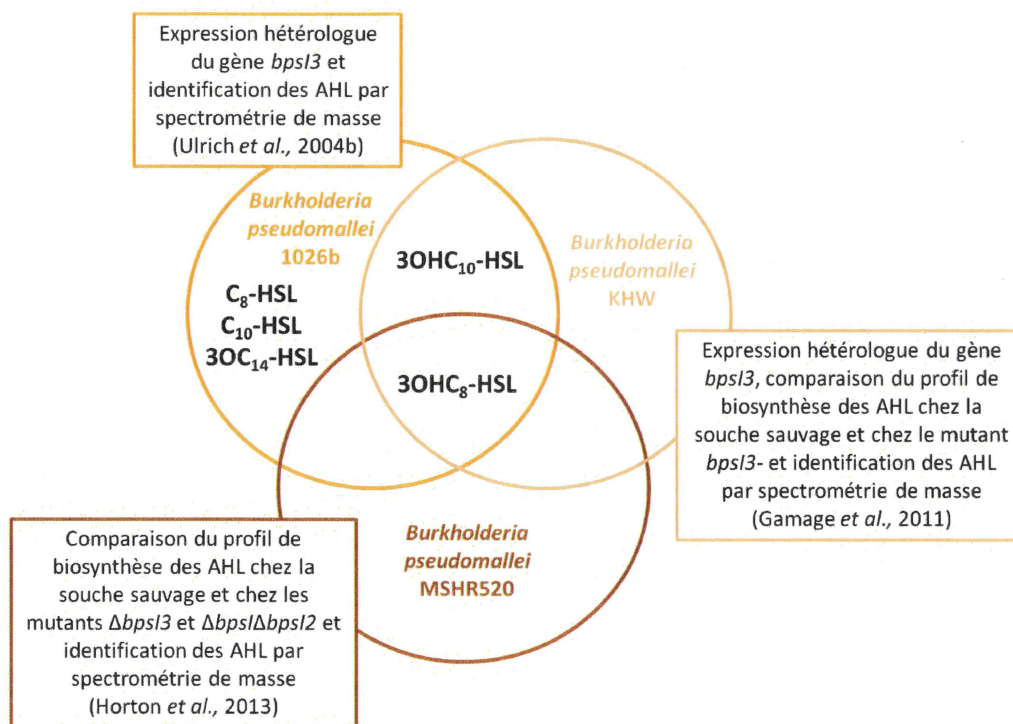


Figure 1.36. Répertoire des AHL synthétisées *via* la synthase BpsI3.

L'expression hétérologue du gène *bmaI3* a permis de déterminer initialement que la C₈-HSL, la C₁₀-HSL et la 3OHC₁₀-HSL sont les AHL produites par la synthase BmaI3 de *B. mallei* ATCC 23344 (Ulrich *et al.*, 2004c). Ces AHL ont été identifiées par spectrométrie de masse (Ulrich *et al.*, 2004c). En revanche, l'étude comparative du profil de biosynthèse des AHL chez la souche sauvage et chez le mutant *bmaI3*- de *B. mallei* ATCC 23344 *via* l'utilisation de biorapporteurs spécifiques révèle que la synthase BmaI3 synthétise majoritairement de la 3OHC₈-HSL de même que, dans une moindre mesure, de la *N*-(3-hydroxy-hexanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₆-HSL) et de la 3OHC₁₀-HSL (Duerkop *et al.*, 2008). Similairement, Majerczyk *et al.* (2013b) ont démontré que la synthase BmaI3 de *B. mallei* GB8 catalyse exclusivement la synthèse de la 3OHC₈-HSL. Ainsi, la 3OHC₈-HSL représente le principal auto-inducteur du système BmaI3/BmaR3.

À ce jour, il n'existe aucune étude démontrant l'implication de BtaR3, de BpsR3 et de BmaR3 dans la modulation de la biosynthèse de la 3OHC₈-HSL. Selon les travaux

préliminaires de Kiratisin *et al.* (2008), le régulateur transcriptionnel BpsR3 de *B. pseudomallei* K96243 réprime directement la transcription du gène *bpsI3*, suggérant une auto-régulation négative du système BpsI3/BpsR3. Cette répression est vraisemblablement indépendante des AHL. L'hypothèse est que BpsR3 agit en tant qu'activateur de l'expression des gènes cibles du système BpsI3/BpsR3 en présence d'AHL et se comporte comme un inhibiteur de la transcription des gènes sous le contrôle du système BpsI3/BpsR3 en absence d'AHL. Semblablement, Gamage *et al.* (2011) ont observé que les AHL ne sont pas impliquées dans la modulation de l'expression du gène *bpsI3* via le régulateur transcriptionnel BpsR3 de *B. pseudomallei* KHW. Il apparaît, en revanche, que le régulateur transcriptionnel BmaR3 de *B. mallei* ATCC 23344 ne contrôle pas la transcription du gène *bmaI3* (Duerkop *et al.*, 2008). De plus, les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014a) suggèrent que le gène *btaI3* ne constitue pas une cible du régulateur transcriptionnel BtaR3 de *B. thailandensis* E264.

Toutes les AHL associées aux systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 chez diverses souches bactériennes de *B. thailandensis*, de *B. pseudomallei* et de *B. mallei*, respectivement, sont répertoriées dans le **Tableau 1.11**.

Tableau 1.11. Répertoire des AHL associées aux systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3.

AHL	LuxI	LuxR	Souche bactérienne	Référence
C ₆ -HSL	BtaI3		<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
3OHC ₆ -HSL	BmaI3		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2008)
C ₈ -HSL	BpsI3		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	BmaI3		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)
3OC ₈ -HSL		BpsR3	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Kiratisin <i>et al.</i> , 2008)
3OHC ₈ -HSL	BtaI3		<i>B. thailandensis</i> E264	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
	BpsI3		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	BpsI3	BpsR3	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	BpsI3		<i>B. pseudomallei</i> MSHR520	(Horton <i>et al.</i> , 2013)
	BmaI3	BmaR3	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2008)
	BmaI3		<i>B. mallei</i> GB8	(Majerczyk <i>et al.</i> , 2013b)
C ₁₀ -HSL	BpsI3		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	BmaI3		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)
3OHC ₁₀ -HSL	BpsI3		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	BpsI3	BpsR3	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
	BmaI3		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)
	BmaI3		<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Duerkop <i>et al.</i> , 2008)
3OHC ₁₂ -HSL		BpsR3	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
3OC ₁₄ -HSL	BpsI3		<i>B. pseudomallei</i> 1026b	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)

1.3.3.2.3.5 Les systèmes BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 jouent un rôle dans la virulence bactérienne

Aucune fonction singulière n'a été attribuée au système BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* E264. L'existence d'interactions éventuelles entre les différents systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 pourrait raisonnablement justifier les difficultés rencontrées en ce qui concerne l'identification de fonctions biologiques spécifiques à ces systèmes de régulation. Toutefois, les travaux préliminaires de Ulrich *et al.* (2004d) suggèrent que l'activité lipolytique, la morphologie coloniale ou encore la production d'hémolysines sont notamment sous le contrôle du système BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* DW503 (Tableau 1.12). Des tests d'infection effectués chez plusieurs organismes modèles de

laboratoire (cf. le **Tableau 1.4** présenté à la section 1.3.2.3.2.2) ont, de plus, permis de mettre en exergue l'importance des systèmes BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 dans la pathogénicité de *B. pseudomallei* DD503 et de *B. mallei* ATCC 23344, respectivement (**Tableau 1.12**).

Tableau 1.12. Processus cellulaires contrôlés via les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3.

Processus cellulaire	Souche bactérienne	Référence
Activité hémolytique	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
Activité lipolytique	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
Développement du biofilm	<i>B. pseudomallei</i> KHW	(Gamage <i>et al.</i> , 2011)
Métabolisme et/ou transport du carbone	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
Mobilité	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
Morphologie coloniale	<i>B. thailandensis</i> DW503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004d)
Virulence	<i>B. pseudomallei</i> DD503	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004b)
	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	(Ulrich <i>et al.</i> , 2004c)

1.3.2.3.6. Les systèmes de *quorum sensing* sont interdépendants au sein des membres du groupe *Bptm*

1.3.2.3.5.1. Interactions entre les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3

À ce jour, aucune interdépendance entre les systèmes BtaI1/BtaR1 et BtaI2/BtaR2 de *B. thailandensis* E264 n'a été caractérisée. En revanche, l'analyse transcriptomique de Majerczyk *et al.* (2014a) montre, d'une part, que le système BtaI1/BtaR1 stimule la transcription du gène *btaR3*, et d'autre part, que les régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3 contrôlent un répertoire de gènes communs (**Fig. 1.37**). Cette analyse suggère, en conséquence, que les systèmes BtaI1/BtaR1 et BtaI3/BtaR3 de *B. thailandensis* E264 sont interdépendants. Si les systèmes BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 de *B. thailandensis* E264 utilisent une AHL commune, à savoir la 3OHC₃-HSL, aucune étude n'a permis de mettre en lumière l'existence d'une interdépendance entre ces deux systèmes de régulation. Par ailleurs, les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014a) indiquent que les régulateurs transcriptionnels BtaR2 et BtaR3 contrôlent un répertoire de gènes différents (**Fig. 1.37**).

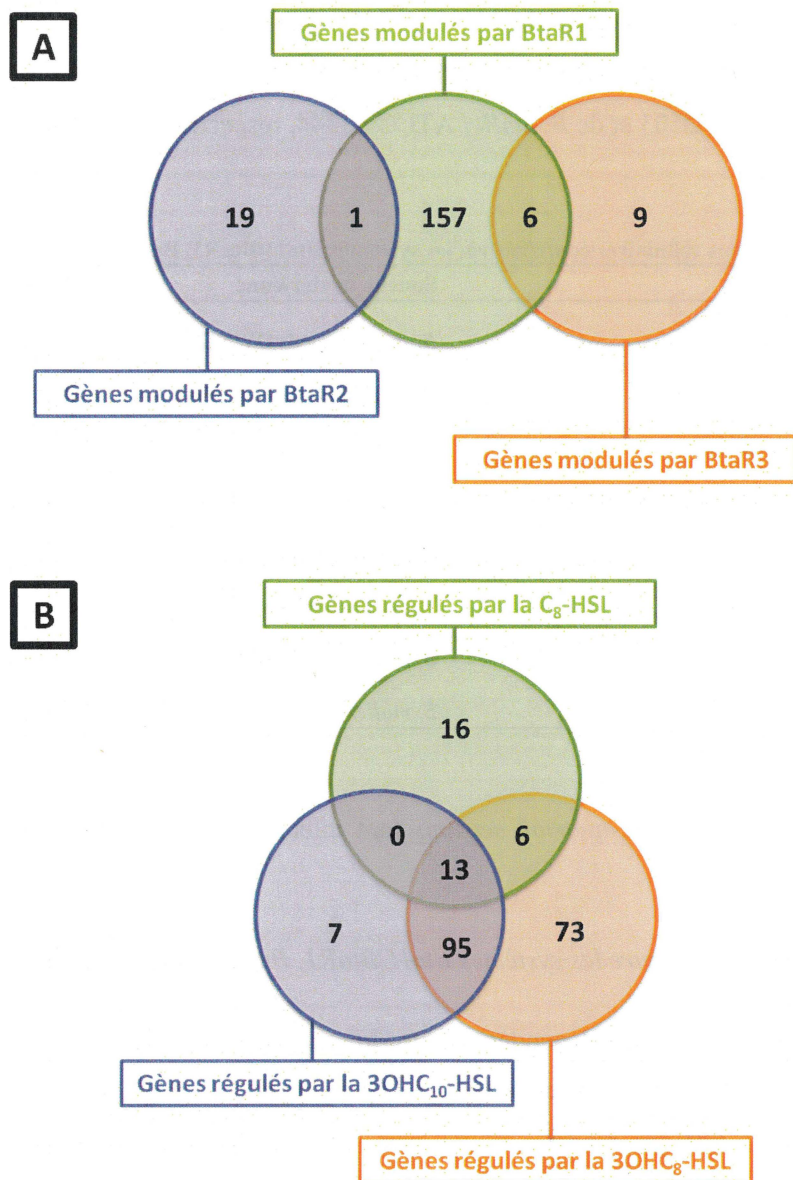


Figure 1.37. Répertoire des gènes sous le contrôle du *quorum sensing* chez *B. thailandensis* E264.
 (A) Diagramme de Venn représentant la proportion de gènes dont l'expression est activée et/ou inhibée par BtaR1, BtaR2 et BtaR3 chez *B. thailandensis* E264. (B) Diagramme de Venn représentant la proportion de gènes dont la transcription est stimulée et/ou réprimée par la C₈-HSL, la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL chez *B. thailandensis* E264. D'après Majerczyk *et al.* (2014a).

1.3.2.3.5.2. Interactions entre les systèmes *BpsI/BpsR*, *BpsI2/BpsR2* et *BpsI3/BpsR3*

Selon l'analyse transcriptomique de Ooi *et al.* (2013), le système *BpsI/BpsR* active l'expression des gènes *bpsI2* et *bpsR2* de *B. pseudomallei* 008. De plus, les travaux préliminaires de Kiratisin *et al.* (2008) indiquent que le complexe *BpsR/3OC₈-HSL*, de même que le complexe *BpsR3/3OC₈-HSL*, stimulent directement la transcription du gène *bpsI2* de

B. pseudomallei K96243, tandis que l'expression du gène *bpsI3* de *B. pseudomallei* K96243 est réprimée directement par les régulateurs transcriptionnels BpsR et BpsR2, suggérant que les systèmes BpsI/BpsR, BpsI2/BpsR2 et BpsI3/BpsR3 sont interdépendants (Fig. 1.38).

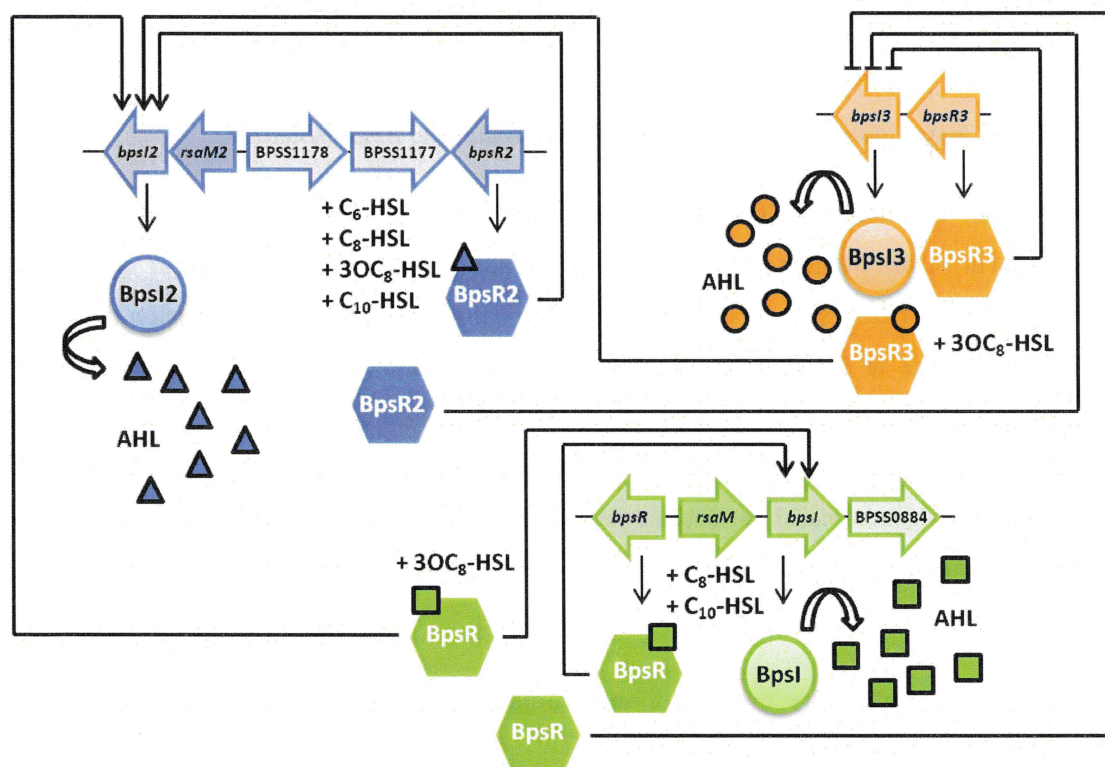


Figure 1.38. Interactions entre les systèmes de *quorum sensing* BpsI/BpsR, BpsI2/BpsR2 et BpsI3/BpsR3 chez *B. pseudomallei* K96243.

À l'heure actuelle, les AHL produites *via* les synthèses BpsI, BpsI2 et BpsI3 de *B. pseudomallei* K96243 n'ont pas encore été identifiées et l'impact des régulateurs transcriptionnels BpsR, BpsR2 et BpsR3 de *B. pseudomallei* K96243 sur la biosynthèse des AHL reste à déterminer.

Chez *B. pseudomallei* KHW, Gamage *et al.* (2011) ont observé que l'absence de la synthèse BpsI, entraîne une réduction drastique de la transcription du gène *bpsI3*, de même qu'une suppression de la production de la 3OHC₈-HSL. L'hypothèse est que le régulateur transcriptionnel BpsR, en association avec la C₈-HSL, active l'expression de *bpsI3*. Par ailleurs, Gamage *et al.* (2011) rapportent que le complexe BpsR3/3OHC₈-HSL contrôle positivement et directement la transcription du gène *bpsI* et des AHL alternatives sont capables de stimuler, dans une moindre mesure, l'expression de *bpsI* *via* le régulateur transcriptionnel BpsR3. Cependant, Gamage *et al.* (2011) suggèrent que le système BpsI3/BpsR3 contrôle aussi négativement et indirectement le système BpsI/BpsR puisque la

3OHC₈-HSL, la principale AHL produite par la synthèse BpsI3 chez *B. pseudomallei* KHW, pourrait agir comme un inhibiteur compétitif de la C₈-HSL, la principale AHL produite par la synthèse BpsI chez *B. pseudomallei* KHW, pour la liaison au régulateur transcriptionnel BpsR et, ainsi, contrecarrer l'activation et/ou l'inhibition des processus cellulaires sous le contrôle du système BpsI/BpsR comme, par exemple, le développement du biofilm.

1.3.2.3.5.3. Interactions entre les systèmes *BmaI1/BmaR1* et *BmaI3/BmaR3*

Chez *B. mallei* ATCC 23344, la transcription du gène *bmaI1* est contrôlée positivement et directement par le complexe BmaR3/3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2008). D'autres AHL ont été testées pour leur implication dans l'activation de l'expression de *bmaI1* et il apparaît que la 3OHC₈-HSL constitue l'unique ligand du régulateur transcriptionnel BmaR3 (Duerkop *et al.*, 2008). D'après les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014b), la C₈-HSL stimule la transcription du gène *bmaR3* chez *B. mallei* GB8. L'hypothèse est que l'expression du gène *bmaR3* est activée par le complexe BmaR1/C₈-HSL. Ces observations révèlent donc que les systèmes *BmaI1/BmaR1* et *BmaI3/BmaR3* sont interdépendants.

1.3.2.3.7. Les régulateurs transcriptionnels orphelins parmi les espèces bactériennes *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. mallei*

Outre les gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3*, qui codent respectivement les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 synthétisant toutes les AHL identifiées chez *B. thailandensis* E264, aucun autre gène *luxI* codant une synthase de type LuxI susceptible de produire des AHL n'est présent sur le génome de *B. thailandensis* E264 (Ulrich *et al.*, 2004d) (**Fig. 1.39**).

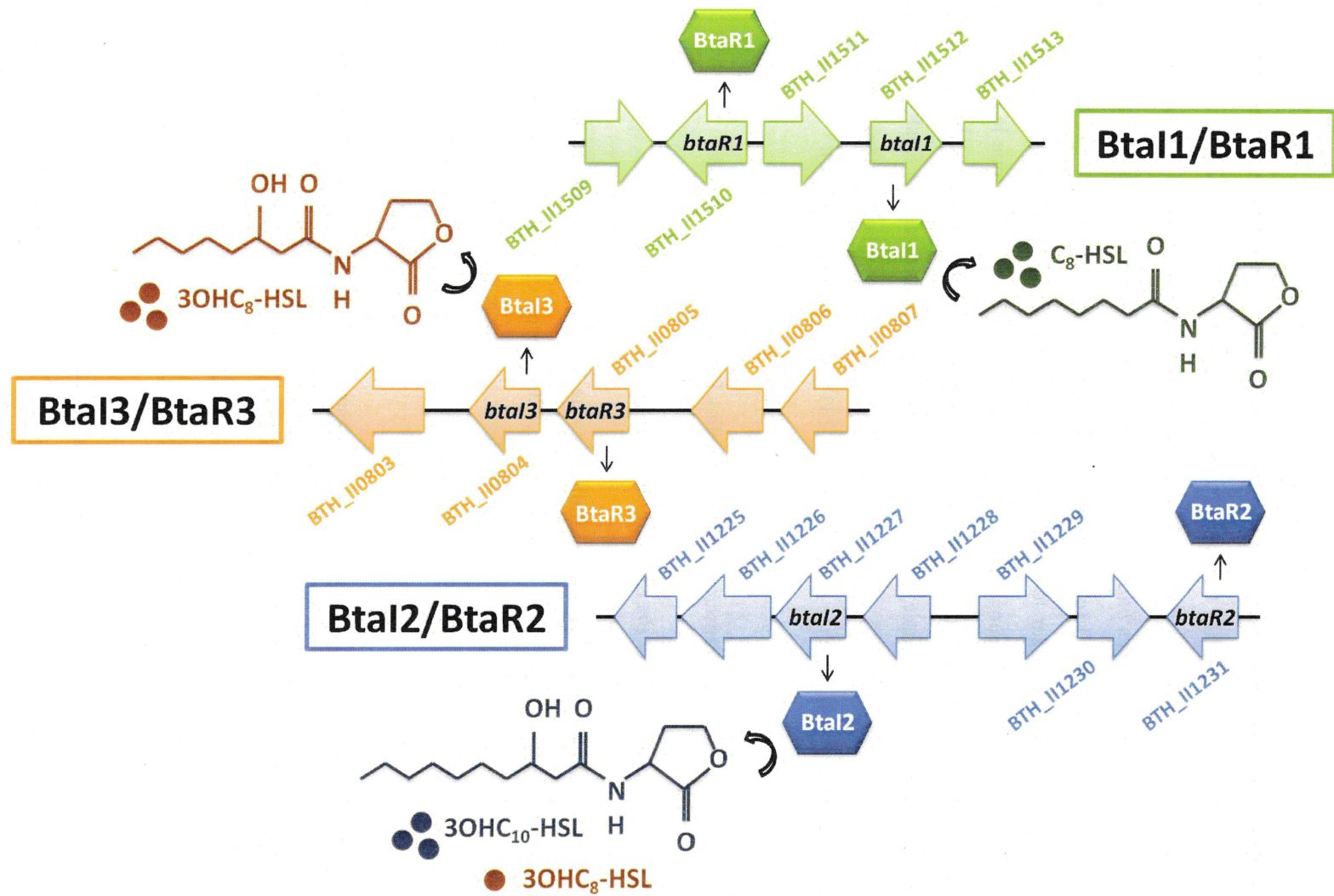


Figure 1.39. Résumé des systèmes de *quorum sensing* qui coexistent chez *B. thailandensis* E264.

En revanche, le génome de *B. thailandensis* E264 contient de nombreux gènes *luxR* codant d'autres régulateurs transcriptionnels de type LuxR, en dehors des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* qui codent respectivement les régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3, parmi lesquels figurent, entre autres, les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 (MalR) et BtaR5 (Ulrich *et al.*, 2004d). Ces gènes sont répartis sur les chromosomes I et II de *B. thailandensis* E264 et, à la différence des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3*, ils ne sont pas localisés à proximité des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3*. À titre d'exemple, le gène *btaR4* (*malR*) est situé sur le chromosome II (cf. la **Figure 1.40** présentée à la section 1.3.2.3.8.1), tandis que le gène *btaR5* est situé sur le chromosome I (cf. la **Figure 1.44** présentée à la section 1.3.2.3.9.1). Par ailleurs, le génome de *B. pseudomallei* K96243, de même que le génome de *B. mallei* ATCC 23344, codent pareillement des régulateurs transcriptionnels de type LuxR additionnels comme, par exemple, les régulateurs transcriptionnels orphelins BpsR4 et BpsR5 chez *B. pseudomallei* K96243 (Ulrich *et al.*, 2004b) et les régulateurs transcriptionnels orphelins BmaR4 et BmaR5 chez *B. mallei* ATCC 23344 (Ulrich *et al.*, 2004c).

1.3.2.3.8. Les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4, BpsR4 et BmaR4

1.3.2.3.8.1. *BtaR4*, *BpsR4* et *BmaR4* sont homologues

Des recherches bioinformatiques indiquent que le régulateur transcriptionnel orphelin BtaR4 de *B. thailandensis* E264 (Ulrich *et al.*, 2004d) est homologue aux régulateurs transcriptionnels orphelins BpsR4 et BmaR4 de *B. pseudomallei* K96243 (Ulrich *et al.*, 2004b) et de *B. mallei* ATCC 23344 (Ulrich *et al.*, 2004c), respectivement (**Tableau 1.13**).

Tableau 1.13. Homologies entre les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4, BpsR4 et BmaR4.

Gène	Protéine	Souche bactérienne	Identité (Similarité)
<i>btaR4</i> (ou BTH_II2087)	BtaR4	<i>B. thailandensis</i> E264	100%
<i>bpsR4</i> (ou BPSS0312)	BpsR4	<i>B. pseudomallei</i> K96243	97% (99%)
<i>bmaR4</i> (ou BMAA1443)	BmaR4	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	98% (99%)

Les gènes *btaR4*, *bpsR4* et *bmaR4* sont localisés sur le chromosome II de *B. thailandensis* E264 (**Fig. 1.40A**), de *B. pseudomallei* K96243 (**Fig. 1.40B**) et de *B. mallei* ATCC 23344 (**Fig. 1.40C**), respectivement. Notons, également, que d'autres homologues du

gène *luxR* codant des régulateurs transcriptionnels de type LuxR orphelins sont présents sur le chromosome II (Fig. 1.40).

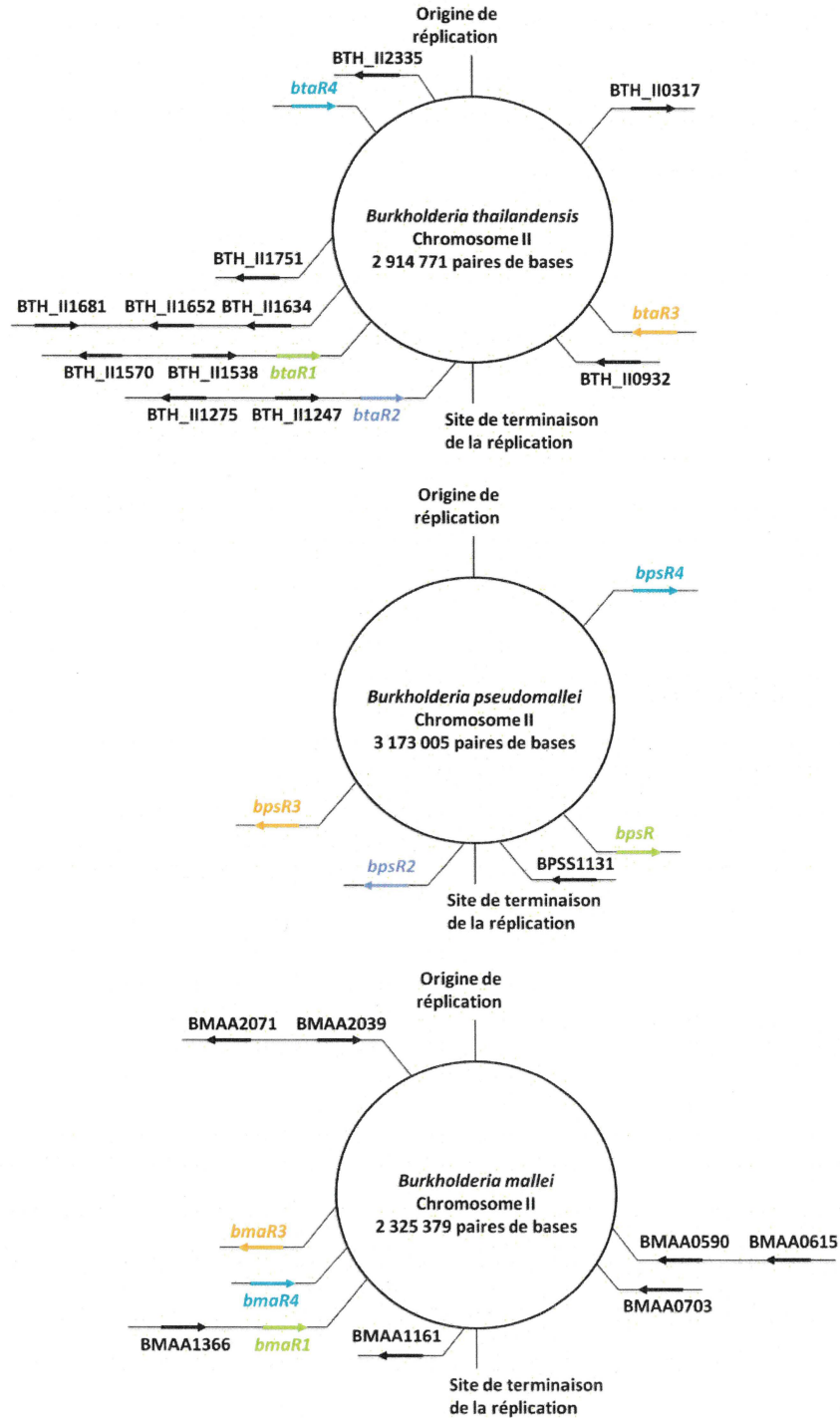


Figure 1.40. Localisation chromosomique des gènes *btaR4* de *B. thailandensis* E264, *bpsR4* de *B. pseudomallei* K96243 et *bmaR4* de *B. mallei* ATCC 23344.

1.3.2.3.8.2. *BtaR4* contrôle positivement et directement l'expression des gènes mal codant les enzymes responsables de la production de la malléilactone

D'après les travaux préliminaires de Ulrich *et al.* (2004d), BtaR4 affecte vraisemblablement l'activité lipolytique et le métabolisme et/ou le transport du carbone chez *B. thailandensis* DW503. Chez *B. thailandensis* E264, Truong *et al.* (2015) ont démontré que BtaR4 contrôle la production de la malléilactone, une molécule cytotoxique ayant des propriétés antimicrobiennes (Fig. 1.41).

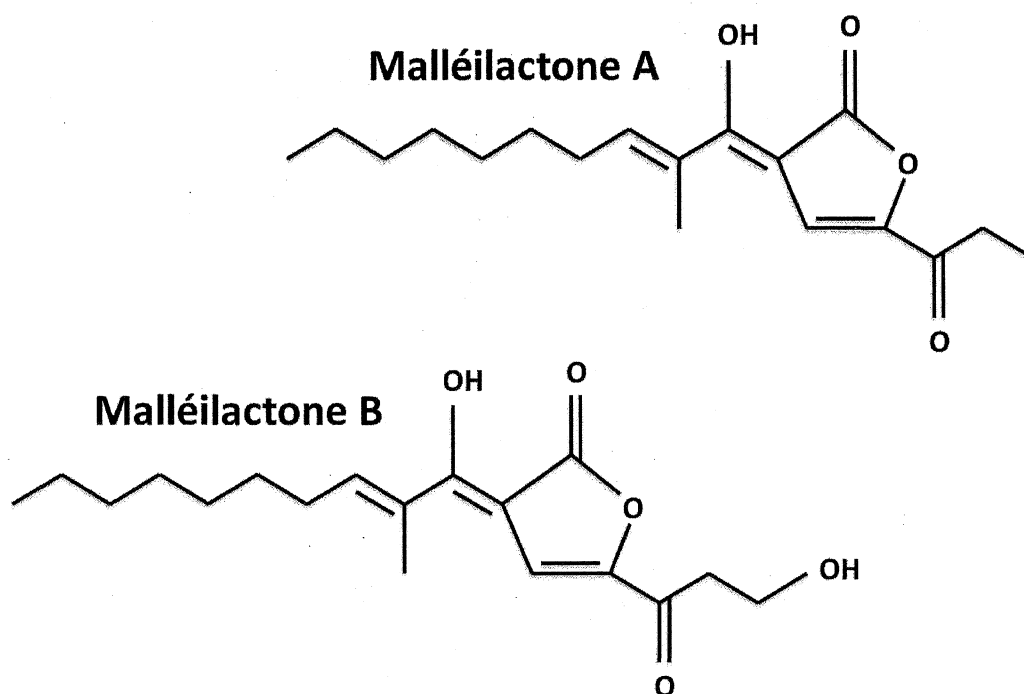
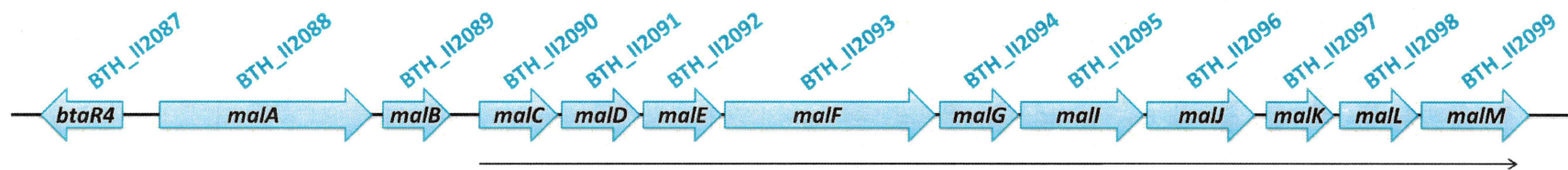


Figure 1.41. Structure chimique de la malléilactone chez *B. thailandensis* E264. D'après Seyedsayamdost (2014).

En outre, Biggins *et al.* (2012) ont rapporté que la malléilactone possède des activités chélatrices et intervient, en conséquence, dans le métabolisme du fer. Il apparaît, par ailleurs, que la malléilactone joue un rôle dans l'établissement des associations hôte-pathogène (Biggins *et al.*, 2012). Des tests d'infection, effectués chez plusieurs organismes modèles de laboratoire (cf. le **Tableau 1.4** présenté à la section 1.3.2.3.2.2) révèlent, en effet, que l'inactivation des gènes *mal*, codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la malléilactone, résulte en une atténuation de la virulence bactérienne (Fig. 1.42).



Gène	Nom	Opéron	Description (d'après Burkholderia.com)
BTH_II2087	<i>btaR4</i>		ATP-dependent transcription regulator LuxR
BTH_II2088	<i>malA</i>		thiotemplate mechanism natural product synthetase
BTH_II2089	<i>malB</i>		hypothetical protein
BTH_II2090	<i>malC</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	syringomycin synthesis regulator SyrP
BTH_II2091	<i>malD</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	hypothetical protein
BTH_II2092	<i>malE</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase
BTH_II2093	<i>malF</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	polyketide synthase
BTH_II2094	<i>malG</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	ketol-acid reductoisomerase
BTH_II2095	<i>malI</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	diaminopimelate decarboxylase
BTH_II2096	<i>malJ</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	long-chain-fatty-acid--CoA ligase
BTH_II2097	<i>malK</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	putative lipoprotein
BTH_II2098	<i>malL</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase
BTH_II2099	<i>malM</i>	BTH_II2090 - BTH_II2099	AMP-binding domain-containing protein

Figure 1.42. Organisation structurale des gènes *mal* codant les enzymes responsables de la production de la malléilactone.

La flèche noire indique que les gènes sont potentiellement organisés en opéron d'après Burkholderia.com.

L'expression des gènes *mal* est contrôlée positivement et directement *via* le régulateur transcriptionnel orphelin BtaR4 (Truong *et al.*, 2015). Truong *et al.* (2015) ont déterminé, d'une part, que BtaR4 interagit spécifiquement avec la région promotrice des gènes *mal* au niveau d'une boîte *lux* putative et, d'autre part, que cette interaction ne requiert pas d'AHL (Fig. 1.43). Ainsi, BtaR4, à la différence des régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3, n'agirait pas en association avec les AHL produites *via* les synthèses BtaI1, BtaI2 et BtaI3. De plus, les travaux préliminaires de Ulrich *et al.* (2004d) suggèrent que la biosynthèse des AHL, chez *B. thailandensis* DW503, n'est pas sous le contrôle de BtaR4, tandis que l'analyse transcriptomique de Majerczyk *et al.* (2014a) indique que BtaR4 n'a aucun impact ni sur l'expression des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3*, ni sur la transcription des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* chez *B. thailandensis* E264. Cette analyse montre, par ailleurs, que le gène *btaR4* ne constitue pas une cible du *quorum sensing*. En revanche, les AHL affectent la transcription des gènes *mal*, suggérant que la modulation de la production de la malléilactone en fonction de la densité cellulaire n'est pas exclusivement dépendante du régulateur transcriptionnel BtaR4 (Majerczyk *et al.*, 2014a, Truong *et al.*, 2015). Il apparaît, en effet, que BtaR1, BtaR2 et BtaR3 régulent également l'expression des gènes *mal* et/ou la biosynthèse de la malléilactone chez *B. thailandensis* E264 (Majerczyk *et al.*, 2014a, Mao *et al.*, 2017).

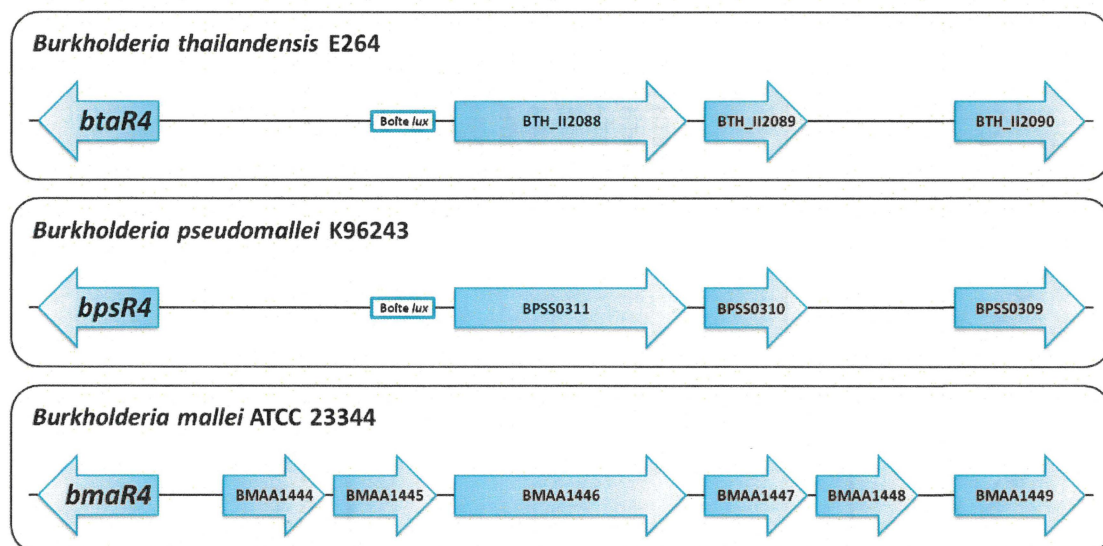


Figure 1.43. Organisation structurale des gènes *btaR4* chez *B. thailandensis* E264, *bpsR4* chez *B. pseudomallei* K96243 et *bmaR4* chez *B. mallei* ATCC 23344

La région promotrice des gènes *mal* de *B. thailandensis* E264 et de *B. pseudomallei* K96243 possède une boîte *lux* putative (GACTGTAAGAAGTTGCAGTA) susceptible d'être reconnue spécifiquement par les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BpsR4, respectivement (Biggins *et al.*, 2012, Truong *et al.*, 2015). En revanche, aucune boîte *lux* potentiellement reconnue de manière spécifique par le régulateur transcriptionnel orphelin BmaR4 n'a été identifiée dans la région promotrice des gènes *mal* de *B. mallei* ATCC 23344.

Le génome de *B. pseudomallei* K96243 et de *B. mallei* ATCC 23344 contient pareillement des gènes *mal* chez lesquelles ils pourraient constituer d'importants facteurs de virulence (**Fig. 1.43**). Alors que ni l'expression du gène *bpsR4* ni la transcription du gène *bmaR4* ne sont sous le contrôle du *quorum sensing*, les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014b) indiquent que les AHL modulent l'expression des gènes *mal* chez *B. pseudomallei* 1026b et chez *B. mallei* GB8. Toutefois, le rôle de BpsR4 et de BmaR4 dans la régulation de la biosynthèse de la malléilactone n'est pas connu. En revanche, les travaux préliminaires de Kiratisin *et al.* (2008) révèlent que BpsR4 contrôle la transcription des gènes *bpsI2* et *bpsI3* chez *B. pseudomallei* K96243, suggérant que BpsR4 affecte la production des AHL et, pour cette raison, la modulation de l'expression génique *via* le *quorum sensing*. L'impact de BmaR4 sur les systèmes BmaI1/BmaR1 et BmaI3/BmaR3 n'a pas encore été investigué.

1.3.2.3.9. Les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR5, BpsR5 et BmaR5

1.3.2.3.9.1. *BtaR5, BpsR5 et BmaR5 sont homologues*

Des recherches bioinformatiques indiquent que le régulateur transcriptionnel orphelin BtaR5 de *B. thailandensis* E264 (Ulrich *et al.*, 2004d) est homologue aux régulateurs transcriptionnels orphelins BpsR5 et BmaR5 de *B. pseudomallei* K96243 (Ulrich *et al.*, 2004b) et de *B. mallei* ATCC 23344 (Ulrich *et al.*, 2004c), respectivement (**Tableau 1.14**).

Tableau 1.14. Homologies entre les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR5, BpsR5 et BmaR5.

Gène	Protéine	Souche bactérienne	Identité (Similarité)
<i>btaR5</i> (ou BTH_I1817)	BtaR5	<i>B. thailandensis</i> E264	100%
<i>bpsR5</i> (ou BPSL2347)	BpsR5	<i>B. pseudomallei</i> K96243	97% (98%)
<i>bmaR5</i> (ou BMA0641)	BmaR5	<i>B. mallei</i> ATCC 23344	98% (98%)

Les gènes *btaR5*, *bpsR5* et *bmaR5* sont localisés sur le chromosome I de *B. thailandensis* E264 (**Fig. 1.44A**), de *B. pseudomallei* K96243 (**Fig. 1.44B**) et de *B. mallei* ATCC 23344 (**Fig. 1.44C**), respectivement. On y retrouve également d'autres homologues du gène *luxR* codant des régulateurs transcriptionnels de type LuxR orphelins (**Fig. 1.44**).

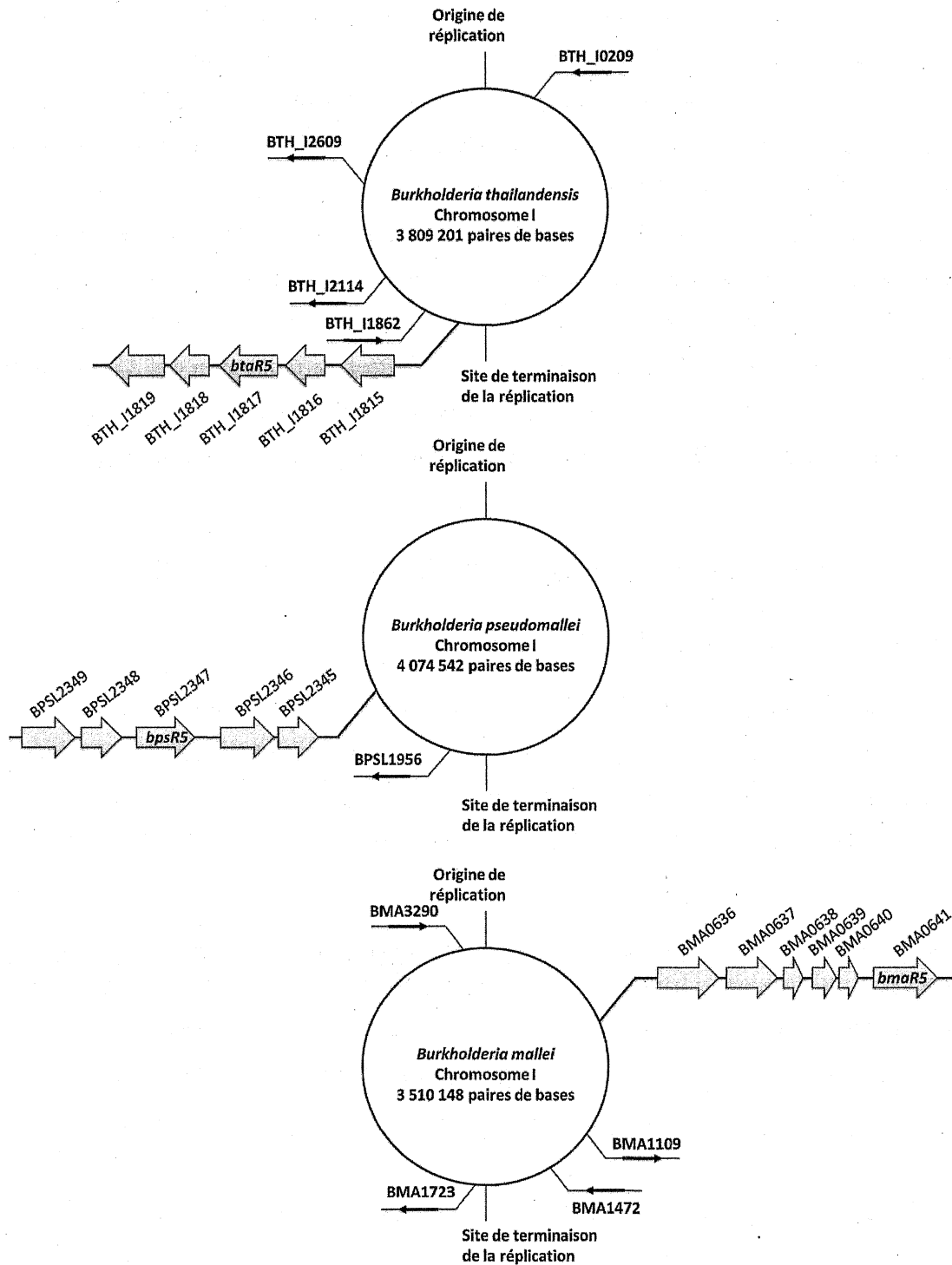


Figure 1.44. Localisation chromosomique des gènes *btaR5* de *B. thailandensis* E264, *bpsR5* de *B. pseudomallei* K96243 et *bmaR5* de *B. mallei* ATCC 23344.

1.3.2.3.9.2. *BtaR5 n'affecte pas les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3*

D'après les travaux préliminaires de Ulrich *et al.* (2004d), BtaR5 n'a pas d'effet sur la biosynthèse des AHL chez *B. thailandensis* DW503. Les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014a) indiquent, par ailleurs, que BtaR5, chez *B. thailandensis* E264, n'affecte ni l'expression des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3*, ni la transcription des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3*. Il apparaît, en revanche, que le gène *btaR5* constitue une cible du *quorum sensing* (Majerczyk *et al.*, 2014a). À l'inverse, l'expression des gènes *bpsR5* et *bmaR5*, chez *B. pseudomallei* 1026b et chez *B. mallei* GB8, respectivement, n'est pas modulée en fonction de la densité bactérienne (Majerczyk *et al.*, 2014b). Toutefois, les travaux préliminaires de Kiratisin *et al.* (2008) révèlent que BpsR5 contrôle la transcription des gènes *bpsI*, *bpsI2* et *bpsI3* chez *B. pseudomallei* K96243, suggérant que BpsR5 influence la production des AHL et, de ce fait, la régulation de l'expression génique dépendante du *quorum sensing*. L'impact de BmaR5 sur les systèmes BmaI1/BmaR1 et BmaI3/BmaR3 n'a pas encore été investigué.

1.3.2.3.9.3. *BpsR5 et BmaR5 jouent un rôle dans la virulence bactérienne*

À l'heure actuelle, la fonction du régulateur transcriptionnel orphelin BtaR5 de *B. thailandensis* E264 est inconnue. En revanche, des études phénotypiques réalisées chez *B. thailandensis* DW503 suggèrent que BtaR5 intervient dans la production d'hémolysines, dans l'activité lipolytique ainsi que dans le métabolisme et/ou le transport du carbone (Ulrich *et al.*, 2004d). D'autre part, des tests d'infection, effectués chez plusieurs organismes modèles de laboratoire (cf. le **Tableau 1.4** présenté à la section 1.3.2.3.2.2), ont démontré l'importance de BpsR5 et de BmaR5 dans la pathogénicité de *B. pseudomallei* DD503 et de *B. mallei* ATCC 23344, respectivement (Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c). Notons, cependant, que les facteurs de survie et/ou de virulence contrôlés *via* les régulateurs transcriptionnels orphelins BpsR5 et BmaR5 restent à déterminer.

1.3.3. Les espèces bactériennes du genre *Burkholderia* produisent des molécules de signalisation putatives appartenant à la famille des HAQ *via* le système de *quorum sensing* hypothétique *hmq*

Chez les bactéries appartenant au genre *Burkholderia*, la modulation de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire est essentiellement attribuée à des systèmes de communication intercellulaire qui utilisent des AHL comme signaux moléculaires. Toutefois, un autre système de *quorum sensing* hypothétique, appelé *hmq*, homologue au système *pqs* de *P. aeruginosa*, est également susceptible d'intervenir dans cette modulation au sein des espèces bactériennes du genre *Burkholderia*.

1.3.3.1. Le système *hmq* utilise des signaux moléculaires putatifs structurellement analogues aux HAQ spécifiques de *P. aeruginosa*

Le système *hmq* implique des molécules de signalisation putatives qui appartiennent à la famille des HAQ (Butt *et al.*, 2016, Chapalain *et al.*, 2017, Diggle *et al.*, 2006a, Diggle *et al.*, 2006b, Vial *et al.*, 2008). Celles-ci présentent des structures chimiques variées et sont divisées en cinq sous-familles distinctes. Les sous-familles A, B et C, qui sont majoritaires, rassemblent les HAQ méthylées, ou 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ). Elles se distinguent notamment par la longueur et/ou l'insaturation, en position 2', de la chaîne alkyle qui les compose. Elles peuvent également être *N*-oxydées. Citons, par exemple, la HMAQ-C₅:2', la HMAQ-C₁₀ et la HMAQNO-C₆:2' qui sont retrouvées dans les sous-familles A, B et C, respectivement (Fig. 1.45). Les sous-familles D et E, qui sont minoritaires, regroupent les HAQ non méthylées. Citons, par exemple, la HAQ-C₈ et la HAQ-C₁₁:2' qui sont retrouvées dans les sous-familles D et E, respectivement (Fig. 1.45).

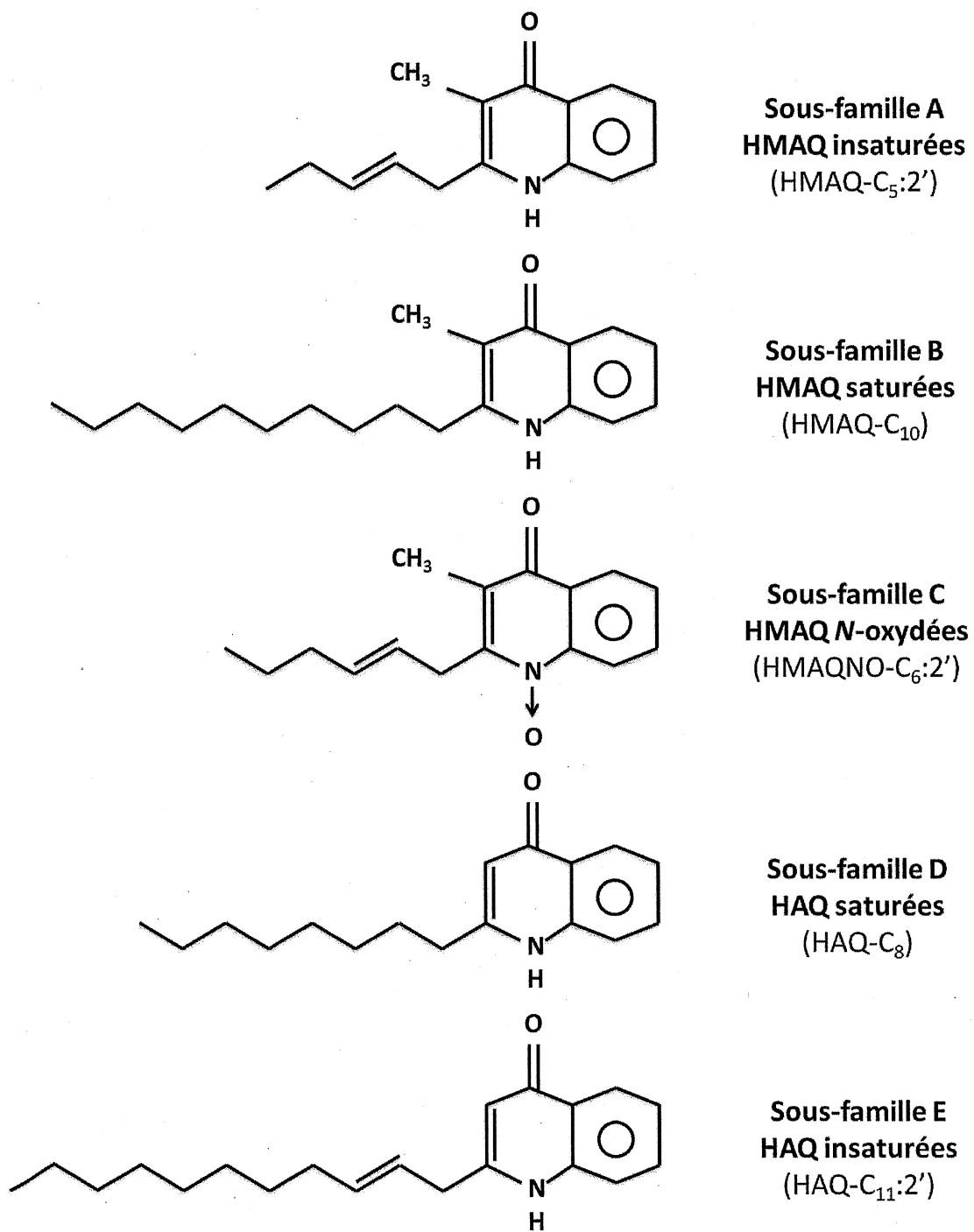


Figure 1.45. Exemples de HMAQ et de HAQ spécifiques du système *hmq*.
 D'après Vial *et al.* (2008).

1.3.3.1.1. Identification de HMAQ parmi les membres du groupe *Bptm*

Les HAQ retrouvées chez les espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* telles que *B. thailandensis* présentent des analogies de structure avec les HAQ spécifiques du système *pqs* de *P. aeruginosa* (Vial *et al.*, 2008). Toutefois, les HAQ de *B. thailandensis* sont, pour la plupart d'entre elles, insaturées et méthylées et ont été, par conséquent, nommées HMAQ. À titre d'exemple, la HMAQ-C₉:2', également appelée 4-hydroxy-3-méthyl-2-nonénylquinoline (HMNQ), constitue la principale HMAQ identifiée chez *B. thailandensis* E264 (Fig. 1.46).

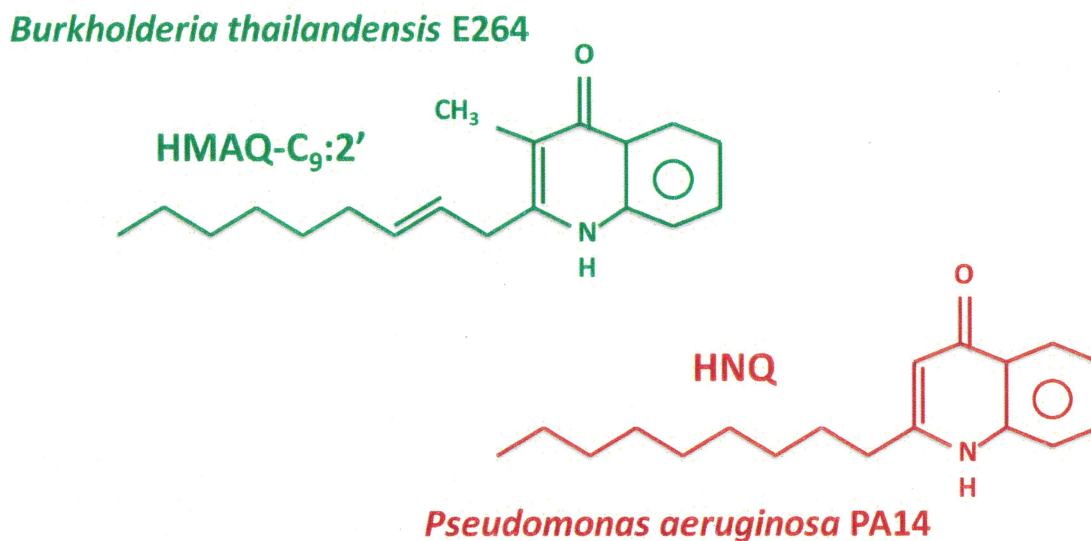


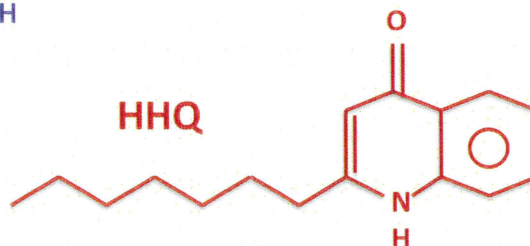
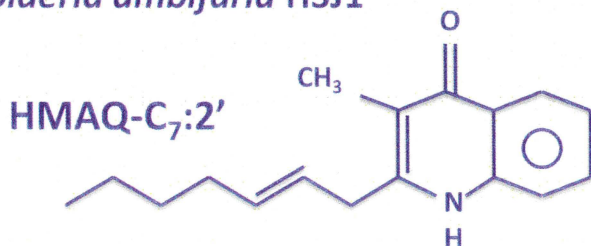
Figure 1.46. Structure chimique de la principale HMAQ identifiée chez *B. thailandensis* E264. *B. thailandensis* E264 produit, de façon majoritaire, de la HMAQ-C₉:2' (Vial *et al.*, 2008). Cette HMAQ est structurellement analogue aux HAQ retrouvées spécifiquement chez *P. aeruginosa* PA14 telles que le HNQ.

Par ailleurs, Diggle *et al.* (2006b) ont rapporté la présence de HAQ chez la bactérie *B. pseudomallei*, génétiquement, physiologiquement et biochimiquement similaire à *B. thailandensis* (cf. la **Figure 1.18** présentée à la section 1.3.1), et des HMAQ ont été détectées subséquemment dans des cultures de plusieurs souches cliniques de *B. pseudomallei*, isolées chez des individus souffrant de la mélioïdose, à savoir *B. pseudomallei* K96243 et *B. pseudomallei* 1026b, qui synthétisent essentiellement de la HMAQ-C₉:2' (Butt *et al.*, 2016, Vial *et al.*, 2008). En revanche, *B. mallei*, bien qu'étroitement apparentée aux espèces bactériennes *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* (cf. la **Figure 1.18** présentée à la section 1.3.1), ne produit ni de HAQ ni de HMAQ (Vial *et al.*, 2008).

1.3.3.1.2. Identification de HMAQ parmi les membres du complexe *Bcc*

Vial *et al.* (2008) ont également démontré que le pathogène opportuniste de l'Homme *B. ambifaria*, un membre du complexe *Bcc* (cf. la **Figure 1.18** présentée à la section 1.3.1), est capable de synthétiser des HMAQ comme, par exemple, la HMAQ-C₇:2', aussi appelée 4-hydroxy-3-méthyl-2-hepténylquinoline (HMHQ), qui est majoritairement produite chez *B. ambifaria* HSJ1 (**Fig. 1.47**).

Burkholderia ambifaria HSJ1



Pseudomonas aeruginosa PA14

Figure 1.47. Structure chimique de la principale HMAQ identifiée chez *B. ambifaria* HSJ1. *B. ambifaria* HSJ1 produit essentiellement de la HMAQ-C₇:2' (Vial *et al.*, 2008). Cette HMAQ présente des analogies de structure avec les HAQ retrouvées de manière spécifique chez *P. aeruginosa* PA14 telles que le HHQ.

Alors que les souches cliniques de *B. ambifaria*, provenant de patients atteints de fibrose kystique, comme, par exemple, *B. ambifaria* HSJ1, synthétisent d'une manière générale des HMAQ, Vial *et al.* (2010) n'ont décelé la présence d'aucune HMAQ chez les souches environnementales de *B. ambifaria*, issues de la rhizosphère de diverses plantes, à l'image de *B. ambifaria* AMMD. Toutefois, des traces de HMAQ ont été détectées ultérieurement dans des cultures de la souche environnementale *B. ambifaria* AMMD produisant, au même titre que la souche clinique *B. ambifaria* HSJ1, essentiellement de la HMAQ-C₇:2', en employant des conditions de culture différentes (Mahenthalingam *et al.*, 2011). À ce jour, l'hypothèse est que la production des HMAQ, chez les souches environnementales de *B. ambifaria*, implique des conditions de culture spécifiques qui se

distinguent de celles nécessaires à la biosynthèse des HMAQ chez les souches cliniques de *B. ambifaria* (Chapalain *et al.*, 2017).

Outre les souches cliniques et environnementales de *B. ambifaria*, d'autres bactéries appartenant au complexe *Bcc*, telles que *B. vietnamiensis*, *B. multivorans* ou encore *Burkholderia stabilis*, ont été testées pour leur capacité à produire des HMAQ et/ou des HAQ (Vial *et al.*, 2008). Aucune HMAQ et/ou HAQ n'a pu être détectée chez ces espèces bactériennes. Cependant, Diggle *et al.* (2006b) ont observé la présence de HAQ dans des cultures de la souche clinique *B. cenocepacia* J415, tandis que Kilani-Feki *et al.* (2011) ont observé la présence de HMAQ dans des cultures de la souche environnementale *B. cepacia* Cs5. Ainsi, *B. ambifaria*, *B. cenocepacia* et *B. cepacia* sont actuellement les seuls membres du complexe *Bcc* identifiés comme étant capables de synthétiser des HAQ méthylées et/ou non méthylées.

1.3.3.2. L'acide anthranilique est le précurseur des HMAQ

Vial *et al.* (2008) ont rapporté que l'ajout d'acide anthranilique radiomarqué dans des cultures de *B. thailandensis* E264 et de *B. ambifaria* HSJ1 induit, de façon systématique, un marquage radioactif des différentes HMAQ produites chez ces souches bactériennes démontrant que les HMAQ, au même titre que les HAQ spécifiques de *P. aeruginosa*, dérivent de l'acide anthranilique (**Fig. 1.48**).

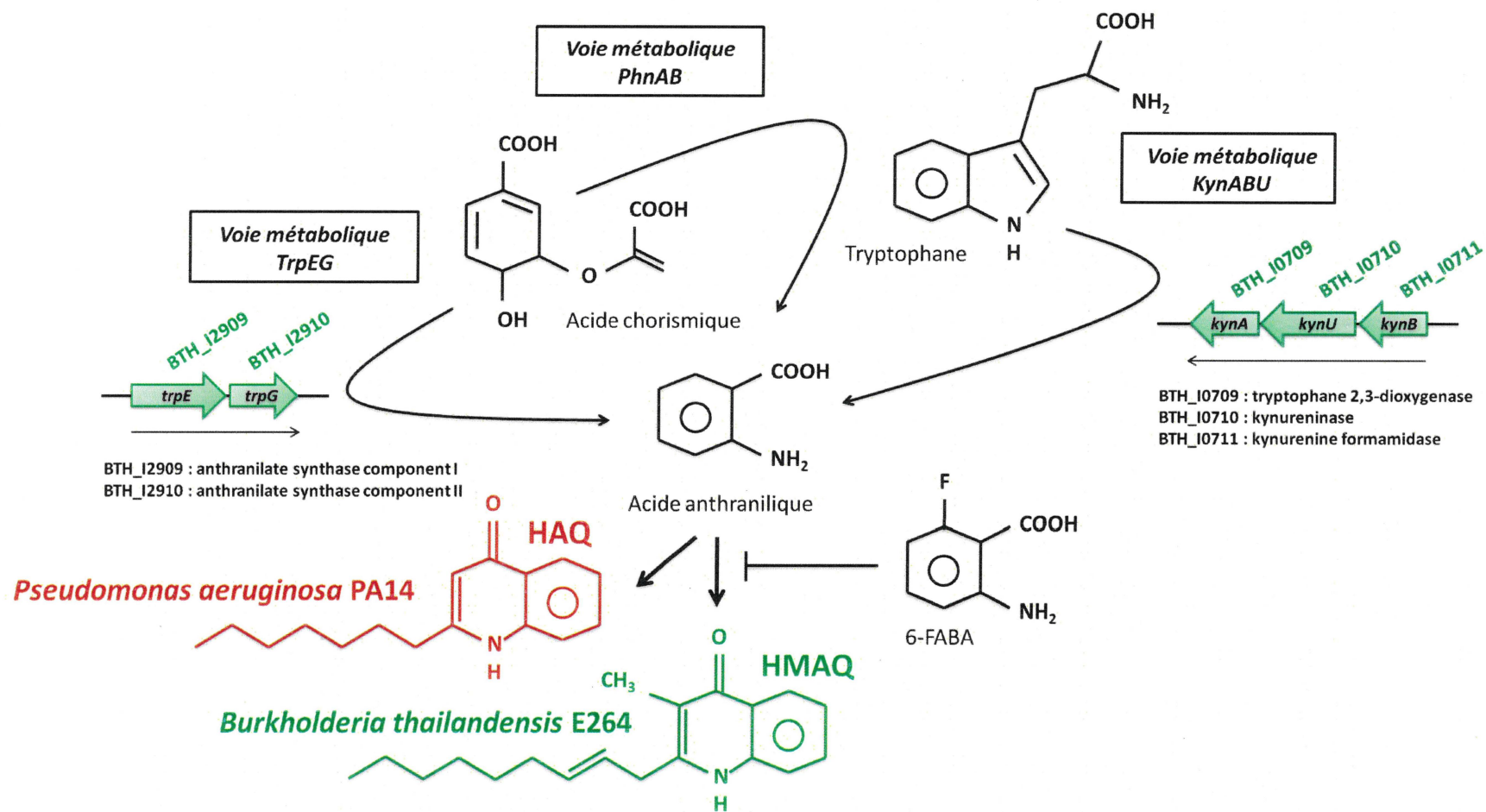


Figure 1.48. Représentation schématique de la biosynthèse des HMAQ à partir de l'acide anthranilique chez les espèces bactériennes du genre *Burkholderia*. Les flèches noires indiquent que les gènes sont potentiellement organisés en opéron d'après Burkholderia.com.

1.3.3.2.1. Implication des voies métaboliques des anthranilate synthases PhnAB et TrpEG

Chez *P. aeruginosa*, la biosynthèse des HAQ implique les voies métaboliques des anthranilate synthases PhnAB et TrpEG fournissant de l'acide anthranilique à partir de l'acide chorismique (cf. la **Figure 1.15** présentée à la section 1.2.3.2.2). *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* K96243 et *B. ambifaria* AMMD ne contiennent pas de gènes homologues aux gènes *phnA* et *phnB* de *P. aeruginosa* PA14, codant respectivement les sous-unités α et β de l'anthranilate synthase PhnAB (Vial *et al.*, 2008). Ainsi, la voie métabolique PhnAB n'est pas responsable de la biosynthèse de l'acide anthranilique nécessaire à la production des HMAQ chez les espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* (**Fig. 1.48**). En revanche, *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* K96243 et *B. ambifaria* AMMD possèdent des gènes homologues aux gènes de l'opéron *trpEG* de *P. aeruginosa* PA14, codant l'anthranilate synthase TrpEG, indiquant que la voie métabolique TrpEG est susceptible d'intervenir dans la biosynthèse des HMAQ chez les bactéries du genre *Burkholderia* (Vial *et al.*, 2008) (**Fig. 1.48**).

1.3.3.2.2. Implication de la voie métabolique de la kynurénine KynABU

Notons, également, que les HAQ spécifiques de *P. aeruginosa* peuvent être produites *via* la voie métabolique de la kynurénine KynABU responsable de la dégradation du tryptophane en acide anthranilique (cf. la **Figure 1.15** présentée à la section 1.2.3.2.2). Des gènes homologues aux gènes *kynA*, *kynB* et *kynU* de *P. aeruginosa* PA14, codant respectivement la tryptophane 2,3-dioxygénase KynA, la kynurénine formamidase KynB et la kynuréninase KynU, sont aussi présents dans le génome des espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* (Vial *et al.*, 2008). De plus, Vial *et al.* (2008) ont observé un marquage radioactif de toutes les HMAQ identifiées chez *B. thailandensis* E264 et chez *B. ambifaria* HSJ1 en présence de tryptophane radiomarqué et Butt *et al.* (2016) ont montré que l'inactivation du gène *kynB* provoque une diminution de la biosynthèse des HMAQ de *B. pseudomallei* K96243. Ainsi, chez les espèces bactériennes du genre *Burkholderia*, l'acide anthranilique synthétisé à partir du tryptophane *via* la voie métabolique KynABU contribue à la production des HMAQ (**Fig. 1.48**).

1.3.3.2.3. Le 6-FABA : un inhibiteur compétitif de l'acide anthranilique

L'utilisation de dérivés halogénés de l'acide anthranilique comme, par exemple, l'acide 2-amino-6-fluorobenzoïque (6-FABA), un analogue structural de l'acide anthranilique, entraîne une abolition de la biosynthèse des HAQ spécifiques de *P. aeruginosa* (Lesic *et al.*, 2007) (Fig. 1.48). Il apparaît, par ailleurs, que la présence de 6-FABA dans des cultures de *B. thailandensis* E264 et de *B. ambifaria* HSJ1 empêche pareillement la production des HMAQ (Lesic *et al.*, 2007, Vial *et al.*, 2008) (Fig. 1.48).

1.3.3.3. L'opéron *hmqABCDEFG* codant les principales protéines responsables de la biosynthèse des HMAQ est homologue à l'opéron *pqsABCDE* de *P. aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, l'opéron *pqsABCDE* code les principales enzymes impliquées dans la biosynthèse des HAQ, à partir de l'acide anthranilique (cf. la Figure 1.16 présentée à la section 1.2.3.2.3). *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* K96243 et *B. ambifaria* AMMD possèdent des gènes, nommés *hmqA*, *hmqB*, *hmqC*, *hmqD* et *hmqE*, qui sont respectivement homologues aux gènes *pqsA*, *pqsB*, *pqsC*, *pqsD* et *pqsE* de *P. aeruginosa* (Diggle *et al.*, 2006a, Diggle *et al.*, 2006b, Vial *et al.*, 2008). Ces gènes sont regroupés, avec les gènes *hmqF* et *hmqG*, au sein d'un opéron, appelé *hmqABCDEFG* (Vial *et al.*, 2008) (Fig. 1.49). Les gènes *hmqF* et *hmqG* ne possèdent pas, quant à eux, d'homologues chez *P. aeruginosa* (Vial *et al.*, 2008).

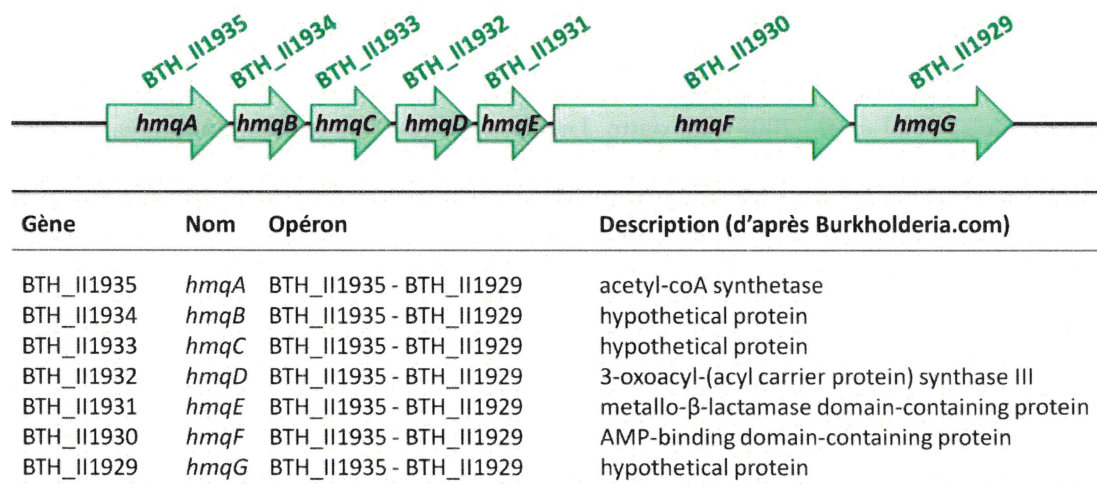


Figure 1.49. Organisation structurale de l'opéron *hmqABCDEFG* chez *B. thailandensis* E264.

Les homologies de séquence entre les opérons *hmqABCDEFG* et *pqsABCDE* suggèrent que les protéines HmqA, HmqB, HmqC, HmqD et HmqE retrouvées chez les espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* exercent des fonctions similaires aux enzymes PqsA, PqsB, PqsC, PqsD et PqsE de *P. aeruginosa*, respectivement (Vial *et al.*, 2008) (Tableau 1.15).

Tableau 1.15. Les protéines HmqA, HmqB, HmqC, HmqD et HmqE de *B. thailandensis* E264 sont respectivement homologues aux enzymes PqsA, PqsB, PqsC, PqsD et PqsE de *P. aeruginosa* PA14.

Gène	Protéine	Souche bactérienne	Identité (Similarité)
<i>pqsA</i> (ou PA14_51430)	PqsA	<i>P. aeruginosa</i> PA14	100%
<i>hmqA</i> (ou BTH_II1935)	HmqA	<i>B. thailandensis</i> E264	30% (44%)
<i>pqsB</i> (ou PA14_51420)	PqsB	<i>P. aeruginosa</i> PA14	100%
<i>hmqB</i> (ou BTH_II1934)	HmqB	<i>B. thailandensis</i> E264	30% (43%)
<i>pqsC</i> (ou PA14_51410)	PqsC	<i>P. aeruginosa</i> PA14	100%
<i>hmqC</i> (ou BTH_II1933)	HmqC	<i>B. thailandensis</i> E264	38% (59%)
<i>pqsD</i> (ou PA14_51390)	PqsD	<i>P. aeruginosa</i> PA14	100%
<i>hmqD</i> (ou BTH_II1932)	HmqD	<i>B. thailandensis</i> E264	54% (69%)
<i>pqsE</i> (ou PA14_51380)	PqsE	<i>P. aeruginosa</i> PA14	100%
<i>hmqE</i> (ou BTH_II1931)	HmqE	<i>B. thailandensis</i> E264	32% (50%)

Vial *et al.* (2008) ont rapporté qu'une mutation polaire du gène *hmqA*, induisant l'inactivation de l'opéron *hmqABCDEFG*, est associée à une suppression de la biosynthèse des HAQ, aussi bien méthylées que non méthylées, chez *B. thailandensis* E264 et chez *B. ambifaria* HSJ1. Cette inactivation entraîne, par ailleurs, une accumulation d'acide anthranilique (Vial *et al.*, 2008). En outre, Diggle *et al.* (2006b) ont démontré que les gènes *hmqA* et *hmqE* de *B. pseudomallei* PP844 sont capables de compléter fonctionnellement les gènes *pqsA* et *pqsE* de *P. aeruginosa* PAO1 et permettent, entre autres, de restaurer la biosynthèse des HAQ, de même que la production de la pyocyanine sous le contrôle du système *pqs*. L'ensemble de ces considérations indique donc que les protéines HmqA, HmqB, HmqC, HmqD, HmqE, HmqF et HmqG, codées par les gènes de l'opéron *hmqABCDEFG*, interviennent effectivement, à partir de l'acide anthranilique, dans la production des HMAQ. HmqE, à l'instar de PqsE chez *P. aeruginosa*, pourrait être également impliquée dans la

régulation de l'expression de gènes de virulence, par exemple, qui constitueraient des cibles du système *hmq*.

D'autre part, les protéines HmqF et HmqG, codées respectivement par les deux gènes supplémentaires de l'opéron *hmqABCDEFG*, à savoir les gènes *hmqF* et *hmqG*, sont respectivement responsables de l'insaturation, s'il y a lieu, et de la méthylation des HMAQ (Agarwal *et al.*, 2012, Vial *et al.*, 2008). En effet, Vial *et al.* (2008) ont observé que l'inactivation du gène *hmqG*, codant la méthyltransférase putative HmqG, résulte, d'une part, en une abolition de la biosynthèse des HAQ méthylées et, d'autre part, en une accumulation des HAQ non méthylées. Notons, par ailleurs, que le groupement méthyle des HMAQ pourrait provenir de la *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM) (Vial *et al.*, 2008).

Aucun homologue du gène *pqsH*, codant la mono-oxygénase FAD-dépendante PqsH responsable de la conversion du HHQ en PQS chez *P. aeruginosa* (cf. la **Figure 1.16** présentée à la section 1.2.3.2.3), n'a été retrouvé chez *B. thailandensis* E264, chez *B. pseudomallei* K96243 ou chez *B. ambifaria* AMMD, justifiant l'absence de PQS chez les espèces bactériennes du genre *Burkholderia* (Butt *et al.*, 2016, Diggle *et al.*, 2006b, Mahenthiralingam *et al.*, 2011, Vial *et al.*, 2008). Le PQS, par opposition au HHQ, pourrait donc procurer à *P. aeruginosa* un avantage écologique vis-à-vis d'autres bactéries pathogènes qui sont dans l'incapacité d'en produire telles que *B. ambifaria* HSJ1 colonisant pareillement les poumons de patients atteints de fibrose kystique (Eberl, 2006a). En revanche, un homologue du gène *pqsL*, codant la mono-oxygénase FAD-dépendante PqsL impliquée dans la biosynthèse des HAQ *N*-oxydes chez *P. aeruginosa* (cf. la **Figure 1.16** présentée à la section 1.2.3.2.3), a été identifié chez *B. thailandensis* E264 et chez *B. pseudomallei* K96243 chez lesquelles des HMAQ *N*-oxydes ont été détectées (Butt *et al.*, 2016, Diggle *et al.*, 2006b, Vial *et al.*, 2008).

Outre les bactéries *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* et *B. ambifaria*, des recherches bioinformatiques ont permis de mettre en exergue que d'autres espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* telles que *Burkholderia oklahomensis* possèdent également l'opéron *hmqABCDEFG* et sont, pour cette raison, susceptibles de produire des HMAQ (Vial *et al.*, 2008).

1.3.3.4. Aucun homologue du gène *mvfR* codant le régulateur transcriptionnel MvfR n'est présent à proximité de l'opéron *hmqABCDEFG*

Chez *P. aeruginosa*, le régulateur transcriptionnel de type LysR, MvfR, contrôle positivement et directement la biosynthèse des HAQ en interagissant avec la région promotrice de l'opéron *pqsABCDE* au niveau d'une boîte LysR (cf. la **Figure 1.17** présentée à la section 1.2.3.2.4). Les homologies de séquence entre les opérons *pqsABCDE* et *hmqABCDEFG* suggèrent que la biosynthèse des HMAQ, similairement à la production des HAQ spécifiques de *P. aeruginosa*, est sous le contrôle d'un régulateur transcriptionnel de type LysR chez les espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* (Vial *et al.*, 2008). Alors que le gène *mvfR*, codant le régulateur transcriptionnel MvfR, est localisé à proximité de l'opéron *pqsABCDE*, aucun homologue du gène *mvfR* n'est présent aux alentours de l'opéron *hmqABCDEFG* de *B. thailandensis* E264, de *B. pseudomallei* K96243 ou de *B. ambifaria* AMMD (Vial *et al.*, 2008) (**Fig. 1.50**). Par ailleurs, Vial *et al.* (2008) n'ont trouvé aucune boîte LysR, susceptible d'être reconnue spécifiquement par un régulateur transcriptionnel de type LysR, dans la région promotrice de l'opéron *hmqABCDEFG*. Ainsi, la modulation de l'expression de *hmqABCDEFG* pourrait être différente de celle de *pqsABCDE*, et impliquer des régulateurs transcriptionnels alternatifs.

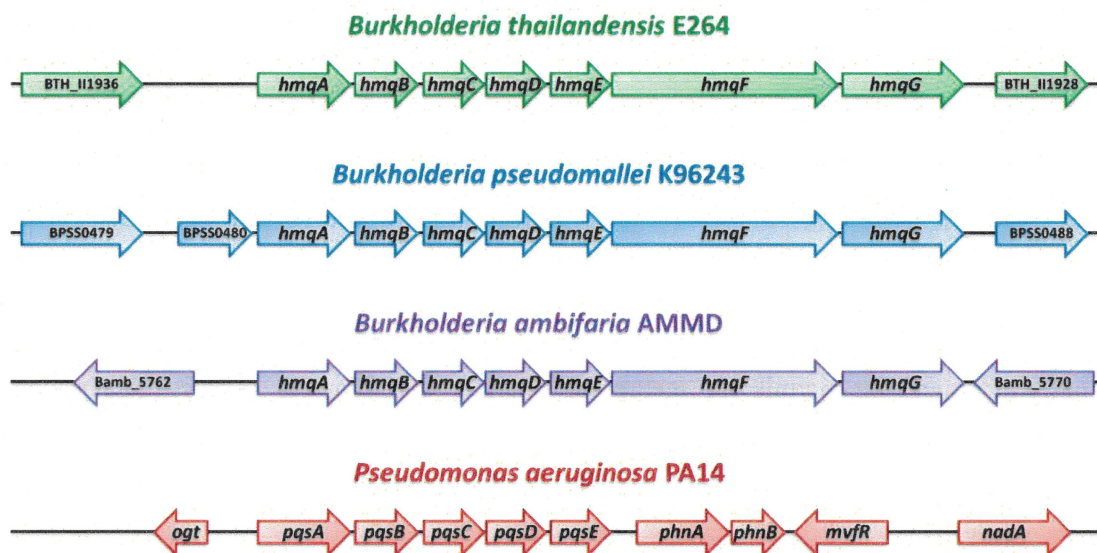


Figure 1.50. Comparaison des opérons *pqsABCDE* chez *P. aeruginosa* PA14 et *hmqABCDEFG* chez *B. thailandensis* E264, chez *B. pseudomallei* K96243 et chez *B. ambifaria* AMMD.

Toutefois, les travaux préliminaires de Dumais (2010), réalisés au sein de notre laboratoire, ont permis d'identifier un régulateur transcriptionnel de type LysR, initialement appelé HmqR, stimulant le système *hmq* de *B. thailandensis* E264. Plus récemment, Mao *et al.* (2017) ont redécouvert ce régulateur transcriptionnel désormais publié sous le nom de ScmR (*secondary metabolite regulator*) et ont confirmé, en l'occurrence, que l'expression de l'opéron *hmqABCDEF*G ainsi que la biosynthèse des HMAQ sont contrôlées *via* le régulateur transcriptionnel ScmR chez *B. thailandensis* E264 (Fig. 1.51).

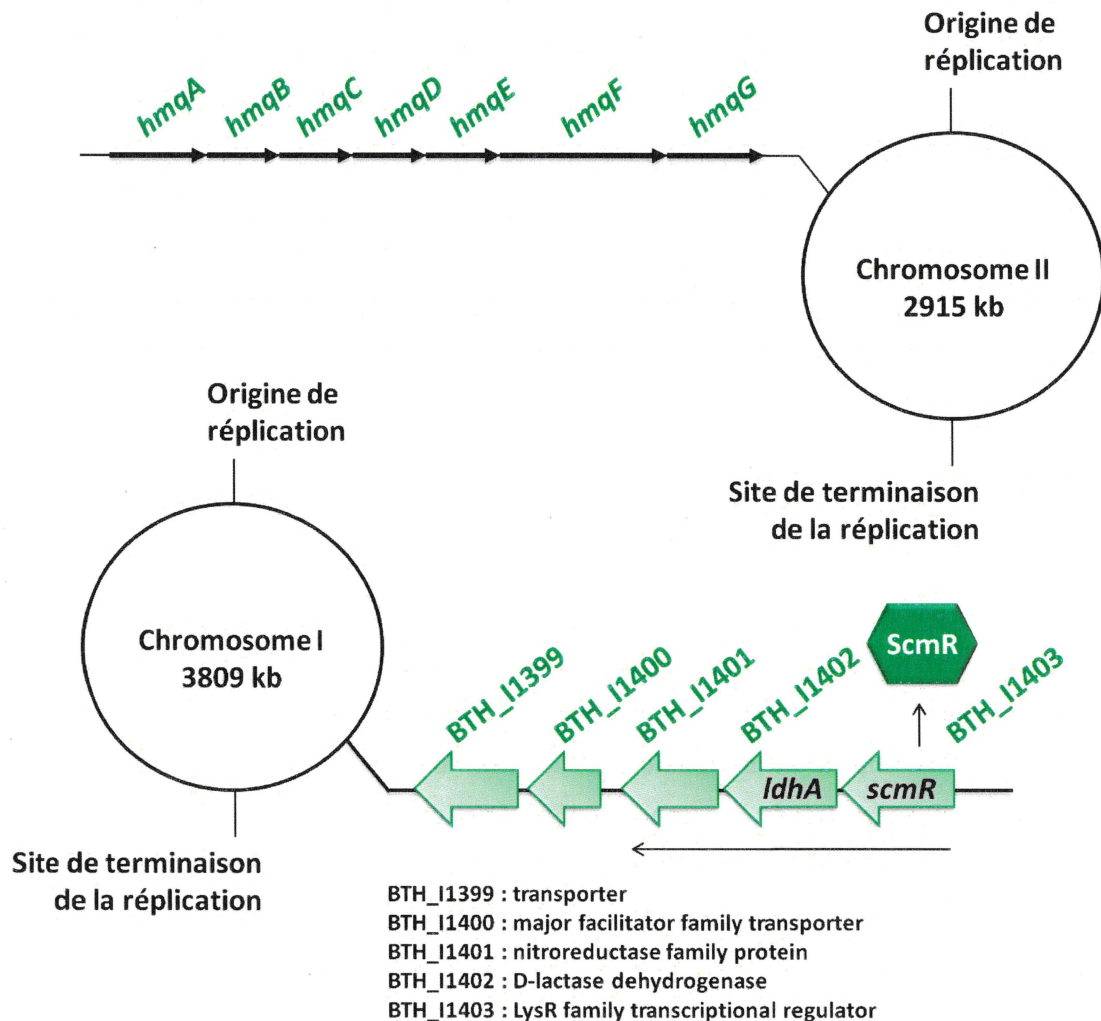


Figure 1.51. Localisation du gène *scmR* au sein du génome de *B. thailandensis* E264.
 Le gène *scmR*, codant le régulateur transcriptionnel ScmR, n'est pas situé à proximité de l'opéron *hmqABCDEF*G chez *B. thailandensis* E264. La flèche noire indique que les gènes sont potentiellement arrangés en opéron d'après Burkholderia.com.

Outre le système *hmq*, Mao *et al.* (2017) ont démontré que ScmR inhibe la transcription et/ou la production de nombreux métabolites secondaires tels que la thailandamide, les bactobolines ou encore la malléilactone. De plus, une analyse transcriptomique de la souche sauvage et d'un mutant $\Delta scmR$ de *B. thailandensis* E264 indique que ScmR constitue un régulateur global de l'expression génique et des études phénotypiques réalisées chez *B. thailandensis* E264 révèlent que ScmR influence la morphologie coloniale, le développement du biofilm ainsi que la virulence bactérienne (Mao *et al.*, 2017). Mao *et al.* (2017) ont, par ailleurs, rapporté que ScmR active la biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL, les principales AHL retrouvées chez *B. thailandensis* E264, via un mécanisme de régulation encore inconnu. Notons, également, que l'inactivation simultanée des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* entraîne une réduction drastique de la transcription du gène *scmR* (Mao *et al.*, 2017). L'hypothèse est que les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 de *B. thailandensis* E264 agissent, entre autres, via le régulateur transcriptionnel ScmR pour contrôler l'expression et/ou la biosynthèse des métabolites secondaires de même que d'autres processus cellulaires comme, par exemple, la morphologie coloniale, le développement du biofilm et la virulence bactérienne (Mao *et al.*, 2017).

1.3.3.5. L'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* n'est pas sous le contrôle des HMAQ

Chez *P. aeruginosa*, l'expression de l'opéron *pqsABCDE* est auto-régulée positivement par l'intermédiaire des HAQ qui agissent tels des co-inducteurs du régulateur transcriptionnel MvfR (cf. la **Figure 1.17** présentée à la section 1.2.3.2.4). En outre, la transcription de l'opéron *pqsABCDE* est auto-régulée négativement par l'intermédiaire de PqsE via un mécanisme de modulation indéterminé. L'étude du rôle des HMAQ dans la régulation de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* chez *B. ambifaria* HSJ1 a permis de déterminer que les HMAQ n'affectent pas la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* (Chapalain *et al.*, 2017). Ainsi, les HMAQ, chez les espèces bactériennes appartenant au genre *Burkholderia*, pourraient être fonctionnellement différentes des HAQ spécifiques de *P. aeruginosa*. Notons, néanmoins, que Chapalain *et al.* (2017) ont observé qu'une mutation polaire du gène *hmqA* engendre une surexpression de l'opéron *hmqABCDEFG*, suggérant une auto-régulation négative du système *hmq* de *B. ambifaria* HSJ1 (cf. la **Figure 1.52** présentée à la section 1.3.3.7.1). Cependant, le mécanisme de régulation sous-jacent est encore inconnu.

1.3.3.6. Lien entre le système *hmq* et les AHL au sein des membres du groupe *Bptm*

1.3.3.6.1. Les AHL affectent la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG*

Chez *P. aeruginosa*, les systèmes *las* et *rhl* contrôlent directement l'expression de l'opéron *pqsABCDE* et indirectement par l'intermédiaire du régulateur transcriptionnel MvfR. D'après l'analyse transcriptomique de Majerczyk *et al.* (2014a), la C₈-HSL, la 3OHC₈-HSL et/ou la 3OHC₁₀-HSL inhibent la transcription des gènes *hmqA*, *hmqC*, *hmqD*, *hmqE*, *hmqF* et *hmqG* chez *B. thailandensis* E264. Cette analyse suggère donc que l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* est réprimée *via* les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et/ou BtaI3/BtaR3. Notons, toutefois, que ni l'absence des régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3, ni l'inactivation des gènes *btaR4* et *btaR5*, n'altèrent vraisemblablement la transcription des gènes *hmqA*, *hmqB*, *hmqC*, *hmqD*, *hmqE*, *hmqF* et *hmqG* (Majerczyk *et al.*, 2014a). En revanche, les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014b) montrent que la 3OHC₈-HSL et/ou la 3OHC₁₀-HSL activent la transcription des gènes *hmqA*, *hmqB*, *hmqC*, *hmqD* et *hmqF* chez *B. pseudomallei* 1026b et suggèrent, en conséquence, que l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* est stimulée *via* les systèmes BpsI2/BpsR2 et/ou BpsI3/BpsR3. Ainsi, la modulation, en fonction de la densité cellulaire, du système *hmq* est variable selon les espèces bactériennes.

1.3.3.6.2. Le système *hmq* n'affecte pas la production des AHL

Chez *P. aeruginosa*, ni la biosynthèse des AHL produites *via* les synthases LasI et RhII, ni l'expression des gènes *lasI* et *rhlI* ne sont sous le contrôle du système *pqs*. Similairement, Diggle *et al.* (2006b) ont rapporté qu'une mutation non polaire du gène *hmqA*, qu'ils nomment *hhqA*, n'influence pas la production de toutes les AHL retrouvées chez *B. pseudomallei* PP844, à savoir la C₈-HSL, la 3OC₈-HSL, la 3OHC₈-HSL, la C₁₀-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₁₂-HSL.

1.3.3.7. Lien entre le système *hmq* et les AHL au sein des membres du complexe *Bcc*

1.3.3.7.1. *B. ambifaria* possède deux systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR

B. ambifaria possède deux systèmes de *quorum sensing* homologues au système LuxI/LuxR : les systèmes CepI/CepR et CepI2/CepR2. Le système CepI/CepR est composé

de la synthèse CepI, qui synthétise principalement de la C₈-HSL, et du régulateur transcriptionnel CepR modulant l'expression des gènes sous le contrôle du système CepI/CepR tels que le gène *cepI* (Chapalain *et al.*, 2017, Chapalain *et al.*, 2013, Zhou *et al.*, 2003) (**Fig. 1.52**). Le système CepI/CepR intervient dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Citons, par exemple, la morphologie coloniale, la colonisation des plantes, le développement du biofilm, la biosynthèse des sidérophores, l'activité hémolytique ou encore la production de molécules antifongiques (Chapalain *et al.*, 2017, Chapalain *et al.*, 2013, Wopperer *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2003). En outre, des tests d'infection effectués chez plusieurs organismes modèles de laboratoire ont démontré l'importance du système CepI/CepR dans la virulence bactérienne (Chapalain *et al.*, 2017, Chapalain *et al.*, 2013, Wopperer *et al.*, 2006).

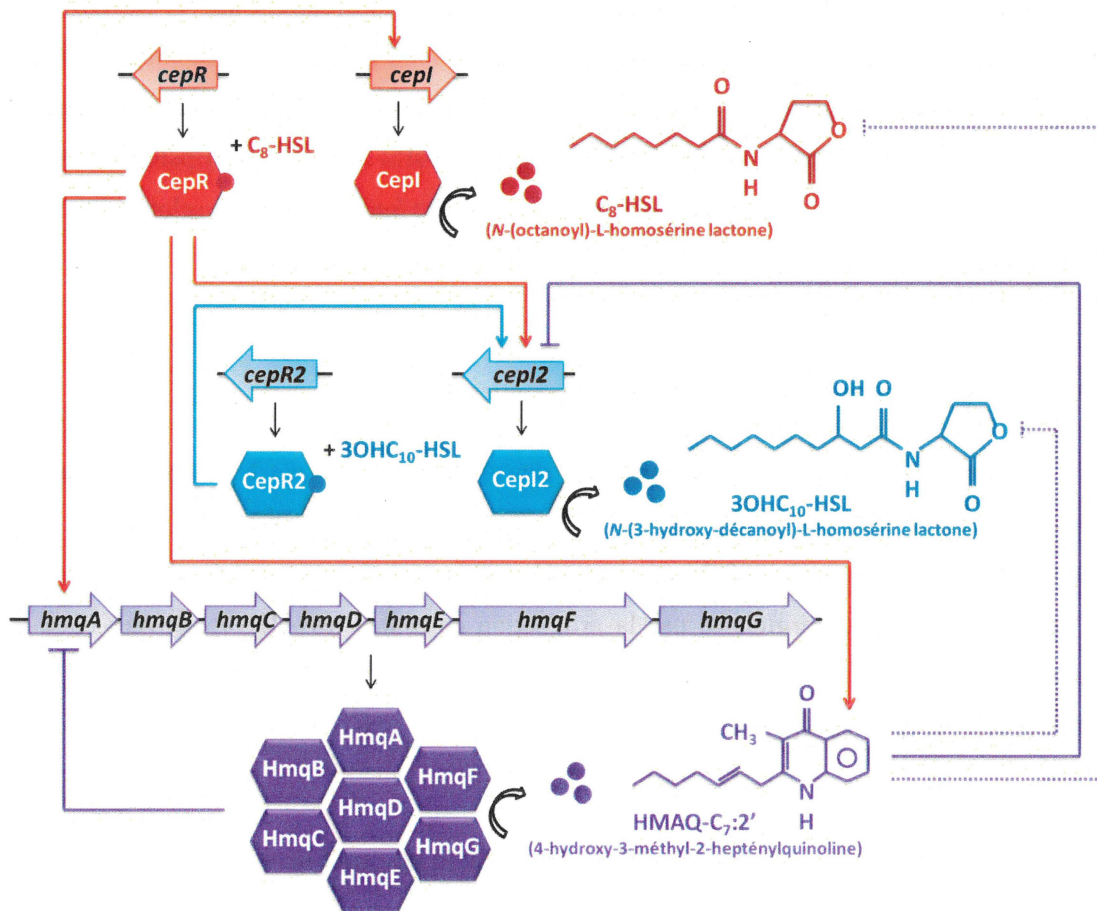


Figure 1.52. Les systèmes CepI/CepR et CepI2/CepR2 et le système *hmq* sont interdépendants chez *B. ambifaria* HSJ1. D'après Chapalain *et al.* (2017).

Le système CepI2/CepR2 est composé de la synthase CepI2, qui synthétise essentiellement de la 3OHC₁₀-HSL, et du régulateur transcriptionnel CepR2 modulant l'expression des gènes contrôlés *via* le système CepI2/CepR2 comme, par exemple, le gène *cepI2* (Chapalain *et al.*, 2017) (**Fig. 1.52**). Le système CepI2/CepR2 régule des processus cellulaires parmi lesquels figurent des cibles du système CepI/CepR telles que la production d'enzymes protéolytiques, l'activité cytotoxique ainsi que la virulence bactérienne (Chapalain *et al.*, 2017). Par ailleurs, Chapalain *et al.* (2017) ont rapporté que les systèmes CepI/CepR et CepI2/CepR2 sont hiérarchisés étant donné que le régulateur transcriptionnel CepR active la transcription du gène *cepI2* et la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 1.52**). Notons, en revanche, que l'expression du gène *cepI* et la production de la C₈-HSL ne sont pas sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CepR2 (Chapalain *et al.*, 2017).

1.3.3.7.2. Les AHL stimulent la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* ainsi que la production des HMAQ chez *B. ambifaria*

Chez *B. ambifaria* HSJ1, le système CepI/CepR active l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* ainsi que la biosynthèse des HMAQ (**Fig. 1.52**). En effet, Chapalain *et al.* (2017) ont démontré que l'inactivation des gènes *cepI* et *cepR* se manifeste par une réduction drastique de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* corrélée à une abolition de la biosynthèse des HMAQ. Par ailleurs, l'ajout exogène de C₈-HSL dans des cultures d'un mutant *cepI*- permet de restaurer la transcription du gène *hmqA* ainsi que la production de la HMAQ-C₇:2', représentant la principale HMAQ identifiée chez *B. ambifaria* HSJ1, à des niveaux comparables à ceux de la souche sauvage (Chapalain *et al.*, 2017). En revanche, le système *hmq* n'est pas sous le contrôle du système CepI2/CepR2 (Chapalain *et al.*, 2017).

1.3.3.7.3. Le système *hmq* réprime la production des AHL chez *B. ambifaria*

Vial *et al.* (2008) ont rapporté que l'inactivation de l'opéron *hmqABCDEFG* résulte en une surproduction de la C₈-HSL, tandis que Chapalain *et al.* (2017) ont démontré que cette inactivation entraîne en définitive une accumulation de toutes les AHL produites *via* la synthase CepI, à savoir la C₆-HSL, la C₈-HSL et la 3OHC₈-HSL, suggérant que le système *hmq* inhibe le système CepI/CepR chez *B. ambifaria* HSJ1 (**Fig. 1.52**). Le système *hmq* n'a, cependant, aucun effet sur la transcription du gène *cepI* (Chapalain *et al.*, 2017). En revanche,

Chapalain *et al.* (2017) ont observé que l'inactivation de l'opéron *hmqABCDEFG* entraîne une surexpression du gène *cepI2* de même qu'une surproduction de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₁₂-HSL qui sont synthétisées par l'intermédiaire de la synthase CepI2, suggérant que le système *hmq* réprime également le système CepI2/CepR2 chez *B. ambifaria* HSJ1 (Fig. 1.52).

1.3.3.8. Le système *hmq* contrôle des processus cellulaires potentiellement impliqués dans les associations hôte-pathogène chez les bactéries du genre *Burkholderia*

Les analogies structurales entre les HAQ et les HMAQ suggèrent que les HMAQ, chez les espèces bactériennes du genre *Burkholderia*, exercent des fonctions biologiques semblables à celles des HAQ spécifiques de *P. aeruginosa* (Vial *et al.*, 2008). Les HAQ participent à la pathogénicité de *P. aeruginosa* indirectement puisqu'elles contrôlent l'expression de nombreux gènes de virulence par l'intermédiaire de PqsE et sont impliquées, notamment, dans le développement du biofilm, dans la mobilité bactérienne ou encore dans la résistance aux antibiotiques nécessaires à l'établissement des interactions hôte-pathogène (Guo *et al.*, 2014, Haussler *et al.*, 2008). D'autre part, les HAQ, *via* leurs propriétés immunomodulatrices et leurs effets cytotoxiques envers les cellules eucaryotes, interviennent directement dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Des études phénotypiques réalisées chez *B. pseudomallei* PP844 ont permis de déterminer qu'une mutation non polaire du gène *hmqA* affecte la morphologie coloniale de même que l'activité élastolytique (Diggle *et al.*, 2006b) (Tableau 1.16). Pesci *et al.* (1999) ont également démontré que la production de l'élastase LasB, un important facteur de virulence chez *P. aeruginosa*, est influencée par le PQS. Ainsi, les HMAQ, au même titre que les HAQ, pourraient jouer un rôle dans la pathogénicité chez les bactéries appartenant au genre *Burkholderia*. Notons, cependant, que cette mutation n'a aucun impact sur la réponse au stress oxydatif, l'activité protéolytique ou encore la biosynthèse des sidérophores chez *B. pseudomallei* PP844 (Diggle *et al.*, 2006b). Diggle *et al.* (2007) ont rapporté, en l'occurrence, que le PQS possède des propriétés chélatrices et intervient, en conséquence, dans le métabolisme du fer chez *P. aeruginosa*, ce qui n'est pas le cas du HHQ.

Tableau 1.16. Processus cellulaires sous le contrôle du système *hmq*.

Processus cellulaire	Souche bactérienne	Référence
Activité antifongique	<i>B. ambifaria</i> HSJ1	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
Activité élastolytique	<i>B. pseudomallei</i> PP844	(Diggle <i>et al.</i> , 2006b)
Biosynthèse des sidérophores	<i>B. ambifaria</i> HSJ1	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
Développement du biofilm	<i>B. pseudomallei</i> K96243	(Butt <i>et al.</i> , 2016)
Morphologie coloniale	<i>B. pseudomallei</i> PP844	(Diggle <i>et al.</i> , 2006b)
Production d'enzymes protéolytiques	<i>B. ambifaria</i> HSJ1	(Vial <i>et al.</i> , 2008)

Chez *B. pseudomallei* K96243, Butt *et al.* (2016) suggèrent que le système *hmq* influence la formation du biofilm (**Tableau 1.16**). En revanche, la mobilité bactérienne, la biosynthèse des sidérophores, la résistance aux antibiotiques et l'activité protéolytique ne sont vraisemblablement pas sous le contrôle du système *hmq* (Butt *et al.*, 2016). Toutefois, des études phénotypiques effectuées chez *B. ambifaria* HSJ1 révèlent qu'une mutation polaire du gène *hmqA* affecte la biosynthèse des sidérophores, la production d'enzymes protéolytiques ainsi que l'activité antifongique (Vial *et al.*, 2008) (**Tableau 1.16**). L'ensemble de ces considérations suggère donc que les processus cellulaires sous le contrôle du système hypothétique *hmq* diffèrent selon les espèces bactériennes.

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

2.1. Hypothèse

L'hypothèse est que les multiples systèmes de communication intercellulaire qui coexistent chez *B. thailandensis* sont organisés en un réseau de régulation hiérarchisé.

2.2. Objectifs

2.2.1. Objectif général

L'objectif général est de caractériser les mécanismes de régulation des multiples systèmes de communication intercellulaire qui coexistent chez *B. thailandensis*.

2.2.2. Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques sont :

- (i) d'approfondir les mécanismes de régulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3;
- (ii) de déterminer l'implication des protéines RsaM1 et RsaM2 dans la modulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3;
- (iii) d'élucider les mécanismes de régulation de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* ainsi que de la biosynthèse des HMAQ et de caractériser fonctionnellement le système *hmq*;
- (iv) de préciser la fonction du régulateur transcriptionnel ScmR.

3. ARTICLES

3.1. Présentation de l'article « The complex quorum sensing circuitry of *Burkholderia thailandensis* is both hierarchically and homeostatically organized »

Servane Le Guillouzer, Marie-Christine Groleau & Éric Déziel

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

Soumission : 6 octobre 2017; **Acceptation** : 26 octobre 2017; **Publication** : 5 décembre 2017

Journal : mBio

Les expériences ont été conçues par S.L.G., M.C.G. et É.D.

S.L.G. et M.C.G. ont effectué les expériences.

Les données ont été interprétées par S.L.G., M.C.G. et É.D.

S.L.G., M.C.G. et É.D. ont rédigé le manuscrit.

RÉSUMÉ

Le génome de la bactérie *Burkholderia thailandensis* code trois systèmes de *quorum sensing* de type LuxI/LuxR : les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3. Les régulateurs transcriptionnels de type LuxR, BtaR1, BtaR2 et BtaR3, modulent l'expression des gènes cibles du *quorum sensing* en association avec diverses *N*-acyl-L-homosérine lactones (AHL) comme molécules de signalisation qui sont produites *via* les synthèses de type LuxI, BtaI1, BtaI2 et BtaI3. Nous avons systématiquement disséqué l'ensemble des systèmes de *quorum sensing* présents au sein de la souche bactérienne *B. thailandensis* E264. Nous avons quantifié la biosynthèse des AHL retrouvées chez cette bactérie, à savoir la *N*-(octanoyl)-L-homosérine lactone (C₈-HSL), la *N*-(3-hydroxy-décanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₁₀-HSL) et la *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₈-HSL), par LC-MS/MS (*liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) chez la souche sauvage et chez des mutants délétionnels du *quorum sensing*. Nous l'avons comparé à l'expression des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* en utilisant des rapporteurs transcriptionnels chromosomiques mini-CTX-*lux*. Par ailleurs, nous avons mesuré la transcription des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* par qRT-PCR (*quantitative reverse transcription-PCR*). Nous avons observé que la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL sont synthétisées différemment au cours de la croissance bactérienne similairement aux profils d'expression des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3*, révélant une activation successive des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3. En outre, la transcription des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* est modulée par des AHL spécifiques et non spécifiques, démontrant que leur régulation dépend non seulement d'eux-mêmes mais implique également les autres systèmes de *quorum sensing*. Nous en concluons que les trois systèmes de *quorum sensing* de *B. thailandensis* sont interdépendants, suggérant qu'ils coopèrent de façon dynamique et fonctionnent de manière concertée pour moduler l'expression des gènes cibles du *quorum sensing* *via* un réseau de régulation complexe.

3.1.1. Abstract

The genome of the bacterium *Burkholderia thailandensis* encodes three complete LuxI/LuxR-type quorum sensing (QS) systems: BtaI1/BtaR1 (QS-1), BtaI2/BtaR2 (QS-2), and BtaI3/BtaR3 (QS-3). The LuxR-type transcriptional regulators BtaR1, BtaR2, and BtaR3 modulate the expression of target genes in association with various *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) as signaling molecules produced by the LuxI-type synthases BtaI1, BtaI2, and BtaI3. We have systematically dissected the complex QS circuitry of *B. thailandensis* strain E264. Direct quantification of *N*-(octanoyl)-L-homoserine lactone (C₈-HSL), *N*-(3-hydroxy-decanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₁₀-HSL), and *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₈-HSL), the primary AHLs produced by this bacterium, was performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in the wild-type strain and in QS deletion mutants. This was compared to the transcription of *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* using chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters. Furthermore, the levels of expression of *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* were monitored by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). We observed that C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL are differentially produced over time during bacterial growth and correlate with the *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* genes expression profiles, revealing a successive activation of the corresponding QS systems. Moreover, the transcription of the *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* genes is modulated by cognate and noncognate AHLs, showing that their regulation depends on themselves and on other QS systems. We conclude that the three QS systems in *B. thailandensis* are interdependent, suggesting that they cooperate dynamically and function in a concerted manner in modulating the expression of QS target genes through a complex regulatory network.

3.1.2. Importance

Quorum sensing (QS) is a widespread bacterial communication system coordinating the expression of specific genes in a cell density-dependent manner and allowing bacteria to synchronize their activities and to function as multicellular communities. QS plays a crucial role in bacterial pathogenicity by regulating the expression of a wide spectrum of virulence/survival factors and is essential to environmental adaptation. The results presented here demonstrate that the multiple QS systems coexisting in the bacterium *Burkholderia thailandensis*, which is considered the avirulent version of the human pathogen *Burkholderia*

pseudomallei and thus commonly used as an alternative study model, are hierarchically and homeostatically organized. We found these QS systems to be finely integrated into a complex regulatory network, including transcriptional and posttranscriptional interactions, and further incorporating growth stages and temporal expression. These results provide a unique, comprehensive illustration of a sophisticated QS network and will contribute to a better appreciation of the regulatory mechanisms that can be involved in the expression of QS-controlled genes, in particular those associated with the establishment of host-pathogen interactions and acclimatization to the environment.

3.1.3. Introduction

Quorum sensing (QS) is a global regulatory mechanism of gene expression depending on bacterial density (Fuqua *et al.*, 1994). Gram-negative bacteria typically possess homologues of the LuxI/LuxR system initially characterized in the bioluminescent marine bacterium *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). The signaling molecules *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) produced by the LuxI-type synthases accumulate in the environment throughout bacterial growth, providing information on cell density. These AHLs activate the LuxR-type transcriptional regulators that modulate the expression of QS target genes, which usually contain a *lux* box sequence in their promoter region. These genes frequently include a *luxI* homologue encoding a LuxI-type synthase generally located in close vicinity of a *luxR* homologue that codes for a LuxR-type transcriptional regulator, resulting in a typical self-inducing loop of AHLs (Fuqua *et al.*, 2002).

Species belonging to the *Burkholderia* genus generally carry a unique AHL-based QS system referred to as the CepI/CepR QS system (Eberl, 2006b, Venturi *et al.*, 2004). The CepI synthase is responsible for the production of *N*-(octanoyl)-L-homoserine lactone (C₈-HSL), whereas the CepR transcriptional regulator modulates the expression of QS target genes in association with C₈-HSL, including the *cepI* gene (Eberl, 2006b, Venturi *et al.*, 2004). Additionally, the *cepR* gene transcription can be autoregulated as well (Lewenza *et al.*, 2001, Malott *et al.*, 2005, Malott *et al.*, 2007). Multiple QS circuitries were also reported for several *Burkholderia* spp., such as the members of the *Burkholderia pseudomallei-thailandensis-mallei* (*Bptm*) group consisting of the nonpathogenic soil saprophyte *Burkholderia thailandensis* and the closely related human pathogens *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* responsible for melioidosis and glanders, respectively (Majerczyk *et al.*,

2013a, Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c, Ulrich *et al.*, 2004d). QS was reported to be involved in the regulation of several virulence factors in *B. pseudomallei* and to be essential to its pathogenicity (Song *et al.*, 2005, Ulrich *et al.*, 2004b, Valade *et al.*, 2004). *B. thailandensis* is considered the avirulent version of *B. pseudomallei* (Brett *et al.*, 1998), and is thus commonly used as a surrogate model for the study of *B. pseudomallei*, which is considered a potential bioterrorism agent and whose manipulation is consequently restricted to biosafety level 3 (BSL3) laboratories (Haraga *et al.*, 2008). The members of the *Bptm* group contain homologous LuxI/LuxR QS systems that are involved in the biosynthesis of various AHLs (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2008, Duerkop *et al.*, 2007, Duerkop *et al.*, 2009, Gamage *et al.*, 2011, Horton *et al.*, 2013, Majerczyk *et al.*, 2013b). In *B. thailandensis*, the LuxI/LuxR QS systems are referred to as the BtaI1/BtaR1 (QS-1), BtaI2/BtaR2 (QS-2), and BtaI3/BtaR3 (QS-3) systems (Majerczyk *et al.*, 2013a). The QS-1, QS-2, and QS-3 systems are also found in *B. pseudomallei*, whereas the QS-2 system is absent in *B. mallei* (Duerkop *et al.*, 2009, Majerczyk *et al.*, 2014b, Nierman *et al.*, 2004, Ong *et al.*, 2004). These species also possess additional orphan *luxR* homologues, namely, *btaR4* (*malR*) and *btaR5* in *B. thailandensis* (Biggins *et al.*, 2012, Truong *et al.*, 2015).

The QS-1 system is composed of the *btaI1* and *btaR1* genes that code for the BtaI1 synthase and the BtaR1 transcriptional regulator, respectively. BtaI1 is responsible for the production of C₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009), and transcription of *btaI1* is positively modulated by BtaR1 (Majerczyk *et al.*, 2014a). The BtaI2 synthase and the BtaR2 transcriptional regulator encoded by the *btaI2* and *btaR2* genes, respectively, constitute the QS-2 system. BtaR2 directly activates expression of *btaI2* involved in both *N*-(3-hydroxy-decanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₁₀-HSL) and *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₈-HSL) biosynthesis (Duerkop *et al.*, 2009). The QS-3 system comprises the *btaI3* gene encoding the BtaI3 synthase that also catalyzes the synthesis of 3OHC₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009), as well as the BtaR3 transcriptional regulator, the product of the *btaR3* gene located next to *btaI3*.

The main goal of this study was to dissect the QS regulatory network of *B. thailandensis* E264 to reveal the interactions existing between the QS-1, QS-2, and QS-3 systems. Besides verifying previously proposed and established interactions, we uncovered several interconnections between the QS-1, QS-2, and QS-3 circuits, providing a comprehensive picture of the complex QS network in *B. thailandensis* E264. Ultimately, this study will contribute to a better appreciation of the QS regulatory mechanism of the

expression of genes in *B. thailandensis*, and in particular those related to pathogenicity in *B. pseudomallei*.

3.1.4. Materials and methods

3.1.4.1. Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used in this study are listed in **Table 3.1**. Unless stated otherwise, all bacteria were cultured at 37°C in tryptic soy broth (TSB; BD Difco, Mississauga, Ontario, Canada), with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on petri dishes containing TSB solidified with 1.5% agar. When required, antibiotics were used at the following concentrations: 15 µg/mL tetracycline (Tc) and 25 µg/mL gentamycin (Gm) for *Escherichia coli* DH5α, while Tc was used at 200 µg/mL for *B. thailandensis* E264. All measurements of optical density at 600 nm (OD₆₀₀) were acquired with a Thermo Fisher Scientific NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

Table 3.1. Bacterial strains used in this study.

Strains	Description	Reference
<i>E. coli</i>		
χ7213	<i>thr-1, leuB6, fhuA21, lacY1, glnV44, recA1, ΔasdA4, Δ(zhf-2::Tn10), thi-1, RP4-2-Tc::Mu [λ, pir]</i>	Lab collection
DH5α	F-, φ80dlacZΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR, recA1, endA1, hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1</i>	Lab collection
ED3328	DH5α (pSLG03, pJNR2); Tc ^R , Gm ^R	This study
<i>B. thailandensis</i>		
E264	Wild-type	(Brett <i>et al.</i> , 1998)
JBT107	E264 Δ <i>btaR1</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT108	E264 Δ <i>btaR2</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT109	E264 Δ <i>btaR3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT101	E264 Δ <i>btaI1</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT102	E264 Δ <i>btaI2</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT103	E264 Δ <i>btaI3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT112	E264 Δ <i>btaI1</i> Δ <i>btaI2</i> Δ <i>btaI3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)

ED3345	E264 $\Delta btaR1::btaI1-lux$	This study
ED3346	E264 $\Delta btaR1::btaI2-lux$	This study
ED3347	E264 $\Delta btaR1::btaI3-lux$	This study
ED3348	E264 $\Delta btaR2::btaI1-lux$	This study
ED3349	E264 $\Delta btaR2::btaI2-lux$	This study
ED3350	E264 $\Delta btaR2::btaI3-lux$	This study
ED3351	E264 $\Delta btaR3::btaI1-lux$	This study
ED3352	E264 $\Delta btaR3::btaI2-lux$	This study
ED3353	E264 $\Delta btaR3::btaI3-lux$	This study
ED3336	E264 $\Delta btaI1::btaI1-lux$	This study
ED3337	E264 $\Delta btaI1::btaI2-lux$	This study
ED3338	E264 $\Delta btaI1::btaI3-lux$	This study
ED3339	E264 $\Delta btaI2::btaI1-lux$	This study
ED3340	E264 $\Delta btaI2::btaI2-lux$	This study
ED3341	E264 $\Delta btaI2::btaI3-lux$	This study
ED3342	E264 $\Delta btaI3::btaI1-lux$	This study
ED3343	E264 $\Delta btaI3::btaI2-lux$	This study
ED3344	E264 $\Delta btaI3::btaI3-lux$	This study
ED3330	E264:: <i>btaI1-lux</i>	This study
ED3331	E264:: <i>btaI2-lux</i>	This study
ED3332	E264:: <i>btaI3-lux</i>	This study
ED3333	E264 $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3::btaI1-lux$	This study
ED3334	E264 $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3::btaI2-lux$	This study
ED3335	E264 $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3::btaI3-lux$	This study

3.1.4.2. Construction of plasmids

All plasmids used in this study are described in **Table 3.2**.

Table 3.2. Plasmids used in this study.

Plasmids	Description	Source
mini-CTX- <i>lux</i>	Integration vector with promoterless <i>luxCDABE</i> ; Tc ^R	(Becher <i>et al.</i> , 2000)
pSLG02	<i>btaI1</i> promoter inserted in <i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	This study
pSLG03	<i>btaI2</i> promoter inserted in <i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	This study
pSLG04	<i>btaI3</i> promoter inserted in <i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	This study
pJNR2	<i>btaR2</i> inserted in <i>Pst</i> I- <i>Sac</i> I restriction sites in pJN105; Gm ^R	(Duerkop <i>et al.</i> , 2009)

Amplification of the promoter regions of *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* was performed from genomic DNA from *B. thailandensis* E264 using the appropriate primers (Table 3.3). The amplified products were digested with the FastDigest restriction enzymes *Xho*I and *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific) and inserted by T4 DNA ligase (Bio Basic, Inc., Markham, ON, Canada) within the corresponding restriction sites in the mini-CTX-*lux* plasmid (Becher *et al.*, 2000), generating the transcriptional reporters pSLG02, pSLG03, and pSLG04, respectively. All primers were from Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada).

Table 3.3. Primers used for PCR.

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')*
<i>btaI1</i>	PBta11F	CGCCTCGAGAACCTGATGGGCATCGAC
	PBta11R	CGCGGATCCGTCGCCATGAACGAAAGTT
<i>btaI2</i>	PBta12F	CGCCTCGAGATTGGATTGGATTGCCAAAT
	PBta12R	CGCGGATCCCTTGACGGTGAATCCAGTT
<i>btaI3</i>	PBta13F	CCGCTCGAGGCGATGGAGAAGCTCAACAC
	PBta13R	CGGATCCTGCGGTTTCGAAGGCTGT

*Restriction sites designed into the primers are underlined.

3.1.4.3. Construction of reporter strains

The mini-CTX-*btaI1-lux*, mini-CTX-*btaI2-lux*, and mini-CTX-*btaI3-lux* transcriptional reporters were integrated into the chromosome of *B. thailandensis* E264 strains through conjugation with *E. coli* χ 7213 followed by selection with Tc. Successful chromosomal insertion of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux* was confirmed by PCR using appropriate primers.

3.1.4.4. LC-MS/MS quantification of AHLs

The concentrations of AHLs were determined from samples of *B. thailandensis* E264 cultures obtained at different time points during bacterial growth by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were prepared and analyzed as described previously (Chapalain *et al.*, 2017). 5,6,7,8-Tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) was used as an internal standard. All experiments were performed in triplicate and conducted at least twice independently.

3.1.4.5. Measurement of the activity of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux* reporters

The levels of expression from the promoter regions of *btaI1*, *btaI2*, or *btaI3* were quantified by measuring the luminescence of *B. thailandensis* E264 cultures carrying the corresponding chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters. Overnight bacterial cultures were diluted in TSB to an initial OD₆₀₀ of 0.1 and incubated as described above. The luminescence was regularly determined from culture samples using a multi-mode microplate reader (Cytation 3, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) and expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). For experiments with AHL additions, cultures were supplemented with 10 µM C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL (Sigma-Aldrich Co., Oakville, ON, Canada) or not supplemented with AHLs from stocks prepared in high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile. Acetonitrile only was added to the controls. All experiments were performed with three biological replicates and repeated at least twice.

3.1.4.6. Heterologous *E. coli* expression system for BtaR2 regulation of *btaI2* expression

The response of the *btaI2* promoter to the BtaR2 transcriptional regulator was determined using a recombinant *E. coli* DH5α strain containing both the chromosomal *btaI2-lux* transcriptional fusion and the arabinose-inducible expression vector pJN105-*btaR2*. Overnight bacterial cultures of *E. coli* DH5α were diluted in lysogeny broth (LB; Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA), with the appropriate antibiotics and grown in triplicate at 37°C, with shaking in a TC-7 roller drum. When the cultures reached an OD₆₀₀ of 0.5, they were supplemented with 10 µM C₈-HSL, 3OHC₈-HSL, or 3OHC₁₀-HSL.

Acetonitrile only was added to the controls. The BtaR2 expression vector was induced with 0.2% L-arabinose (wt/vol). The *btaI2-lux* luciferase activity was measured every 30 min during 10 hrs as described above. All experiments were repeated at least three times.

3.1.4.7. Quantitative reverse transcription-PCR experiments

Total RNA of *B. thailandensis* E264 cultures at an OD₆₀₀ of 4.0 was extracted with the PureZOL RNA isolation reagent (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) and treated twice with the TURBO DNA-Free kit (Ambion Life Technologies, Inc., Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Extractions were done on three different bacterial cultures. Quality and purity controls were confirmed by agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometric analysis, respectively. cDNA synthesis was performed using the iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad Laboratories), and amplification was accomplished on a Corbett Life Science Rotor-Gene® 6000 thermal cycler using the SsoAdvanced universal SYBR green supermix (Bio-Rad Laboratories), according to the manufacturer's protocol. The reference gene was *ndh* (Subsin *et al.*, 2007). The *ndh* gene displayed a stable expression under the different genetic contexts tested. All primers used for cDNA amplification are presented in **Table 3.4**. Differences in gene expression between *B. thailandensis* E264 strains were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula (Livak *et al.*, 2001). A threshold of 0.5 was chosen as significant. All experiments were performed in triplicate and conducted at least twice independently.

Table 3.4. Primers used for qRT-PCR.

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')
<i>ndh</i>	SLG_qRT-PCR_ndh_F	ACCAGGGCGAATTGATCTC
	SLG_qRT-PCR_ndh_R	GATGACGAGCGTGTCGTATT
<i>btaR1</i>	SLG_qRT-PCR_btaR1_F	AGCTCGAACATGATCGTCTG
	SLG_qRT-PCR_btaR1_R	TGAAGCGTCAGATGGTTGAT
<i>btaR2</i>	SLG_qRT-PCR_btaR2_F	GAGAAATTCCGCAACGAGAG
	SLG_qRT-PCR_btaR2_R	GCCGTCCACTTCAACACAT
<i>btaR3</i>	SLG_qRT-PCR_btaR3_F	CGACTACTTCACCATCGATCC
	SLG_qRT-PCR_btaR3_R	GCTGATGCCGTTGTGCGAG

3.1.4.8. Data analysis

Unless stated otherwise, data are reported as means \pm standard deviations (SD). Statistical analyses were performed with the R software version 3.3.3 (<http://www.R-project.org/>) using one-way analysis of variance (ANOVA). Probability values of less than 0.05 were considered significant.

3.1.5. Results

3.1.5.1. The *B. thailandensis* QS-1, QS-2, and QS-3 systems are successively activated

B. thailandensis E264 produces 3OHC₁₀-HSL and to lesser extents, C₈-HSL and 3OHC₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Majerczyk *et al.*, 2014a), but their levels at different stages throughout the bacterial growth had never been investigated. Considering that nonsimultaneous production of AHLs in *B. pseudomallei* KHW was suggested (Gamage *et al.*, 2011), we hypothesized that these three AHLs are differentially produced over the growth phases of *B. thailandensis* E264. We thus determined the production profiles of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL at various time points of the bacterial growth. LC-MS/MS was used to quantify the concentrations of these AHLs in wild-type *B. thailandensis* E264 cultures. We found that the amounts of 3OHC₁₀-HSL increased rapidly through the early logarithmic growth phase (OD₆₀₀ \approx 3.0) and late exponential growth phase (OD₆₀₀ \approx 5.0) but decreased thereafter (**Fig. 3.1A**). Interestingly, 3OHC₈-HSL concentrations kept increasing throughout bacterial growth to levels similar to the ones of 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 3.1A**). C₈-HSL accumulated only during logarithmic growth and then remained stable in the stationary growth phase (OD₆₀₀ \approx 8.0) (**Fig. 3.1A**).

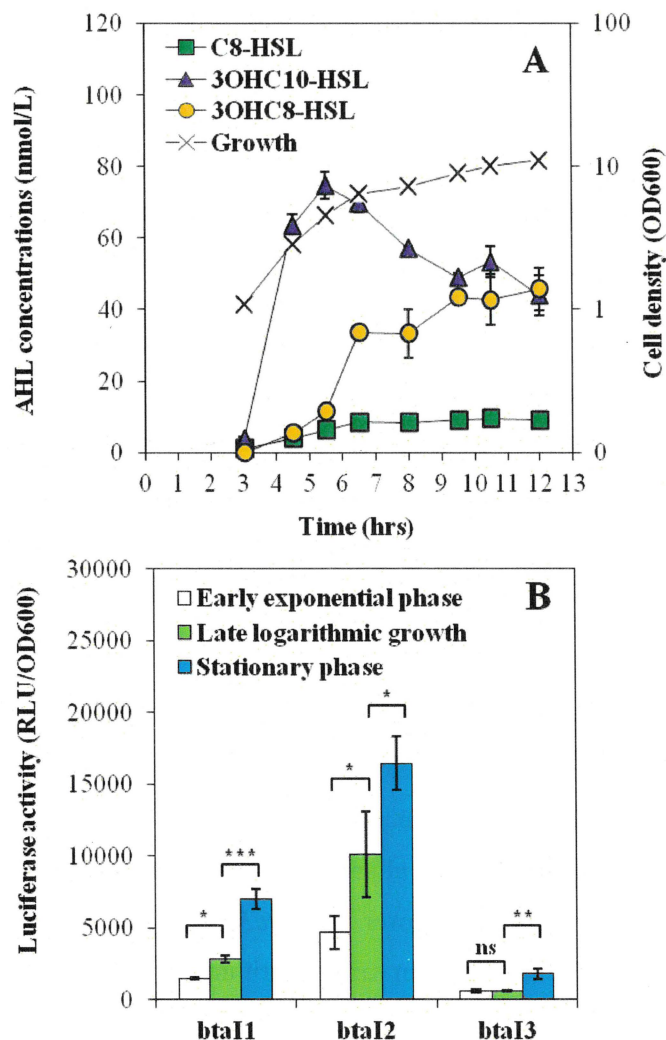


Figure 3.1. The QS-1, QS-2, and QS-3 systems are consecutively activated.

(A) C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL concentrations were measured by LC-MS/MS throughout the different stages of bacterial growth in cultures of the wild-type E264 strain of *B. thailandensis*. The values are means \pm standard deviations (error bars) for three replicates. (B) The luciferase activity of the chromosomal *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux* transcriptional fusions was monitored during the early exponential growth phase (OD₆₀₀ \approx 3.0), late logarithmic growth phase (OD₆₀₀ \approx 5.0), and stationary growth phase (OD₆₀₀ \approx 8.0). The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). Values that are significantly different are indicated by brackets and asterisks as follows: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$. Values that are not significantly different (ns) are also indicated.

To gain additional insights, biosynthesis of AHLs was correlated to the expression of the *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* genes. The activity of the chromosomal *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux* transcriptional reporters was measured during bacterial growth. In agreement with the AHL production profiles, activation of both *btaI1* and *btaI2* was observed from logarithmic growth (Fig. 3.1B), with *btaI2* expression starting earlier than for *btaI1* (data not shown), whereas *btaI3* was not activated until stationary phase was reached (Fig. 3.1B).

Collectively, our results point toward a successive activation of the different QS systems in *B. thailandensis* E264 throughout the bacterial growth phases.

3.1.5.2. The QS-1, QS-2, and QS-3 systems act in a coordinated way to finely modulate the synthesis of AHLs

In order to verify whether the successive activation of the QS-1, QS-2, and QS-3 systems results from interactions between these QS circuits, we determined the kinetics of production of AHLs in cultures of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutants compared to the wild-type E264 strain of *B. thailandensis* throughout the bacterial growth phases. We also measured expression of the AHL synthase-coding genes *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* in the same backgrounds harboring a chromosomal *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, or *btaI3-lux* transcriptional fusion.

BtaI1 produces C₈-HSL, and BtaR1 is considered the main regulator of *btaI1* expression (Chandler *et al.*, 2009). Therefore, we were surprised to see increased production of C₈-HSL in the $\Delta btaR1$ mutant compared to the wild-type strain (**Fig. 3.2A**). This overproduction was principally detected after the end of the exponential phase. Nevertheless, transcription of the *btaI1* gene was lower in $\Delta btaR1$ throughout the different stages of bacterial growth, and it was almost zero in early logarithmic growth (**Fig. 3.2B**).

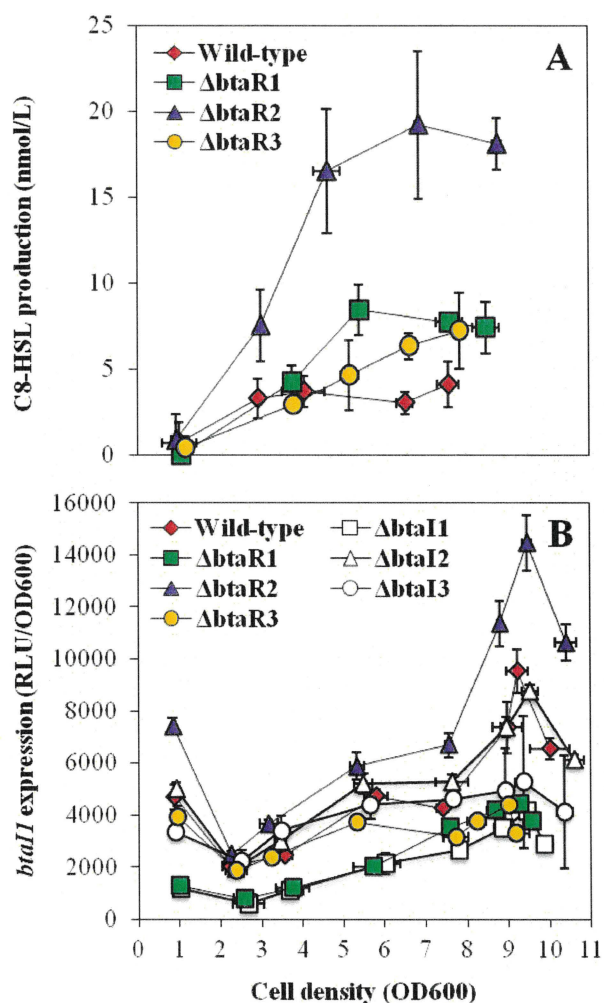


Figure 3.2. C₈-HSL production and expression from the *btaI1* promoter in the wild-type and QS mutant strains of *B. thailandensis* E264.

(A) The biosynthesis of C₈-HSL was quantified using LC-MS/MS at various times during growth in cultures of the wild-type strain and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The luciferase activity of the chromosomal *btaI1-lux* transcriptional fusion was monitored in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, $\Delta btaR3$, $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$, and $\Delta btaI3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

Because of these results, it was important to confirm that *btaI1* expression is activated by BtaR1 in conjunction with C₈-HSL. We monitored *btaI1* expression in response to exogenous addition of C₈-HSL in the wild-type *B. thailandensis* strain E264 and its $\Delta btaR1$, $\Delta btaI1$, and $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutants. The *btaI1* gene exhibited comparable transcriptional profiles in the absence of BtaR1 or C₈-HSL, supporting the idea that BtaR1/C₈-HSL does indeed activate *btaI1* transcription (Fig. 3.3). Accordingly, adding exogenous C₈-HSL restored *btaI1* transcription in both the $\Delta btaI1$ and $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutants (Fig. 3.3). While expression of *btaI1* was induced in the wild-type strain culture supplemented with

exogenous C₈-HSL, no difference was noticed for the $\Delta btaR1$ mutant, confirming that activation of *btaI1* by this AHL involves BtaR1 (Fig. 3.3).

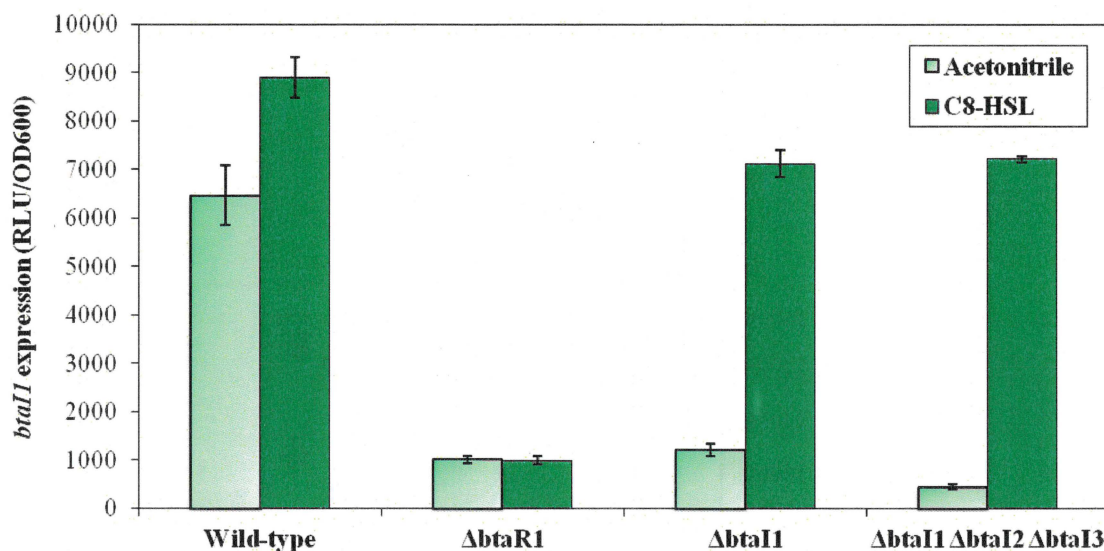


Figure 3.3. *btaI1* activation requires BtaR1 and C₈-HSL.

The luciferase activity of the chromosomal *btaI1-lux* transcriptional fusion was monitored during the exponential growth phase in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the $\Delta btaR1$, $\Delta btaI1$, and $\Delta btaI1 \Delta btaI2 \Delta btaI3$ mutant strains. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

To determine whether the QS-1 system is also under BtaR2 and BtaR3 control, we investigated the effects of these transcriptional regulators on both the production of C₈-HSL and expression of *btaI1*. Interestingly, C₈-HSL concentrations were also increased in the $\Delta btaR2$ mutant, with a matching upregulation of *btaI1* expression during logarithmic growth (Fig. 3.2), revealing that BtaR2 might repress the production of C₈-HSL by modulating the transcription of *btaI1*. While C₈-HSL was also overproduced in the absence of BtaR3 during stationary phase (Fig. 3.2A), *btaI1* transcription was downregulated in the $\Delta btaR3$ mutant (Fig. 3.2B), suggesting that the negative impact of BtaR3 on C₈-HSL biosynthesis does not result from *btaI1* regulation. Altogether, these data indicate that while BtaR1 constitutes the main regulator of the QS-1 system, C₈-HSL biosynthesis is also directly and indirectly dependent on both BtaR2 and BtaR3, respectively.

3OHC₁₀-HSL is produced by the BtaI2 synthase (Duerkop *et al.*, 2009). While BtaR2 directly activates *btaI2* expression in response to 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL, the latter being also produced by BtaI2 (Duerkop *et al.*, 2009), the direct impact of BtaR2 on the

production of these two AHLs is still untested. We observed that both 3OHC₁₀-HSL biosynthesis and *btaI2* expression were almost completely abolished in the $\Delta btaR2$ mutant, confirming that BtaR2 is their main regulator (Fig. 3.4). Despite the absence of BtaR2, we detected a slight, but consistent and highly reproducible, production of 3OHC₁₀-HSL during stationary phase (Fig. 3.4A). Accordingly, transcription of *btaI2* was also slightly augmented later (Fig. 3.4B). Thus, 3OHC₁₀-HSL biosynthesis and *btaI2* expression might not be exclusively under BtaR2 control.

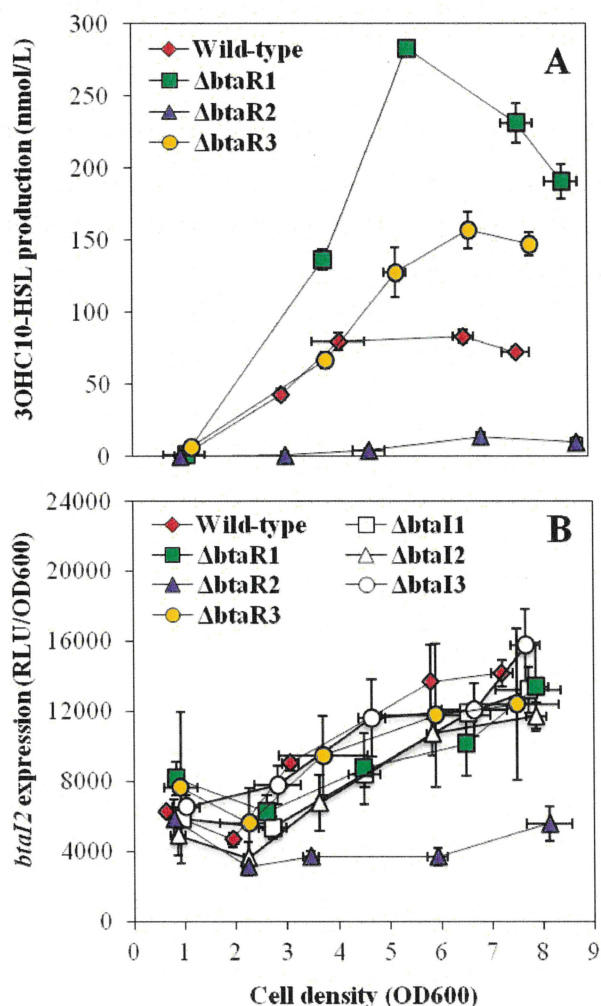


Figure 3.4. 3OHC₁₀-HSL production and expression from the *btaI2* promoter in the wild-type and QS mutant strains of *B. thailandensis* E264.

(A) The biosynthesis of 3OHC₁₀-HSL was quantified using LC-MS/MS at various times during growth in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The luciferase activity of the chromosomal *btaI2-lux* transcriptional fusion was monitored in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, $\Delta btaR3$, $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$, and $\Delta btaI3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

To determine whether BtaR1 and BtaR3 also intervene in the regulation of 3OHC₁₀-HSL production and *btaI2* transcription, their effects on the QS-2 system were investigated. Interestingly, 3OHC₁₀-HSL concentrations were strongly increased in the $\Delta btaR1$ mutant compared to the wild-type strain from the beginning of logarithmic growth (**Fig. 3.4A**). The levels of 3OHC₁₀-HSL were also increased in the $\Delta btaR3$ mutant background, but this was observed only after the end of the exponential phase (**Fig. 3.4A**). However, in both cases, no impact on *btaI2* transcription was noticed despite an increase in the amounts of 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 3.4B**). Collectively, these observations indicate that although BtaR1 and BtaR3 influence the biosynthesis of 3OHC₁₀-HSL, the effects of these transcriptional regulators on the QS-2 system are indirect.

BtaI3 is mainly responsible for 3OHC₈-HSL biosynthesis (Chandler *et al.*, 2009). While no discernible difference in 3OHC₈-HSL concentrations was detected in cultures of the $\Delta btaR3$ mutant compared to cultures of the wild-type strain (**Fig. 3.5A**), the levels of *btaI3* transcription were decreased (**Fig. 3.5B**).

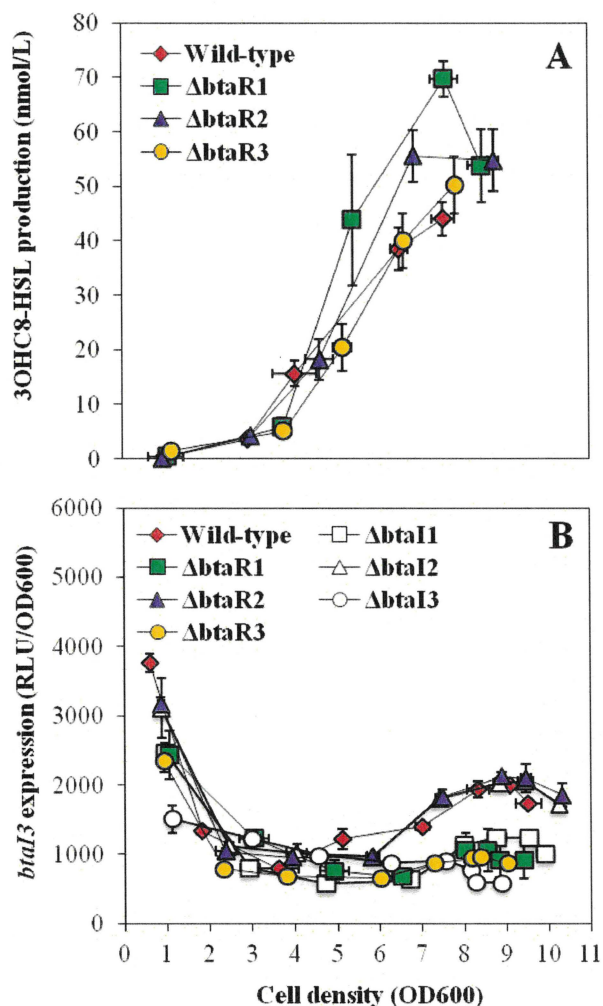


Figure 3.5. 3OHC₈-HSL production and expression from the *btaI3* promoter in the wild-type and QS mutant strains of *B. thailandensis* E264.

(A) The biosynthesis of 3OHC₈-HSL was quantified using LC-MS/MS at various times during growth in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The luciferase activity of the chromosomal *btaI3-lux* transcriptional fusion was monitored in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, $\Delta btaR3$, $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$, and $\Delta btaI3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

To confirm whether transcription of *btaI3* is dependent on BtaR3 and on 3OHC₈-HSL, *btaI3* expression was measured in the wild-type strain and in the $\Delta btaR3$, $\Delta btaI3$, and $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutants supplemented with exogenous 3OHC₈-HSL or not supplemented with 3OHC₈-HSL. We found that *btaI3* was similarly downregulated in the $\Delta btaR3$ and $\Delta btaI3$ mutant backgrounds, suggesting that BtaR3 activates *btaI3* in response to 3OHC₈-HSL (Fig. 3.6). Accordingly, *btaI3* transcription was not affected by the addition of 3OHC₈-HSL in the $\Delta btaR3$ mutant, but it was increased in the wild-type strain culture under the same conditions, revealing that activation of *btaI3* by this AHL is linked to BtaR3 (Fig.

3.6). Unexpectedly, adding exogenous 3OHC₈-HSL to the culture of the $\Delta btaI3$ mutant did not restore *btaI3* transcription to wild-type levels (Fig. 3.6). However, we observed that expression of *btaI3* was restored in the AHL-defective $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant supplemented with 3OHC₈-HSL, confirming the involvement of this AHL in the activation of *btaI3* (Fig. 3.6). Taken together, these data confirm that *btaI3* is activated by BtaR3/3OHC₈-HSL and suggest that expression of this gene is controlled by additional AHLs and/or alternative LuxR-type transcriptional regulators.

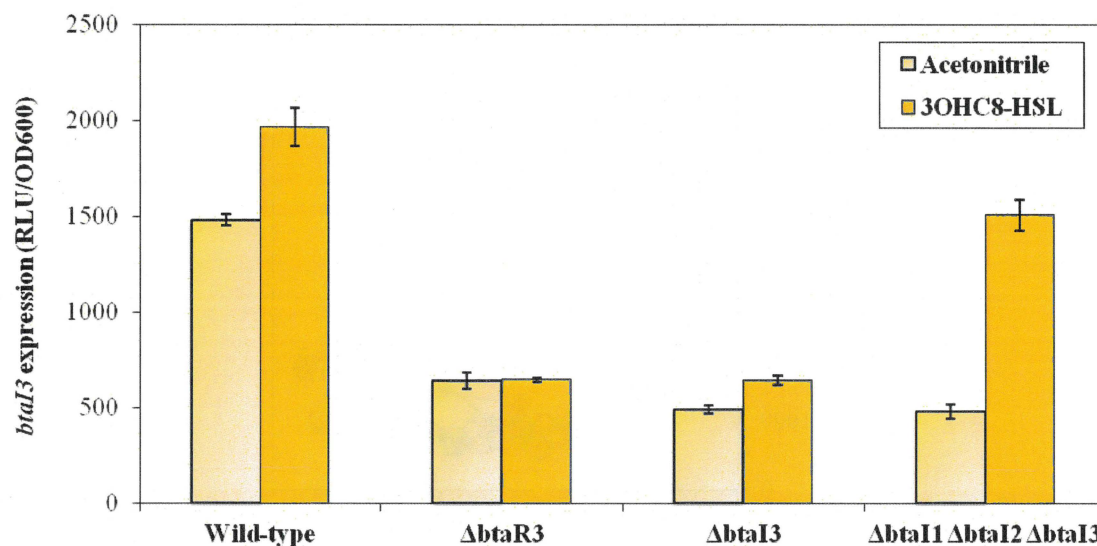


Figure 3.6. *btaI3* is activated by BtaR3 and 3OHC₈-HSL.

The luciferase activity of the chromosomal *btaI3-lux* transcriptional fusion was measured during stationary phase in cultures of the *B. thailandensis* wild-type E264 strain and the $\Delta btaR3$, $\Delta btaI3$, and $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant strains. Cultures were supplemented with 10 μ M 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

To confirm that the QS-3 system is not exclusively modulated by BtaR3, we investigated the influence of BtaR1 and BtaR2 on 3OHC₈-HSL biosynthesis and *btaI3* expression. As previously noted for C₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL (Figs. 3.2A and 3.4A), the levels of 3OHC₈-HSL were enhanced in the $\Delta btaR1$ mutant compared to the wild-type strain (Fig. 3.5A). While 3OHC₁₀-HSL overproduction was observed during the different stages of bacterial growth (Fig. 3.4A), augmentation of 3OHC₈-HSL concentrations occurred principally in the late exponential phase in the $\Delta btaR1$ mutant (Fig. 3.5A). Surprisingly, expression of *btaI3* was lower, suggesting that the negative regulation of 3OHC₈-HSL biosynthesis by BtaR1 is indirect and does not result from *btaI3* modulation (Fig. 3.5B).

Additionally, we observed an increase in 3OHC₈-HSL levels in the $\Delta btaR2$ mutant from late logarithmic growth (**Fig. 3.5A**). Nevertheless, no obvious change in expression of *btaI3* was visible, revealing that BtaR2 might not repress 3OHC₈-HSL biosynthesis directly through regulation of *btaI3* transcription as well (**Fig. 3.5B**). All in all, these findings demonstrate that the QS-1, QS-2, and QS-3 systems work collectively to regulate production of AHLs.

We also analyzed production of AHLs in the $\Delta btaR4$ and $\Delta btaR5$ mutants, and no difference with the wild-type strain production was found under the conditions of our experiments, revealing that neither BtaR4 nor BtaR5 are involved in the regulation of the biosynthesis of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL (data not shown).

3.1.5.3. The *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* genes are QS-controlled

In order to verify whether the QS modulatory cascade also involves cross-regulation between the BtaR1, BtaR2, and BtaR3 transcriptional regulators, the levels of expression of the respective *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* genes were assessed by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) in the wild-type *B. thailandensis* E264 strain and in the AHL-defective $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant during the exponential phase of bacterial growth. Interestingly, the transcription of *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* was significantly affected by the absence of AHLs, indicating that they are controlled by QS (**Fig. 3.7**). *btaR1* transcription was increased in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant compared to the wild-type strain, revealing that its expression is negatively regulated by AHLs (**Fig. 3.7A**). Conversely, *btaR2* and *btaR3* were both downregulated in the absence of AHLs, showing that these genes are activated by QS (**Figs. 3.7B and C**). To further investigate the impact of AHLs on the expression of *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3*, their transcription was measured in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant supplemented with exogenous C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. Interestingly, the levels of expression of *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* were restored to wild-type ones in the presence of AHLs produced by their respective cognate synthase, as well as in the presence of noncognate AHLs, suggesting that their regulation depends on themselves and on other QS systems (**Fig. 3.7**). Collectively, our results indicate that the interdependence of the QS-1, QS-2, and QS-3 systems also implicates cross-modulation between BtaR1, BtaR2, and BtaR3.

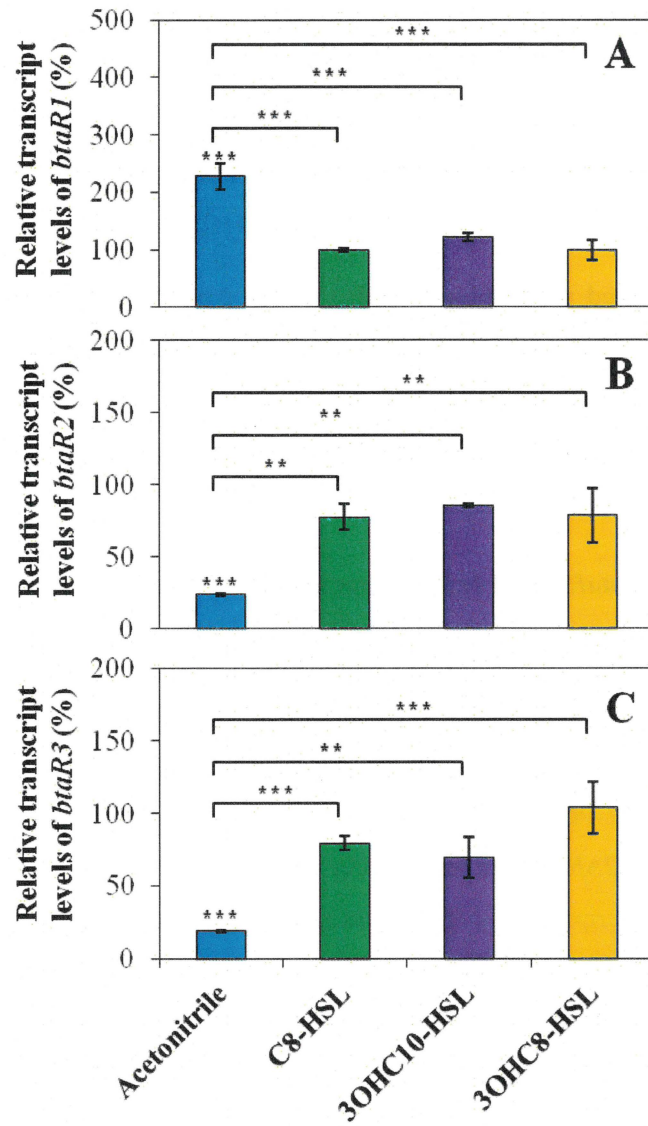


Figure 3.7. Effects of AHLs on the levels of expression of the *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* genes. The relative transcript levels of (A) *btaR1*, (B) *btaR2*, and (C) *btaR3* from the wild-type *B. thailandensis* E264 strain and its $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant strain were estimated by qRT-PCR. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$.

3.1.5.4. The levels of expression of *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* are modulated by cognate and noncognate AHLs

To further elucidate the regulatory mechanisms directing *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* expression, the activity of the corresponding chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters was measured in the AHL-defective $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant supplemented with

exogenous AHLs or not supplemented with AHLs. Since we noticed that the QS-1 and QS-2 systems were both activated in the logarithmic growth phase, whereas activation of the QS-3 system started in the stationary phase (**Fig. 3.1**), experiments with *btaI1-lux* and *btaI2-lux* were done during the exponential phase, while those with *btaI3-lux* were performed during the stationary phase. Additionally, the impact of AHLs on the transcription of *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* was also estimated by monitoring the activity of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux*, respectively, in cultures of the $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$, and $\Delta btaI3$ mutants versus the wild-type *B. thailandensis* E264 strain throughout the bacterial growth phases.

While we demonstrated that *btaI1* is positively controlled by BtaR1 and activated by BtaI1-produced C₈-HSL (**Fig. 3.3**), expression of *btaI1* was also enhanced in the presence of noncognate AHLs, namely, 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009), in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant background (**Fig. 3.8A**).

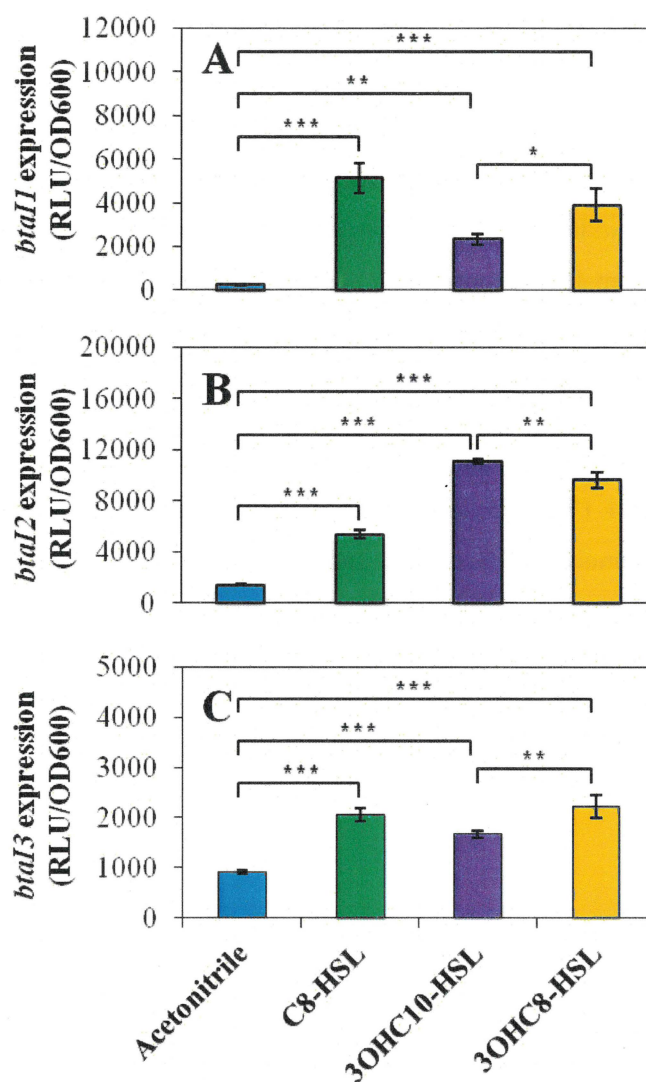


Figure 3.8. Activation of expression from the *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* promoters by AHLs.

The luciferase activity of the chromosomal (A) *btaI1-lux*, (B) *btaI2-lux*, and (C) *btaI3-lux* transcriptional fusions was monitored in cultures of the *B. thailandensis* E264 $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant strain. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

Since we found that BtaR3 activates *btaI1* as well (Fig. 3.2B), we tested the impact of 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL on *btaI1* transcription in the absence of BtaR3 in order to verify whether activation of *btaI1* by these AHLs could be dependent on BtaR3. No significant effect on *btaI1* transcription was visible in cultures of the $\Delta btaR3$ mutant supplemented with either 3OHC₁₀-HSL or 3OHC₈-HSL (Fig. 3.9). This suggests that BtaR3 is necessary for activation of *btaI1* by these AHLs. Collectively, these observations confirm

that *btaI1* is mainly activated by BtaR1/C₈-HSL and might also be positively regulated by BtaR3 in conjunction with 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL.

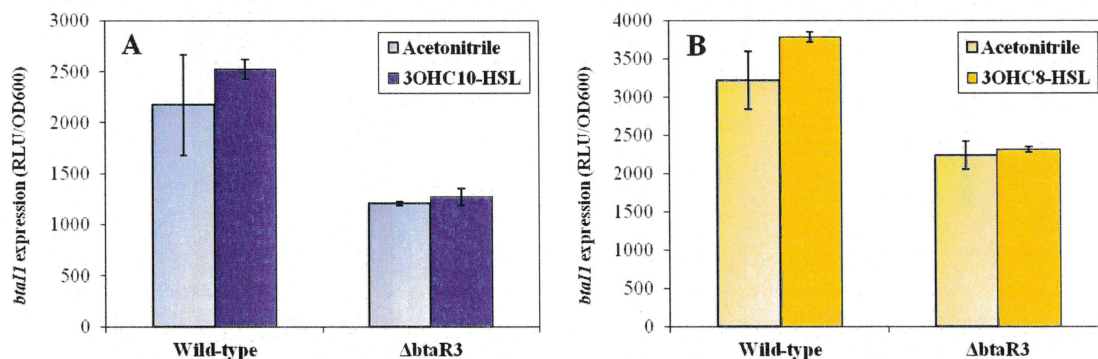


Figure 3.9. Impact of 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL on activation of *btaI1* by BtaR3.

The luciferase activity of the chromosomal *btaI1-lux* transcriptional fusion was monitored during stationary phase in cultures of the *B. thailandensis* wild-type E264 strain and the $\Delta btaR3$ mutant strain. Cultures were supplemented with 10 μ M (A) 3OHC₁₀-HSL or (B) 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

Expression of *btaI2* was more strongly enhanced by 3OHC₁₀-HSL (Fig. 3.8B). We also noticed a significant activation with 3OHC₈-HSL (Fig. 3.8B). Surprisingly, activation in the presence of the noncognate C₈-HSL was observed as well, revealing that expression of *btaI2* is not exclusively under BtaR2 control (Fig. 3.8B). Additionally, we attested that BtaR2 directly modulates *btaI2* transcription in response to 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL, produced by its cognate synthase BtaI2 (Duerkop *et al.*, 2009), but does not function with C₈-HSL (Fig. 3.10). Altogether, these data confirm that *btaI2* is positively regulated by BtaR2 in response to both 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL, whereas activation by C₈-HSL is independent of BtaR2.

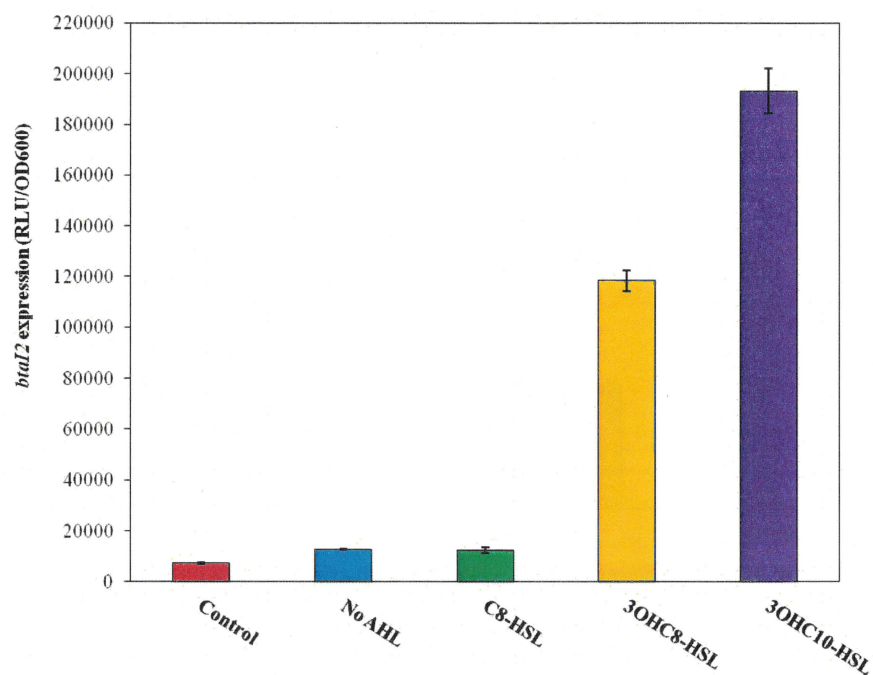


Figure 3.10. *btaI2* is directly activated by BtaR2 in response to 3OHC₈-HSL or 3OHC₁₀-HSL. The luciferase activity of the chromosomal *btaI2-lux* transcriptional fusion was monitored in the heterologous system, namely, *E. coli* DH5 α also containing a BtaR2 expression vector with an arabinose-inducible promoter. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₈-HSL, or 3OHC₁₀-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

Expression of *btaI3* was at least doubled in cultures of the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant when supplemented with any of the three AHLs (**Fig. 3.8C**), with 3OHC₈-HSL being the most efficient AHL. Interestingly, 3OHC₈-HSL had no impact in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant background with coaddition of C₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL, suggesting that these AHLs might compete for *btaI3* activation (**Fig. 3.11**).

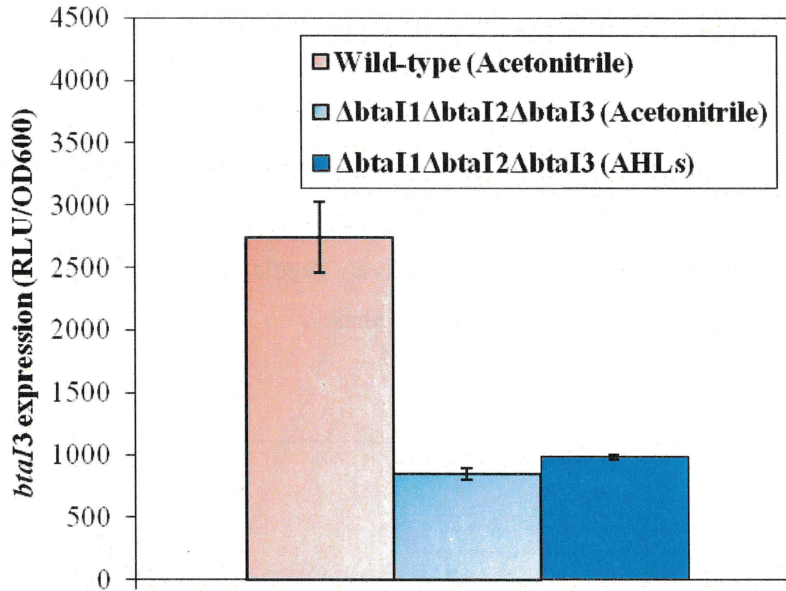


Figure 3.11. 3OHC₈-HSL activation of *btaI3* is dependent on C₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL. The luciferase activity of the chromosomal *btaI3-lux* transcriptional fusion was measured during stationary phase in cultures of the *B. thailandensis* wild-type E264 strain and the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant strain. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

Similarly to 3OHC₈-HSL, the expression of *btaI3* was not enhanced by 3OHC₁₀-HSL in the absence of BtaR3 (Fig. 3.12), showing that BtaR3 responds to both 3OHC₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL to stimulate *btaI3* transcription.

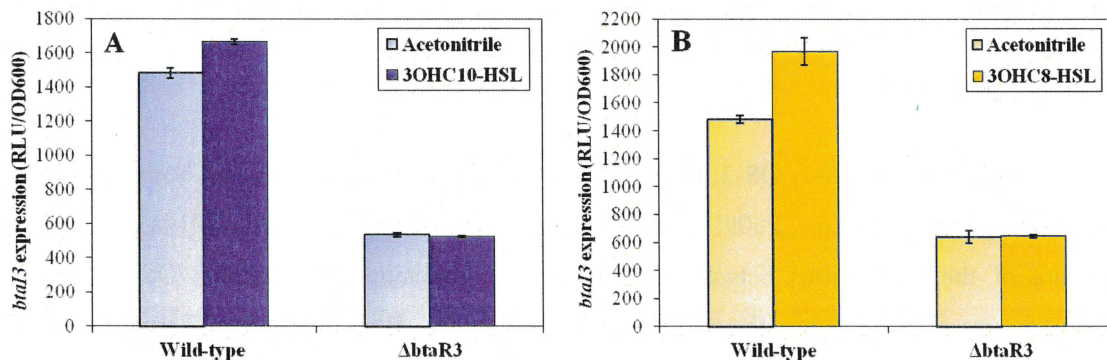


Figure 3.12. Impact of 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL on activation of *btaI3* by BtaR3. The luciferase activity of the chromosomal *btaI3-lux* transcriptional fusion was monitored during stationary phase in cultures of the *B. thailandensis* wild-type E264 strain and the $\Delta btaR3$ mutant strain. Cultures were supplemented with 10 μ M (A) 3OHC₁₀-HSL or (B) 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

Since all three AHLs seem able to activate expression of *btaI3*, we investigated whether their respective influence changes over the various growth phases. Strikingly, *btaI3* was mostly activated by C₈-HSL during the logarithmic growth phase, whereas activation of *btaI3* by 3OHC₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL was more prominent during the stationary phase (Fig. 3.13). Taken together, these results indicate that *btaI3* is activated by BtaR1/C₈-HSL in the exponential growth phase and is also positively regulated by BtaR3 in association with 3OHC₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL in the stationary phase.

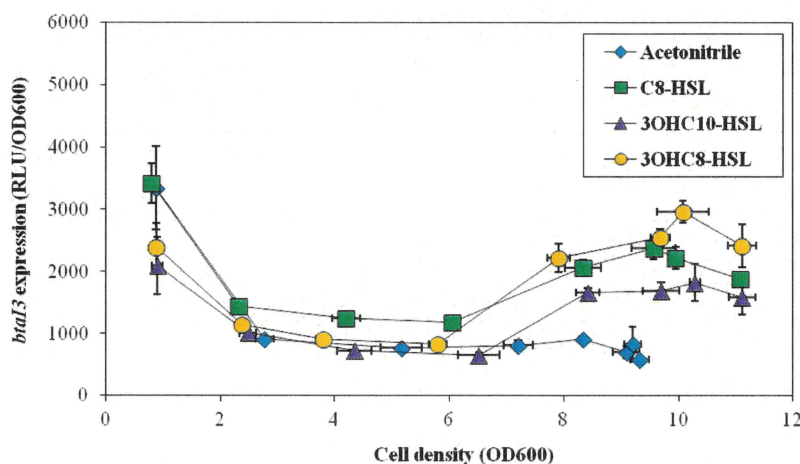


Figure 3.13. Activation of expression from the *btaI3* promoter by AHLs.

The luciferase activity of the chromosomal *btaI3-lux* transcriptional fusion was monitored at various times during growth in cultures of the *B. thailandensis* E264 $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant strain. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

3.1.6. Discussion

Although the QS-1, QS-2, and QS-3 systems of *B. thailandensis* had been previously described (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Majerczyk *et al.*, 2014a), a detailed picture of the interactions between the elements composing this complex QS regulatory network was missing. Since the real impact of the BtaR1, BtaR2, and BtaR3 transcriptional regulators on the biosynthesis of their cognate AHLs and expression of adjacent *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* genes, respectively, was assumed in the literature but almost never confirmed experimentally, we investigated production of AHLs in all $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutants and compared it with measurements of the levels of expression of *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* genes.

As previously described for *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011), we observed variations in the biosynthesis of the main AHLs as well as in the transcription of the AHL synthase-coding genes *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* throughout the growth phases in *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.1**). These observations highlighted the timing of expression of the QS-1, QS-2, and QS-3 systems during the different stages of growth and consequently the existence of potential interactions between these QS circuits. While C₈-HSL is generally considered the primary AHL produced by *Burkholderia* spp. (Eberl, 2006b, Venturi *et al.*, 2004) and is indeed predominately detected in stationary-phase cultures of *B. pseudomallei* K96243 and *B. mallei* ATCC 23344 (Duerkop *et al.*, 2008, Duerkop *et al.*, 2007, Gamage *et al.*, 2011, Majerczyk *et al.*, 2013b), we confirmed that 3OHC₁₀-HSL is actually the most abundant AHL found in *B. thailandensis* E264 cultures during the different stages of growth, revealing the importance of the QS-2 system in the QS circuitry of *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.14**).

higher affinity for this AHL than for 3OHC₈-HSL (**Fig. 3.8B**), which is also produced by the same synthase (Duerkop *et al.*, 2009). Similarly, the *bpsI2* gene that codes for the BpsI2 synthase was also shown to be substantially enhanced by 3OHC₁₀-HSL in *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011). The fact remains that the levels of expression of *btaI2* were similar in the wild-type E264 strain of *B. thailandensis* and in the non-3OHC₁₀-HSL-producing $\Delta btaI2$ mutant (**Fig. 3.4B**). Considering that 3OHC₈-HSL is still produced in the absence of BtaI2 (Duerkop *et al.*, 2009), we must conclude that both 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL can induce the transcription of *btaI2* (**Fig. 3.14**). Because we confirmed that BtaR2 does not function with C₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2009) (**Fig. 3.10**), an alternative LuxR-type transcriptional regulator is likely involved in its effect on *btaI2* expression, highlighting an interaction between the QS-1 and QS-2 systems.

Although both BtaR1 and BtaR3 affect 3OHC₁₀-HSL production (**Fig. 3.4A**), indicating that regulation of the biosynthesis of this AHL implies dynamic coordination between the *B. thailandensis* E264 QS-1, QS-2, and QS-3 circuits (**Fig. 3.14**), neither one has an effect on *btaI2* expression (**Fig. 3.4B**). Nevertheless, Majerczyk *et al.* (2014a) demonstrated that *btaR2* expression is stimulated by 3OHC₈-HSL, and we determined that the transcription of this gene is in fact affected by the absence of all AHLs found in *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.7B**). Thus, we hypothesize that BtaR1 and BtaR3 act indirectly through *btaR2* control. We also do not exclude that additional transcriptional and/or posttranscriptional regulators are involved in the modulation of the QS-2 system. Interestingly, this system contains an additional gene between *btaI2* and *btaR2* that is conserved in the *Burkholderia* genus (Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012). It encodes a hypothetical protein that is 37% identical to the *B. cenocepacia* J2315 BcRsaM (Michalska *et al.*, 2014), a homologue of the QS repressor RsaM originally identified in the plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* (Mattiuzzo *et al.*, 2011), which we consequently renamed RsaM2 (**Fig. 3.15**). Accordingly, we observed that C₈-HSL (cf. la **Figure 3.42B** présentée à la section 3.2.5.2), 3OHC₁₀-HSL (cf. la **Figure 3.43A** présentée à la section 3.2.5.2), and 3OHC₈-HSL (cf. la **Figure 3.44B** présentée à la section 3.2.5.2) concentrations were all increased in an *rsaM2*- mutant compared to the wild-type strain, indicating that RsaM2 likely intervenes in the regulation of all QS systems of *B. thailandensis* E264.

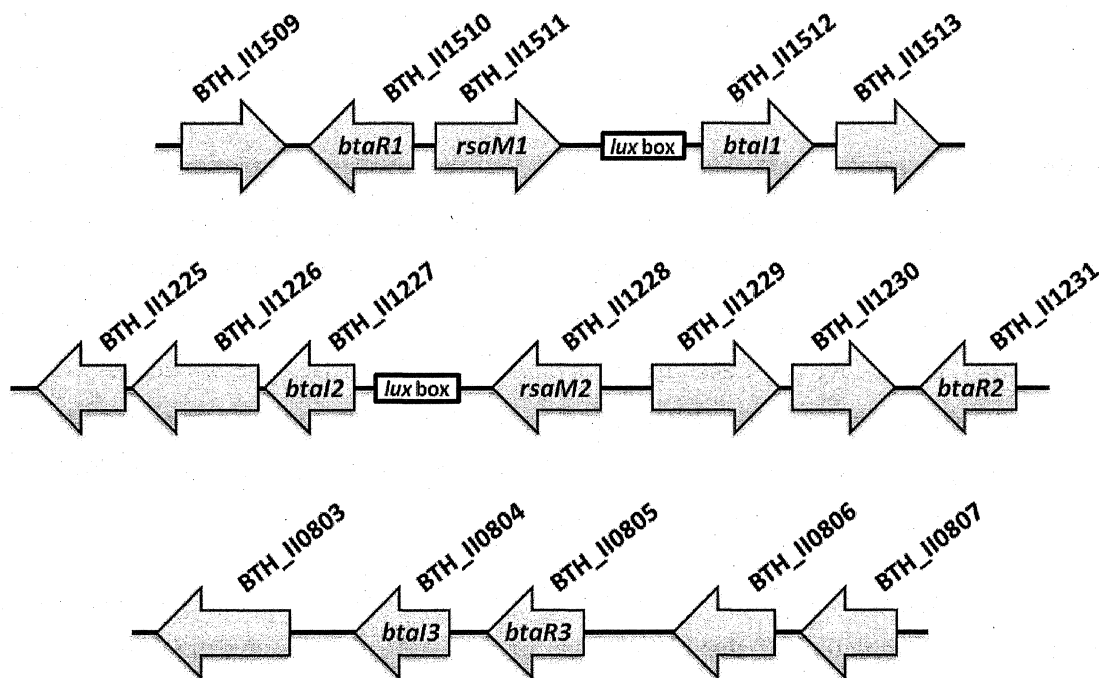


Figure 3.15. Genetic organization of the QS-1, QS-2, and QS-3 system genes in *B. thailandensis* E264. *btaI1* and *btaR1* are not located next to each other and are divergently transcribed in *B. thailandensis* E264. The promoter region of *btaI1* contains a putative *lux* box sequence centered 73.5 bp upstream of the *btaI1* translation start site (CCCTGTAAGGGTTAACAGTT). *btaI2* and *btaR2* are also not located next to each other and are transcribed in the same direction on the genome of *B. thailandensis* E264. The promoter region of *btaI2* contains a putative *lux* box sequence centered 65.0 bp upstream of the *btaI2* translation start site (ACCTGTAGAAATCGTAGT). *btaI3* and *btaR3* are also transcribed in the same direction and are located next to each other in *B. thailandensis* E264.

As described previously for the *B. pseudomallei* KHW BpsI and *B. mallei* ATCC 23344 BmaI synthases (Duerkop *et al.*, 2007, Gamage *et al.*, 2011, Song *et al.*, 2005), Chandler *et al.* (2009) demonstrated that BtaI1 is responsible for C₈-HSL production. In agreement with the finding that the *B. pseudomallei* K96243 BpsR and *B. mallei* ATCC 23344 BmaR1 transcriptional regulators directly activate the BpsI- and BmaI1-encoding genes in response to C₈-HSL, respectively (Duerkop *et al.*, 2007, Kiratisin *et al.*, 2008), Majerczyk *et al.* (2014a) reported that *btaI1* transcription is positively modulated by BtaR1. We observed a strong BtaR1-dependent induction of *btaI1* through C₈-HSL (Fig. 3.3), and confirmed that the QS-1 system responds best toward its cognate AHL (Fig. 3.8A). While we demonstrated that BtaR1 constitutes the main regulator of *btaI1* expression, we assume that BtaR1 represents the main regulator of C₈-HSL biosynthesis as well. An uncoupling of AHL production and expression of the corresponding synthase was also reported in a *Burkholderia* RsaM-deficient strain (Inhülsen, 2011, Michalska *et al.*, 2014). BcRsaM from *B. cenocepacia* H111 was indeed described as an important repressor of C₈-HSL biosynthesis and shown to

activate the transcription of *cepI* and *cepR* encoding the LuxI-type synthase CepI and the LuxR-type transcriptional regulator CepR, respectively (Inhülsen, 2011, Michalska *et al.*, 2014). Interestingly, a gene encoding a hypothetical protein sharing 63% identity with the *B. cenocepacia* J2315 BcRsaM, hence called RsaM1, was also found between *btaII* and *btaRI* (Fig. 3.15). Investigating the effect of RsaM1 on the biosynthesis of AHLs in *B. thailandensis* E264 showed that C₈-HSL is overproduced in an *rsaM1*- mutant compared to the wild-type strain (cf. la Figure 3.42A présentée à la section 3.2.5.2), revealing a possible link between the QS-1 system and RsaM1. Additional experiments will be necessary to fully understand the mechanisms involved in the regulation of the QS-1 system as well as the implications of the RsaM-like proteins in *B. thailandensis* E264.

We demonstrated that the biosynthesis of C₈-HSL and transcription of *btaII* are both negatively controlled by BtaR2 (Fig. 3.2). Because no overexpression of the *btaII* gene was observed in the $\Delta btaI2$ mutant background, we assume that BtaR2 represses the QS-1 system in the absence of its ligands. This contrasts with the BtaR3-dependent regulation of *btaII* transcription in conjunction with 3OHC₈-HSL, as well as with 3OHC₁₀-HSL, albeit to a lesser extent (Fig. 3.14). This is also further supported by the fact that BpsR3 was reported to directly activate *bpsI* in response to both 3OHC₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL, with 3OHC₈-HSL eliciting the strongest response from BpsR3 (Gamage *et al.*, 2011). Considering that *bmaII* was also shown to be directly controlled by BmaR3/3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2008), we suppose that BtaR3 directly activates expression of the *btaII* gene as well. However, we believe the effect of BtaR3 on the QS-1 system is more complex. While the *bpsR* gene encoding BpsR was reported to be positively autoregulated (Song *et al.*, 2005), we determined that *btaRI* expression is repressed by QS (Fig. 3.7A). Thus, negative regulation of C₈-HSL biosynthesis by BtaR3 could be linked to *btaRI* modulation. Altogether, these observations further highlight the existence of interactions between the QS-1, QS-2, and QS-3 circuits and reveal that the timing of expression of the QS-1 system is dependent on both the QS-2 and QS-3 systems (Fig. 3.14). This might contribute to the successive activation of the *B. thailandensis* E264 QS circuits observed throughout bacterial growth.

Similarly to the *B. pseudomallei* KWH BpsI3 and *B. mallei* ATCC 23344 BmaI3 synthases, BtaI3 was shown to produce 3OHC₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2008, Gamage *et al.*, 2011). While the *B. pseudomallei* KHW BpsR3 and *B. mallei* ATCC 23344 BmaR3 transcriptional regulators specifically respond to 3OHC₈-HSL, the *bpsI3* and the *bmaI3* genes were not reported to be activated by BpsR3 and BmaR3, respectively, in

conjunction with 3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2008, Gamage *et al.*, 2011). Here, in *B. thailandensis* E264, we demonstrated that the transcription of *btaI3* is positively controlled by BtaR3 and activated by 3OHC₈-HSL (Fig. 3.6). However, 3OHC₈-HSL-dependent activation of *btaI3* seems to be conditioned by the presence of other AHLs (Fig. 3.11). The interaction between BtaR3 and 3OHC₈-HSL, necessary to active *btaI3* expression, could be impeded by a competitive inhibition exerted by another AHL, as already proposed in *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011). In addition, we observed that *btaI3* expression is activated by 3OHC₁₀-HSL, albeit to a lesser extent (Fig. 3.8C). Indeed, the BtaR3-controlled genes identified in transcriptomic analyses were also generally affected by both 3OHC₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL (Majerczyk *et al.*, 2014a). This further supports the view that BtaR3 functions with these two AHLs (Fig. 3.14). Considering that BpsI3 and BmaI3 were both shown to produce 3OHC₁₀-HSL in addition to 3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2008, Gamage *et al.*, 2011), it is possible that BtaI3 intervenes in the biosynthesis of 3OHC₁₀-HSL in *B. thailandensis* E264 as well.

Remarkably, positive 3OHC₈-HSL- and 3OHC₁₀-HSL-dependent regulation of *btaI3* occurred in the stationary growth phase (Fig. 3.13), in agreement with the expression profile of this gene. Conversely, activation of *btaI2* transcription by these AHLs was mainly observed during logarithmic growth. We thus hypothesize that the QS-3 system regulates the QS-2 system targets by producing 3OHC₈-HSL in stationary phase, whereas production of this AHL by the QS-2 system occurs essentially during the exponential phase, implying a coordination between the QS-2 and QS-3 systems (Fig. 3.14). Additionally, it seems that 3OHC₈-HSL is produced by BtaI2 at the expense of 3OHC₁₀-HSL. This would explain why there is an overlap between these QS circuits when it comes to genes modulated by 3OHC₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL (Majerczyk *et al.*, 2014a). Importantly, while sharing common AHLs, the QS-2 and QS-3 systems are apparently not transcriptionally linked.

The BtaR1/C₈-HSL-dependent control of *btaI3* transcription, which starts in the exponential growth phase, is consistent with the idea that the QS-1 system is required for the expression of *btaI3* (Majerczyk *et al.*, 2014a), and might also account for the belated activation of the QS-3 circuit in comparison with the QS-1 and QS-2 systems. This again illustrates the successive expression of these QS circuits, and points toward an interdependence between the QS-1 and QS-3 systems (Fig. 3.14). Such an interconnection has already been observed among the members of the *Bptm* group as *bpsI3* transcription was reported to be stimulated by the BpsI/BpsR QS system (Gamage *et al.*, 2011). Nevertheless, the precise regulatory mechanism directing the QS-3 system through BtaR1 is currently

unknown. While BtaR1 seems to act by activating *btaI3* transcription, we propose that the negative impact of BtaR1 on 3OHC₈-HSL biosynthesis does not result from a direct interaction with the *btaI3* promoter but rather could imply the effect of BtaR1 on the level of *btaR3* as previously suggested (Majerczyk *et al.*, 2014a). Additional transcriptional and/or posttranscriptional regulators might be involved in the BtaR1-dependent modulation of the QS-3 system as well. Indeed, we observed that 3OHC₈-HSL is also overproduced in an *rsaM1*- mutant compared to the wild-type strain (cf. la **Figure 3.44A** présentée à la section 3.2.5.2), revealing a possible link between the QS-3 system and RsaM1.

3.1.7. Conclusion

The study described here provides for the first time an exhaustive portrait of the interplay between the QS-1, QS-2, and QS-3 systems in *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.14**). We observed an interdependence between the QS-1 and QS-2 systems. While we confirmed that the QS-3 system is controlled by BtaR1, we also found that BtaR3 modulates the QS-1 system, which indicates that those two systems are interconnected. Interestingly, such an interaction between the QS-1 and QS-3 systems seems to be conserved in the closely related species of the *Bptm* group (Duerkop *et al.*, 2008, Gamage *et al.*, 2011, Majerczyk *et al.*, 2014a). Interestingly, the QS-2 and QS-3 systems that share common AHLs seem not to be transcriptionally linked, but instead they are temporally connected by their common AHLs. We also highlighted a surprising uncoupling of AHL production and expression of the corresponding synthase inside the QS-1 system, which hints that QS regulation does not always follow a classic pattern. Collectively, the results of our study suggest that there are homeostatic regulatory loops provided by the various QS systems in *B. thailandensis* resulting from transcriptional and posttranscriptional interactions, allowing tightly controlled coordination of the expression of genes.

Although we have found new connections and insights on the QS cascade, there are still many questions to be answered. Indeed, further work is needed to comprehend more about the mechanisms behind those links and regulations as well as the implications of recently characterized RsaM-like proteins. The temporal pattern of QS-controlled genes clearly shows that additional factors are involved (Gamage *et al.*, 2011, Majerczyk *et al.*, 2014a, Majerczyk *et al.*, 2014b, Majerczyk *et al.*, 2013b, Schuster *et al.*, 2003).

3.1.8. Funding information

This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grants MOP-97888 and MOP-142466 to Éric Déziel. Éric Déziel holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

3.1.9. Acknowledgments

We thank Everett Peter Greenberg (Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA) for providing the *B. thailandensis* E264 strains. We especially thank Sylvain Milot for his technical help.

3.1.10. Présentation des résultats additionnels de l'article « The complex quorum sensing circuitry of *Burkholderia thailandensis* is both hierarchically and homeostatically organized »

Des expériences additionnelles ont été réalisées dans le cadre de l'étude de la régulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 de *B. thailandensis* E264 et sont présentées ici.

3.1.10.1. Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 n'affectent pas la croissance bactérienne

L'analyse comparative des courbes de croissance de la souche sauvage et des mutants $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$, $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$, $\Delta btaI3$, $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264 indique que l'inactivation des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3*, n'a pas d'effet sur la croissance bactérienne (Fig. 3.16A) de même que l'absence des régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3 (Fig. 3.16B). Ainsi, les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 n'affectent pas la croissance bactérienne dans les conditions de culture testées pour la réalisation de toutes les expériences décrites dans l'article « The complex quorum sensing circuitry of *Burkholderia thailandensis* is both hierarchically and homeostatically organized ».

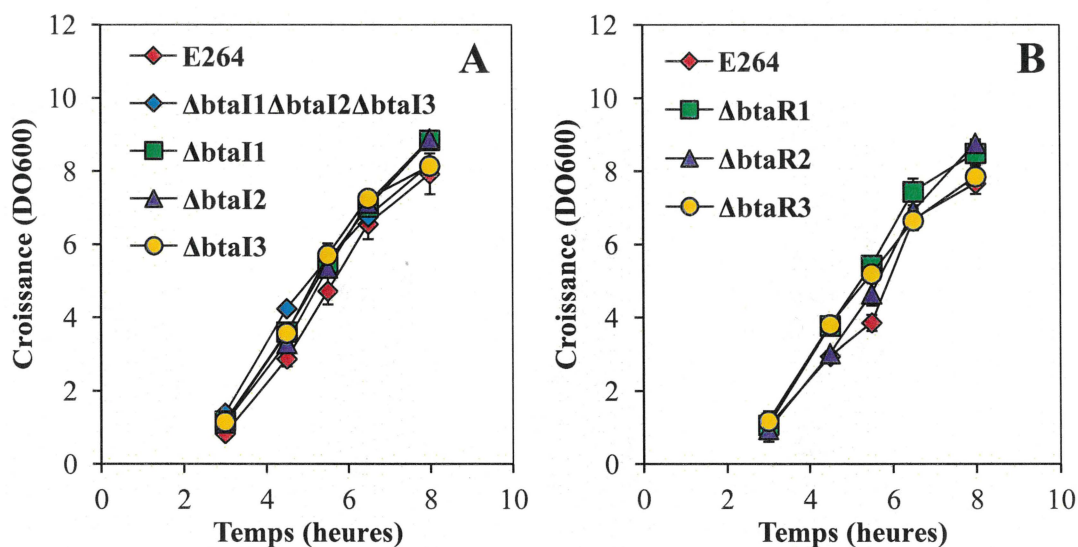


Figure 3.16. Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 n'ont aucun impact sur la croissance bactérienne.

Les densités cellulaires ont été suivies par mesure de la turbidité dans des cultures de (A) la souche sauvage et des mutants $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$, $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$ et $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 et de (B) la souche sauvage et des mutants $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264. Les densités cellulaires sont exprimées en unités d'absorption à 600 nm (DO_{600}). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.2. Détermination de l'impact des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 sur la transcription du gène de référence *ndh*

D'après l'analyse transcriptomique de Majerczyk *et al.* (2014a), la transcription du gène de référence *ndh*, codant une NADH déshydrogénase, n'est pas sous le contrôle des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* E264. Des expériences de quantification de la transcription du gène *ndh* ont été réalisées par qRT-PCR dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en C_8 -HSL, $3OHC_{10}$ -HSL et $3OHC_8$ -HSL. Ces expériences montrent que la transcription du gène de référence *ndh* ne présente aucune variation dans les différentes conditions de culture testées (Fig. 3.17).

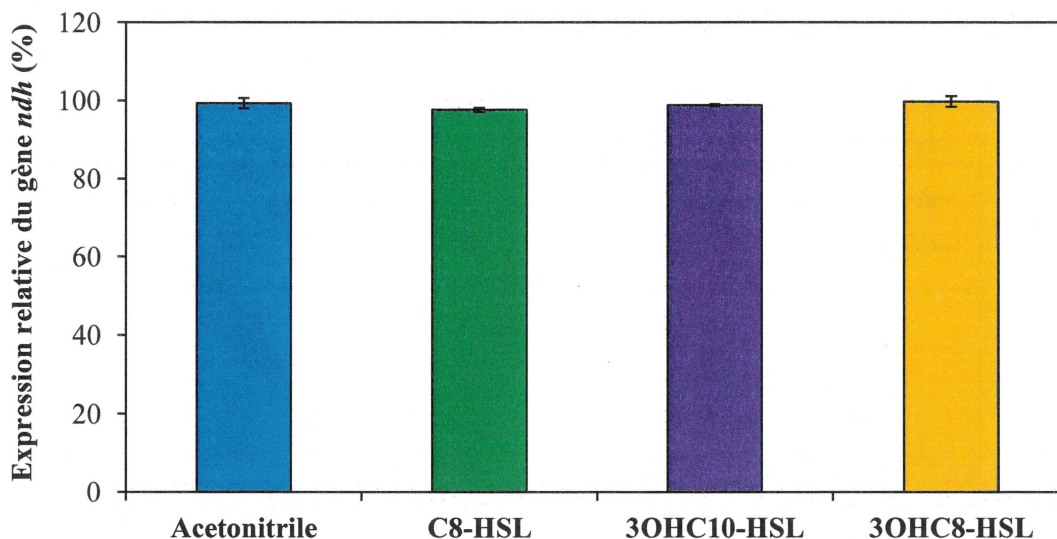


Figure 3.17. L'expression du gène de référence *ndh* est stable dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en AHL. L'expression relative du gène de référence *ndh* a été mesurée par qRT-PCR dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. Les AHL ont été diluées préalablement dans de l'acétonitrile et ont été ajoutées à une concentration de 10 μ M. L'expression du gène *ndh* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Par ailleurs, des expériences de quantification de la transcription du gène de référence *ndh* effectuées par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264 corroborent les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014a) selon lesquelles les régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3 n'affectent pas la transcription du gène *ndh* (Fig. 3.18). Nous avons donc confirmé que les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 ne contrôlent pas la transcription du gène de référence *ndh* chez *B. thailandensis* E264. Pour cette raison, nous l'avons retenu pour la normalisation des données de qRT-PCR.

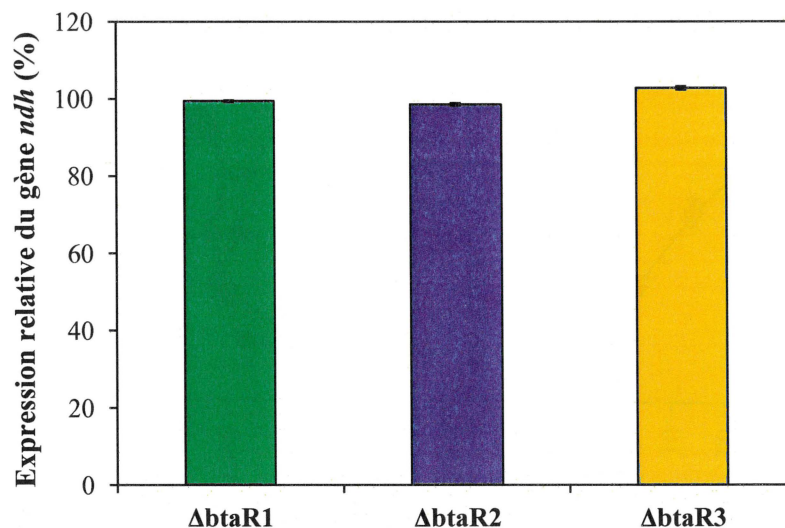


Figure 3.18. L'expression du gène de référence *ndh* est stable chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264.

L'expression relative du gène de référence *ndh* a été mesurée par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. L'expression du gène *ndh* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.3. Les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 sont exclusivement responsables de la biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL

Afin de confirmer que la production des principales AHL retrouvées chez *B. thailandensis* E264 implique uniquement les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3, des expériences de quantification de la biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL ont été réalisées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne. Par ailleurs, les profils d'expression des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* ont été déterminés dans les mêmes contextes génétiques via l'utilisation des rapporteurs transcriptionnels *btaI1-lux*, *btaI2-lux* et *btaI3-lux*, respectivement. Il apparaît que l'absence de BtaI1, de BtaI2 et de BtaI3 entraîne une abolition de la biosynthèse de la C₈-HSL (Fig. 3.19A), de la 3OHC₁₀-HSL (Fig. 3.19B) et de la 3OHC₈-HSL (Fig. 3.19C) ainsi qu'une réduction drastique de la transcription des gènes *btaI1* (Fig. 3.19D), *btaI2* (Fig. 3.19E) et *btaI3* (Fig. 3.19F). Par conséquent, nous en concluons que la synthèse des principales AHL retrouvées chez *B. thailandensis* E264 est catalysée exclusivement par les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3.

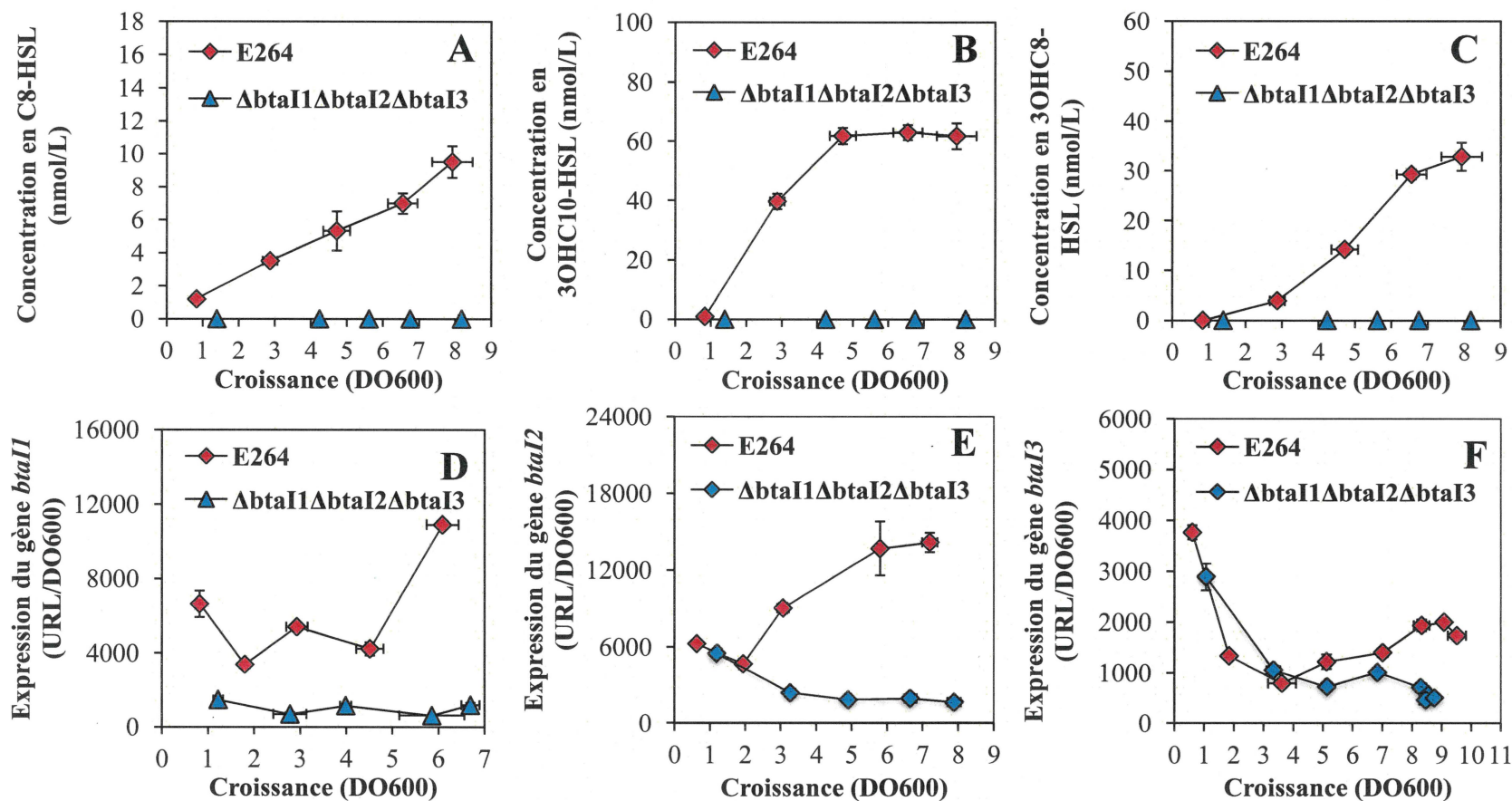


Figure 3.19. Les synthèses BtaI1, BtaI2 et BtaI3 sont exclusivement responsables de la biosynthèse des AHL.

Les concentrations en (A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL et (C) 3OHC₈-HSL ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264. Les activités luciféras des rapporteurs transcriptionnels (D) *btaI1-lux*, (E) *btaI2-lux* et (F) *btaI3-lux* sont exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.4. Confirmation de l'effet des régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3 sur la production de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL

3.1.10.4.1. Complémentation de la biosynthèse des AHL via l'utilisation des vecteurs d'expression constitutive des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3*

Les régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3 influencent la production des AHL au cours de la croissance bactérienne (cf. la **Figure 3.14** présentée à la section 3.1.6). Afin de confirmer l'impact de l'inactivation des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* sur la biosynthèse des principales AHL retrouvées chez *B. thailandensis* E264, nous avons effectué des études de complémentation de la production de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL via l'utilisation des vecteurs d'expression constitutive des gènes *btaR1* (pME6000-*btaR1*), *btaR2* (pME6000-*btaR2*) et *btaR3* (pME6000-*btaR3*) (**Tableau 3.5**).

Tableau 3.5. Souches utilisées pour les études de complémentation de la production des AHL.

Souches	Description	Référence
ED1020	E264 (pME6000)	Cette étude
ED3476	E264 Δ <i>btaR1</i> (pME6000)	Cette étude
ED1014	E264 Δ <i>btaR1</i> (pME6000- <i>btaR1</i>)	Cette étude
ED3478	E264 Δ <i>btaR2</i> (pME6000)	Cette étude
ED1015	E264 Δ <i>btaR2</i> (pME6000- <i>btaR2</i>)	Cette étude
ED3480	E264 Δ <i>btaR3</i> (pME6000)	Cette étude
ED1016	E264 Δ <i>btaR3</i> (pME6000- <i>btaR3</i>)	Cette étude

Nous avons construit les plasmides pME6000-*btaR1*, pME6000-*btaR2* et pME6000-*btaR3* via des réactions de PCR effectuées sur l'ADN génomique de *B. thailandensis* E264 (**Tableau 3.6**).

Tableau 3.6. Plasmides utilisés pour les études de complémentation de la production des AHL.

Plasmides	Description	Source
pME6000	Broad-host-range cloning vector; Tc ^R	(Maurhofer <i>et al.</i> , 1998)
pMCG20	<i>btaR1</i> inserted in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III restriction sites in pME6000; Tc ^R	Cette étude
pMCG21	<i>btaR2</i> inserted in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III restriction sites in pME6000; Tc ^R	Cette étude
pMCG22	<i>btaR3</i> inserted in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III restriction sites in pME6000; Tc ^R	Cette étude

Les amorces utilisées pour la construction des plasmides pME6000-*btaR1*, pME6000-*btaR2* et pME6000-*btaR3* ont été conçues grâce à l'outil bioinformatique « Primer3 » (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Tableau 3.7). De plus, les amorces sens (*i.e.* *btaR1F*, *btaR2F* et *btaR3F*) et antisens (*i.e.* *btaR1R*, *btaR2R* et *btaR3R*) contiennent les sites de restriction *Bam*HI et *Hind*III, respectivement, qui assurent l'insertion des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* dans le site multiple de clonage du plasmide pME6000 (Maurhofer *et al.*, 1998). Les souches bactériennes de *B. thailandensis* E264, rendues préalablement électro-compétentes, ont été ensuite électroporées par les constructions plasmidiques pME6000-*btaR1*, pME6000-*btaR2* et pME6000-*btaR3*.

Tableau 3.7. Amorces utilisées pour les études de complémentation de la production des AHL.

Gènes	Oligonucléotides	Séquences (5' vers 3')*	T _m (°C)	%GC
<i>btaR1</i>	<i>btaR1F</i>	GCGGGATCCGACGATACGTGAACGAGCTG	59,47	55,00
	<i>btaR1R</i>	CGCAAGCTTGGATGAGCATGGAGAAAAGC	59,78	50,00
<i>btaR2</i>	<i>btaR2F</i>	GCGGGATCCATGCGAGGATATGGAGATGC	60,03	50,00
	<i>btaR2R</i>	CGCAAGCTTTCGAGATATCCCGCCTATTG	60,02	50,00
<i>btaR3</i>	<i>btaR3F</i>	CGCGGATCCCCGCTCTTGCAATCGTTATT	60,23	45,00
	<i>btaR3R</i>	CGCAAGCTTATGAGACGGAAGGCGTTAAA	59,71	45,00

*Les nucléotides en gras représentent les sites de coupure spécifiques des enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III. Les nucléotides en amont de ces sites de restriction ont été rajoutés dans le but d'optimiser l'efficacité de la digestion enzymatique des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3*.

3.1.10.4.1.1. Analyse de l'impact du régulateur transcriptionnel *BtaR1* sur les concentrations en AHL lors de l'utilisation du plasmide pME6000-*btaR1*

L'inactivation du gène *btaR1* entraîne une forte surproduction de la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL à partir de la phase exponentielle précoce (DO₆₀₀ ≈ 3,0) (cf. la **Figure 3.4A**

présentée à la section 3.1.5.2), de même qu'une faible surproduction de la C₈-HSL (cf. la **Figure 3.2A** présentée à la section 3.1.5.2) et de la 3OHC₈-HSL (cf. la **Figure 3.5A** présentée à la section 3.1.5.2) à partir de la phase exponentielle tardive (DO₆₀₀ ≈ 5,0). Il apparaît que les concentrations en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL sont semblables chez les mutants $\Delta btaR1$ (pME6000) et $\Delta btaR1$ (pME6000-*btaR1*) de *B. thailandensis* E264 au cours des phases exponentielle (DO₆₀₀ ≈ 4,0) (**Fig. 3.20A**) et stationnaire (DO₆₀₀ ≈ 8,0) de la croissance bactérienne (**Fig. 3.20B**). Toutefois, nous aurions dû vérifier la fonctionnalité de la construction plasmidique pME6000-*btaR1* en comparant, par exemple, le niveau d'expression du gène *btaII* chez les mutants $\Delta btaR1$ (pME6000) et $\Delta btaR1$ (pME6000-*btaR1*) de *B. thailandensis* E264. Pour cette raison, les études de complémentation de la biosynthèse des AHL via l'utilisation du vecteur d'expression constitutive du gène *btaR1* ne permettent pas de confirmer l'effet du régulateur transcriptionnel BtaR1 sur la production de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL.

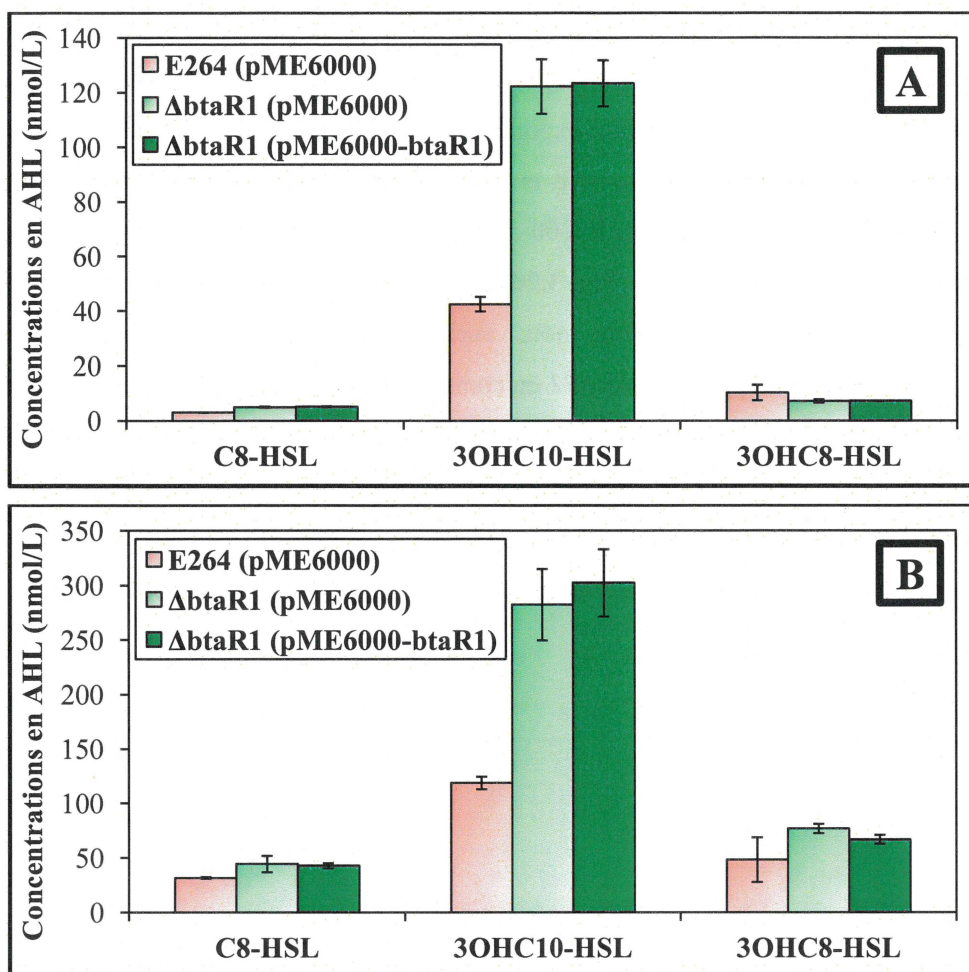


Figure 3.20. Complémentation de la biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL via l'utilisation du vecteur d'expression constitutive du gène *btaR1*.

Les concentrations en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaR1$ de *B. thailandensis* E264 en présence et en absence du plasmide pME6000-*btaR1* au cours des phases (A) exponentielle et (B) stationnaire de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.4.1.2. Analyse de l'impact du régulateur transcriptionnel *BtaR2* sur les concentrations en AHL lors de l'utilisation du plasmide pME6000-*btaR2*

L'absence du régulateur transcriptionnel *BtaR2* résulte en une abolition de la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL au cours des différentes phases de la croissance bactérienne (cf. la **Figure 3.4A** présentée à la section 3.1.5.2). De plus, l'inactivation du gène *btaR2* entraîne une forte surproduction de la C₈-HSL au début de la phase exponentielle (cf. la **Figure 3.2A** présentée à la section 3.1.5.2) ainsi qu'une faible surproduction de la 3OHC₈-HSL à la fin de la phase exponentielle (cf. la **Figure 3.5A** présentée à la section 3.1.5.2). Les

études de complémentation de la biosynthèse des AHL montrent que le vecteur d'expression constitutive du gène *btaR2* permet de restaurer les concentrations en C₈-HSL et 3OHC₁₀-HSL à des niveaux comparables à ceux de la souche sauvage (**Fig. 3.21**). Ces observations témoignent de la fonctionnalité de la construction plasmidique pME6000-*btaR2*. Elles attestent, par ailleurs, que BtaR2 contrôle négativement et positivement la biosynthèse de la C₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL, respectivement. En revanche, les concentrations en 3OHC₈-HSL sont semblables chez les mutants $\Delta btaR2$ (pME6000) et $\Delta btaR2$ (pME6000-*btaR2*) de *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.21**). D'autres expériences seront, de ce fait, nécessaires afin de confirmer l'impact de BtaR2 sur la biosynthèse de la 3OHC₈-HSL.

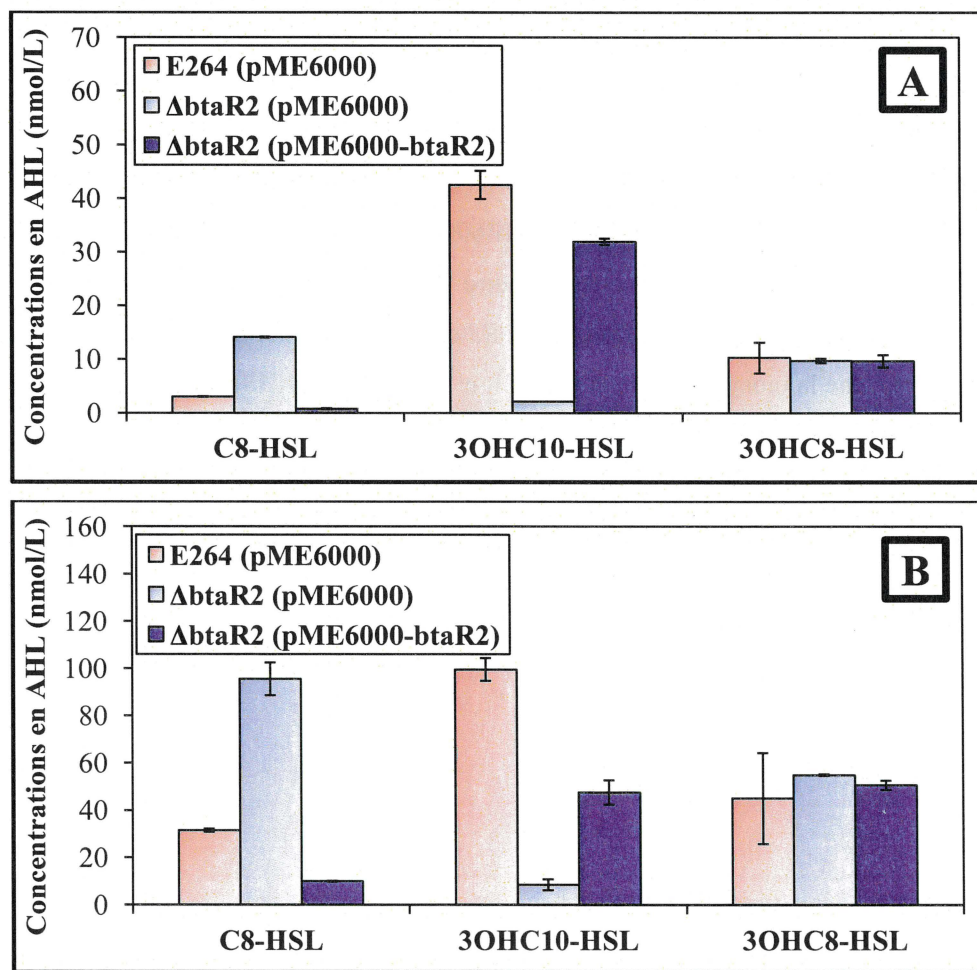


Figure 3.21. Complémentation de la biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL via l'utilisation du vecteur d'expression constitutive du gène *btaR2*.

Les concentrations en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaR2$ de *B. thailandensis* E264 en présence et en absence du plasmide pME6000-*btaR2* au cours des phases (A) exponentielle et (B) stationnaire de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.4.1.3. Analyse de l'impact du régulateur transcriptionnel *BtaR3* sur les concentrations en AHL lors de l'utilisation du plasmide pME6000-*btaR3*

L'inactivation du gène *btaR3* entraîne une forte surproduction de la 3OHC₁₀-HSL à partir de la phase exponentielle (cf. la **Figure 3.4A** présentée à la section 3.1.5.2), de même qu'une faible surproduction de la C₈-HSL à partir de la phase stationnaire (cf. la **Figure 3.2A** présentée à la section 3.1.5.2). En revanche, la biosynthèse de la 3OHC₈-HSL n'est vraisemblablement ni activée ni inhibée par le régulateur transcriptionnel BtaR3 au cours des différentes phases de la croissance bactérienne (cf. la **Figure 3.5A** présentée à la section 3.1.5.2). Les études de complémentation de la production des AHL montrent que l'expression constitutive du gène *btaR3* est caractérisée par une diminution des concentrations en C₈-HSL et 3OHC₁₀-HSL ainsi qu'une augmentation des concentrations en 3OHC₈-HSL pendant la phase exponentielle (**Fig. 3.22A**). Similairement, le vecteur d'expression constitutive du gène *btaR3* permet de restaurer les concentrations en C₈-HSL et 3OHC₁₀-HSL à des niveaux comparables à ceux de la souche sauvage, tandis que les concentrations en 3OHC₈-HSL sont semblables chez les mutants $\Delta btaR3$ (pME6000) et $\Delta btaR3$ (pME6000-*btaR3*) de *B. thailandensis* E264 pendant la phase stationnaire (**Fig. 3.22B**). Ces observations démontrent que la construction plasmidique pME6000-*btaR3* est fonctionnelle. En outre, elles confirment que BtaR3 réprime la biosynthèse de la C₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL et suggèrent que BtaR3 stimule la biosynthèse de la 3OHC₈-HSL.

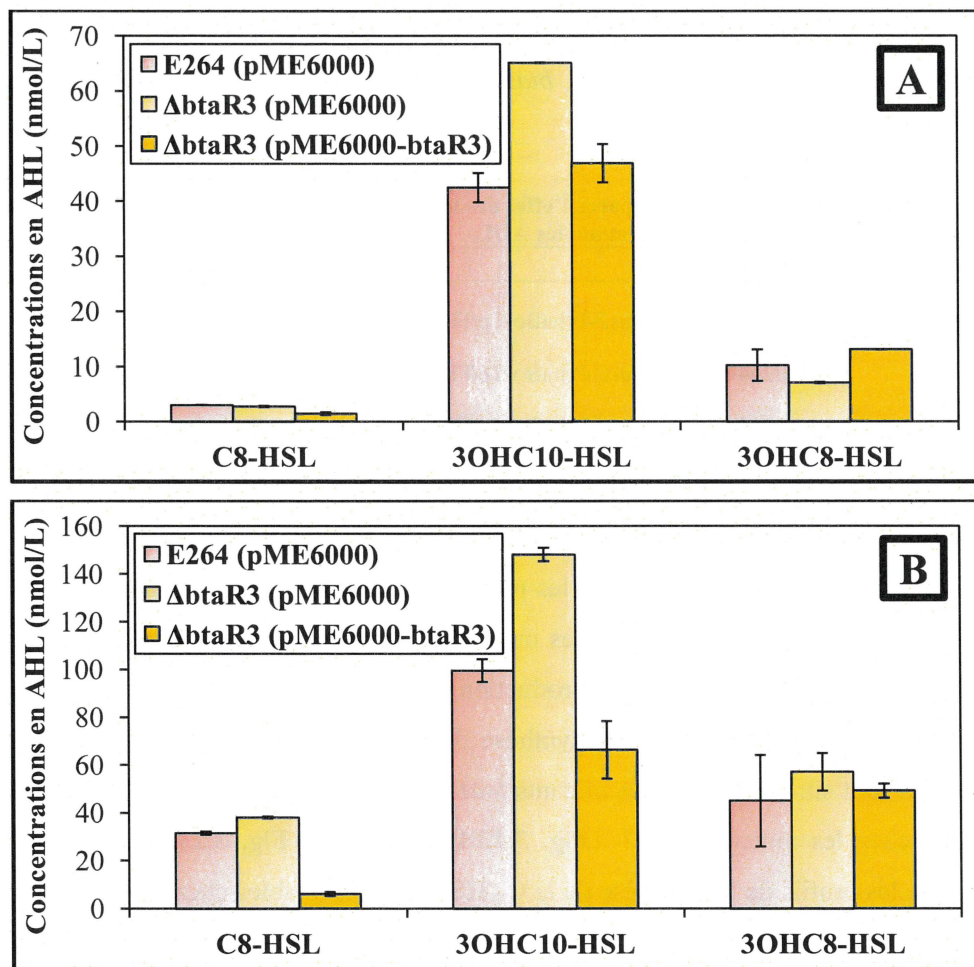


Figure 3.22. Complémentation de la biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL via l'utilisation du vecteur d'expression constitutive du gène *btaR3*.

Les concentrations en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264 en présence et en absence du plasmide pME6000-*btaR3* au cours des phases (A) exponentielle et (B) stationnaire de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.4.2. Comparaison de la biosynthèse des AHL chez les mutants transpositionnels *btaR1*-, *btaR2*- et *btaR3*- et chez les mutants délétionnels $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$

Afin de confirmer que les gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* s'auto-régulent (cf. la **Figure 3.7** présentée à la section 3.1.5.3), nous envisageons d'effectuer des expériences de qRT-PCR. Toutefois, chez les mutants $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ que nous avons utilisés pour la réalisation de toutes les expériences décrites dans l'article « The complex quorum sensing circuitry of *Burkholderia thailandensis* is both hierarchically and homeostatically organized », les gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* ont été délétés, respectivement. Ces expériences pourraient

être, en revanche, effectuées chez les mutants *btaR1*-, *btaR2*- et *btaR3*- qui contiennent des transposons insérés dans les gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3*, respectivement (**Tableau 3.8**).

Tableau 3.8. Souches utilisées pour comparer l'effet des mutations transpositionnelles et délétionnelles des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* sur la production des AHL.

Souches	Description	Référence
BT09577	E264 <i>btaR1</i> ::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT; Tp ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
BT07725	E264 <i>btaR2</i> ::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT; Tp ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
BT04155	E264 <i>btaR3</i> ::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT; Tp ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)

Néanmoins, il est important de vérifier que les mutants transpositionnels *btaR1*-, *btaR2*- et *btaR3*- se comportent comme les mutants délétionnels $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$. Pour cela, nous avons comparé l'effet des mutations transpositionnelles et délétionnelles des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* sur la production des principales AHL retrouvées chez *B. thailandensis* E264. Les profils de biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL sont similaires chez les mutants *btaR1*- (**Fig. 3.23A**) et $\Delta btaR1$ (**Fig. 3.23D**), de même que chez les mutants *btaR2*- (**Fig. 3.23B**) et $\Delta btaR2$ (**Fig. 3.23E**). Il apparaît, par ailleurs, que les profils de biosynthèse de la C₈-HSL sont semblables chez les mutants *btaR3*- (**Fig. 3.23C**) et $\Delta btaR3$ (**Fig. 3.23F**). En revanche, les profils de biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL sont différents chez les mutants *btaR3*- (**Fig. 3.23C**) et $\Delta btaR3$ (**Fig. 3.23F**). Alors que la mutation transpositionnelle du gène *btaR3* n'influence pas la production de la 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 3.23C**), la mutation délétionnelle entraîne une surproduction de cette AHL (**Fig. 3.23F**). De plus, la mutation transpositionnelle du gène *btaR3* résulte en une réduction drastique de la production de la 3OHC₈-HSL (**Fig. 3.23C**), tandis que la mutation délétionnelle n'a pas d'impact sur la production de cette AHL (**Fig. 3.23F**).

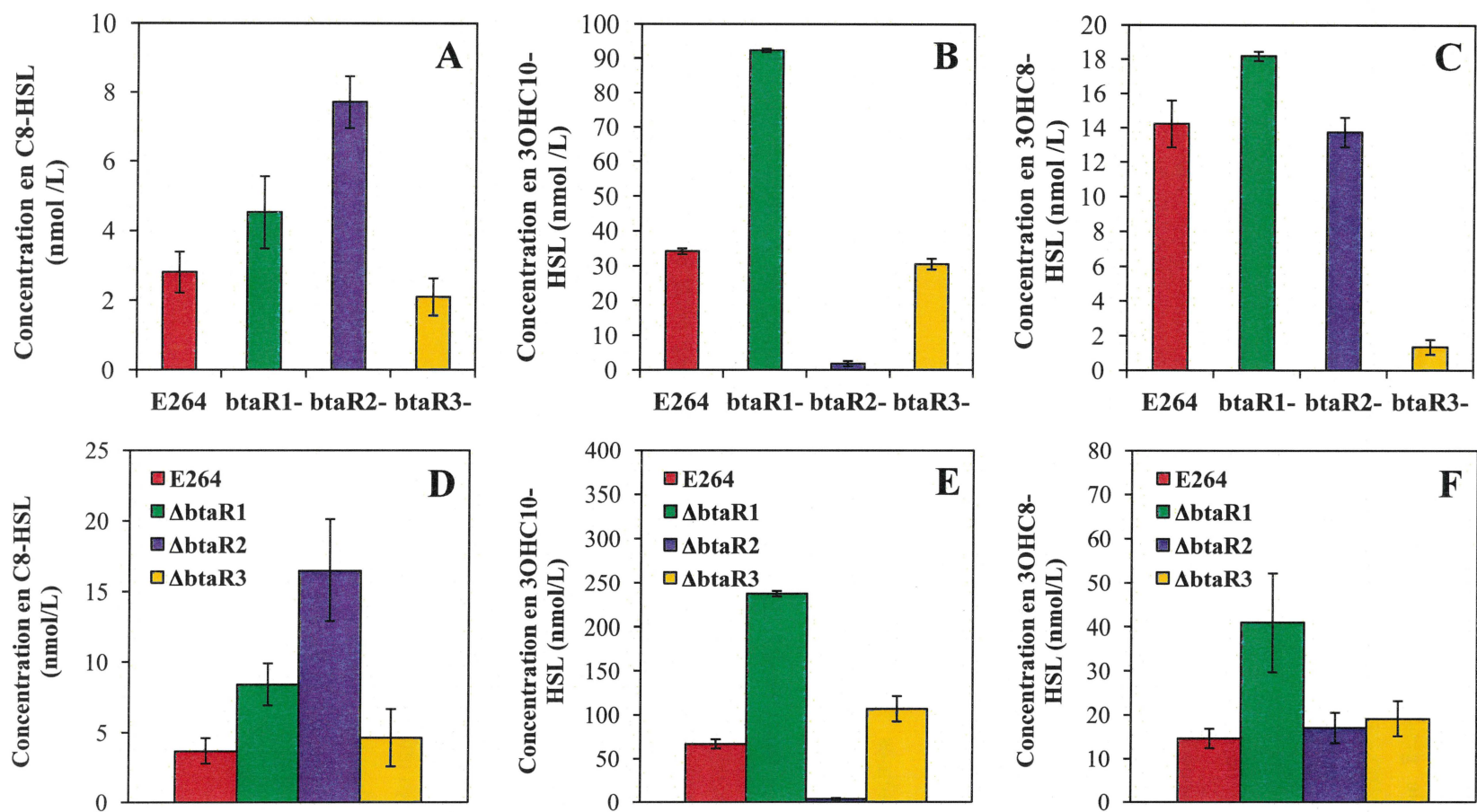


Figure 3.23. Impact des mutations transpositionnelles et délétionnelles des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* sur la production des AHL.

Les concentrations en (A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL et (C) 3OHC₈-HSL chez la souche sauvage et chez les mutants *btaR1*-, *btaR2*- et *btaR3*- de *B. thailandensis* E264 et les concentrations en (D) C₈-HSL, (E) 3OHC₁₀-HSL et (F) 3OHC₈-HSL chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264 ont été mesurées par LC-MS/MS au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Compte tenu de l'organisation structurale des gènes *btaR3* et *btaI3* (cf. la **Figure 3.15** présentée à la section 3.1.6), il est possible que la mutation transpositionnelle affecte autant le gène *btaR3* que le gène *btaI3*. Il apparaît, en l'occurrence, que la 3OHC₈-HSL, et possiblement la 3OHC₁₀-HSL, sont notamment produites *via* la synthase BtaI3, ce qui n'est pas le cas de la C₈-HSL (cf. la **Figure 3.14** présentée à la section 3.1.6). Nous pourrions vérifier notre hypothèse selon laquelle la mutation transpositionnelle du gène *btaR3* a un effet polaire sur le gène *btaI3* en utilisant le plasmide pME6000-*btaR3* pour compléter le mutant *btaR3*-. Quoiqu'il en soit, nous ne pouvons utiliser le mutant *btaR3*- pour effectuer les expériences de quantification de la transcription du gène *btaR3*. Pour cette raison, nous proposons de construire des rapporteurs transcriptionnels *btaR1-lux*, *btaR2-lux* et *btaR3-lux* qui nous permettront de quantifier l'expression des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* chez les mutants $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$, respectivement.

3.1.10.5. Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 s'expriment de manière successive au cours de la croissance bactérienne

Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 de *B. thailandensis* E264 s'expriment successivement au cours de la croissance bactérienne (cf. la **Figure 3.1B** présentée à la section 3.1.5.1). En effet, l'expression du gène *btaI1* est induite à partir de la phase exponentielle et l'analyse du profil de transcription de ce gène montre une activation tardive au cours de la phase logarithmique (**Fig. 3.24**). L'analyse du profil de transcription du gène *btaI2*, dont l'expression est également induite à partir de la phase exponentielle, indique une activation précoce au cours de la phase logarithmique (**Fig. 3.24**). En revanche, l'expression du gène *btaI3* est induite à partir de la phase stationnaire (**Fig. 3.24**). Notre hypothèse est que les interactions qui existent entre les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 conditionnent l'expression successive des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* au cours de la croissance bactérienne (cf. la **Figure 3.14** présentée à la section 3.1.6).

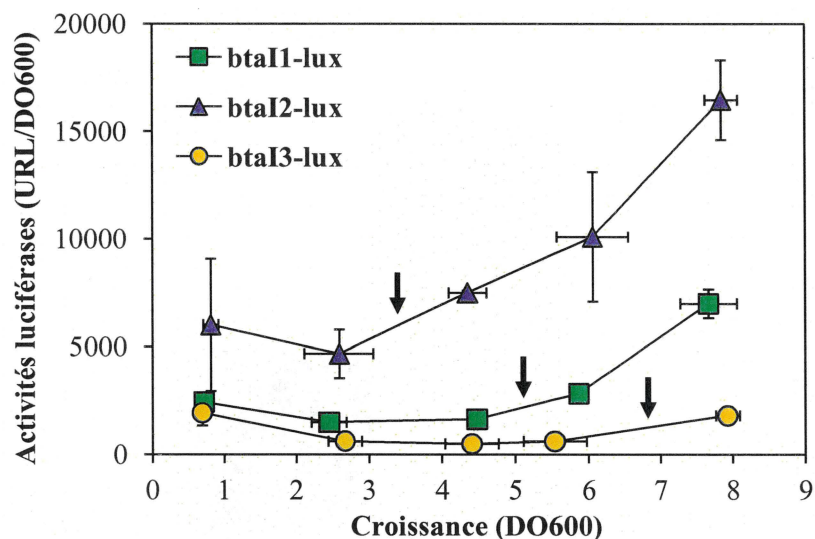


Figure 3.24. Les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 s'expriment de manière successive au cours de la croissance bactérienne.

Les activités luciférases des rapporteurs transcriptionnels *btaI1-lux*, *btaI2-lux* et *btaI3-lux*, exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀), ont été mesurées chez la souche sauvage de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Les flèches noires marquent l'induction de l'expression des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* au cours des différentes phases de la croissance bactérienne.

Notons, également, que lors du premier point de mesure, nous supposons que les bactéries, issues d'une culture de nuit avec lesquelles les milieux ont été inoculés, étaient encore en phase stationnaire ce qui pourrait expliquer les fortes activités luciférases détectées.

3.1.10.6. Approfondissement du mécanisme de régulation du système BtaI1/BtaR1

3.1.10.6.1. La transcription du gène *btaI1* est stimulée par le régulateur transcriptionnel BtaR1 à partir de la phase exponentielle et le régulateur transcriptionnel BtaR3 active l'expression du gène *btaI1* à partir de la phase stationnaire

Les régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3 activent l'expression du gène *btaI1* à partir des phases exponentielle et stationnaire de la croissance bactérienne, respectivement (cf. la **Figure 3.2B** présentée à la section 3.1.5.2). Des expériences de qRT-PCR confirment effectivement que la transcription du gène *btaI1* est stimulée par le régulateur transcriptionnel BtaR1 au cours de la phase exponentielle conformément aux données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014a) (**Fig. 3.25**).

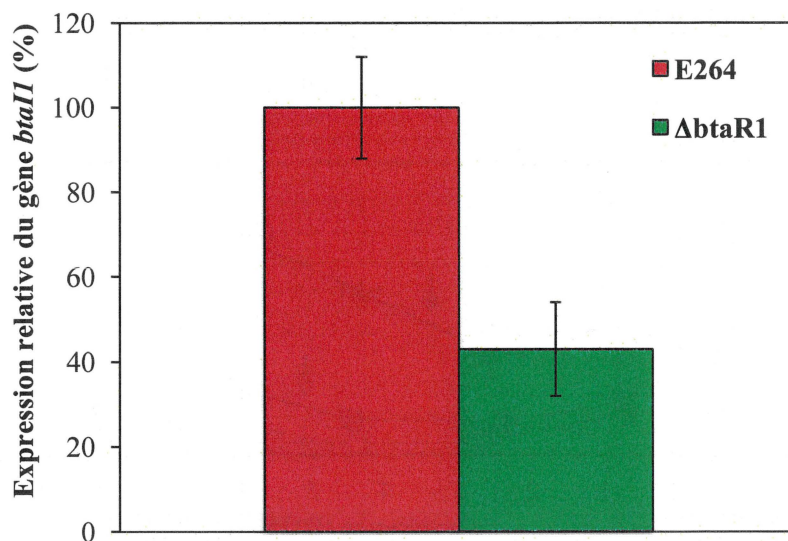


Figure 3.25. L'expression du gène *btaII* est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel BtaR1 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne.

L'expression relative du gène *btaII* a été mesurée par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaR1$ de *B. thailandensis* E264. L'expression du gène *btaII* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Par ailleurs, des expériences de quantification de la transcription des gènes *btaII* et *btaR1*, effectuées chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264, attestent que le régulateur transcriptionnel BtaR3 n'a aucun impact sur l'expression du gène *btaII* au cours de la phase exponentielle et indiquent que l'expression du gène *btaR1* n'est pas sous le contrôle du régulateur transcriptionnel BtaR3 (Fig. 3.26). D'autres expériences seront donc nécessaires afin de déterminer l'effet du régulateur transcriptionnel BtaR3 sur l'expression du gène *btaR1* au cours de la phase stationnaire. Ces expériences permettront de préciser si le régulateur transcriptionnel BtaR3 stimule directement la transcription du gène *btaII* et/ou indirectement en activant la transcription du gène *btaR1*.

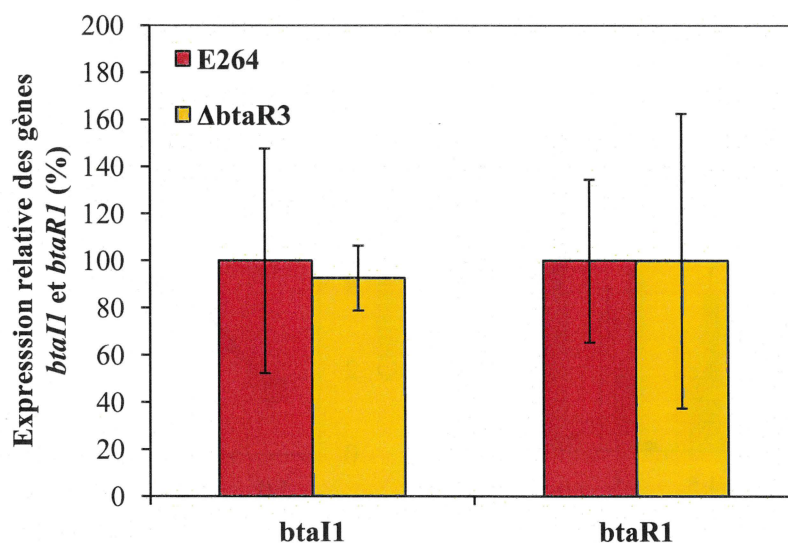


Figure 3.26. Le régulateur transcriptionnel BtaR3 n'affecte pas l'expression des gènes *btaI1* et *btaR1* au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne.

L'expression relative des gènes *btaI1* et *btaR1* a été mesurée par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264. L'expression des gènes *btaI1* et *btaR1* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.6.2. La C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL stimulent l'expression du gène *btaI1* au cours des différentes phases de la croissance bactérienne

La transcription du gène *btaI1* est activée via la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL au cours de la phase exponentielle (cf. la **Figure 3.8A** présentée à la section 3.1.5.4). Des expériences de quantification de l'expression du gène *btaI1*, réalisées dans des cultures du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en AHL, révèlent, par ailleurs, que la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL stimulent la transcription du gène *btaI1* au cours de la phase stationnaire (**Fig. 3.27**).

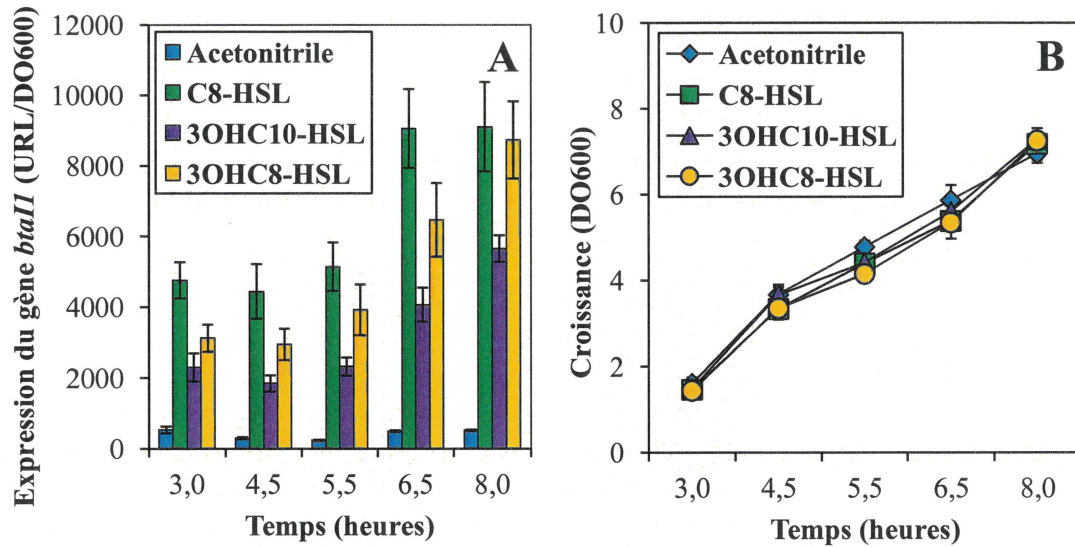


Figure 3.27. La C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL activent l'expression du gène *btaII* au cours des différentes phases de la croissance bactérienne.

(A) Les activités luciféras du rapporteur transcriptionnel *btaII-lux*, exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀), ont été mesurées dans des cultures du mutant $\Delta btaII\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL (B) au cours de la croissance bactérienne. Les AHL ont été diluées préalablement dans de l'acétonitrile et ont été ajoutées à une concentration de 10 μ M. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Nous savons que le régulateur transcriptionnel BtaR1 stimule l'expression du gène *btaII* en association avec la C₈-HSL, la principale AHL produite *via* la synthase BtaI1 (Chandler *et al.*, 2009), au cours de la phase exponentielle (cf. la **Figure 3.3** présentée à la section 3.1.5.2). Il apparaît, par ailleurs, que l'activation de l'expression du gène *btaII* par l'intermédiaire de la C₈-HSL requiert le régulateur transcriptionnel BtaR1 au cours de la phase stationnaire. En effet, l'ajout exogène de C₈-HSL dans des cultures du mutant $\Delta btaII$ permet de restaurer la transcription du gène *btaII* (**Fig. 3.28A**). L'ajout exogène de C₈-HSL dans des cultures du mutant $\Delta btaR1$, par contre, n'a aucun effet sur la transcription du gène *btaII* (**Fig. 3.28B**).

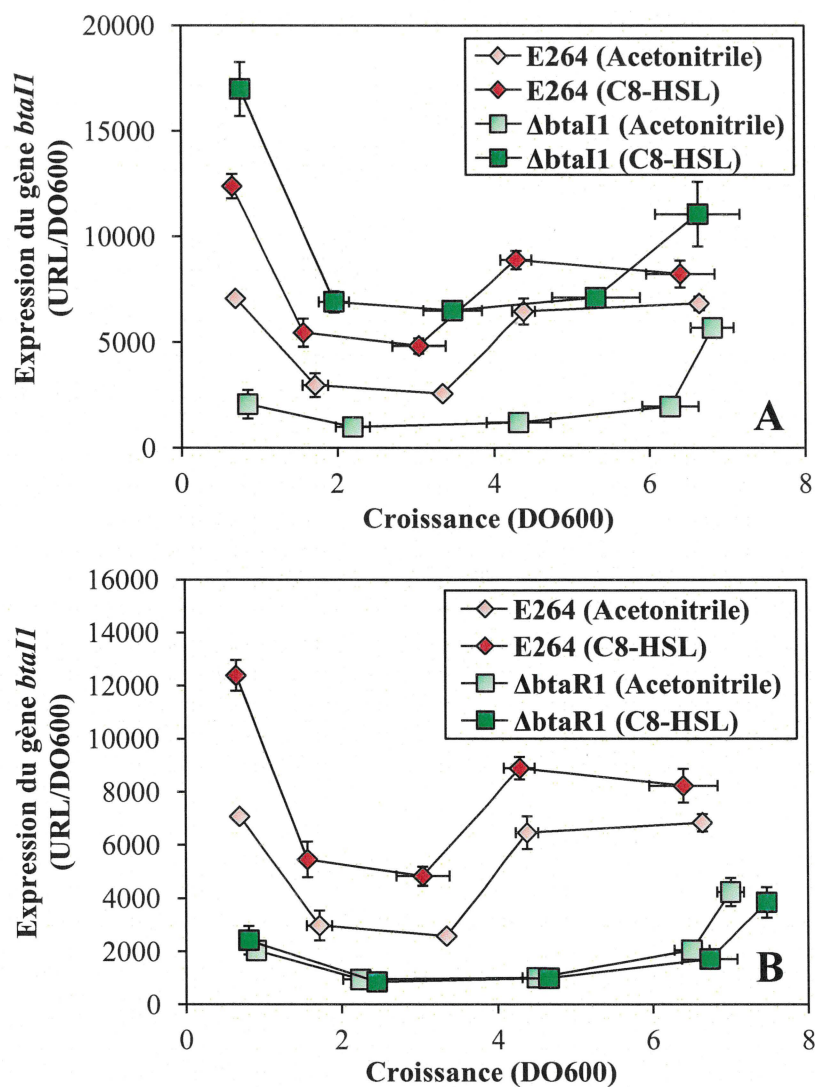
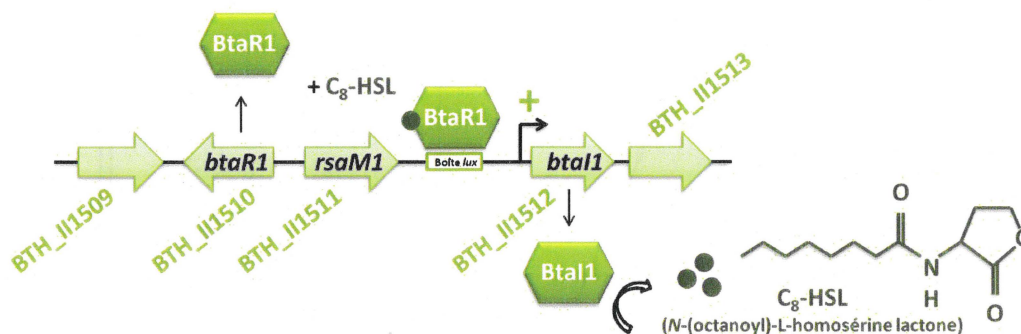


Figure 3.28. Le régulateur transcriptionnel BtaI1 stimule l'expression du gène *btaI1* en association avec la C₈-HSL produite *via* la synthase BtaI1 au cours des différentes phases de la croissance bactérienne. Les activités luciférases du rapporteur transcriptionnel *btaI1-lux*, exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀), ont été mesurées dans des cultures de (A) la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI1$ de *B. thailandensis* E264 et de (B) la souche sauvage et du mutant $\Delta btaR1$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en C₈-HSL au cours de la croissance bactérienne. La C₈-HSL a été diluée préalablement dans de l'acétonitrile et a été ajoutée à une concentration de 10 μ M. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Ces observations témoignent de l'auto-régulation positive du système BtaI1/BtaR1 de *B. thailandensis* E264, similairement aux systèmes BpsI/BpsR de *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011, Song *et al.*, 2005) et BmaI1/BmaR1 de *B. mallei* ATCC 23344 (Duerkop *et al.*, 2007) (Fig. 3.29).



Gène	Nom	Opéron	Description (d'après Burkholderia.com)
BTH_II1509			MgtC family protein
BTH_II1510	<i>btaR1</i>		ATP-dependent transcription regulator LuxR
BTH_II1511	<i>rsaM1</i>		hypothetical protein
BTH_II1512	<i>btaI1</i>	BTH_II1512 - BTH_II1513	N-acyl homoserine lactone synthase
BTH_II1513		BTH_II1512 - BTH_II1513	hypothetical protein

Figure 3.29. Régulation hypothétique de la transcription de *btaI1* via le complexe BtaR1/C₈-HSL. BtaR1, en association avec la C₈-HSL, activerait directement la transcription du gène *btaI1* via une boîte *lux* présente dans la région promotrice de ce gène (cf. la **Figure 3.15** présentée à la section 3.1.6). Ainsi, BtaR1 contrôlerait positivement la production de la C₈-HSL, dont la synthèse est catalysée par BtaI1 (Chandler *et al.*, 2009), créant, de ce fait, une boucle d'auto-induction typique des systèmes de *quorum sensing*.

De plus, nous pensons que l'activation de la transcription du gène *btaI1* via la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL implique le régulateur transcriptionnel BtaR3 (cf. la **Figure 3.9** présentée à la section 3.1.5.4). Toutefois, des expériences additionnelles seront indispensables afin de confirmer que l'activation de l'expression du gène *btaI1* via le régulateur transcriptionnel BtaR3 requiert véritablement une interaction entre BtaR3 et la 3OHC₁₀-HSL ainsi qu'entre BtaR3 et la 3OHC₈-HSL. Des travaux préliminaires réalisés au sein de notre laboratoire chez le système d'expression hétérologue *E. coli* DH5α en présence d'un vecteur d'expression inductible du gène *btaR3* n'ont pas permis de démontrer sans équivoque que BtaR3 agit conjointement avec la 3OHC₁₀-HSL et/ou la 3OHC₈-HSL pour stimuler directement la transcription du gène *btaI1* (M. C. Groleau, données non montrées), à la manière des régulateurs transcriptionnels BpsR3 de *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011) et BmaR3 de *B. mallei* ATCC 23344 (Duerkop *et al.*, 2008). Par conséquent, nous pourrions envisager de réaliser des expériences de retard de migration sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes.

3.1.10.7. Approfondissement du mécanisme de régulation du système BtaI2/BtaR2

3.1.10.7.1. La C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL stimulent l'expression du gène *btaI2* au cours des différentes phases de la croissance bactérienne

La transcription du gène *btaI2* est activée *via* la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL au cours de la phase exponentielle (cf. la **Figure 3.8B** présentée à la section 3.1.5.4). Des expériences de quantification de l'expression du gène *btaI2*, réalisées dans des cultures du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en AHL, révèlent, par ailleurs, que la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL stimulent la transcription du gène *btaI2* au cours de la phase stationnaire (**Fig. 3.30**).

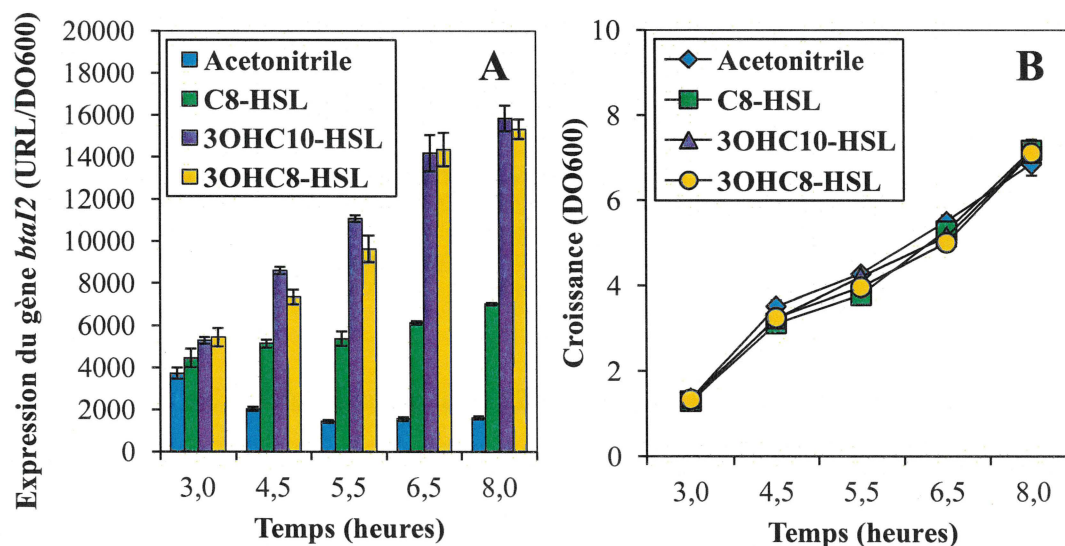


Figure 3.30. La C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL activent l'expression du gène *btaI2* au cours des différentes phases de la croissance bactérienne.

(A) Les activités luciférases du rapporteur transcriptionnel *btaI2-lux*, exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀), ont été mesurées dans des cultures du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL (B) au cours de la croissance bactérienne. Les AHL ont été diluées préalablement dans de l'acétonitrile et ont été ajoutées à une concentration de 10 μ M. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.7.2. Le régulateur transcriptionnel BtaR2 contrôle l'expression du gène *btaI2*

Le régulateur transcriptionnel BtaR2 contrôle positivement et directement l'expression du gène *btaI2* en association avec la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2009) (cf. la **Figure 3.10** présentée à la section 3.1.5.4). En outre, des expériences de qRT-PCR

corroborent les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014a) selon lesquelles la transcription du gène *btaI2* est stimulée *via* le régulateur transcriptionnel BtaR2 (**Fig. 3.31**).

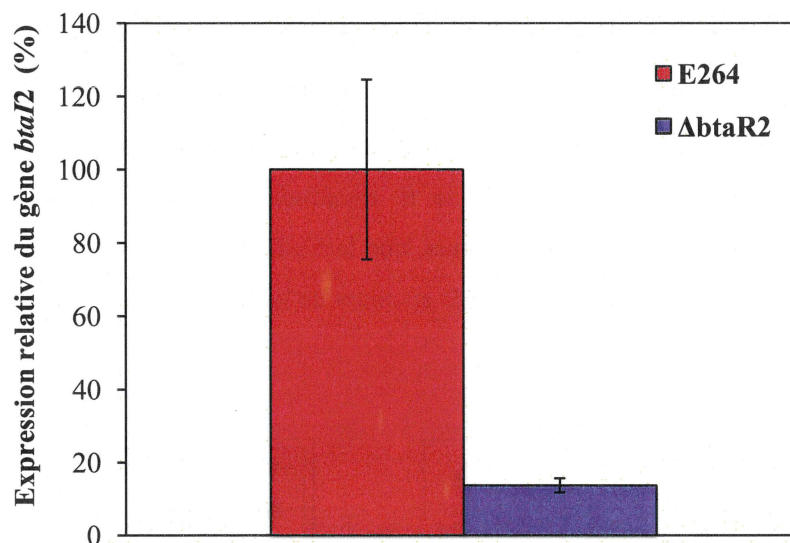


Figure 3.31. L'expression du gène *btaI2* est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel BtaR2. L'expression relative du gène *btaI2* a été mesurée par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaR2$ de *B. thailandensis* E264 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. L'expression du gène *btaI2* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.1.10.7.3. L'expression des gènes *btaI2* et *btaR2* n'est pas sous le contrôle des régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3

Les régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3, en revanche, ne stimulent pas la transcription des gènes *btaI2* et *btaR2*, conformément aux données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014a) (**Fig. 3.32**). Ainsi, l'activation de l'expression du gène *btaI2* par l'intermédiaire de la C₈-HSL n'implique apparemment ni le régulateur transcriptionnel BtaR1 ni le régulateur transcriptionnel BtaR3. Similairement, Majerczyk *et al.* (2014a) ont rapporté que la C₈-HSL est capable d'activer d'autres gènes, à savoir les gènes *bta* codant les enzymes nécessaires à la biosynthèse des bactobolines (cf. la **Figure 1.33** présentée à la section 1.3.2.3.4.3), dont la transcription est contrôlée positivement et directement par le régulateur transcriptionnel BtaR2. Ces gènes ne figurent pas parmi les cibles des régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3 (Majerczyk *et al.*, 2014a). Notons, cependant, que des gènes *luxR*, codant des régulateurs transcriptionnels de type LuxR orphelins, sont présents à proximité des gènes *bta* (cf. la **Figure 1.40** présentée à la section 1.3.2.3.8.1). Il est envisageable que ces régulateurs

transcriptionnels stimulent la transcription des gènes *bta* en association avec la C₃-HSL. Des expériences supplémentaires devront être réalisées afin de déterminer l'effet des régulateurs transcriptionnels de type LuxR orphelins sur l'expression des gènes *bta* ainsi que sur la transcription des gènes *btaI2* et *btaR2*.

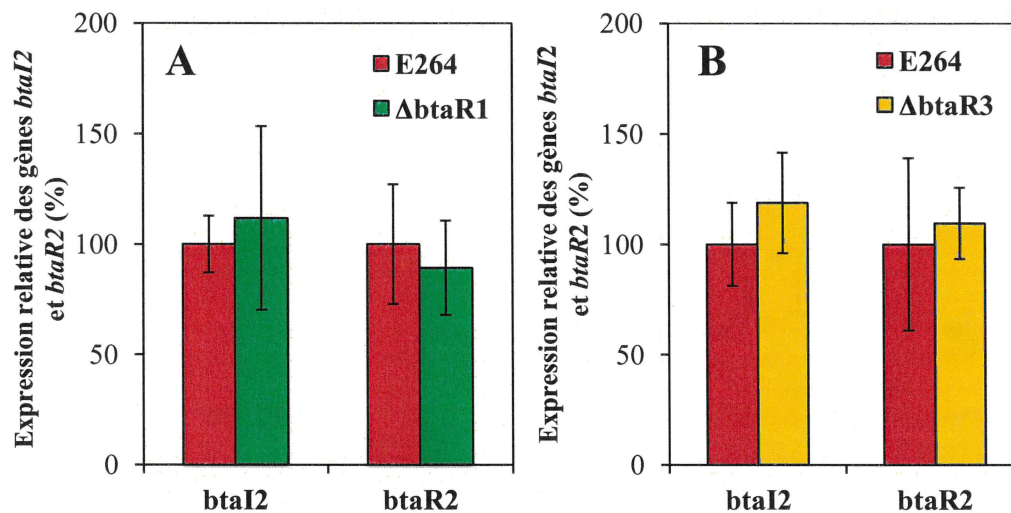


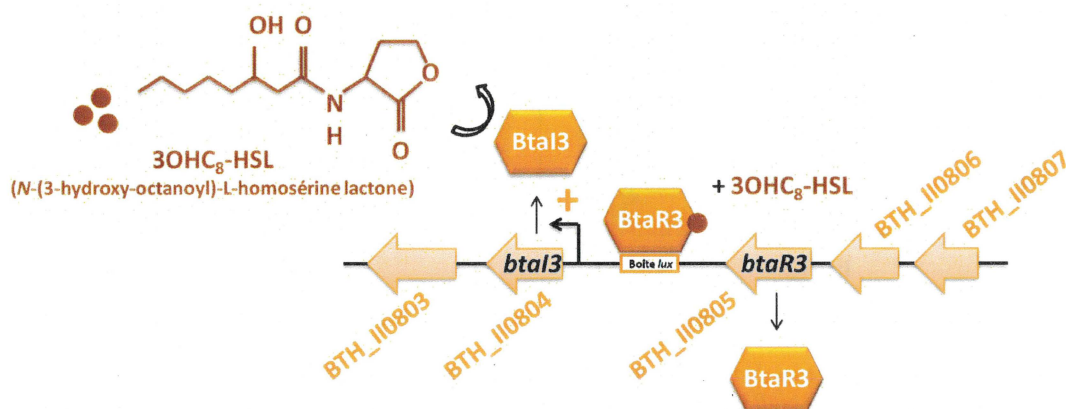
Figure 3.32. Les régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3 n'affectent pas l'expression des gènes *btaI2* et *btaR2*.

L'expression relative des gènes *btaI2* et *btaR2* a été mesurée par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants (A) $\Delta btaR1$ et (B) $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. L'expression des gènes *btaI2* et *btaR2* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

L'ensemble de ces considérations confirme donc que le régulateur transcriptionnel BtaR2 contrôle positivement et directement la production de la 3OHC₁₀-HSL, la principale AHL produite *via* la synthase BtaI2 (Duerkop *et al.*, 2009), alors que les systèmes BtaI1/BtaR1 et BtaI3/BtaR3 contrôlent, selon toute apparence, négativement et indirectement la biosynthèse de cette AHL. Par conséquent, des expériences additionnelles seront nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme de modulation de la production de la 3OHC₁₀-HSL *via* les régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3. En outre, nous pensons que d'autres éléments régulateurs sont susceptibles de contrôler le système BtaI2/BtaR2.

3.1.10.8. Approfondissement du mécanisme de régulation du système BtaI3/BtaR3

Contrairement aux systèmes BpsI3/BpsR3 de *B. pseudomallei* K96243 (Kiratisin *et al.*, 2008) et BmaI3/BmaR3 de *B. mallei* ATCC 23344 (Duerkop *et al.*, 2008), le système BtaI3/BtaR3 de *B. thailandensis* E264 est, selon toute vraisemblance, auto-régulée positivement (Fig. 3.33). Notre hypothèse est que le régulateur transcriptionnel BtaR3 active l'expression du gène *btaI3* en association avec la 3OHC₈-HSL, la principale AHL produite via la synthase BtaI3 (Chandler *et al.*, 2009) (cf. la Figure 3.12B présentée à la section 3.1.5.4).



Gène	Nom	Opéron	Description (d'après Burkholderia.com)
BTH_II0803			FAD/FMN-binding oxidoreductase
BTH_II0804	<i>btaI3</i>		<i>N</i> -acyl homoserine lactone synthase
BTH_II0805	<i>btaR3</i>		LuxR family transcriptional regulator
BTH_II0806			hypothetical protein
BTH_II0807			phosphate transporter family protein

Figure 3.33. Régulation hypothétique de la transcription de *btaI3* via le complexe BtaR3/3OHC₈-HSL. BtaR3, en association avec la 3OHC₈-HSL, activerait directement la transcription du gène *btaI3* via une boîte *lux* présente dans la région promotrice de ce gène. Ainsi, BtaR3 contrôlerait positivement la production de la 3OHC₈-HSL, dont la synthèse est catalysée par BtaI3 (Chandler *et al.*, 2009), créant, de ce fait, une boucle d'auto-induction typique des systèmes de *quorum sensing*.

En effet, l'inactivation du gène *btaR3*, de même que l'absence de la synthase BtaI3, résultent en une réduction drastique de la transcription du gène *btaI3* (Fig. 3.34). Il apparaît, par ailleurs, que l'ajout exogène de 3OHC₈-HSL dans des cultures du mutant $\Delta btaR3$ n'a pas d'impact sur la transcription du gène *btaI3* (Fig. 3.34A), confirmant que l'activation de l'expression du gène *btaI3* via la 3OHC₈-HSL requiert le régulateur transcriptionnel BtaR3.

Cependant, nous avons observé que l'ajout exogène de 3OHC₈-HSL dans des cultures du mutant $\Delta btaI3$ n'entraîne pas une restauration de la transcription du gène *btaI3* (Fig. 3.34B).

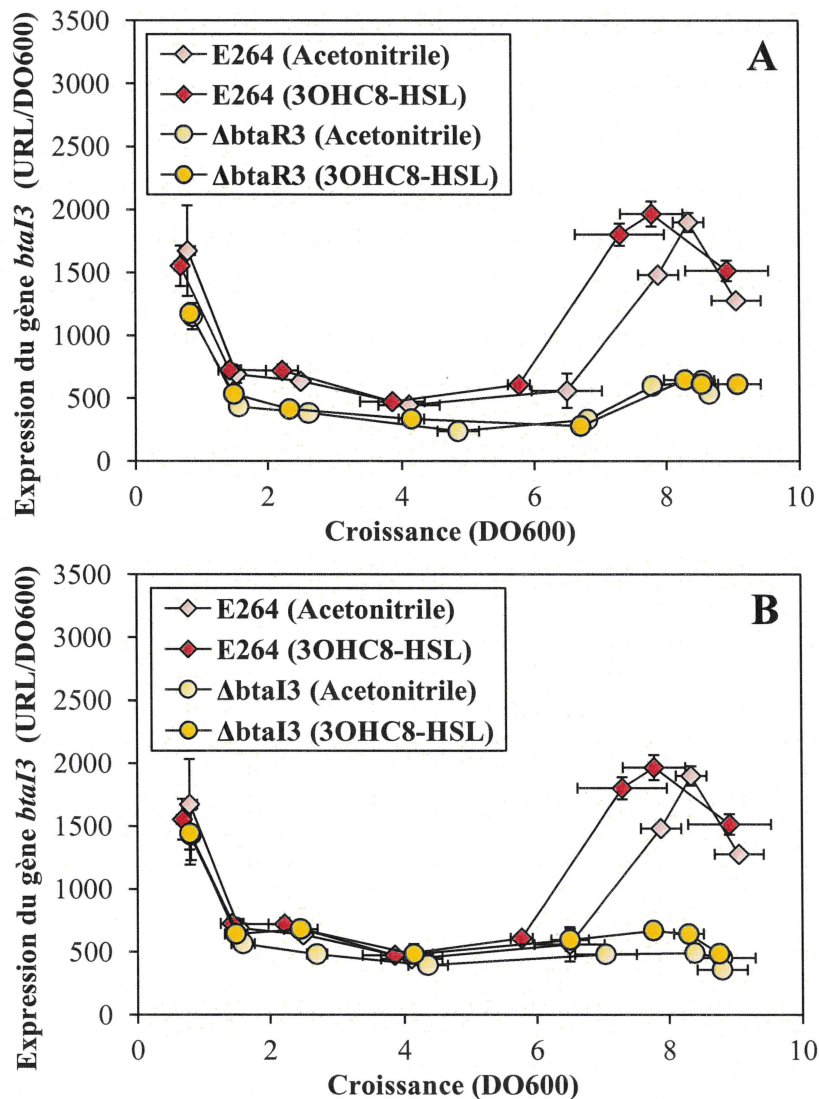


Figure 3.34. Effet de la 3OHC₈-HSL sur la transcription du gène *btaI3* dans des cultures de la souche sauvage et des mutants $\Delta btaR3$ et $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264.

Les activités luciféras du rapporteur transcriptionnel *btaI3-lux*, exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀), ont été mesurées dans des cultures de (A) la souche sauvage et du mutant $\Delta btaR3$ de *B. thailandensis* E264 et de (B) la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en 3OHC₈-HSL au cours de la croissance bactérienne. La 3OHC₈-HSL a été diluée préalablement dans de l'acétonitrile et a été ajoutée à une concentration de 10 μ M. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

L'ensemble de ces considérations suggère que la synthase BtaI3 ne synthétise pas exclusivement de la 3OHC₈-HSL et/ou que cette AHL ne constitue pas l'unique ligand du régulateur transcriptionnel BtaR3. Nous pensons, en l'occurrence, que la synthase BtaI3 de *B. thailandensis* E264, à l'instar des synthases Bpsi3 de *B. pseudomallei* KHW (Gamage *et al.*, 2011) et BmaI3 de *B. mallei* ATCC 23344 (Duerkop *et al.*, 2008), synthétise de la 3OHC₁₀-HSL et que l'expression du gène *btaI3* est stimulée *via* le régulateur transcriptionnel BtaR3 en association avec la 3OHC₁₀-HSL (cf. la **Figure 3.12A** présentée à la section 3.1.5.4). En outre, nous savons que la C₈-HSL active la transcription du gène *btaI3* vraisemblablement *via* le régulateur transcriptionnel BtaR1. Nous avons déterminé, en conséquence, l'impact de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL sur la transcription du gène *btaI3* dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en AHL au cours de la croissance bactérienne. Il apparaît que la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL ne permettent pas de restaurer la transcription du gène *btaI3* (**Fig. 3.35**).

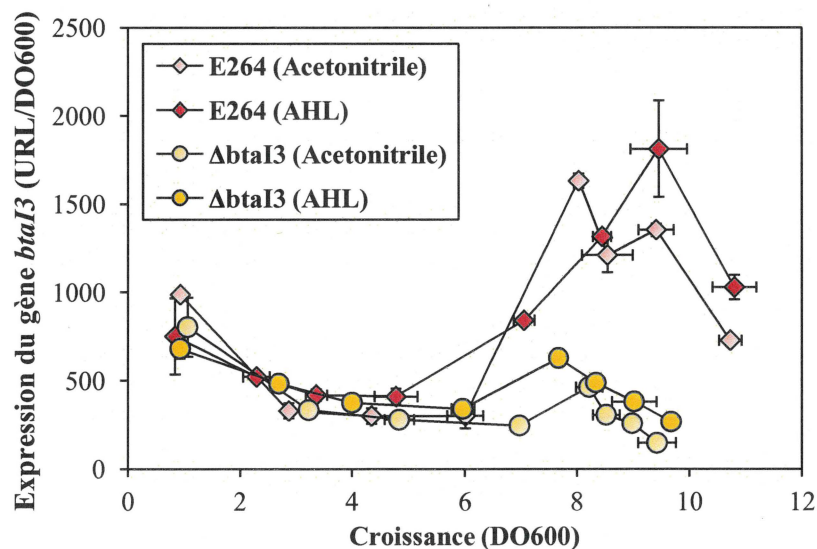


Figure 3.35. Impact de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL sur la transcription du gène *btaI3* dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264.

Les activités luciférases du rapporteur transcriptionnel *btaI3-lux*, exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀), ont été mesurées dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL. Les AHL ont été diluées préalablement dans de l'acétonitrile et ont été ajoutées à une concentration de 10 μ M. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Toutefois, nous avons démontré que la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL sont capables de stimuler individuellement la transcription du gène *btaI3* dans des cultures du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 (cf. la **Figure 3.13** présentée à la section 3.1.5.4). En revanche, l'ajout exogène de C₈-HSL, de 3OHC₁₀-HSL et de 3OHC₈-HSL simultanément dans des cultures du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 n'a aucun impact sur la transcription du gène *btaI3* (cf. la **Figure 3.11** présentée à la section 3.1.5.4). Notre hypothèse est donc que la C₈-HSL et/ou la 3OHC₁₀-HSL influencent l'activation de l'expression du gène *btaI3* via la 3OHC₈-HSL. À titre d'exemple, nous pourrions tester l'aptitude de la 3OHC₈-HSL à stimuler la transcription du gène *btaI3* chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 en présence et en absence de concentrations variables en C₈-HSL et/ou 3OHC₁₀-HSL afin de déterminer s'il existe réellement un phénomène de compétition entre la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL pour l'activation de l'expression du gène *btaI3* via le régulateur transcriptionnel BtaR3. Par ailleurs, des expériences d'empreinte à la DNase I pourraient être envisagées dans le but de caractériser la séquence de liaison spécifique du régulateur transcriptionnel BtaR3 dans la région promotrice du gène *btaI3*. En effet, nous n'avons pas été capables, via des recherches bioinformatiques, d'identifier une boîte *lux* susceptible d'être reconnue spécifiquement par le régulateur transcriptionnel BtaR3 dans la région promotrice du gène *btaI3* de *B. thailandensis* E264.

3.1.10.9. Les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BtaR5 n'interviennent pas dans la modulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3

Afin de vérifier l'implication des régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BtaR5 dans la modulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3, des expériences de quantification de la biosynthèse des principales AHL identifiées chez *B. thailandensis* E264 ont été réalisées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaR4$ et $\Delta btaR5$ de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne (**Tableau 3.9**). Par ailleurs, les profils d'expression des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* ont été déterminés dans les mêmes contextes génétiques via l'utilisation des rapporteurs transcriptionnels *btaI1-lux*, *btaI2-lux* et *btaI3-lux*, respectivement (**Tableau 3.9**).

Tableau 3.9. Souches utilisées pour étudier la modulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 via les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BtaR5.

Souches	Description	Référence
JBT110	E264 $\Delta btaR4$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT111	E264 $\Delta btaR5$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED3492	E264 $\Delta btaR4::btaI1-lux$	Cette étude
ED3493	E264 $\Delta btaR4::btaI2-lux$	Cette étude
ED3494	E264 $\Delta btaR4::btaI3-lux$	Cette étude
ED3495	E264 $\Delta btaR5::btaI1-lux$	Cette étude
ED3496	E264 $\Delta btaR5::btaI2-lux$	Cette étude
ED3497	E264 $\Delta btaR5::btaI3-lux$	Cette étude

Ces expériences montrent que l'absence de BtaR4 et de BtaR5 n'a aucun impact sur la production de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL dans les conditions de culture testées, et confirment les données RNA-Seq de Majerczyk *et al.* (2014a) selon lesquelles la transcription des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* n'est sous le contrôle ni de BtaR4, ni de BtaR5 (Fig. 3.36). En conclusion, les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BtaR5 n'affectent pas les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* E264.

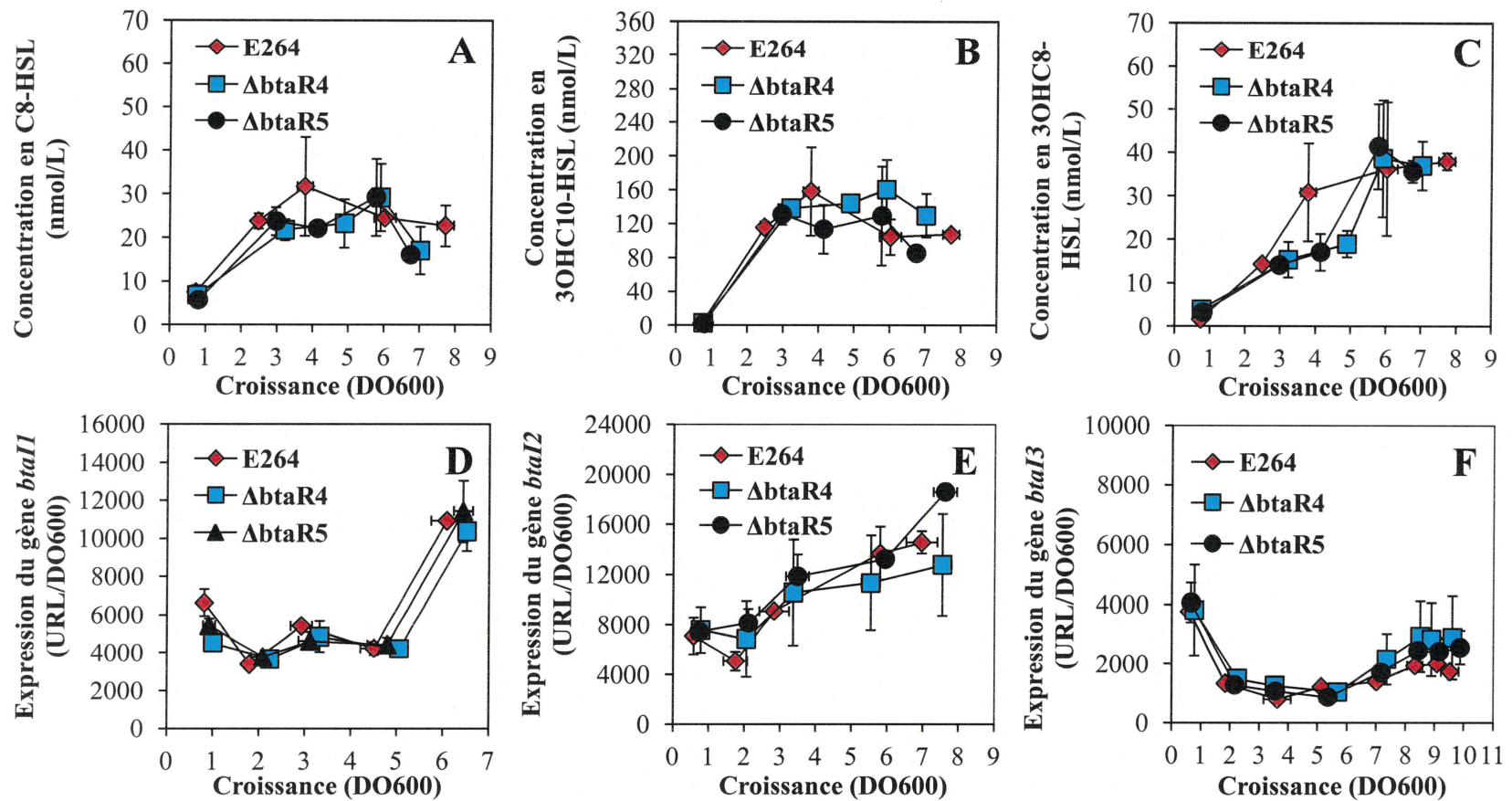


Figure 3.36. Les régulateurs transcriptionnels orphelins BtaR4 et BtaR5 n'affectent pas les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3.

Les concentrations en (A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL et (C) 3OHC₈-HSL ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaR4$ et $\Delta btaR5$ de *B. thailandensis* E264. Les activités luciférase des rapporteurs transcriptionnels (D) *btaI1-lux*, (E) *btaI2-lux* et (F) *btaI3-lux* sont exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.2. Présentation de l'article « Two *rsaM* homologues encode central regulatory elements modulating quorum sensing in *Burkholderia thailandensis* »

Servane Le Guillouzer, Marie-Christine Groleau & Éric Déziel

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

Soumission : 4 décembre 2017; **Acceptation :** 20 février 2018; **Publication :** 5 mars 2018

Journal : Journal of Bacteriology

Les expériences ont été conçues par S.L.G., M.C.G. et É.D.

S.L.G. et M.C.G. ont effectué les expériences.

Les données ont été interprétées par S.L.G., M.C.G. et É.D.

S.L.G., M.C.G. et É.D. ont rédigé le manuscrit.

RÉSUMÉ

La bactérie *Burkholderia thailandensis* possède trois systèmes de *quorum sensing*, appelés BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3, qui utilisent des *N*-acyl-L-homosérine-lactones (AHL) comme molécules de signalisation. Ces systèmes de *quorum sensing* sont responsables de la biosynthèse de la *N*-(octanoyl)-L-homosérine lactone (C₈-HSL), de la *N*-(3-hydroxy-décanyol)-L-homosérine lactone (3OHC₁₀-HSL) et de la *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homosérine lactone (3OHC₈-HSL), qui sont produites *via* les synthèses de type LuxI, BtaI1, BtaI2 et BtaI3, et modulées par les régulateurs transcriptionnels de type LuxR, BtaR1, BtaR2 et BtaR3. Les régions génomiques *btaR1/btaI1* et *btaR2/btaI2* contiennent chacune un gène supplémentaire codant un homologue du répresseur du *quorum sensing* RsaM initialement caractérisé chez la bactérie phytopathogène *Pseudomonas fuscovaginae* et nommé, en conséquence, *rsaM1* et *rsaM2*, respectivement. Nous avons caractérisé la fonction de ces deux homologues conservés du gène *rsaM* et démontré leur implication dans la régulation de la biosynthèse des AHL chez la souche bactérienne *B. thailandensis* E264. Nous avons quantifié la production de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL par LC-MS/MS (*liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) chez la souche sauvage et chez les mutants *rsaM1*- et *rsaM2*-, et nous avons mesuré l'expression des gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* en utilisant des rapporteurs transcriptionnels chromosomiques mini-CTX-*lux*. Par ailleurs, nous avons mesuré la transcription des gènes *btaR1*, *btaR2* et *btaR3* par qRT-PCR (*quantitative reverse transcription-PCR*). Nous avons observé que RsaM1 réprime majoritairement le système BtaI1/BtaR1, tandis que RsaM2 réprime principalement le système BtaI2/BtaR2. En outre, nous avons constaté que les gènes *rsaM1* et *rsaM2* sont non seulement sous le contrôle du *quorum sensing* mais également auto-régulé négativement. Nous en concluons que RsaM1 et RsaM2 constituent des éléments essentiels du *quorum sensing* de *B. thailandensis* et jouent un rôle crucial dans l'organisation hiérarchique et homéostatique des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3.

3.2.1. Abstract

The bacterium *Burkholderia thailandensis* possesses three *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL) quorum sensing (QS) systems designated BtaI1/BtaR1 (QS-1), BtaI2/BtaR2 (QS-2), and BtaI3/BtaR3 (QS-3). These QS systems are associated with the biosynthesis of *N*-(octanoyl)-L-homoserine lactone (C₈-HSL), *N*-(3-hydroxy-decanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₁₀-HSL), and *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₈-HSL), which are produced by the LuxI-type synthases BtaI1, BtaI2, and BtaI3, and modulated by the LuxR-type transcriptional regulators BtaR1, BtaR2, and BtaR3. The *btaR1/btaI1* and *btaR2/btaI2* gene clusters each carry an additional gene encoding a homologue of the QS repressor RsaM originally identified in the phytopathogen *Pseudomonas fuscovaginae*, and thus here named *rsaM1* and *rsaM2*, respectively. We have characterized the function of these two conserved *rsaM* homologues and demonstrated their involvement in the regulation of AHLs biosynthesis in *B. thailandensis* strain E264. We quantified the production of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in the wild-type strain and in the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants, and we monitored *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* expression using chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters. The transcription of *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* was also measured by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). We observed that RsaM1 mainly represses the QS-1 system, whereas RsaM2 principally represses the QS-2 system. We also found that both *rsaM1* and *rsaM2* are QS-controlled, as well as negatively autoregulated. We conclude that RsaM1 and RsaM2 are an integral part of the QS circuitry of *B. thailandensis* and play a major role in the hierarchical and homeostatic organization of the QS-1, QS-2, and QS-3 systems.

3.2.2. Importance

Quorum sensing (QS) is commonly involved in the coordination of gene expression associated with the establishment of host-pathogen interactions and acclimatization to the environment. We present the functional characterization of two *rsaM* homologues in the regulation of the multiple QS systems coexisting in the nonpathogenic bacterium *Burkholderia thailandensis*, widely used as a model system for the study of the human pathogen *Burkholderia pseudomallei*. We found that inactivation of these *rsaM* homologues, which are clustered with the other QS genes, profoundly affects the QS circuitry of *B. thailandensis*. We conclude that they constitute essential regulatory components of the QS

modulatory network, and provide additional layers of regulation to modulate the expression of QS-controlled genes, particularly those linked to environmental adaptation.

3.2.3. Introduction

Quorum sensing (QS) is a widespread cell-cell communication system that coordinates expression of specific genes in a bacterial population density-dependent manner (Fuqua *et al.*, 1994). QS is mediated by diffusible signaling molecules, called auto-inducers, which are synthesized and secreted in response to fluctuations in cell density. They accumulate in the environment as bacterial growth progresses until a threshold concentration is reached allowing bacteria to synchronize their activities and to function as multicellular communities. Gram-negative bacteria commonly possess homologues of the LuxI/LuxR system initially characterized in the bioluminescent marine bacterium *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). The signaling molecules *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) are produced by the LuxI-type synthases. These AHLs activate the LuxR-type transcriptional regulators that modulate the expression of QS target genes, which usually contain a *lux* box sequence in their promoter region. These genes frequently include a *luxI* homologue encoding the AHL synthase, resulting in a typical self-inducing loop of AHLs (Fuqua *et al.*, 2002).

The *Burkholderia* genus encompasses heterogeneous species colonizing diverse ecological niches, such as soil, water, plants, as well as animals, including humans (Coenye *et al.*, 2003, Vial *et al.*, 2011). The *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), for instance, comprises notable opportunistic human pathogens deleterious to both cystic fibrosis (CF) patients and immunocompromised individuals (Mahenthiralingam *et al.*, 2005a). Bcc members carry *luxI* and *luxR* homologues, namely, *cepI* and *cepR*, respectively, coding for the AHL-based QS system CepI/CepR (Eberl, 2006b, Venturi *et al.*, 2004). CepI is a LuxI-type synthase responsible for *N*-(octanoyl)-L-homoserine lactone (C₈-HSL) biosynthesis, which generally is the predominant AHL found in the *Burkholderia* genus (Eberl, 2006b, Venturi *et al.*, 2004). The LuxR-type transcriptional regulator CepR modulates the expression of QS target genes in conjunction with C₈-HSL, including the *cepI* gene itself, creating the typical QS autoregulation loop (Eberl, 2006b, Venturi *et al.*, 2004). The genetic organization of *cepI* and *cepR* is conserved among *Burkholderia* spp. (Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012). Interestingly, they are generally separated by a gene encoding an RsaM-like protein originally identified in the plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* (Mattiuzzo *et al.*, 2011, Uzelac *et*

al., 2017), which was shown to be a major negative regulator of both AHL biosynthesis and expression of AHL synthase-coding genes (Mattiuzzo *et al.*, 2011). RsaM actually acts as a global regulator mediating the expression of numerous genes through and out of the QS regulon in *P. fuscovaginae* (Uzelac *et al.*, 2017). The function of RsaM-like proteins could therefore be important for balancing and fine-tuning of QS-dependent regulation in the *Burkholderia* genus (Inhülsen, 2011). These proteins do not present any sequence similarity with biochemically- or structurally-characterized proteins, such as DNA-binding motifs, and constitute single-domain proteins with unique topology presenting a novel fold (Michalska *et al.*, 2014). Their precise underlying regulatory mechanism thus remains unknown.

The nonpathogenic soil saprophyte *Burkholderia thailandensis*, as well as the closely related human pathogen *Burkholderia pseudomallei* (Brett *et al.*, 1998), both encode two conserved RsaM-like proteins of uncharacterized function (Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012). The genome of *B. thailandensis* contains three LuxI/LuxR-type QS systems designated BtaI1/BtaR1 (QS-1), BtaI2/BtaR2 (QS-2), and BtaI3/BtaR3 (QS-3) (Majerczyk *et al.*, 2013a, Ulrich *et al.*, 2004d). These QS systems are also found in *B. pseudomallei* and were reported to be involved in the regulation of several virulence genes and to be essential to its pathogenicity (Song *et al.*, 2005, Ulrich *et al.*, 2004b, Valade *et al.*, 2004). We recently thoroughly dissected the QS circuitry of *B. thailandensis* and found that the QS-1, QS-2, and QS-3 systems are hierarchically and homeostatically organized, and integrated into an intricate modulatory network, including transcriptional and posttranscriptional interactions (Le Guillouzer *et al.*, 2017). The QS-1 system is responsible for C₈-HSL production (Chandler *et al.*, 2009). The BtaR1 transcriptional regulator activates the expression of the *btaI1* gene encoding the BtaI1 synthase (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a). The QS-2 system is responsible for the biosynthesis of both *N*-(3-hydroxy-decanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₁₀-HSL) and *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₈-HSL) (Duerkop *et al.*, 2009). The *btaI2* gene, which codes for the BtaI2 synthase, is positively and directly controlled by the BtaR2 transcriptional regulator in association with 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017). The QS-3 system is composed of the BtaR3 transcriptional regulator and the BtaI3 synthase responsible for 3OHC₈-HSL production as well (Chandler *et al.*, 2009). The *btaI3* gene is activated by BtaR3 (Le Guillouzer *et al.*, 2017). While both the QS-1 and QS-2 gene clusters include an *rsaM* homologue, here named *rsaM1* and *rsaM2*, respectively, no homologue of *rsaM* is present in the vicinity of *btaR3/btaI3* (Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012).

The central aim of this study was to further elucidate the QS modulatory network of *B. thailandensis* E264 by characterizing the role of RsaM1 and RsaM2 in the regulation of its components. We established that they negatively affect the biosynthesis of AHLs and that they are central to the homeostasis of the QS circuitry of *B. thailandensis* E264. This study provides new insights on the intricate interplay existing between the various elements of *B. thailandensis* QS systems, and is essential in unraveling the regulatory mechanism underlying QS-dependent gene expression in this bacterium.

3.2.4. Materials and methods

3.2.4.1. Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used in this study are listed in **Table 3.10**. Unless stated otherwise, all bacteria were cultured at 37°C in tryptic soy broth (TSB; BD Difco, Mississauga, Ontario, Canada), with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on petri dishes containing TSB solidified with 1.5% agar. When required, antibiotics were used at the following concentrations: 200 µg/mL tetracycline (Tc) and 100 µg/mL trimethoprim (Tp) for *B. thailandensis* E264, while Tc was used at 15 µg/mL for *Escherichia coli* DH5α. All measurements of optical density at 600 nm (OD₆₀₀) were acquired with a Thermo Fisher Scientific NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

Table 3.10. Bacterial strains used in this study.

Strains	Description	Reference
<i>E. coli</i>		
χ7213	<i>thr-1, leuB6, fhuA21, lacY1, glnV44, recA1, ΔasdA4, Δ(zhf-2::Tn10), thi-1, RP4-2-Tc::Mu [λ pir]</i>	Lab collection
DH5α	F ⁻ , φ80dlacZΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR, recA1, endA1, hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA, supE44, λ⁻, thi-1, gyrA96, relA1</i>	Lab collection
<i>B. thailandensis</i>		
E264	Wild-type	(Brett <i>et al.</i> , 1998)
JBT107	E264 Δ <i>btaR1</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT108	E264 Δ <i>btaR2</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT109	E264 Δ <i>btaR3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)

JBT112	E264 $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT101	E264 $\Delta btaI1$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT102	E264 $\Delta btaI2$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT103	E264 $\Delta btaI3$	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
BT03295	E264 <i>rsaM1</i> ::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT; Tp ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
BT04218	E264 <i>rsaM2</i> ::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT; Tp ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
ED1020	E264 (pME6000)	This study
ED3477	E264 (pME6000- <i>btaR2</i>)	This study
ED3478	E264 $\Delta btaR2$ (pME6000)	This study
ED1015	E264 $\Delta btaR2$ (pME6000- <i>btaR2</i>)	This study
ED3330	E264:: <i>btaI1-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
ED3331	E264:: <i>btaI2-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
ED3332	E264:: <i>btaI3-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
ED3469	E264 <i>rsaM1</i> :: <i>btaI1-lux</i>	This study
ED3470	E264 <i>rsaM1</i> :: <i>btaI2-lux</i>	This study
ED3471	E264 <i>rsaM1</i> :: <i>btaI3-lux</i>	This study
ED3472	E264 <i>rsaM2</i> :: <i>btaI1-lux</i>	This study
ED3473	E264 <i>rsaM2</i> :: <i>btaI2-lux</i>	This study
ED3474	E264 <i>rsaM2</i> :: <i>btaI3-lux</i>	This study

3.2.4.2. Construction of plasmids

All plasmids used in this study are described in **Table 3.11**.

Table 3.11. Plasmids used in this study.

Plasmids	Description	Source
pME6000	Broad-host-range cloning vector; Tc ^R	(Maurhofer <i>et al.</i> , 1998)
pMCG21	<i>btaR2</i> inserted in <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III restriction sites in pME6000; Tc ^R	This study
pSLG02	<i>btaI1</i> promoter inserted in the restriction sites <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI in the mini-CTX- <i>lux</i> integration vector with promoterless <i>luxCDABE</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
pSLG03	<i>btaI2</i> promoter inserted in the restriction sites <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI in the mini-CTX- <i>lux</i> integration vector with promoterless <i>luxCDABE</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
pSLG04	<i>btaI3</i> promoter inserted in the restriction sites <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> HI in the mini-CTX- <i>lux</i> integration vector with promoterless <i>luxCDABE</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)

Amplification of *btaR2* was performed from genomic DNA from *B. thailandensis* E264 using the appropriate primers (Table 3.12). The amplified product was digested with the FastDigest restriction enzymes *Bam*HI and *Hind*III (Thermo Fisher Scientific) and inserted by T4 DNA ligase (Bio Basic, Inc., Markham, ON, Canada) within the corresponding restriction sites in the pME6000 plasmid (Maurhofer *et al.*, 1998), generating the constitutive expression vector pMCG21. All primers were from Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada).

Table 3.12. Primers used for PCR.

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')*
<i>btaR2</i>	btaR2F	GCGGGATCCATGCGAGGATATGGAGATGC
	btaR2R	CGCAAGCTTTCGAGATATCCCGCCTATTG

*Restriction sites designed into the primers are underlined.

3.2.4.3. Construction of recombinant strains

The pME6000 and pME6000-*btaR2* constitutive expression vectors were introduced in *B. thailandensis* E264 strains by electroporation. Briefly, bacterial cultures were grown to an OD₆₀₀ of 1.0, pelleted by centrifugation, and washed several times with 1 mL of sterile water. The pellets were concentrated 100-fold in 100 µL of sterile water and electroporated using a 1 mm gap disposable electroporation cuvette (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) at 1.8 kV with an Eppendorf Electroporator 2510 (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY,

USA). Cells were grown for 1 hr in 1 mL lysogeny broth (LB; Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA) at 37°C then plated on Tc selective media.

3.2.4.4. Construction of reporter strains

Chromosomal integration of the mini-CTX-*btaI1-lux*, mini-CTX-*btaI2-lux*, and mini-CTX-*btaI3-lux* transcriptional reporters at the *attB* locus in *B. thailandensis* E264 strains was performed through conjugation with the auxotrophic *E. coli* χ 7213. Overnight bacterial cultures of *B. thailandensis* E264 strains were diluted in 1.5 mL TSB to an initial OD₆₀₀ of 0.1 and incubated as described above. Overnight bacterial cultures of *E. coli* χ 7213 carrying the corresponding chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters were diluted in 1.5 mL TSB supplemented with 62.5 μ g/mL diaminopimelic acid (DAP; Sigma-Aldrich Co., Oakville, ON, Canada) to an initial OD₆₀₀ of 0.1 and statically grown at 37°C. When the cultures reached an OD₆₀₀ of 0.5, they were pelleted by centrifugation. The pellets were resuspended together in 100 μ L TSB and spotted onto TSB agar plates containing DAP and incubated overnight at 37°C. The bacterial strains were suspended in 1 mL TSB then plated on Tc selective media. Successful chromosomal insertion of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux* was confirmed by PCR using appropriate primers.

3.2.4.5. LC-MS/MS quantification of AHLs

The concentrations of AHLs were determined from samples of *B. thailandensis* E264 cultures obtained at different time points during bacterial growth by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were prepared and analyzed as described previously (Chapalain *et al.*, 2017). 5,6,7,8-Tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) was used as an internal standard. All experiments were performed in triplicate and conducted at least twice independently.

3.2.4.6. Measurement of the activity of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux* reporters

The levels of expression from the promoter regions of *btaI1*, *btaI2*, or *btaI3* were quantified by measuring the luminescence of *B. thailandensis* E264 cultures carrying the corresponding chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters, as described previously

(Le Guillouzer *et al.*, 2017). Overnight bacterial cultures were diluted in TSB to an initial OD₆₀₀ of 0.1 and incubated as indicated above. The luminescence was regularly determined from culture samples using a multi-mode microplate reader (Cytation 3, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) and expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). All experiments were performed with three biological replicates and repeated at least twice.

3.2.4.7. Quantitative reverse transcription-PCR and reverse transcription-PCR experiments

Total RNA of *B. thailandensis* E264 cultures at an OD₆₀₀ of 4.0 was extracted with the PureZOL RNA isolation reagent (Bio-Rad Laboratories) and treated twice with the TURBO DNA-Free kit (Ambion Life Technologies, Inc., Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Extractions were done on three different bacterial cultures. Quality and purity controls were confirmed by agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometric analysis, respectively. cDNA synthesis was performed using the iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad Laboratories), and amplification was accomplished on a Corbett Life Science Rotor-Gene 6000 thermal cycler using the SsoAdvanced universal SYBR green supermix (Bio-Rad Laboratories), according to the manufacturer's protocol. The reference gene was *ndh* (Subsin *et al.*, 2007). The *ndh* gene displayed stable expression under the different genetic contexts tested. All primers used for cDNA amplification are presented in **Table 3.13**. Differences in gene expression between *B. thailandensis* E264 strains were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula (Livak *et al.*, 2001). A threshold of 0.5 was chosen as significant. For experiments with AHL additions, cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL (Sigma-Aldrich Co.) or not supplemented with AHLs from stocks prepared in high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile. Acetonitrile only was added to the controls. All experiments were performed in triplicate and conducted at least twice independently.

Table 3.13. Primers used for qRT-PCR and RT-PCR.

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')
<i>ndh</i>	SLG_qRT-PCR_ndh_F SLG_qRT-PCR_ndh_R	ACCAGGGCGAATTGATCTC GATGACGAGCGTGTCTGATT
<i>btaR1</i>	SLG_qRT-PCR_btaR1_F SLG_qRT-PCR_btaR1_R	AGCTCGAACATGATCGTCTG TGAAGCGTCAGATGGTTGAT
<i>btaR2</i>	SLG_qRT-PCR_btaR2_F SLG_qRT-PCR_btaR2_R	GAGAAATTCGCAACGAGAG GCCGTCCACTTCAACACAT
<i>btaR3</i>	SLG_qRT-PCR_btaR3_F SLG_qRT-PCR_btaR3_R	CGACTACTTCACCATCGATCC GCTGATGCCGTTGTCTGAG
<i>btaI1</i>	btaI1RTF btaI1RTR	CTTCGAACGGGATCAATACG CATGTCGTGTGCGACCAG
<i>rsaM1</i>	SLG_qPCR_BTH_II1511_F SLG_qPCR_BTH_II1511_R	TGAATTCACCACTGCTCCAC ATTCCGGACGATACGTGAAC
<i>rsaM2</i>	SLG_qPCR_BTH_II1228_F SLG_qPCR_BTH_II1228_R	GGACGGATACGTTCTGTCTGT AGGTCCCAGATTTCCGAGAG
<i>rsaM1-btaI1</i>	SLG_RT-PCR_rsaM1-btaI1_F SLG_RT-PCR_rsaM1-btaI1_R	GTCGCTACCGCGATGCTT CCGATAAAGGCCCAGATCA
<i>rsaM2-btaI2</i>	SLG_RT-PCR_rsaM2-btaI2_F SLG_RT-PCR_rsaM2-btaI2_R	GGCGATTTCTATTGGATTGG CTTGACGGTGAATCCAGTT

3.2.4.8. Data analysis

Unless stated otherwise, data are reported as means \pm standard deviations (SD). Statistical analyses were performed with the R software version 3.3.3 (<http://www.R-project.org/>) using one-way analysis of variance (ANOVA) or a *t* test. Probability values of less than 0.05 were considered significant.

3.2.5. Results

3.2.5.1. The QS-1 and QS-2 gene clusters of *B. thailandensis* each carry an *rsaM* homologue

The *B. thailandensis* E264 QS-1 system *btaI1* (BTH_II1512) and *btaR1* (BTH_II1510) genes, encoding the BtaI1 synthase and the BtaR1 transcriptional regulator, respectively, are separated by the BTH_II1511 gene that codes for a hypothetical protein conserved in the *Burkholderia* genus (Chen *et al.*, 2012, Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012, Inhülsen, 2011, Michalska *et al.*, 2014, Venturi *et al.*, 2011). This hypothetical

protein of 147 amino acids is similar to RsaM-like proteins and displays 35.8% identity with the QS repressor RsaM of the phytopathogen *P. fuscovaginae* UPB0736 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q2T542>) (Fig. 3.37A). Interestingly, another *rsaM* homologue, encoding a hypothetical protein of uncharacterized function, is present on the genome of *B. thailandensis* E264 between the QS-2 system *btaI2* (BTH_II1227) and *btaR2* (BTH_II1231) genes that code for the BtaI2 synthase and the BtaR2 transcriptional regulator, respectively. This hypothetical protein of 135 amino acids encoded by the BTH_II1228 gene is 32.4% identical to *P. fuscovaginae* UPB0736 RsaM (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q2T5X5>) (Fig. 3.37A). Therefore, the putative proteins encoded by the BTH_II1511 and BTH_II1228 genes were designated RsaM1 and RsaM2, respectively.

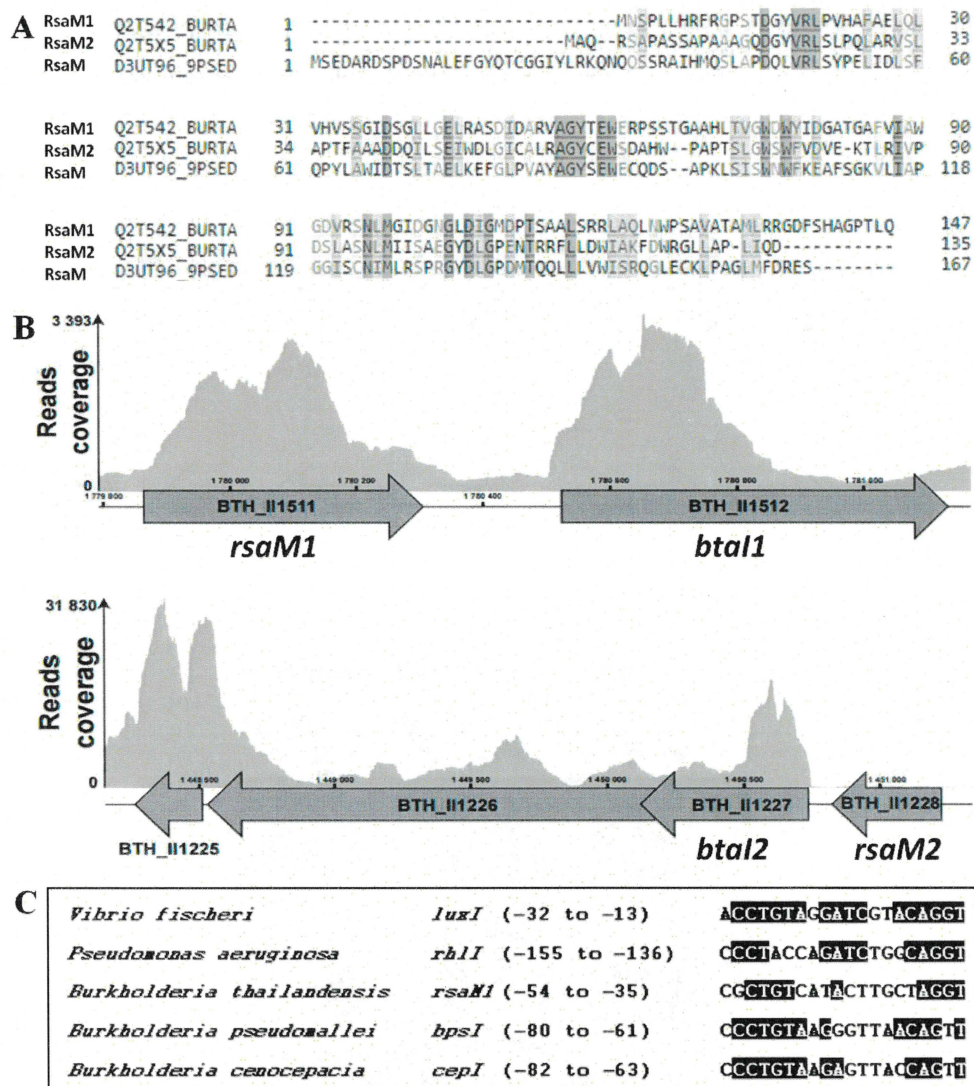


Figure 3.37. *B. thailandensis* possesses two conserved RsaM-like proteins designated RsaM1 and RsaM2. (A) Sequence alignment of the RsaM1 and RsaM2 proteins of *B. thailandensis* E264 with the *P. fuscovaginae* UPB0736 RsaM homologue. The alignment was generated using Clustal W. Strictly conserved residues are shown on a dark grey background and moderately conserved ones are shown on a light grey background. (B) Genetic arrangement of the RsaM1- and RsaM2-encoding genes with *btaI1* and *btaI2*, respectively. (C) The *rsaM1* gene encoding RsaM1 possesses in its promoter region a putative *lux* box sequence, which is homologous to characterized *lux* box sequences in Proteobacteria. The start and stop positions of each sequence are indicated in parentheses relative to the translational start site.

Since the *rsaM1* and *rsaM2* genes are directly adjacent to *btaI1* and *btaI2* on the genome of *B. thailandensis* E264, respectively, and transcribed in the same direction (Fig. 3.37B), we asked whether they could be cotranscribed. *rsaM2* is indeed predicted to be arranged in operon with *btaI2* (<http://www.burkholderia.com/>). According to our transcriptomic analyses obtained by RNA-Sequencing (RNA-Seq) (cf. les Annexes, page

317), neither *rsaM1* nor *rsaM2* are cotranscribed with the *btaI1* and *btaI2* genes, respectively (Fig. 3.37B), as confirmed by reverse transcription-PCR (RT-PCR) experiments (Fig. 3.38).

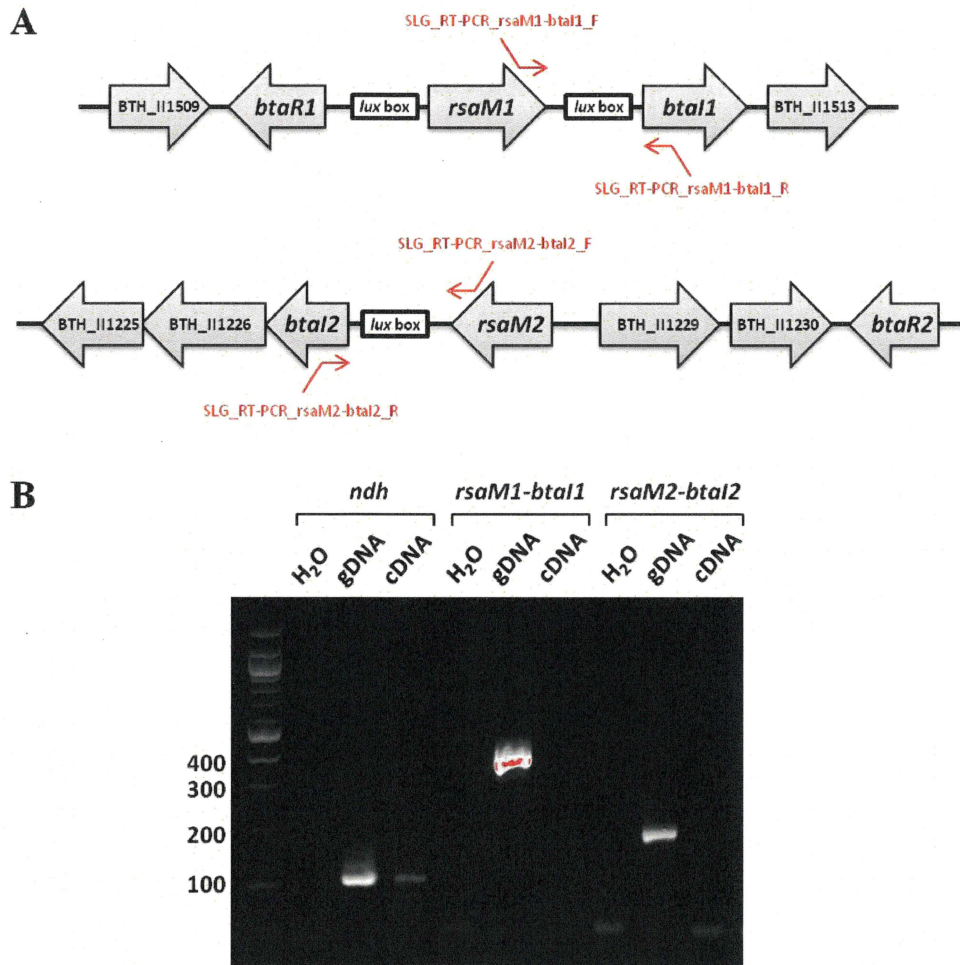


Figure 3.38. Confirmation of the genetic organization of the *rsaM1* and *rsaM2* genes.

(A) The *rsaM1* and *rsaM2* genes are directly adjacent to *btaI1* and *btaI2* on the genome of *B. thailandensis* E264, respectively. The SLG_RT-PCR_ *rsaM1*-*btaI1*_F and SLG_RT-PCR_ *rsaM1*-*btaI1*_R primer pair was used to amplify the intergenic region of the *rsaM1* and *btaI1* genes, whereas the SLG_RT-PCR_ *rsaM2*-*btaI2*_F and SLG_RT-PCR_ *rsaM2*-*btaI2*_R primer pair was used to amplify the intergenic region of the *rsaM2* and *btaI2* genes. These regions each contain a putative *lux* box sequence as reported formerly (Le Guillouzer *et al.*, 2017). (B) RT-PCR experiments were performed to examine cotranscription of the *rsaM1* and *rsaM2* genes with *btaI1* and *btaI2*, respectively, and analyzed by agarose gel electrophoresis. The notation *ndh* indicates that the PCR reactions were conducted using the SLG_qRT-PCR_ *ndh*_F and SLG_qRT-PCR_ *ndh*_R primer pair with H₂O as a negative control, genomic DNA (gDNA) as a positive control, or complementary DNA (cDNA) of *B. thailandensis* E264. These reactions testify to the efficiency of the RT-PCR experiments as revealed by the presence of a PCR amplification product in the cDNA lane. The notation *rsaM1*-*btaI1* indicates that the PCR reactions were carried out with the SLG_RT-PCR_ *rsaM1*-*btaI1*_F and SLG_RT-PCR_ *rsaM1*-*btaI1*_R primer pair, whereas the notation *rsaM2*-*btaI2* indicates that the PCR reactions were carried out with the SLG_RT-PCR_ *rsaM2*-*btaI2*_F and SLG_RT-PCR_ *rsaM2*-*btaI2*_R primer pair. The absence of PCR amplification products in the cDNA lanes reveals that neither *rsaM1* nor *rsaM2* are cotranscribed with the *btaI1* and *btaI2* genes, respectively. The molecular marker is the DNA Ladder 100 bp (New England Biolabs, Inc., Whitby, ON, Canada).

The function of the *rsaM1* and *rsaM2* genes is unknown. While *rsaM2* is located within a cluster responsible for bactobolin antibiotics biosynthesis (Carr *et al.*, 2011, Duerkop *et al.*, 2009, Seyedsayamdost *et al.*, 2010), its involvement was actually not demonstrated. To determine whether *rsaM1* and *rsaM2* are functionally similar to the RsaM-encoding gene of *P. fuscovaginae* UPB0736, which was described as an important repressor of AHLs production (Mattiuzzo *et al.*, 2011), we investigated the impact of these genes on the biosynthesis of the following predominant AHLs produced by *B. thailandensis* E264: 3OHC₁₀-HSL and to lesser extents, C₈-HSL and 3OHC₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a). LC-MS/MS was used to measure the total concentrations of these AHLs at various time intervals of the bacterial growth in the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and in *rsaM1*- and *rsaM2*- null mutants. These mutants both overproduced AHLs compared to the wild-type strain (Fig. 3.39).

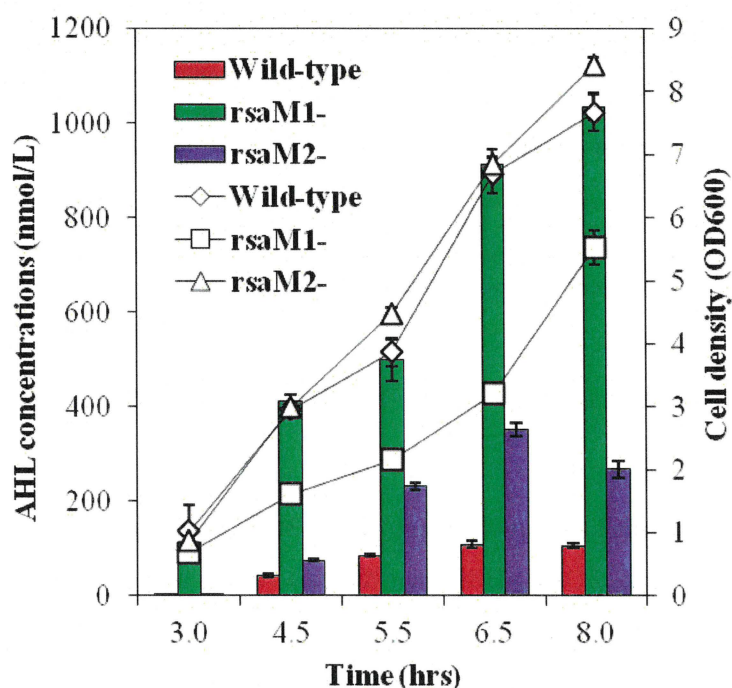


Figure 3.39. AHLs are overproduced by *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants. Total concentrations of AHLs (3OHC₁₀-HSL, C₈-HSL, and 3OHC₈-HSL) (bars) were monitored by LC-MS/MS at various times during growth (lines) in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and isogenic *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates.

Interestingly, the impact of RsaM1 on total AHL concentrations was more pronounced than the effect of RsaM2 (Fig. 3.39). Of note, the *rsaM1*- mutant displayed a delayed growth phenotype (Fig. 3.39), and more cell aggregation was observed in this background (Fig. 3.40).

Altogether, these observations indicate that the RsaM1 and RsaM2 proteins of *B. thailandensis* E264 constitute negative regulators of QS, as previously reported for *P. fuscovaginae* UPB0736 RsaM (Mattiuzzo *et al.*, 2011).

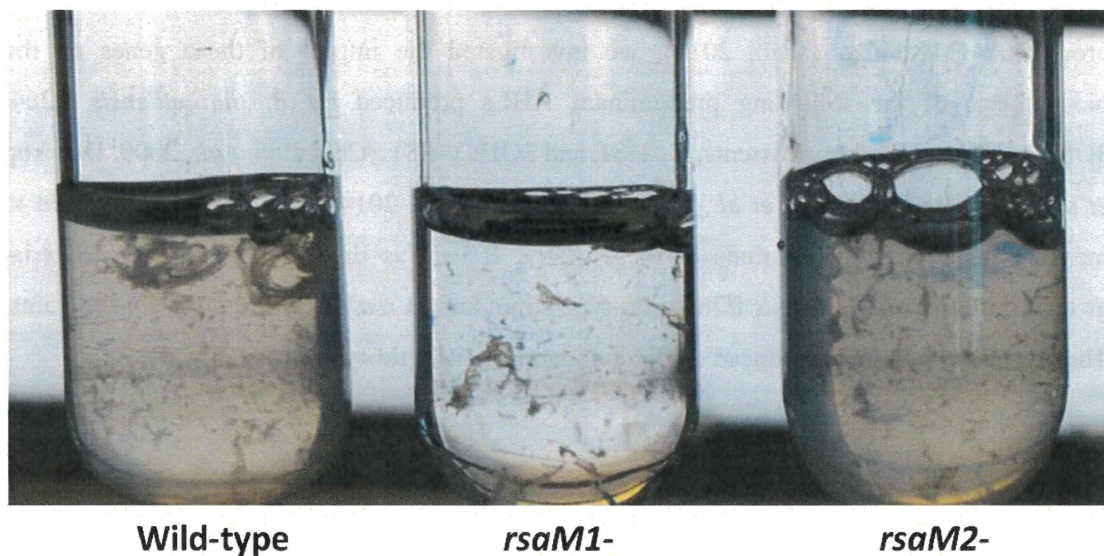


Figure 3.40. Cell aggregation in the wild-type and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264.

To assess auto-aggregation of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains, overnight bacterial cultures were diluted in M9 minimal medium supplemented with 0.4% glucose (wt/vol) and morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) buffer (50 mM; pH 7.0) to an initial OD₆₀₀ of 0.01 and grown with shaking for 24 hrs at 37°C as described previously (Chandler *et al.*, 2009).

3.2.5.2. RsaM1 mainly represses the QS-1 system and RsaM2 principally represses the QS-2 system

Since we confirmed the involvement of the BtaI1, BtaI2, and BtaI3 synthases in C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL biosynthesis, respectively (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009) (**Fig. 3.41**), we determined the effect of RsaM1 and RsaM2 on the QS-1, QS-2, and QS-3 systems by measuring the respective production of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL in the wild-type strain and in the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants of *B. thailandensis* E264 throughout the bacterial growth phases. To gain additional insights, we also monitored the expression of the AHL synthase-coding genes *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* in the same backgrounds using the chromosomal *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux* transcriptional reporters, respectively.

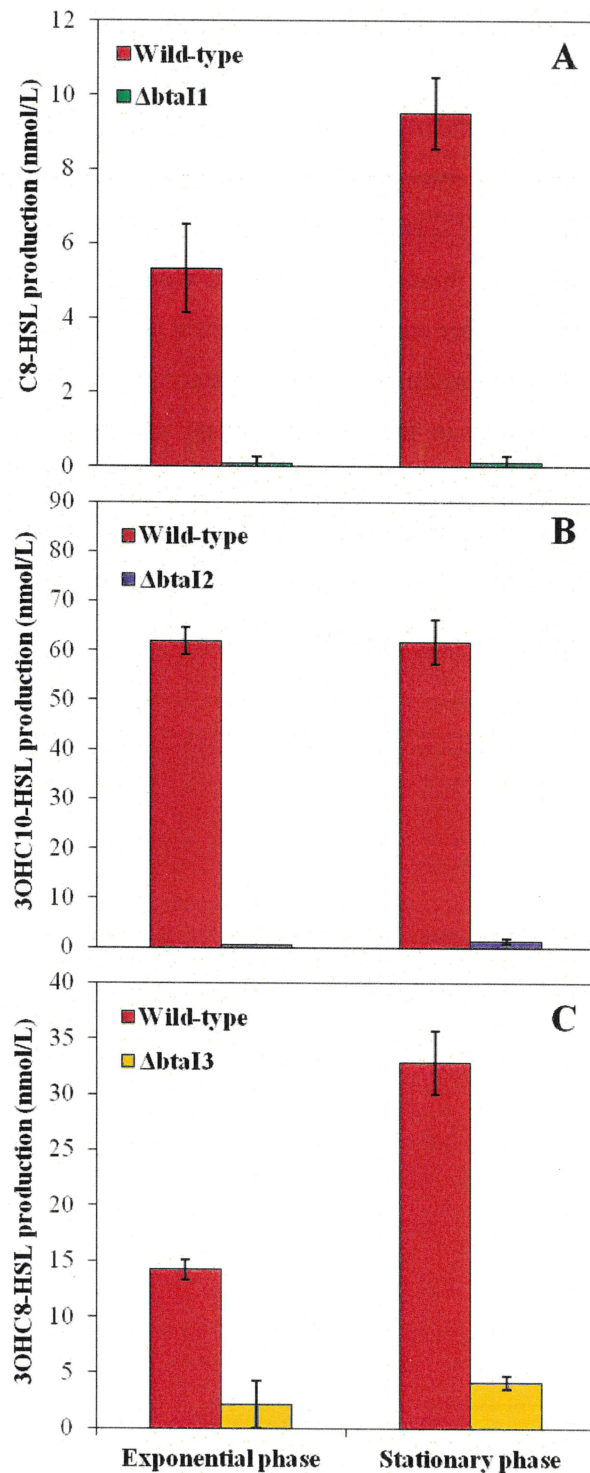


Figure 3.41. AHLs biosynthesis in the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and the $\Delta bta11$, $\Delta bta12$, and $\Delta bta13$ mutants.

The production of (A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL, and (C) 3OHC₈-HSL was quantified using LC-MS/MS during the exponential and stationary phases in cultures of the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and the (A) $\Delta bta11$, (B) $\Delta bta12$, and (C) $\Delta bta13$ mutants, respectively. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates.

We observed a dramatic overproduction of C₈-HSL in the *rsaM1*- mutant compared to the wild-type strain during the early (OD₆₀₀ ≈ 3.0) and late (OD₆₀₀ ≈ 5.0) exponential phases, indicating that RsaM1 represses the biosynthesis of C₈-HSL (**Fig. 3.42A**). The transcription of the *btaI1* gene was accordingly enhanced in the absence of RsaM1, suggesting that RsaM1 intervenes in the modulation of C₈-HSL production by regulating the transcription of *btaI1* (**Fig. 3.42C**). Interestingly, the impact of RsaM1 on C₈-HSL biosynthesis (approximately 200-fold) was larger than its effect on *btaI1* transcription (approximately 2-fold) (**Fig. 3.42**). We also detected a small, but reproducible, augmentation of C₈-HSL concentrations from the stationary phase (OD₆₀₀ ≈ 8.0) in the *rsaM2*- mutant compared to the wild-type strain, highlighting that the production of C₈-HSL is negatively modulated by RsaM2 as well (**Fig. 3.42B**). However, no discernible difference in the transcription of *btaI1* was detected in the absence of RsaM2 (**Fig. 3.42C**). Thus, the negative impact of RsaM2 on C₈-HSL production might not result from regulation of *btaI1* transcription.

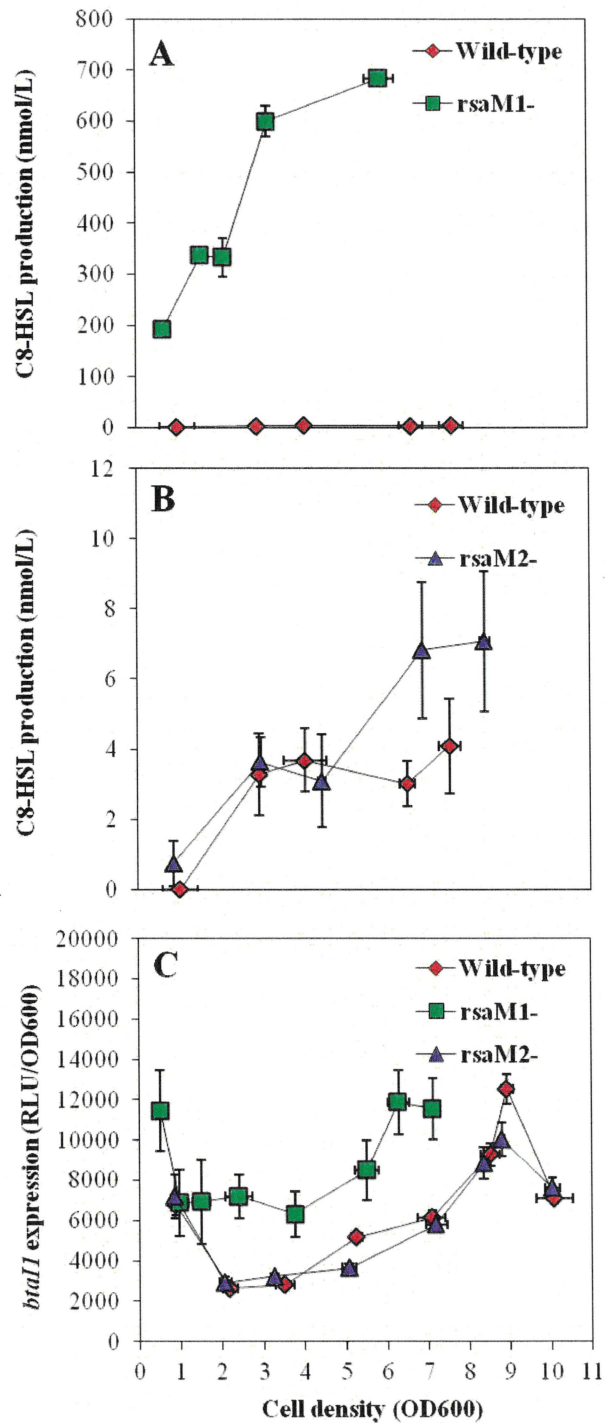


Figure 3.42. C₈-HSL biosynthesis and expression from the *btaI1* promoter in the wild-type and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264.

The production of C₈-HSL was quantified using LC-MS/MS at various times during growth in cultures of the wild-type and of the (A) *rsaM1*- and (B) *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (C) The luciferase activity of the chromosomal *btaI1-lux* transcriptional fusion was monitored in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

While 3OHC₁₀-HSL production, as well as the transcription of *btaI2*, were unaffected in the absence of RsaM1 (Fig. 3.43), the concentrations of 3OHC₁₀-HSL were strongly increased in the *rsaM2*- mutant in comparison with the wild-type strain throughout both the late exponential and stationary phases (Fig. 3.43A), and *btaI2* transcription was similarly upregulated (Fig. 3.43B). These data suggest that RsaM2 represses 3OHC₁₀-HSL biosynthesis by modulating the transcription of *btaI2*.

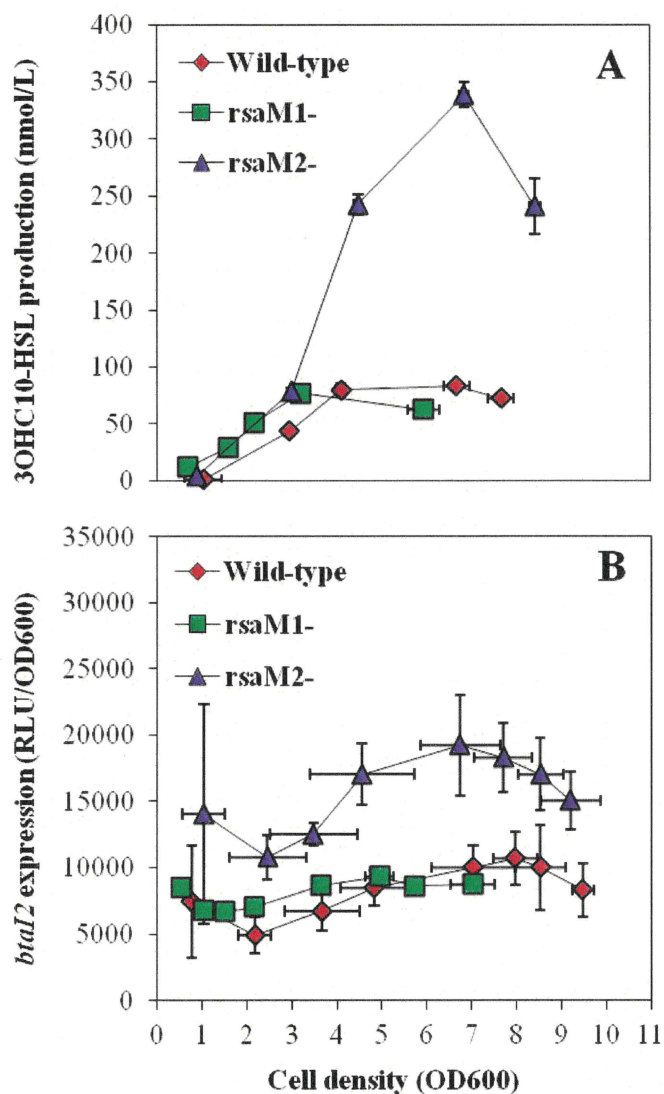


Figure 3.43. 3OHC₁₀-HSL biosynthesis and expression from the *btaI2* promoter in the wild-type and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264.

(A) The production of 3OHC₁₀-HSL was quantified using LC-MS/MS at various times during growth in cultures of the wild-type and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The luciferase activity of the chromosomal *btaI2-lux* transcriptional fusion was monitored in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

The levels of 3OHC₈-HSL were also higher from the logarithmic growth in the *rsaM1*-mutant compared to the wild-type strain (**Fig. 3.44A**). Unexpectedly, the transcription of the *btaI3* gene was not increased, suggesting that the negative impact of RsaM1 on 3OHC₈-HSL production does not involve regulation of *btaI3* transcription (**Fig. 3.44C**). Additionally, 3OHC₈-HSL concentrations were augmented during the stationary phase in the *rsaM2*-mutant in comparison with the wild-type strain, showing that the production of 3OHC₈-HSL is repressed by RsaM2 as well (**Fig. 3.44B**). Nevertheless, no visible change in the transcription of *btaI3* was noticed in the absence of RsaM2, revealing that the RsaM2-dependent control on 3OHC₈-HSL biosynthesis might not be linked to modulation of *btaI3* transcription (**Fig. 3.44C**).

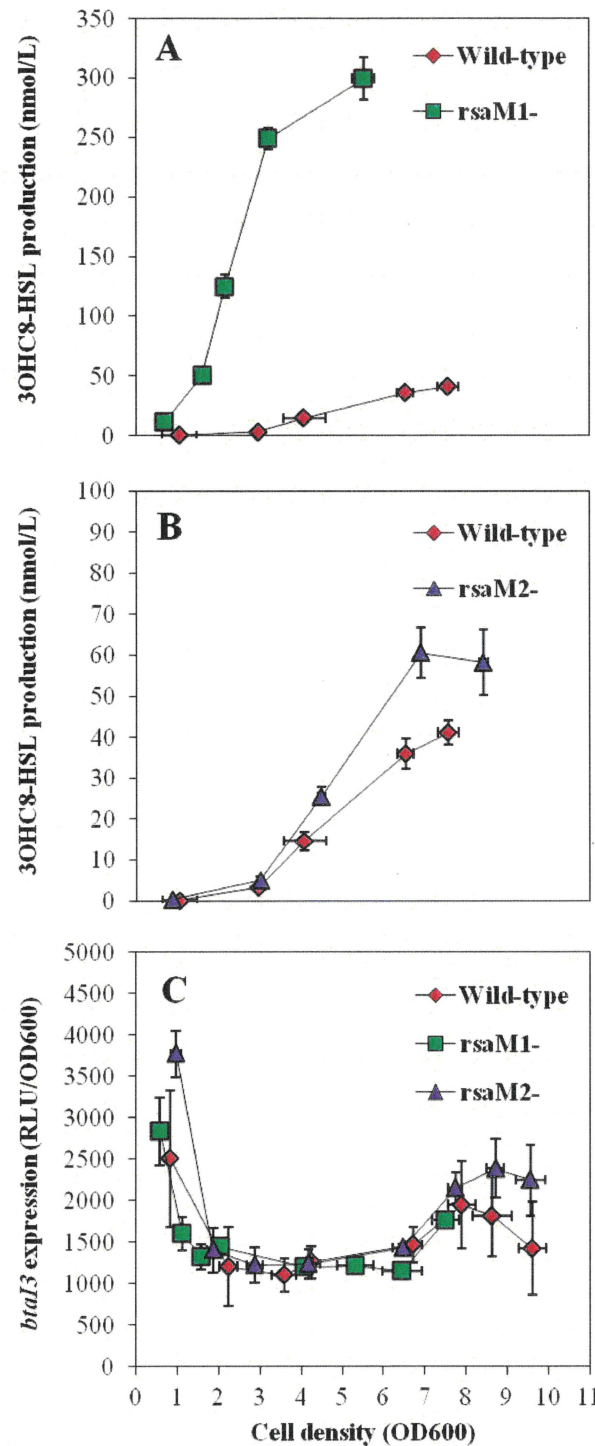


Figure 3.44. 3OHC₈-HSL biosynthesis and expression from the *btaI3* promoter in the wild-type and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264.

The production of 3OHC₈-HSL was quantified using LC-MS/MS at various times during growth in cultures of the wild-type and of the (A) *rsaM1*- and (B) *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (C) The luciferase activity of the chromosomal *btaI3-lux* transcriptional fusion was monitored in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

While the concentrations of both C₈-HSL and 3OHC₈-HSL were enhanced in the *rsaM1*- mutant background, the impact on C₈-HSL biosynthesis was more pronounced than the effect on 3OHC₈-HSL production (**Figs. 3.45A and B**). Additionally, the amounts of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL were all increased in the *rsaM2*- mutant background, however, 3OHC₁₀-HSL levels were the most affected (**Figs. 3.45A and C**). Collectively, these findings indicate that RsaM1 mainly represses the QS-1 system, whereas RsaM2 principally represses the QS-2 system.

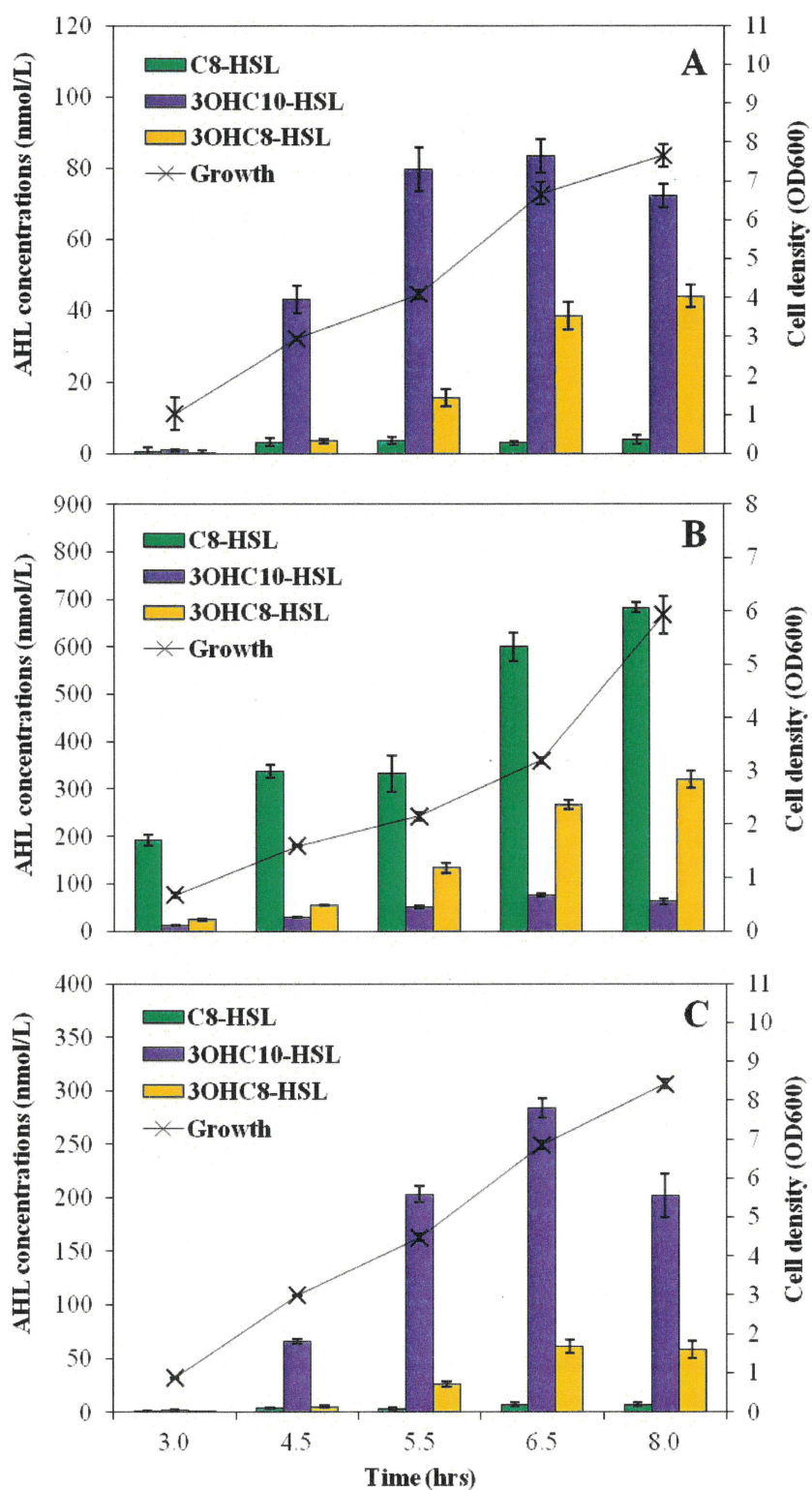


Figure 3.45. AHL production profiles in the wild-type and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264.

The biosynthesis of AHLs (bars) was monitored by LC-MS/MS at various times during growth (lines) in cultures of (A) the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and (B) *rsaM1*- and (C) *rsaM2*- mutant strains. The values represent the means for three replicates.

3.2.5.3. RsaM1 negatively regulates the *btaR1* gene transcription but the transcription of the *btaR2* gene is not modulated by RsaM2

In order to determine whether the impact of RsaM1 and RsaM2 on AHLs biosynthesis also implicates the BtaR1, BtaR2, and BtaR3 transcriptional regulators, we monitored the levels of expression of *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3*, respectively, by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) in the wild-type strain and in the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants of *B. thailandensis* E264 during the exponential phase of the bacterial growth. We observed an increase in *btaR1* transcription in the absence of RsaM1 (**Fig. 3.46A**), but no significant variation was noticed in the *rsaM2*- mutant compared to the wild-type strain (**Fig. 3.46A**), correlating with the transcription profiles of *btaII* in these backgrounds (**Fig. 3.47**). Thus, the transcription of both *btaR1* and *btaII* is negatively regulated by RsaM1, suggesting that the negative impact of RsaM1 on the production of C₈-HSL involves regulation of *btaR1* and *btaII* transcription, whereas RsaM2 does not apparently impact the QS-1 system genes transcription to repress C₈-HSL biosynthesis.

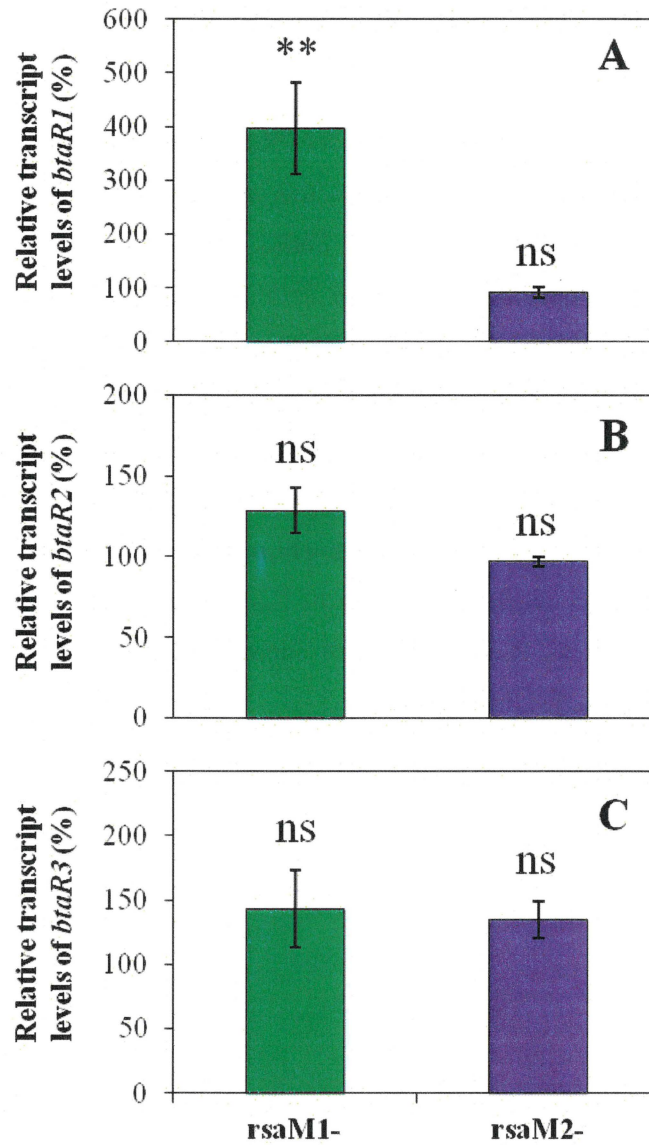


Figure 3.46. RsaM1 negatively regulates the transcription of *btaR1* but *btaR2* transcription is not modulated by RsaM2.

The relative transcript levels of (A) *btaR1*, (B) *btaR2*, and (C) *btaR3* were assessed by qRT-PCR in cultures of the wild-type and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The values are means \pm standard deviations (error bars) for three replicates. Values that are significantly different are indicated by brackets and asterisks as follows: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$. Values that are not significantly different (ns) are also indicated.

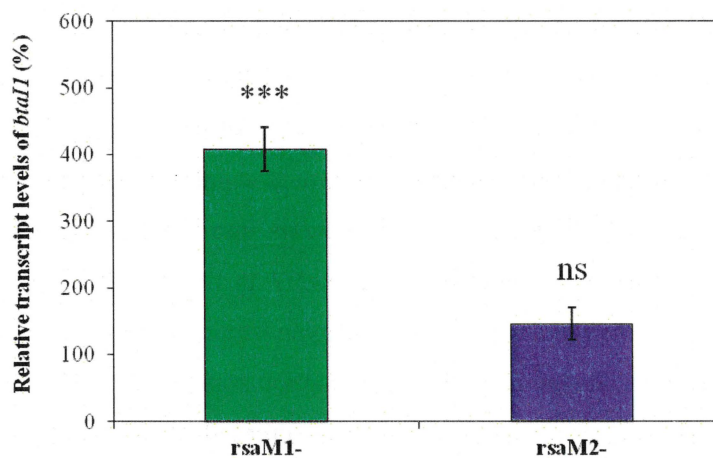


Figure 3.47. The impact of RsaM1 and RsaM2 on *btaI1* transcription.

The relative transcript levels of *btaI1* were assessed by qRT-PCR in cultures of the wild-type and the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The values represent the means for three replicates. ***, $P < 0.001$; ns, nonsignificant.

Furthermore, no significant difference was detected in *btaR2* transcription in both the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains compared to the wild-type strain, showing that neither RsaM1 nor RsaM2 modulate the transcription of *btaR2* (Fig. 3.46B). Consequently, while RsaM1 seems to have no effect on the QS-2 system, the RsaM2-dependent control on 3OHC₁₀-HSL biosynthesis is not likely linked to regulation of *btaR2* transcription and therefore appears to solely result from modulation of *btaI2* transcription. Moreover, neither RsaM1 nor RsaM2 had a significant impact on the transcription of *btaR3* (Fig. 3.46C). These observations indicate that the production of 3OHC₈-HSL is not controlled by RsaM1 and RsaM2 through modulation of the transcription of the QS-3 system genes.

3.2.5.4. The *rsaM1* and *rsaM2* genes are QS-controlled

The transcription of the *rsaM2* gene was reported to be activated by QS, but not the *rsaM1* gene transcription (Majerczyk *et al.*, 2014a). Our transcriptomic analyses indicate that QS indeed stimulates *rsaM2* transcription, as well as the transcription of *rsaM1* (cf. les Annexes, page 317).

In order to ascertain that the transcription of *rsaM1* is positively controlled by QS, we monitored *rsaM1* transcription by qRT-PCR in the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and in the AHL-defective $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant supplemented with exogenous AHLs or not

supplemented with AHLs during the logarithmic growth phase. We observed that expression of *rsaMI* was reduced in the absence of AHLs (**Fig. 3.48A**), confirming that QS stimulates *rsaMI* transcription. Furthermore, the transcription of *rsaMI* was significantly enhanced in cultures of the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant background supplemented with C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL (**Fig. 3.48A**). To gain insights into the QS-dependent regulation of *rsaMI*, we also measured the transcription of *rsaMI* in the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutants versus the *B. thailandensis* E264 wild-type strain during the logarithmic growth phase. While no obvious change in *rsaMI* transcription was visible in the absence of neither BtaR2 nor BtaR3, the transcription of *rsaMI* was decreased in the $\Delta btaR1$ mutant compared to the wild-type strain (**Fig. 3.48B**). Taken together, these data indicate that the transcription of *rsaMI* is positively regulated by the QS-1 system, whereas the QS-2 and QS-3 systems are not likely involved in the modulation of *rsaMI* transcription.

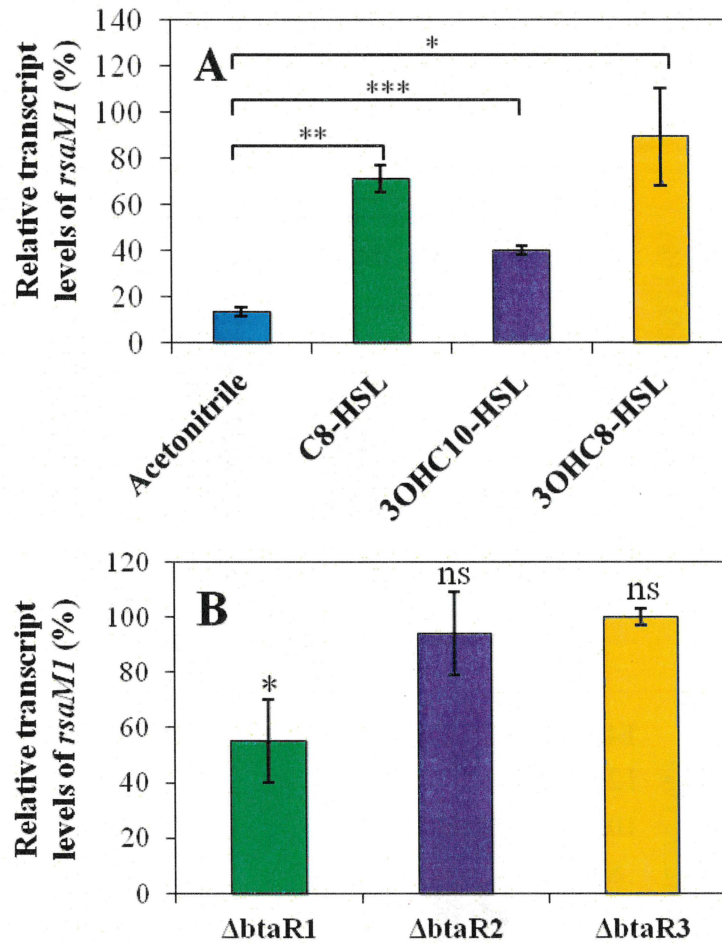


Figure 3.48. QS positively regulates *rsaM1* transcription.

(A) The relative transcript levels of *rsaM1* from the *B. thailandensis* E264 wild-type and its $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant strains were estimated by qRT-PCR. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The relative transcript levels of *rsaM1* were assessed by qRT-PCR in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, nonsignificant.

The transcription of *rsaM2* was lowered in the absence of AHLs (Fig. 3.49A), confirming that the *rsaM2* gene is activated by QS as well. Moreover, *rsaM2* transcription was significantly enhanced in cultures of the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant background supplemented with 3OHC₁₀-HSL or 3OHC₈-HSL (Fig. 3.49A). Interestingly, we observed that the transcription of *rsaM2* was also downregulated in the $\Delta btaR2$ mutant compared to the wild-type strain, meaning that the *rsaM2* gene is positively controlled by BtaR2, whereas no discernible difference in *rsaM2* transcription was detected in the absence of neither BtaR1 nor BtaR3 (Fig. 3.49B). Altogether, our results indicate that the transcription of *rsaM2* is

positively modulated by the QS-2 system, whereas the QS-1 and QS-3 systems do not apparently intervene in the regulation of *rsaM2* transcription.

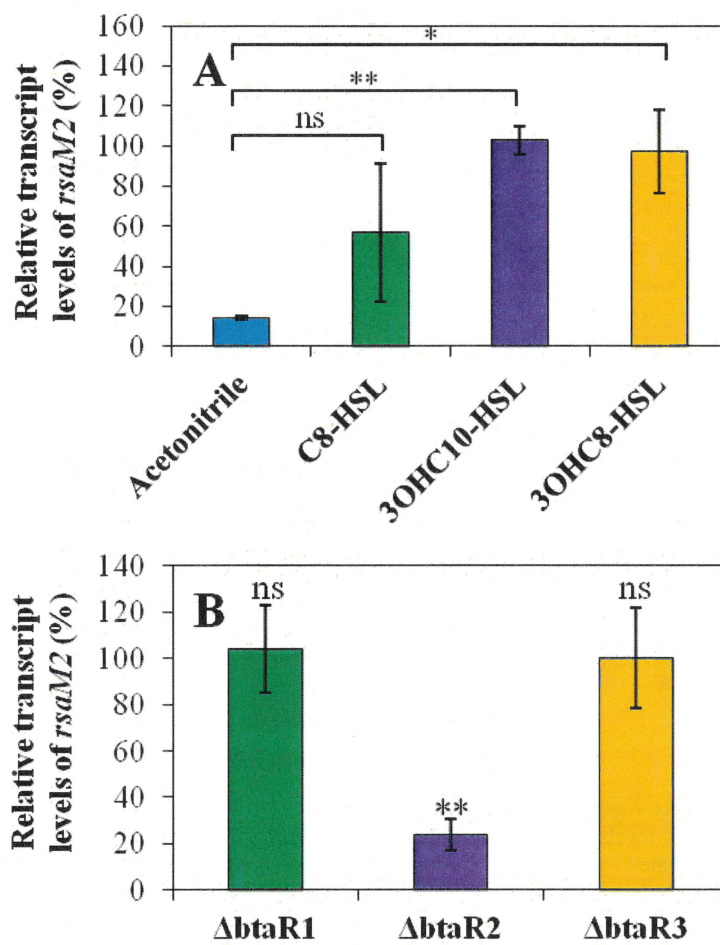


Figure 3.49. The transcription of *rsaM2* is activated by QS.

(A) The relative transcript levels of *rsaM2* from the *B. thailandensis* E264 wild-type and its $\Delta bta11\Delta bta12\Delta bta13$ mutant strains were monitored by qRT-PCR. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The relative transcript levels of *rsaM2* were quantified by qRT-PCR in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, nonsignificant.

Collectively, these observations highlight that the transcription of *rsaM1* is activated by the QS-1 system, which is negatively regulated by RsaM1, whereas *rsaM2* transcription is stimulated by the QS-2 system, which is negatively regulated by RsaM2, showing that these repressors are deeply integrated into the QS modulatory network of *B. thailandensis* E264.

3.2.5.5. *rsaM1* and *rsaM2* are negatively autoregulated

To further explore the RsaM1 and RsaM2 molecular mechanism of action, the levels of expression of *rsaM1* and *rsaM2* were assessed by qRT-PCR in the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and in the *rsaM1*- and *rsaM2*- mutants during the exponential phase of the bacterial growth. The transcription of *rsaM1* was strongly increased in the absence of RsaM1 (Fig. 3.50A), and the same was observed for *rsaM2* transcription in the *rsaM2*- mutant compared to the wild-type strain (Fig. 3.50B). However, the absence of RsaM2 had no impact on *rsaM1* transcription (Fig. 3.50A), and the transcription of *rsaM2* was unchanged in the *rsaM1*- mutant in comparison with the wild-type strain (Fig. 3.50B). Altogether, our results indicate that RsaM1 and RsaM2 repress their own transcription, but do not influence each other.

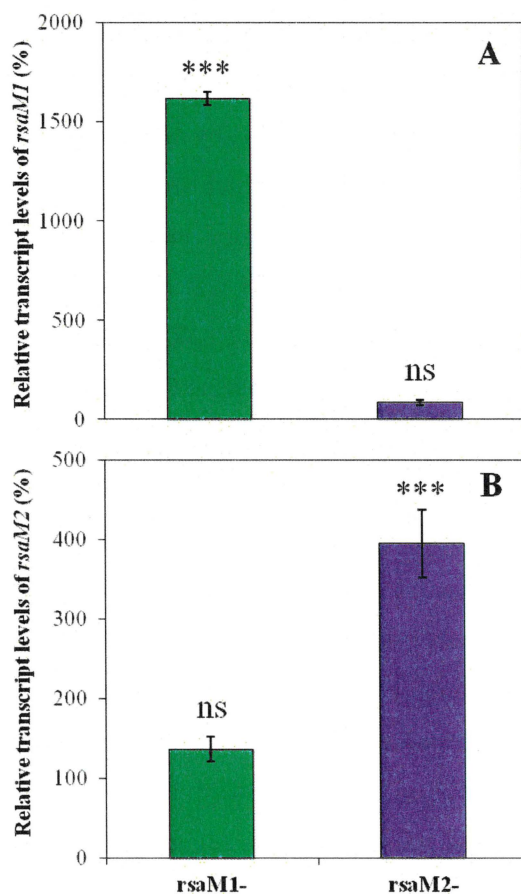


Figure 3.50. The *rsaM1* and *rsaM2* genes are negatively autoregulated.

The relative transcript levels of (A) *rsaM1* and (B) *rsaM2* from the wild-type *B. thailandensis* E264 strain and its *rsaM1*- and *rsaM2*- mutant strains were estimated by qRT-PCR. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The error bars represent the standard deviations for three replicates. ***, $P < 0.001$; ns, nonsignificant.

3.2.6. Discussion

While the function of RsaM-like proteins was previously investigated in a few *Burkholderia* species (Chen *et al.*, 2012, Inhülsen, 2011, Michalska *et al.*, 2014), their involvement in the complex organization of the multiple QS circuitries found in the closely related species of the *Burkholderia pseudomallei-thailandensis-mallei* (*Bptm*) group had not been addressed. Here, we initiated the study of the two *rsaM* homologues present on the genome of *B. thailandensis* E264.

The *rsaM1* gene, which is divergently transcribed from *btaR1* and oriented in the same direction as *btaI1*, encodes an RsaM-like protein initially characterized in the plant pathogen *P. fuscovaginae* (Chen *et al.*, 2012, Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012, Inhülsen, 2011, Michalska *et al.*, 2014, Venturi *et al.*, 2011) (**Figs. 3.37A and B**). The RsaM protein of *P. fuscovaginae* UPB0736 was reported to negatively control the AHL-based QS systems PfsI/PfsR and PfvI/PfvR (Mattiuzzo *et al.*, 2011, Venturi *et al.*, 2011). It is hypothesized to directly repress the transcription of the LuxI-type synthases PfsI- and PfvI-encoding genes. However, it could also act indirectly, for instance, by inhibiting the functionality of the LuxR-type transcriptional regulators PfsR and PfvR, which are required for activation of the *pfsI* and *pfvI* genes transcription, respectively. In the Bcc member *Burkholderia cenocepacia*, an RsaM-like protein homologue, namely, *BcRsaM* was described as an important repressor of the production of C₈-HSL affiliated to the CepI/CepR QS system, and proposed to regulate the activity and/or stability of the LuxI-type synthase CepI and the LuxR-type transcriptional regulator CepR, as well as the orphan LuxR-type transcriptional regulator CepR2 (Inhülsen, 2011, Michalska *et al.*, 2014). The *B. cenocepacia* H111 *cepI*, *cepR*, and *cepR2* genes transcription was shown to be lowered in the *rsaM*- mutant in comparison with the wild-type strain (Inhülsen, 2011). However, in *B. thailandensis* E264, we found that the transcription of *btaI1* and *btaR1* was both increased in the absence of RsaM1 (**Figs. 3.42C and 3.46A**), correlating with the accumulation of C₈-HSL in this background (**Fig. 3.42A**). Consequently, RsaM1 could repress the transcription of *btaI1* and *btaR1*, suggesting that its mode of action in *B. thailandensis* E264 differs from that of *BcRsaM*. However, we noticed that the impact of RsaM1 on C₈-HSL biosynthesis was dramatically higher than its effect on *btaI1* transcription, which hints that RsaM1 could also act at posttranscriptional levels, as proposed for *BcRsaM*. Thus, RsaM1 could directly repress the transcription of the *btaI1* and *btaR1* genes, or indirectly, for instance, by modulating the activity and/or stability of BtaI1, or by controlling

the functionality of BtaR1. This demonstrates that while BtaR1 is considered the principal regulator of *btaI1* transcription, RsaM1 plays a major role in modulating the production of C₈-HSL (**Fig. 3.51**). Strikingly, the absence of RsaM1 was associated with a growth defect in TSB medium (**Fig. 3.39**), and leads to an aggregative growth phenotype in modified M9 medium (**Fig. 3.40**). This could be linked to the prominent levels of C₈-HSL produced in the *rsaM1*- mutant compared to the wild-type strain, and thus overactivation of phenotypes controlled by the QS-1 system such as auto-aggregation, biofilm development, and oxalate production (Chandler *et al.*, 2009, Goo *et al.*, 2015, Goo *et al.*, 2012, Majerczyk *et al.*, 2014a, Tseng *et al.*, 2016).

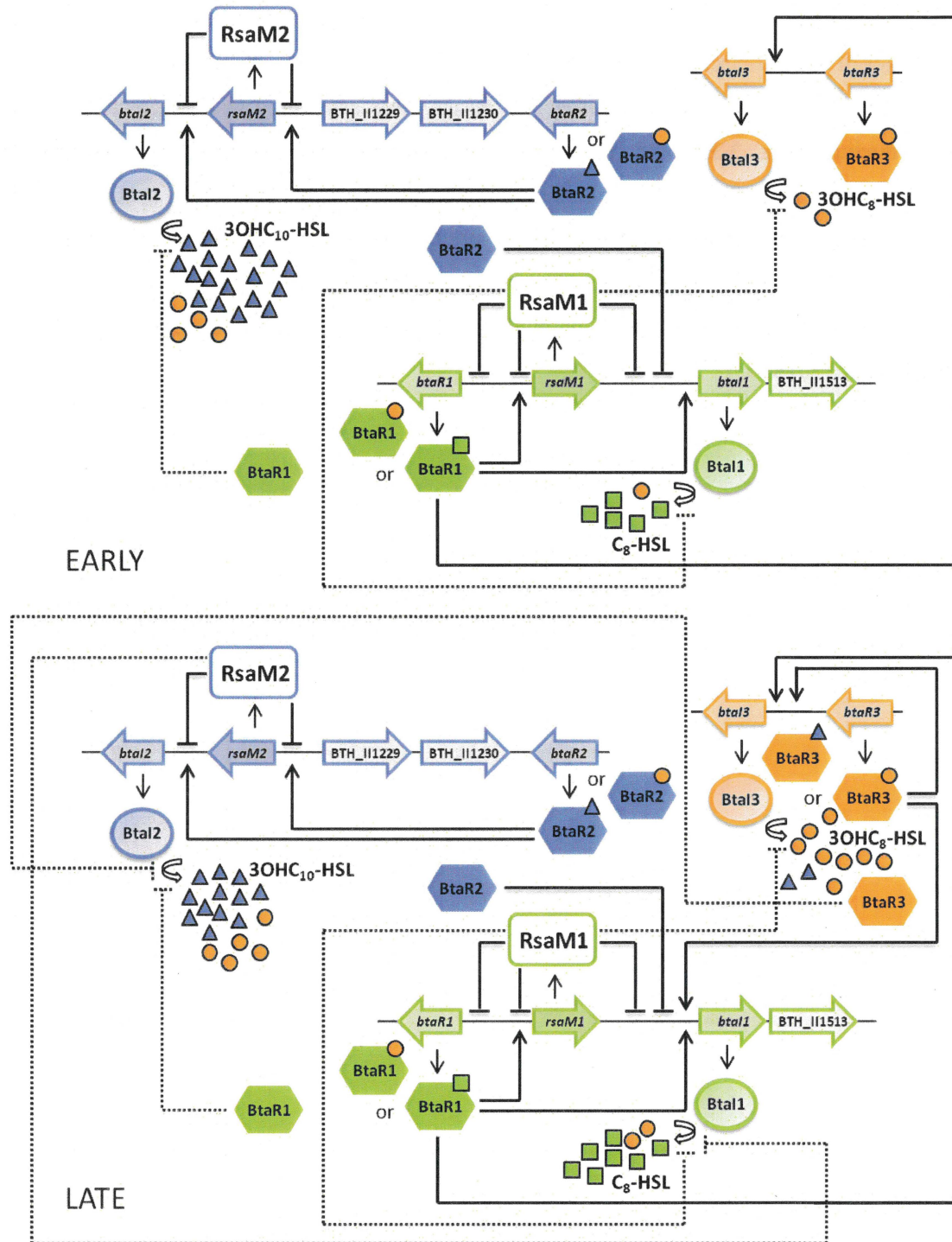


Figure 3.51. Proposed involvement of RsaM1 and RsaM2 in the QS circuitry of *B. thailandensis* E264. The QS-1 system is composed of the Bta1 synthase, which is principally responsible for C₈-HSL biosynthesis (Chandler *et al.*, 2009), and is hypothesized to produce 3OHC₈-HSL, as well as the BtaR1 transcriptional regulator that stimulates the transcription of *bta11* in association with C₈-HSL (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a). The Bta2 synthase, which synthesizes both 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2009), as well as the BtaR2 transcriptional regulator that activates *bta2* transcription in conjunction with these AHL signaling molecules (Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a), constitute the QS-2 system. Furthermore, the QS-1 and QS-2 systems contain *rsaM* homologues designated *rsaM1* and *rsaM2*, respectively. The RsaM1 protein mainly represses the production of C₈-HSL. It could act

directly by repressing the transcription of *btaI1* and *btaR1*, or indirectly, for instance, by modulating the activity and/or stability of BtaI1, or by controlling the functionality of BtaR1. The RsaM2 protein principally represses the production of 3OHC₁₀-HSL, as well as *btaI2* transcription, but not the transcription of *btaR2*. The *rsaM1* and *rsaM2* genes are negatively autoregulated and activated by the QS-1 and QS-2 systems, respectively, showing an important homeostatic modulation of AHLs biosynthesis. Moreover, an interdependence between the QS-1 and QS-2 systems was observed. The production of C₈-HSL, as well as *btaI1* transcription, but not the transcription of *btaR1*, are indeed negatively controlled by BtaR2 (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Since RsaM2 seems to have no impact on the transcription of *btaI1* and *btaR1*, the negative modulation of C₈-HSL biosynthesis by RsaM2 might involve other regulatory elements, underscoring an additional modulatory layer connecting the QS-1 and QS-2 systems. While neither the transcription of *btaI2* nor *btaR2* transcription are under BtaR1 control, BtaR1 appears to repress the production of 3OHC₁₀-HSL (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a). Similarly, 3OHC₁₀-HSL biosynthesis was shown to be negatively controlled by the QS-3 system (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a), which is composed of the BtaI3 synthase and the BtaR3 transcriptional regulator. BtaI3 is mainly responsible for 3OHC₈-HSL biosynthesis (Chandler *et al.*, 2009), and is hypothesized to produce 3OHC₁₀-HSL (Le Guillouzer *et al.*, 2017), whereas the transcription of *btaI3* is stimulated by BtaR3 in association with 3OHC₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL (Le Guillouzer *et al.*, 2017). An interdependence between the QS-1 and QS-3 systems was observed as well since *btaI3* transcription is likely activated by BtaR1/C₈-HSL from the exponential phase, and BtaR3, in conjunction with 3OHC₈-HSL and 3OHC₁₀-HSL, was suggested to positively modulate the transcription of *btaI1* from the stationary phase (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Additionally, RsaM1 could repress the production of 3OHC₈-HSL by targeting the QS-1 and/or QS-3 systems, thus further connecting these QS circuitries.

We recently reported that the transcription of *btaI1* is activated by BtaR1/C₈-HSL, meaning that the QS-1 system is positively autoregulated (Le Guillouzer *et al.*, 2017) (**Fig. 3.51**). We indeed confirmed that *btaI1* transcription is downregulated in the Δ *btaR1* mutant when compared to the wild-type strain (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a). However, we observed an accumulation of C₈-HSL in the absence of BtaR1 (Le Guillouzer *et al.*, 2017). We thus hypothesized that additional regulatory elements are involved in the modulation of C₈-HSL production (Le Guillouzer *et al.*, 2017). The finding that BtaR1, as well as C₈-HSL, activate the transcription of *rsaM1* might explain why more production of C₈-HSL is detected in the absence of BtaR1 (**Fig. 3.48**). In fact, it is possible that the mutation in *btaR1*, which appears to affect *rsaM1* transcription, results indirectly in C₈-HSL overproduction. Moreover, it reveals that the QS-1 system is also negatively autoregulated through RsaM1, presumably counteracting with the positive feedback loop mediated by BtaR1/C₈-HSL for the biosynthesis of C₈-HSL. This could be necessary to modulate the QS response depending on specific environmental conditions, as previously suggested for other negative regulators of QS. For instance, the QteE and RsaL repressors in the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* are known to modulate the timing and the extent of the QS response and likely increase *P. aeruginosa* phenotypic plasticity and population fitness, ultimately facilitating colonization of challenging environments including higher organisms (Bondi *et al.*, 2014, de Kievit *et al.*, 1999, Gupta *et al.*, 2013, Rampioni *et al.*, 2006, Rampioni *et al.*, 2007a, Rampioni *et al.*, 2007b, Siehnel *et al.*, 2010, Venturi *et al.*,

2011). The RsaL protein is also found ubiquitously in the group of nonpathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp., such as *Burkholderia kururiensis*, and its role is hypothesized to be a switch to turn on/off the AHL signaling system upon varying environmental conditions (Suarez-Moreno *et al.*, 2008, Venturi *et al.*, 2011). We found a putative *lux* box sequence in the promoter region of *rsaM1* that might be specifically recognized by BtaR1/C₈-HSL to stimulate *rsaM1* transcription (**Fig. 3.37C**). Consistently, the CepR transcriptional regulator of *B. cenocepacia* K56-2 was shown to positively and directly control the transcription of the *rsaM* gene in association with C₈-HSL (O'Grady *et al.*, 2009, Wei *et al.*, 2011). Nevertheless, *rsaM1* displayed different transcriptional profiles in the $\Delta btaR1$ mutant and in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant backgrounds (**Fig. 3.48**), indicating that the QS-dependent regulation of *rsaM1* transcription might be more complex and will need further investigation.

We suppose that RsaM1 does not control the QS-2 system since neither the biosynthesis of 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 3.43A**), which we confirmed constitutes the main AHL produced by BtaI2 (Duerkop *et al.*, 2009) (**Fig. 3.41B**), nor the transcription of *btaI2* and *btaR2* are impacted in the *rsaM1*- mutant compared to the wild-type strain (**Figs. 3.43B and 3.46B**). Therefore, we must deduce that the effect of RsaM1 on 3OHC₈-HSL production (**Fig. 3.44A**), which is also synthesized by BtaI2 (Duerkop *et al.*, 2009), does not result from regulation of the QS-2 system and might rather involve modulation of the QS-1 and/or QS-3 systems. We indeed confirmed that BtaI3 principally synthesizes 3OHC₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009) (**Fig. 3.41C**). However, RsaM1 seems to have no impact on *btaI3* and *btaR3* transcription (**Figs. 3.44C and 3.46C**). An explanation could be that RsaM1 indirectly modulates the QS-3 system through the control of other regulatory elements that would affect the production of 3OHC₈-HSL, and thus further connecting the QS-1 and QS-3 systems in *B. thailandensis* E264 that were shown to be transcriptionally linked (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a) (**Fig. 3.51**). Interestingly, the QS repressor RsaM of *P. fuscovaginae* UPB0736 was reported to control several genes encoding transcriptional factors and could consequently intervene directly in the modulation of gene expression, as well as indirectly via auxiliary regulators (Uzelac *et al.*, 2017, Venturi *et al.*, 2011). In order to further understand the molecular mechanism of action of RsaM1, we propose to define the RsaM1 regulon, for instance, by performing RNA-Seq analyses and/or Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq) analyses. Still, it is also conceivable that RsaM1 affects 3OHC₈-HSL biosynthesis by directly regulating the QS-1 system. In fact, 3OHC₈-HSL could be produced

via BtaI1 in the wild-type strain in concentrations under our detection limit, and that those levels become now detectable in the QS-1 system-boosted *rsaM1*- mutant. We previously reported that, besides C₈-HSL, the homologue of this AHL synthase can produce trace amounts of 3OHC₈-HSL in the Bcc member *Burkholderia ambifaria* (Chapalain *et al.*, 2017). Additionally, the *B. pseudomallei* KHW BpsI and *Burkholderia mallei* ATCC 23344 BmaI1 synthases, which are homologous to BtaI1 (Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c, Ulrich *et al.*, 2004d), were both shown to produce 3OHC₈-HSL in addition to C₈-HSL, albeit to lower concentrations (Duerkop *et al.*, 2007, Gamage *et al.*, 2011), and the *B. pseudomallei* KHW BpsR and *B. mallei* ATCC 23344 BmaR1 transcriptional regulators, which are homologous to BtaR1 (Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c, Ulrich *et al.*, 2004d), were reported to specifically respond to both C₈-HSL and 3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2007, Gamage *et al.*, 2011). Accordingly, the BtaR1-controlled genes identified in transcriptomic analyses were generally affected by both C₈-HSL and 3OHC₈-HSL (Majerczyk *et al.*, 2014a). This would then explain why these AHLs exhibit similar production profiles (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Additional experiments will however be necessary to confirm the possible production of 3OHC₈-HSL by BtaI1.

The *rsaM2* gene, which is found directly adjacent to *btaI2* and is transcribed in the same direction, encodes an additional RsaM-like protein (Figs. 3.37A and B). The transcription of *btaI2* and 3OHC₁₀-HSL production, are activated by BtaR2 that constitutes the main regulator of the QS-2 system (Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a). Additionally, we demonstrated that the QS-2 system is negatively modulated by RsaM2 (Fig. 3.43), whereas the transcription of *rsaM2* is stimulated by the QS-2 system (Fig. 3.49). Consequently, while *btaI2* transcription is directly activated by BtaR2, it seems that BtaR2 also represses the transcription of *btaI2* indirectly through RsaM2 control (Fig. 3.51). We assume that the negative regulation exerted by RsaM2 restrains the QS-2 system response by limiting the self-inducing loop that leads to the accumulation of 3OHC₁₀-HSL, showing again an important homeostatic modulation of AHLs production in *B. thailandensis* E264. The negative impact of RsaM2 on the production of 3OHC₈-HSL, as for the RsaM2-dependent regulation of 3OHC₁₀-HSL biosynthesis, might result from modulation of *btaI2* transcription (Fig. 3.51). Remarkably, we noticed that the production of 3OHC₁₀-HSL is repressed by RsaM2 from the exponential phase (Fig. 3.43A), whereas 3OHC₈-HSL biosynthesis is repressed by RsaM2 from the stationary phase (Fig. 3.44B). This is consistent with our proposal that 3OHC₈-HSL is produced by BtaI2 at the expense of 3OHC₁₀-HSL in

the stationary phase (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Since the transcription of neither *btaI3* nor *btaR3* seems to be under RsaM2 control, we conclude that RsaM2 does not influence 3OHC₈-HSL biosynthesis by modulating the QS-3 system genes transcription.

It is not clear how C₈-HSL biosynthesis is repressed by RsaM2 when no matching overexpression of *btaI1* is observed in the absence of RsaM2 (**Figs. 3.42B and C**), as we confirmed the loss of C₈-HSL production in the $\Delta btaI1$ mutant in comparison with the wild-type strain, indicating that this AHL is exclusively synthesized by BtaI1 (Chandler *et al.*, 2009) (**Fig. 3.41A**). We recently reported that the QS-1 and QS-2 systems are transcriptionally linked (Le Guillouzer *et al.*, 2017), and we indeed determined that C₈-HSL biosynthesis and the transcription of *btaI1*, but not *btaR1* transcription, are repressed by BtaR2 (**Fig. 3.52**). Therefore, while the QS-2 system appears to directly repress the production of C₈-HSL by modulating *btaI1* transcription, it is possible that C₈-HSL biosynthesis is also negatively and indirectly controlled by the QS-2 system, underscoring an additional modulatory layer connecting the QS-1 and QS-2 systems in *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.51**). In fact, the negative impact of RsaM2 on the production of C₈-HSL could involve additional transcriptional and/or posttranscriptional regulators. More experiments will thus be necessary to determine the precise underlying molecular mechanism of action of RsaM2.

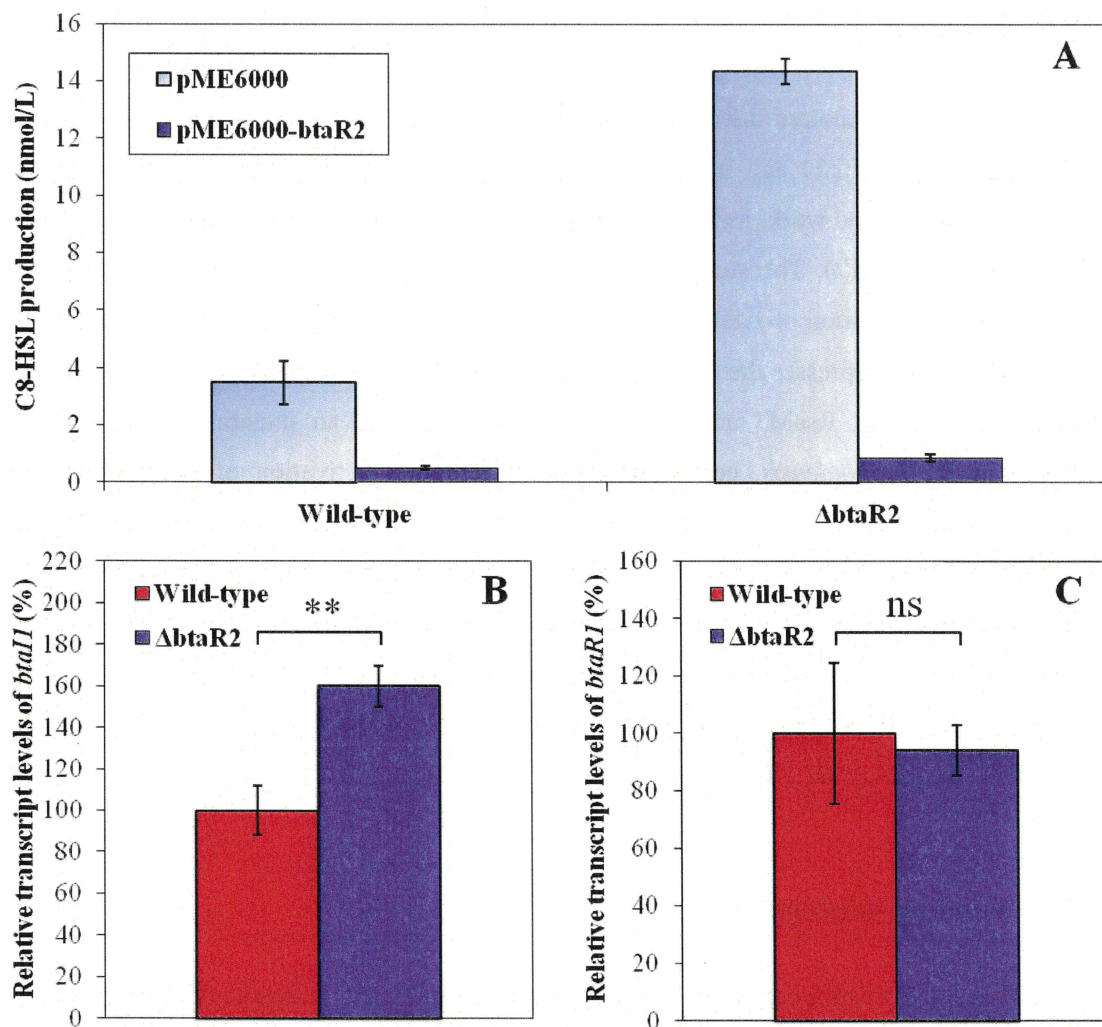


Figure 3.52. The biosynthesis of C₈-HSL and *btaI1* transcription are negatively regulated by BtaR2. (A) C₈-HSL production was quantified using LC-MS/MS during the logarithmic growth in cultures of the wild-type strain and the $\Delta btaR2$ mutant strain of *B. thailandensis* E264 carrying either pME6000 (light bars) or pME6000-*btaR2* (dark bars). The values represent the means for three replicates. The relative transcript levels of (B) *btaI1* and (C) *btaR1* from the wild-type *B. thailandensis* E264 strain and its $\Delta btaR2$ mutant strain were estimated by qRT-PCR during the logarithmic growth. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. **, $P < 0.01$; ns, nonsignificant.

We demonstrated that RsaM1 and RsaM2 repress their own transcription (Fig. 3.50). Negative autoregulation of these repressors could be necessary to maintain AHLs at appropriate levels depending on particular environmental conditions, and likely further contributes to the hierarchical and homeostatic expression of the QS-1, QS-2, and QS-3 systems (Fig. 3.51).

3.2.7. Conclusion

We recently reported the complex organization of the QS-1, QS-2, and QS-3 systems in *B. thailandensis* E264 and we observed that these QS systems are integrated into an intricate modulatory network, including the required involvement of additional regulators (Le Guillouzer *et al.*, 2017). The study described here uncovers the central role of RsaM1 and RsaM2 in the modulation of AHLs signaling in this bacterium (**Fig. 3.51**). We demonstrated that RsaM1 mainly represses the QS-1 system, whereas RsaM2 principally represses the QS-2 system. Additionally, RsaM1 and RsaM2 were shown to be an integral part of the QS circuitry in *B. thailandensis*, contributing to the temporal activation of its multiple QS systems by modulating the production of AHLs. The precise underlying molecular mechanism of action of these proteins is however currently unknown and has to be further investigated in the future given their importance in the regulation of QS-controlled genes in the *Burkholderia* genus and other Proteobacteria (Chen *et al.*, 2012, Choudhary *et al.*, 2013, Gelencsér *et al.*, 2012, Inhülsen, 2011, Mattiuzzo *et al.*, 2011, Michalska *et al.*, 2014, Uzelac *et al.*, 2017, Venturi *et al.*, 2011).

3.2.8. Funding information

This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grants MOP-97888 and MOP-142466 to Éric Déziel. Éric Déziel holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

3.2.9. Acknowledgments

We thank Everett Peter Greenberg (Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA) for providing the *B. thailandensis* E264 strains. We especially thank Sylvain Milot and François D'Heygere for their technical help.

3.2.10. Présentation des résultats additionnels de l'article « Two *rsaM* homologues encode central regulatory elements modulating quorum sensing in *Burkholderia thailandensis* »

Des expériences additionnelles ont été effectuées dans le cadre de l'étude du rôle des protéines RsaM1 et RsaM2 chez *B. thailandensis* E264 et sont présentées ici.

3.2.10.1. Détermination de l'impact des protéines RsaM1 et RsaM2 sur la transcription du gène de référence *ndh*

Des expériences de quantification de la transcription du gène de référence *ndh* ont été réalisées par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants *rsaM1*- et *rsaM2*- de *B. thailandensis* E264. Ces expériences montrent que les protéines RsaM1 et RsaM2 n'affectent pas la transcription du gène *ndh* (Fig. 3.53). Nous l'avons donc retenu pour la normalisation des données de qRT-PCR.

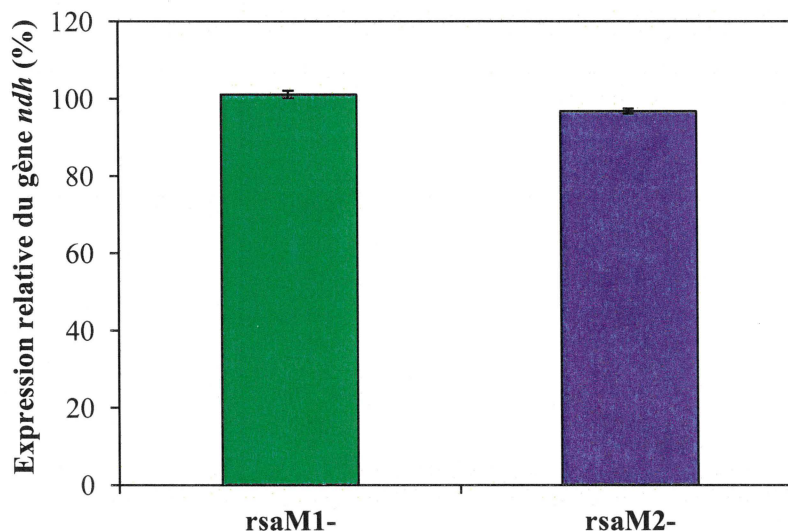


Figure 3.53. L'expression du gène de référence *ndh* est stable chez la souche sauvage et chez les mutants *rsaM1*- et *rsaM2*- de *B. thailandensis* E264.

L'expression relative du gène de référence *ndh* a été mesurée par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants *rsaM1*- et *rsaM2*- de *B. thailandensis* E264 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. L'expression du gène *ndh* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.2.10.2. Détermination de l'effet des synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 sur la production de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL

Afin de déterminer l'impact des synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 sur la biosynthèse des principales AHL retrouvées chez *B. thailandensis* E264, des expériences de quantification de la biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL ont été réalisées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$ et $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne.

3.2.10.2.1. La synthase BtaI1 synthétise essentiellement de la C₈-HSL

La C₈-HSL constitue la principale AHL synthétisée *via* la synthase BtaI1 chez *B. thailandensis* E264 (Chandler *et al.*, 2009). Les expériences de quantification de la production des AHL chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaI1$ de *B. thailandensis* E264 montrent effectivement que la synthase BtaI1 est essentiellement responsable de la biosynthèse de la C₈-HSL puisque l'inactivation du gène *btaI1* résulte en une abolition de la production de cette AHL au cours de la croissance bactérienne (Fig. 3.54).

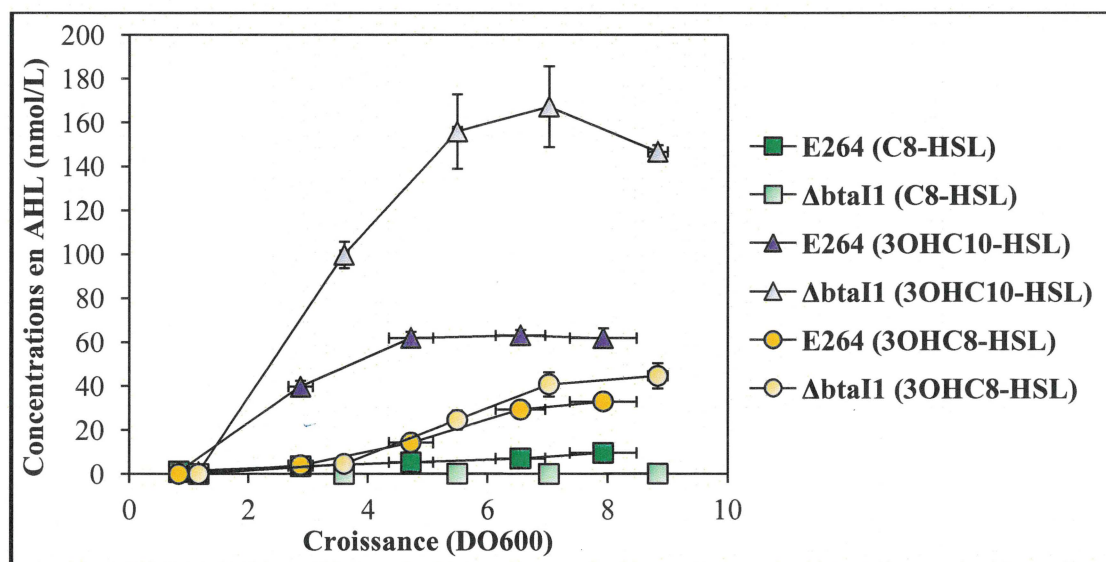


Figure 3.54. La synthase BtaI1 est principalement responsable de la production de la C₈-HSL.

Les concentrations en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage (courbes foncées) et chez le mutant $\Delta btaI1$ (courbes claires) de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Par ailleurs, l'inactivation du gène *btaI1* entraîne une forte surproduction de la 3OHC₁₀-HSL de même qu'une faible surproduction de la 3OHC₈-HSL (**Fig. 3.54**), suggérant que la C₈-HSL est impliquée dans la modulation de la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL (cf. la **Figure 3.4A** présentée à la section 3.1.5.2) et de la 3OHC₈-HSL (cf. la **Figure 3.5A** présentée à la section 3.1.5.2) dépendante du régulateur transcriptionnel BtaR1. Notre hypothèse est que le système BtaI1/BtaR1 contrôle négativement et indirectement la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL par l'intermédiaire de régulateurs transcriptionnels et/ou post-transcriptionnels tels que les protéines RsaM1 et RsaM2 (cf. la **Figure 3.51** présentée à la section 3.2.6). En outre, nous pensons que la synthase BtaI1 de *B. thailandensis* E264, similairement aux synthases BpsI de *B. pseudomallei* KHW et BmaI1 de *B. mallei* ATCC 23344 (Duerkop *et al.*, 2007, Gamage *et al.*, 2011), synthétise, dans une moindre mesure, de la 3OHC₈-HSL. D'autres expériences seront, en conséquence, indispensables afin de préciser le mécanisme de régulation de la production de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL *via* le système BtaI1/BtaR1 chez *B. thailandensis* E264.

3.2.10.2.2. La synthase BtaI2 synthétise essentiellement de la 3OHC₁₀-HSL

La 3OHC₁₀-HSL représente l' AHL majoritairement produite *via* la synthase BtaI2 chez *B. thailandensis* E264 (Duerkop *et al.*, 2009). Par ailleurs, Duerkop *et al.* (2009) ont rapporté que la synthase BtaI2 synthétise de la 3OHC₈-HSL, moins abondamment. Les expériences de quantification de la production des AHL chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaI2$ de *B. thailandensis* E264 attestent que la synthase BtaI2 est principalement responsable de la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 3.55**). En revanche, l'inactivation du gène *btaI2* n'entraîne pas une suppression de la production de la 3OHC₈-HSL au cours de la croissance bactérienne (**Fig. 3.55**). Ainsi, cette AHL n'est pas synthétisée essentiellement *via* la synthase BtaI2. Similairement, Gamage *et al.* (2011) ont démontré que la synthase BpsI2 de *B. pseudomallei* KHW synthétise principalement de la 3OHC₁₀-HSL ainsi que, dans une moindre mesure, de la 3OHC₈-HSL. Toutefois, l'inactivation du gène *bpsI2* résulte en une abolition de la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL, tandis que la production de la 3OHC₈-HSL est inchangée (Gamage *et al.*, 2011). Chez *B. pseudomallei* MSHR520, Horton *et al.* (2013) ont observé que le mutant $\Delta btaI2$ synthétise de la 3OHC₈-HSL. Il apparaît, néanmoins, que les mutants $\Delta btaI1\Delta btaI2$ et $\Delta btaI2\Delta btaI3$ n'en produisent pas (Horton *et al.*, 2013). L'ensemble

de ces considérations suggère donc que les synthèses BtaI1 et/ou BtaI3 pallient l'absence de la synthase BtaI2 en produisant de la 3OHC₈-HSL.

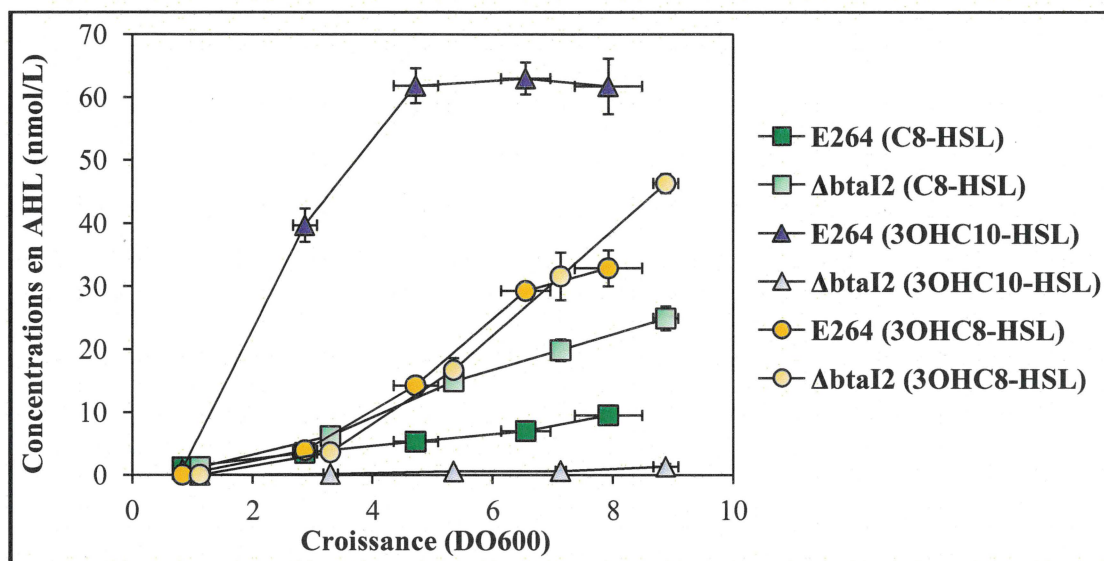


Figure 3.55. La synthase BtaI2 est essentiellement responsable de la production de la 3OHC₁₀-HSL. Les concentrations en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage (courbes foncées) et chez le mutant $\Delta btaI2$ (courbes claires) de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Par ailleurs, l'inactivation du gène *btaI2* résulte en une surproduction de la C₈-HSL (Fig. 3.55), suggérant que la modulation de la biosynthèse de la C₈-HSL dépendante du régulateur transcriptionnel BtaR2 implique la 3OHC₁₀-HSL (cf. la Figure 3.2A présentée à la section 3.1.5.2). En effet, l'expression du gène *btaI1*, mais pas celle du gène *btaR1*, est réprimée *via* le régulateur transcriptionnel BtaR2 (cf. la Figure 3.52 présentée à la section 3.2.6). Ainsi, le système BtaI2/BtaR2 contrôle négativement et directement la biosynthèse de la C₈-HSL. Toutefois, l'absence de la synthase BtaI2 n'a aucun impact sur la transcription du gène *btaI1* (cf. la Figure 3.2B présentée à la section 3.1.5.2), suggérant que le régulateur transcriptionnel BtaR2 inhibe l'expression du gène *btaI1* en absence de 3OHC₁₀-HSL. Similairement, l'inactivation du gène *rsaM2* entraîne une surproduction de la C₈-HSL mais n'a pas d'effet sur la transcription du gène *btaI1* (cf. la Figure 3.42 présentée à la section 3.2.5.2). Étant donné que le régulateur transcriptionnel BtaR2 active l'expression du gène *rsaM2* en présence de 3OHC₁₀-HSL (cf. la Figure 3.49 présentée à la section 3.2.5.4), nous supposons que le système BtaI2/BtaR2 contrôle négativement et indirectement la biosynthèse de la C₈-HSL par l'intermédiaire de la protéine RsaM2. L'ensemble de ces considérations

suggère donc que le régulateur transcriptionnel BtaR2 inhibe directement la biosynthèse de la C₈-HSL en réprimant la transcription du gène *btaI1* en absence de 3OHC₁₀-HSL et indirectement en stimulant la transcription du gène *rsaM2* en présence de cette AHL (Fig. 3.56).

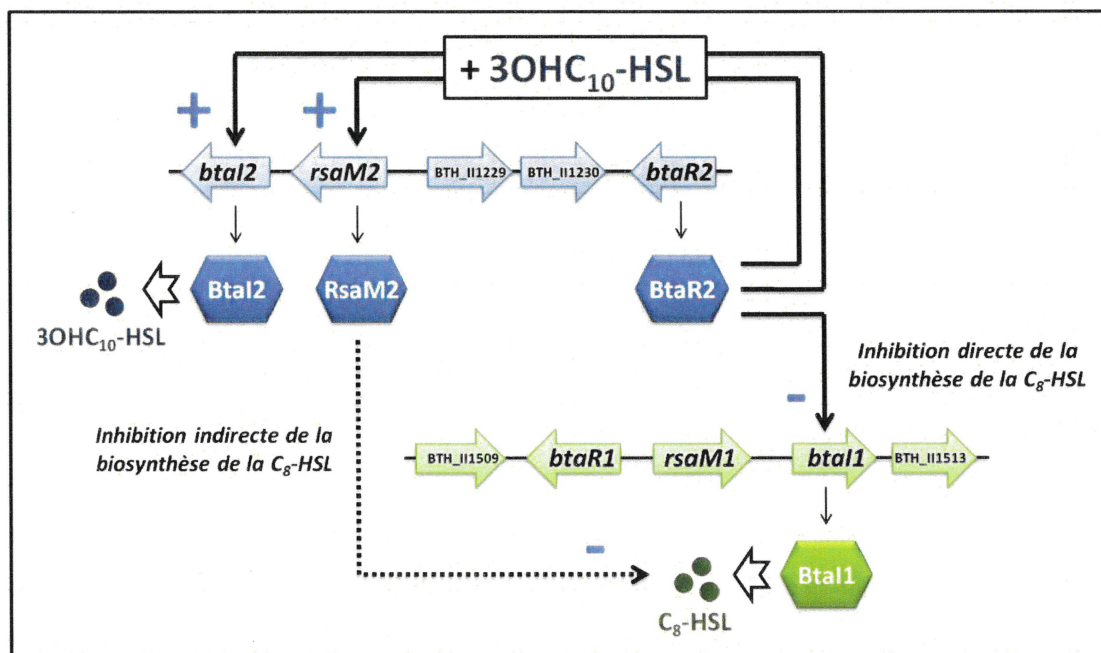


Figure 3.56. Modèle hypothétique de la régulation de la biosynthèse de la C₈-HSL via le système BtaI2/BtaR2 chez *B. thailandensis* E264.

Le régulateur transcriptionnel BtaR2, en absence de 3OHC₁₀-HSL, inhibe l'expression du gène *btaI1*, codant la synthase BtaI1 qui catalyse la synthèse de la C₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009), et réprime donc directement le système BtaI1/BtaR1. Par ailleurs, le régulateur transcriptionnel BtaR2, en présence de 3OHC₁₀-HSL, active la transcription du gène *btaI2*, qui code la synthase BtaI2 responsable de la production de cette AHL (Duerkop *et al.*, 2009), de même que l'expression du gène *rsaM2*, codant la protéine RsaM2 qui réprime indirectement le système BtaI1/BtaR1.

3.2.10.2.3. La synthase BtaI3 synthétise essentiellement de la 3OHC₈-HSL

La 3OHC₈-HSL constitue la principale AHL synthétisée via la synthase BtaI3 chez *B. thailandensis* E264 (Chandler *et al.*, 2009). Les expériences de quantification de la production des AHL chez la souche sauvage et chez le mutant $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 montrent que l'inactivation du gène *btaI3* entraîne une abolition de la biosynthèse de la 3OHC₈-HSL au cours de la phase exponentielle (DO₆₀₀ \approx 4,0) de même qu'une réduction drastique de la biosynthèse de cette AHL au cours de la phase stationnaire (DO₆₀₀ \approx 8,0) (Fig. 3.57). Ainsi, la synthase BtaI3 est essentiellement responsable de la production de la 3OHC₈-HSL.

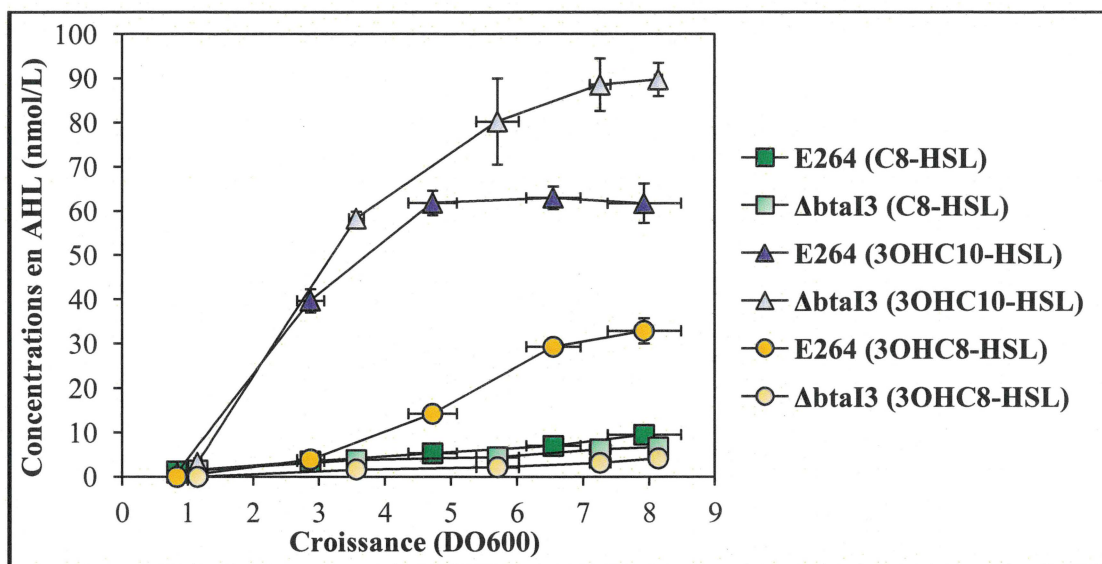


Figure 3.57. La synthase BtaI3 est principalement responsable de la production de la 3OHC₈-HSL. Les concentrations en C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage (courbes foncées) et chez le mutant $\Delta btaI3$ (courbes claires) de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Par ailleurs, l'inactivation du gène *btaI3* n'affecte pas la biosynthèse de la C₈-HSL (Fig. 3.57), suggérant que la modulation de la biosynthèse de la C₈-HSL dépendante du régulateur transcriptionnel BtaR3 n'implique pas la 3OHC₈-HSL (cf. la Figure 3.2A présentée à la section 3.1.5.2). Notons, également, que l'absence des synthases BpsI3 de *B. pseudomallei* KHW et BmaI3 de *B. mallei* GB8 n'a pas d'impact significatif sur la production de la C₈-HSL (Gamage *et al.*, 2011, Majerczyk *et al.*, 2013b). En revanche, l'inactivation du gène *btaI3* résulte en une surproduction de la 3OHC₁₀-HSL (Fig. 3.57), suggérant que la 3OHC₈-HSL est impliquée dans la modulation de la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL dépendante du régulateur transcriptionnel BtaR3 (cf. la Figure 3.4A présentée à la section 3.1.5.2). Toutefois, ni l'absence de la synthase BtaI3, ni l'inactivation du gène *btaR3* n'affectent la transcription du gène *btaI2* (cf. la Figure 3.4B présentée à la section 3.1.5.2). Similairement, l'inactivation du gène *btaI1* et l'absence du régulateur transcriptionnel BtaR1 entraînent une surproduction de la 3OHC₁₀-HSL, mais n'ont aucun impact sur l'expression du gène *btaI2* (cf. la Figure 3.4 présentée à la section 3.1.5.2). De plus, l'effet du système BtaI1/BtaR1 sur la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL est plus important que l'effet du système BtaI3/BtaR3. Par conséquent, il est envisageable que le système BtaI3/BtaR3 contrôle négativement et indirectement la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL par l'intermédiaire du système BtaI1/BtaR1 considérant que le régulateur transcriptionnel BtaR3 active l'expression

du gène *btaI1* (cf. la **Figure 3.2B** présentée à la section 3.1.5.2) et possiblement celle du gène *btaR1* (cf. la **Figure 3.7A** présentée à la section 3.1.5.3). Nous pensons, cependant, que la synthase BtaI3 de *B. thailandensis* E264, à l'instar des synthases BpsI3 de *B. pseudomallei* KHW et BmaI3 de *B. mallei* ATCC 23344 (Duerkop *et al.*, 2008, Gamage *et al.*, 2011), synthétise, dans une moindre mesure, de la 3OHC₁₀-HSL. D'autres expériences seront, en conséquence, indispensables afin de préciser le mécanisme de régulation de la production de la C₈-HSL et de la 3OHC₁₀-HSL *via* le système BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* E264.

Pour conclure, il est indispensable de caractériser toutes les AHL produites *via* les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 afin de mieux comprendre l'impact des protéines RsaM1 et RsaM2 sur les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3. En particulier, des expériences additionnelles devront être envisagées afin d'identifier les AHL synthétisées moins abondamment *via* les synthases BtaI1 et BtaI3, à savoir, la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL, respectivement, puisque la comparaison des concentrations en AHL chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaI1$ et $\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 permet de caractériser uniquement les principales AHL produites *via* les synthases BtaI1 et BtaI3, à savoir la C₈-HSL et la 3OHC₈-HSL, respectivement. L'analyse du profil de biosynthèse des AHL dans des cultures de la souche sauvage et du mutant $\Delta btaI1\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 a permis de démontrer que la synthase BtaI2 synthétise principalement de la 3OHC₁₀-HSL ainsi que, dans une moindre mesure, de la 3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2009). Pour cette raison, nous proposons d'étudier les AHL produites chez la souche sauvage et chez les mutants $\Delta btaI2\Delta btaI3$ et $\Delta btaI1\Delta btaI2$ de *B. thailandensis* E264 dans le but de déterminer les autres AHL susceptibles d'être synthétisées *via* les synthases BtaI1 et BtaI3, respectivement. En outre, nous proposons d'exprimer constitutivement les gènes *btaI1*, *btaI2* et *btaI3* chez le mutant $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ de *B. thailandensis* E264 afin d'identifier sans équivoque toutes les AHL produites *via* les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3. *In fine*, ces expériences permettront de mieux comprendre le mécanisme de régulation de la biosynthèse des AHL *via* les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 ainsi que *via* d'autres régulateurs transcriptionnels et/ou post-transcriptionnels tels que les protéines RsaM1 et RsaM2 et, ultimement, la modulation de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire chez *B. thailandensis*.

3.3. Présentation de l'article « The putative 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinoline signaling system in *Burkholderia thailandensis* modulates *N*-acyl-L-homoserine lactones biosynthesis, interspecies interactions, and virulence »

Servane Le Guillouzer, Marie-Christine Groleau, Jean-Philippe Dumais & Éric Déziel

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

Soumission : ; Acceptation : ; Publication :

Journal :

Les expériences ont été conçues par S.L.G., M.C.G., J.P.D. et É.D.

S.L.G., M.C.G. et J.P.D. ont effectué les expériences.

Les données ont été interprétées par S.L.G., M.C.G., J.P.D. et É.D.

S.L.G., M.C.G. et É.D. ont rédigé le manuscrit.

RÉSUMÉ

Burkholderia thailandensis, *Burkholderia pseudomallei* et *Burkholderia ambifaria* synthétisent des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ), qui sont analogues aux 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) produites par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Les HAQ incluent des molécules de signalisation telles que la 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) et la 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (*Pseudomonas quinolone signal* [PQS]), qui contribuent à la virulence de *P. aeruginosa* en agissant comme des co-inducteurs du régulateur transcriptionnel MvfR (PqsR), le principal activateur de l'opéron *pqsABCDE* codant les principales enzymes requises pour la biosynthèse des HAQ. Par ailleurs, la transcription de *pqsABCDE* est modulée via les systèmes de *quorum sensing* LasI/LasR et RhII/RhIR de *P. aeruginosa*, qui sont médiés par des *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHL). Nous avons étudié les mécanismes de régulation de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* chez *B. thailandensis*, qui code les principales protéines nécessaires à la production des HMAQ, et nous avons confirmé que la transcription de *hmqABCDEFG*, ainsi que la biosynthèse des HMAQ, sont sous le contrôle des systèmes de *quorum sensing* médiés via les AHL. Cependant, en contraste avec *P. aeruginosa*, nous avons observé que les HMAQ ne modulent pas la transcription de *hmqABCDEFG*, suggérant qu'elles ne sont pas impliquées dans la communication intra-espèces, mais sont susceptibles, en revanche, d'intervenir dans les interactions inter-espèces. Enfin, nous avons démontré que le système de *quorum sensing* hypothétique *hmq*, chez *B. thailandensis*, régule des processus cellulaires, qui sont non seulement contrôlés via le *quorum sensing* par l'intermédiaire des AHL, mais également associés à la pathogénicité, et nous avons mis en exergue que le système *hmq* agit tel un facteur de virulence en utilisant l'organisme modèle de laboratoire *Drosophila melanogaster*, révélant le potentiel des HMAQ comme cibles attractives pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

3.3.1. Abstract

Burkholderia thailandensis, *Burkholderia pseudomallei*, and *Burkholderia ambifaria* synthesize 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinolines (HMAQs), which are analogous to 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. HAQs include signaling molecules, such as 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) and 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (*Pseudomonas* quinolone signal [PQS]), which contribute to the pathogenicity of *P. aeruginosa* by acting as co-inducers of the MvfR transcriptional regulator (PqsR), the main activator of the *pqsABCDE* operon encoding the principal enzymes required for the biosynthesis of HAQs. Furthermore, *pqsABCDE* transcription is modulated by the *P. aeruginosa* *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL)-based quorum sensing (QS) systems LasI/LasR and RhII/RhlR. We have investigated the regulatory mechanisms directing expression of the *hmqABCDEFG* operon in *B. thailandensis*, which encodes the primary proteins necessary for HMAQs production, and we have confirmed that *hmqABCDEFG* transcription, as well as the biosynthesis of HMAQs, are modulated by AHL-mediated QS systems. However, in contrast with *P. aeruginosa*, we have found that HMAQs do not modulate *hmqABCDEFG* transcription, suggesting that they are not involved in intraspecies communication, but instead could intervene in interspecies interactions. Finally, we have demonstrated that the putative HMAQ signaling system regulates phenotypic traits that are both QS-controlled and associated with pathogenicity in *B. thailandensis*, and we have highlighted that the HMAQ system acts as a virulence determinant using the fruit fly model *Drosophila melanogaster*, revealing the potential of HMAQs as attractive targets for the development of new therapeutic strategies.

3.3.2. Introduction

Quorum sensing (QS) is a global regulatory mechanism of gene expression depending on bacterial density (Fuqua *et al.*, 1994). Bacteria produce signaling molecules whose concentration in the environment provides an indication on bacterial density. These molecular signals, perceived by bacteria of the same population, trigger regulatory cascades synchronously in the whole population leading to coordinated bacterial activities.

Pseudomonas aeruginosa, an opportunistic pathogen responsible for many nosocomial infections, constitutes a model organism for the study of QS regulation. Its pathogenicity is

attributed to multiple virulence factors that are mainly under QS control through signaling molecules belonging, on the one hand, to the *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) family and, on the other hand, to the 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) family (Jimenez *et al.*, 2012). The primary enzymes mediating the biosynthesis of HAQs are encoded by the *pqsABCDE* operon in *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002) (Fig. 3.58). The transcription of *pqsABCDE* is controlled through the AHL-based QS systems LasI/LasR and RhII/RhlR (Gilbert *et al.*, 2009, McGrath *et al.*, 2004, Wade *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 2006b). These LuxI/LuxR-type QS systems directly modulate *pqsABCDE* transcription, as well as indirectly via the LysR-type transcriptional regulator MvfR (PqsR), which constitutes the main regulator of HAQs biosynthesis (Calfee *et al.*, 2001, Cao *et al.*, 2001, Déziel *et al.*, 2005).

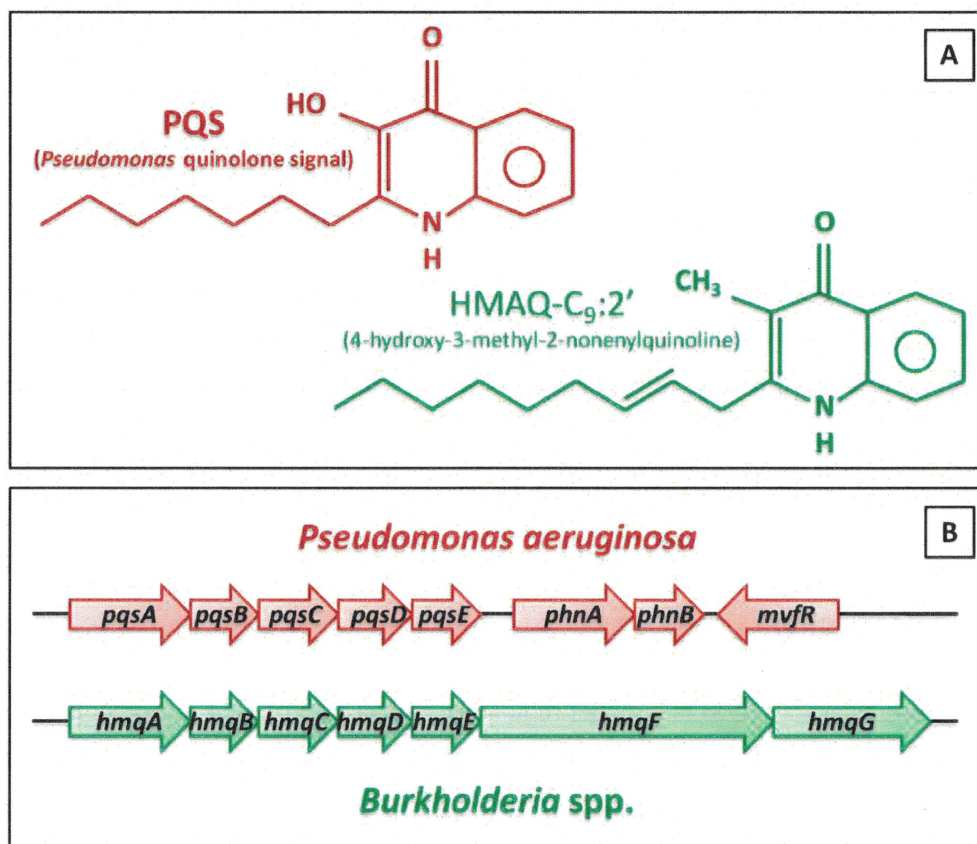


Figure 3.58. The *pqsABCDE* and *hmqABCDEFG* operons are responsible for the biosynthesis of HAQs and HMAQs, respectively. (A) Chemical structure of HAQs and HMAQs found in *P. aeruginosa* and *Burkholderia* spp., respectively. (B) Genetic organization of the *P. aeruginosa* *pqsABCDE* and the *Burkholderia* spp. *hmqABCDEFG* operons.

HAQs, especially 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) and 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (*Pseudomonas* quinolone signal [PQS]), participate in the pathogenicity of *P. aeruginosa* indirectly since they control the expression of many virulence genes via PqsE (Déziel *et al.*, 2005, Farrow *et al.*, 2008, Hazan *et al.*, 2010, Rampioni *et al.*, 2016, Rampioni *et al.*, 2010), and are involved in the development of biofilm, in iron metabolism, in swarming motility, and in the resistance to antibiotics necessary for the establishment of host-pathogen interactions (Diggle *et al.*, 2007, Guo *et al.*, 2014, Haussler *et al.*, 2008). HHQ and PQS activate the transcription of *pqsABCDE* via their binding to MvfR, resulting in a typical QS self-inducing loop (Diggle *et al.*, 2007, Fletcher *et al.*, 2007, Rampioni *et al.*, 2016, Wade *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 2006a, Xiao *et al.*, 2006b). Furthermore, HAQs, via their immunomodulatory properties and their cytotoxic effects on eukaryotic cells, are directly implicated in the virulence of *P. aeruginosa* (Heeb *et al.*, 2011, Hooi *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2010, Skindersoe *et al.*, 2009).

The nonpathogenic soil saprophyte *Burkholderia thailandensis*, as well as the opportunistic pathogens *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia ambifaria*, synthesize putative signaling molecules called 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinolines (HMAQs) that are structurally analogous to HAQs (Butt *et al.*, 2016, Diggle *et al.*, 2006b, Vial *et al.*, 2010, Vial *et al.*, 2008) (**Fig. 3.58A**). The *hmqABCDEFG* operon, which encodes the primary proteins involved in HMAQs production among *Burkholderia* spp. (Vial *et al.*, 2008), is homologous to the *P. aeruginosa pqsABCDE* operon (**Fig. 3.58B**). The two additional genes encoded in *hmqABCDEFG*, namely, *hmqF* and *hmqG*, are responsible for the insaturation and methylation found in HMAQs, respectively (Agarwal *et al.*, 2012, Vial *et al.*, 2008). No MvfR-like regulator has been yet identified among the HMAQ-producing *Burkholderia* species (Vial *et al.*, 2008). However, AHL-mediated QS systems regulate the expression of *hmqABCDEFG*, highlighting an interconnection between AHLs and the putative HMAQ signaling system in *Burkholderia* spp. as well (Chapalain *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a, Majerczyk *et al.*, 2014b). *B. thailandensis* possesses multiple AHL signaling systems, designated BtaI1/BtaR1 (QS-1), BtaI2/BtaR2 (QS-2), and BtaI3/BtaR3 (QS-3) (Majerczyk *et al.*, 2013a). The LuxR-type transcriptional regulators BtaR1, BtaR2, and BtaR3 modulate the expression of numerous genes in conjunction with *N*-(octanoyl)-L-homoserine lactone (C₈-HSL), *N*-3-(hydroxy-decanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₁₀-HSL), and *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₈-HSL) as signaling molecules, which are produced

by the LuxI-type synthases BtaI1, BtaI2, and BtaI3 (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017, Le Guillouzer *et al.*, 2018).

The function of the HMAQ system has been previously addressed in the *Burkholderia* genus, with involvements in the biosynthesis of extracellular proteases and elastases, biofilm formation, colony morphology, as well as antifungal activity, and thus suggesting that HMAQs play a role in bacterial virulence (Butt *et al.*, 2016, Diggle *et al.*, 2006a, Diggle *et al.*, 2006b, Vial *et al.*, 2010, Vial *et al.*, 2008). Still, the implication of HMAQs in pathogenicity is currently unknown.

The main aim of this study was to further investigate the regulatory mechanisms directing expression of the *hmqABCDEFG* operon and HMAQs biosynthesis and to further characterize the function of the HMAQ system in the *Burkholderia* genus. We confirmed the interplay existing between the AHL signaling systems of *B. thailandensis* and HMAQs. Furthermore, we observed that HMAQs do not modulate the transcription of *hmqABCDEFG*, suggesting that they are not involved in intraspecies communication, but instead could intervene in interspecies interactions. Moreover, we found that the HMAQ system regulates phenotypic traits that are both controlled by the *B. thailandensis* AHL-mediated QS systems and associated with bacterial virulence, and we demonstrated that the HMAQ system influences pathogenicity using the fruit fly model *Drosophila melanogaster*, revealing the potential of HMAQs as attractive targets for the development of new therapeutic strategies.

3.3.3. Materials and methods

3.3.3.1. Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used in this study are listed in **Table 3.14**. Unless stated otherwise, all bacteria were cultured at 37°C in tryptic soy broth (TSB; BD Difco, Mississauga, Ontario, Canada), with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on petri dishes containing TSB solidified with 1.5% agar. When required, antibiotics were used at the following concentrations: tetracycline (Tc) at 200 µg/mL for *B. thailandensis* E264, 100 µg/mL for *P. aeruginosa* PA14, and 15 µg/mL for *Escherichia coli* DH5α, trimethoprim (Tp) at 100 µg/mL for *B. thailandensis* E264, kanamycin (Km) at 100 µg/mL for *B. thailandensis* E264 and 200 µg/mL for *P. aeruginosa* PA14, chloramphenicol (Cm) at 40 µg/mL for both *B. thailandensis* E264 and *B. ambifaria* H5J1,

carbenicillin (Cb) at 50 µg/mL for *E. coli* DH5α, and gentamicin (Gm) at 30 µg/mL for both *P. aeruginosa* PA14 and *E. coli* DH5α. All measurements of optical density at 600 nm (OD₆₀₀) were acquired with a Thermo Fisher Scientific NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

Table 3.14. Bacterial strains used in this study.

Strains	Description	Reference
<i>E. coli</i>		
χ7213	<i>thr-1, leuB6, fhuA21, lacY1, glnV44, recA1, ΔasdA4, Δ(zhf-2::Tn10), thi-1, RP4-2-Tc::Mu [λ pir]</i>	Lab collection
DH5α	F-, φ80dlacZΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR, recA1, endA1, hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1</i>	Lab collection
SM10λ <i>pir</i>	<i>thi-1, thr-1, leuB6, tonA21, lacY1, supE44, recA1::RP4-2-Tc::Mu [λ pir]; Km^R</i>	Lab collection
ED1019	DH5α (pMCG03, pME6000); Cb ^R , Tet ^R	This study
ED1021	DH5α (pMCG03, pJPD03); Cb ^R , Tet ^R	This study
<i>B. ambifaria</i>		
HSJ1	Wild-type	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
ED350	HSJ1 <i>hmqA::pKNOCK-Cm; Cm^R</i>	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
ED373	HSJ1 <i>hmqG::pKNOCK-Cm; Cm^R</i>	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. thailandensis</i>		
E264	Wild-type	(Brett <i>et al.</i> , 1998)
JBT112	E264 Δ <i>btaI1</i> Δ <i>btaI2</i> Δ <i>btaI3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT101	E264 Δ <i>btaI1</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT102	E264 Δ <i>btaI2</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT103	E264 Δ <i>btaI3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT107	E264 Δ <i>btaR1</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT108	E264 Δ <i>btaR2</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT109	E264 Δ <i>btaR3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED999	E264 <i>hmqA::pKNOCK-Cm; Cm^R</i>	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
BT02698	E264 <i>hmqG::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT; Tp^R</i>	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
ED3330	E264:: <i>btaI1-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
ED3498	E264 <i>hmqA::btaI1-lux</i>	This study

ED3331	E264:: <i>btaI2-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
ED3499	E264 <i>hmqA</i> :: <i>btaI2-lux</i>	This study
ED3332	E264:: <i>btaI3-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
ED3500	E264 <i>hmqA</i> :: <i>btaI3-lux</i>	This study
ED813	E264:: <i>hmqA-lacZ</i>	This study
ED988	E264:: <i>hmqA-lacZ</i> (pME6000)	This study
ED989	E264:: <i>hmqA-lacZ</i> (pME6000- <i>scmR</i>)	This study
ED992	E264 <i>scmR</i> :: <i>hmqA-lacZ</i>	This study
ED990	E264 <i>scmR</i> :: <i>hmqA-lacZ</i> (pME6000)	This study
ED991	E264 <i>scmR</i> :: <i>hmqA-lacZ</i> (pME6000- <i>scmR</i>)	This study
ED3501	E264:: <i>hmqA-lux</i>	This study
ED3502	E264 <i>hmqA</i> :: <i>hmqA-lux</i>	This study
ED3503	E264 <i>hmqG</i> :: <i>hmqA-lux</i>	This study
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14	Wild-type	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
ED37	PA14 <i>pqsA</i> ::Tn <i>phoA</i> ; Km ^R	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
ED35	PA14 <i>mvfR</i> -	(Cao <i>et al.</i> , 2001)
ED700	PA14 <i>pqsA</i> :: <i>pqsA-lacZ</i>	This study
ED2713	PA14 (pME6000)	This study
ED2714	PA14 <i>mvfR</i> - (pME6000)	This study
ED2715	PA14 <i>mvfR</i> - (pME6000- <i>scmR</i>)	This study

3.3.3.2. Construction of plasmids

All plasmids used in this study are described in **Table 3.15**.

Table 3.15. Plasmids used in this study.

Plasmids	Description	Source
mini-CTX- <i>lux</i>	Integration vector with promoterless <i>luxCDABE</i> ; Tc ^R	(Becher <i>et al.</i> , 2000)
pSLG02	<i>btaI1</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
pSLG03	<i>btaI2</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
pSLG04	<i>btaI3</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
pSLG05	<i>hmqA</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	This study
mini-CTX- <i>lacZ</i>	Integration vector with promoterless <i>lacZ</i> ; Tc ^R	(Becher <i>et al.</i> , 2000)
pJPD02	<i>hmqA</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lacZ</i> ; Tc ^R	This study
pFLPe4	Site-specific excision vector; Cb ^R , Km ^R	(Choi <i>et al.</i> , 2008)
pUT-mini-Tn5-Km	mini-Tn5-Km delivery vector; Km ^R	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
pME6000	Broad-host-range cloning vector; Tc ^R	(Maurhofer <i>et al.</i> , 1998)
pJPD03	<i>scmR</i> inserted in <i>KpnI-HindIII</i> restriction sites in pME6000; Tet ^R	This study
pQF50	Broad-host-range transcriptional fusion vector with promoterless <i>lacZ</i> ; Cb ^R	(Farinha <i>et al.</i> , 1990)
pMCG03	<i>hmqA</i> promoter inserted in <i>HindIII-BglIII</i> restriction sites in pQF50; Cb ^R	This study
pUC18T-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i>	Integration vector with promoterless <i>lacZ</i> ; Gm ^R	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
pTSL01	<i>pqsA</i> promoter inserted in <i>KpnI-PstI</i> restriction sites in pUC18T-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i> ; Gm ^R	This study

Amplification of the promoter region of *hmqA* was performed from genomic DNA from *B. thailandensis* E264 using the appropriate primers (Table 3.16). The amplified product was digested with the FastDigest restriction enzymes *XhoI*, *BamHI*, *HindIII*, and *BglIII* (Thermo Fisher Scientific) and inserted by T4 DNA ligase (Bio Basic, Inc., Markham, ON, Canada) within the corresponding restriction sites in the mini-CTX-*lux*, mini-CTX-*lacZ* (Becher *et al.*, 2000), and pQF50 (Farinha *et al.*, 1990) plasmids, generating the transcriptional reporters pSLG05, pJPD02, and pMCG03, respectively. Amplification of *scmR* was accomplished from genomic DNA of *B. thailandensis* E264 using the primers shown in

Table 3.16. The amplified product was digested with the restriction enzymes *KpnI* and *HindIII* before ligation within the corresponding restriction sites in the pME6000 plasmid (Maurhofer *et al.*, 1998), generating the constitutive expression vector pJPD03. Amplification of the promoter region of *pqsA* was accomplished from genomic DNA of *P. aeruginosa* PA14 using the primers shown in **Table 3.16**. The amplified product was digested with the restriction enzymes *KpnI* and *PstI* before ligation within the corresponding restriction sites in the pUC18T-mini-Tn7T-Gm-*lacZ* plasmid (Choi *et al.*, 2005), generating the transcriptional reporter pTSL01. All primers were purchased from Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada).

Table 3.16. Primers used for PCR.

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')*
<i>hmqA</i>	pTZhmqATL-3 pTZhmqATR	AAA <u>ACTCGAG</u> AGGACGGGTGCGATTCT CGC <u>GATCC</u> GGCAACTCGAAGACGAACTC
<i>hmqA</i>	ThaiL2 ThaiR	GA <u>AGATCT</u> GTAGGACGGGTGCGATTCT CTAA <u>AGCTT</u> GCAGGCAACTCGAAGACGAACTC
<i>scmR</i>	BTH_I1403-F- <i>KpnI</i> BTH_I1403-R- <i>HindIII</i>	CGGGGT <u>ACCCCG</u> AAGACAAGCCCTGTGCTGAT CCC <u>AAGCTT</u> GGGAGGTGCGCGTCAGTTACTT
<i>pqsA</i>	pqsAminiTn7 <i>KpnI</i> pqsAminiTn7 <i>PstI</i>	CTAGGCGGT <u>ACCCGCC</u> GGCTTGAGCAGGC GGATCCTGCAGGTAGGTGTCCTCTTCGGC

*Restriction sites designed into the primers are underlined.

3.3.3.3. Construction of reporter strains

Chromosomal integration of the mini-CTX-*btaI1-lux*, mini-CTX-*btaI2-lux*, mini-CTX-*btaI3-lux*, mini-CTX-*hmqA-lux*, and mini-CTX-*hmqA-lacZ* transcriptional reporters at the *attB* locus in *B. thailandensis* E264 strains was performed through conjugation with the auxotrophic *E. coli* χ 7213, as described previously (Le Guillouzer *et al.*, 2018). Successful chromosomal insertion of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, *btaI3-lux*, *hmqA-lux*, and *hmqA-lacZ* was confirmed by PCR using appropriate primers. Excision of the tetracycline cassette in the chromosomal *hmqA-lacZ* transcriptional fusion was carried out using the pFLPe4 plasmid as previously described (Choi *et al.*, 2008). Chromosomal integration of the pUC18T-mini-Tn7T-Gm-*pqsA-lacZ* transcriptional reporter at the *attB* locus in *P. aeruginosa* PA14 strains was performed through conjugation with *E. coli* SM10 λ pir. Successful chromosomal insertion of *pqsA-lacZ* was confirmed by PCR using the appropriate primers.

3.3.3.4. Construction of recombinant strains

The pME6000 and pME6000-*scmR* constitutive expression vectors were introduced in *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* PA14 strains by electroporation. Briefly, bacterial cultures were grown to an OD₆₀₀ of 1.0, pelleted by centrifugation, and washed several times with 1 mL of sterile water. The pellets were concentrated 100-fold in 100 µL of sterile water and electroporated using a 1 mm gap disposable electroporation cuvette (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) at 1.8 kV with an Eppendorf Electroporator 2510 (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA). Cells were grown for 1 hr in 1 mL lysogeny broth (LB; Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA) at 37°C then plated on Tc selective media.

3.3.3.5. Transposon mutagenesis and identification of the transposon insertion sites

Random transposon insertions in the *B. thailandensis* E264 wild-type strain carrying the chromosomal *hmqA-lacZ* transcriptional fusion were generated through conjugation with *E. coli* SM10 λ *pir* containing the pUT-mini-Tn5-Km plasmid. Transposants were selected by plating on TSB agar containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal; Gold Biotechnology, Inc., St. Louis, MO, USA) (40 µg/mL), Km (100 µg/mL), and Gm (50 µg/mL) for counterselection against *E. coli* SM10 λ *pir*. After incubation for 48 hrs at 37°C, kanamycin-resistant colonies with altered β -galactosidase activity, hence having a transposon inserted within a gene affecting expression from the *hmqA* promoter, were confirmed by liquid β -galactosidase activity assay with *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG; Thermo Fisher Scientific) (Miller, 1972). Transposon insertion locations were determined by PCR according to the protocol previously described (Kwon *et al.*, 2000). All sequences were obtained from the McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montreal, QC, Canada).

3.3.3.6. Quantitative reverse transcription-PCR experiments

Total RNA of *B. thailandensis* E264 cultures at an OD₆₀₀ of 4.0 was extracted with the PureZOL RNA isolation reagent (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) and treated twice with the TURBO DNA-Free kit (Ambion Life Technologies, Inc., Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Extractions were done on three

different bacterial cultures. Quality and purity controls were confirmed by agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometric analysis, respectively. cDNA synthesis was performed using the iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad Laboratories), and amplification was accomplished on a Corbett Life Science Rotor-Gene 6000 thermal cycler using the SsoAdvanced universal SYBR green supermix (Bio-Rad Laboratories), according to the manufacturer's protocol. The reference gene was *ndh* (Subsin *et al.*, 2007). The *ndh* gene displayed stable expression under the different genetic contexts tested. All primers used for cDNA amplification are presented in **Table 3.17**. Differences in gene expression between *Burkholderia thailandensis* E264 strains were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula (Livak *et al.*, 2001). A threshold of 0.5 was chosen as significant.

Tableau 3.17. Primers used for qRT-PCR.

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')
<i>ndh</i>	SLG_qRT-PCR_ndh_F SLG_qRT-PCR_ndh_R	ACCAGGGCGAATTGATCTC GATGACGAGCGTGTCTGATT
<i>hmqA</i>	RThmqAthaiF RThmqAthaiR	AATCTGCCTGCAACGACCGATCT AGCTCGAGCAGTTCGCGATACGA
<i>btaR1</i>	SLG_qRT-PCR_btaR1_F SLG_qRT-PCR_btaR1_R	AGCTCGAACATGATCGTCTG TGAAGCGTCAGATGGTTGAT
<i>btaR2</i>	SLG_qRT-PCR_btaR2_F SLG_qRT-PCR_btaR2_R	GAGAAATTCGCAACGAGAG GCCGTCCACTTCAACACAT
<i>btaR3</i>	SLG_qRT-PCR_btaR3_F SLG_qRT-PCR_btaR3_R	CGACTACTTCACCATCGATCC GCTGATGCCGTTGTCGAG
<i>btaI1</i>	btaI1RTF btaI1RTR	CTTCGAACGGGATCAATACG CATGTCGTGTGCGACCAG
<i>btaI2</i>	btaI2RTF btaI2RTR	TCTACGTCGTCGGCAAGAC ACAGGATCGACGACGAAAAT
<i>btaI3</i>	btaI3RTF btaI3RTR	GCGCCATGTCATACATCATC GTCGAACTCGTCCCATTCC

3.3.3.7. LC-MS/MS quantification of HMAQs, HAQs, and AHLs

The concentrations of HMAQs, HAQs, and AHLs were determined from samples of *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* PA14 cultures obtained at different time points during bacterial growth by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were prepared and analyzed as described previously (Vial *et al.*, 2008). 5,6,7,8-Tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) was used as an internal

standard. For experiments with 4-hydroxy-3-methyl-2-nonenylquinoline (HMAQ-C₉:2') additions, cultures were supplemented or not with 50 μ M HMAQ-C₉:2' from a stock prepared in high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol. Methanol only was added to the controls. For experiments with additions of the anthranilic acid analogue 6-fluoro-2-aminobenzoic acid (6-FABA), cultures were supplemented with 1 mM 6-FABA (Sigma-Aldrich Co., Oakville, ON, Canada) or not supplemented with 6-FABA from a stock prepared in HPLC-grade dimethylsulfoxide (DMSO). DMSO only was added to the controls. All experiments were performed in triplicate and conducted at least twice independently.

3.3.3.8. HMAQs and HAQs purification

The main HMAQs produced by *B. thailandensis* E264 and *B. ambifaria* HSJ1, namely, HMAQ-C₉:2' and 4-hydroxy-3-methyl-2-heptenylquinoline (HMAQ-C₇:2'), respectively (Vial *et al.*, 2008), were purified by HPLC as previously described (Chapalain *et al.*, 2017). HHQ and PQS, which are produced by *P. aeruginosa* PA14 (D eziel *et al.*, 2004), were synthesized as previously described (L epine *et al.*, 2003).

3.3.3.9. Measurement of the activity of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, *btaI3-lux*, and *hmqA-lux* reporters

Expression from the promoter regions of *btaI1*, *btaI2*, *btaI3*, or *hmqA* was quantified by measuring the luminescence of *B. thailandensis* E264 cultures carrying the corresponding chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters, as described previously (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Overnight bacterial cultures were diluted in TSB to an initial OD₆₀₀ of 0.1 and incubated as indicated above. The luminescence was regularly determined from culture samples using a multi-mode microplate reader (Cytation 3, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) and expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). For experiments with AHL additions, cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL (Sigma-Aldrich Co.) or not supplemented with AHLs from stocks prepared in HPLC-grade acetonitrile. Acetonitrile only was added to the controls. For experiments with additions of HAQs, cultures were supplemented or not with 50 μ M HHQ and PQS from stocks prepared in HPLC-grade methanol. Methanol only was added

to the controls. All experiments were performed with three biological replicates and repeated at least twice.

3.3.3.10. Preparation of total culture extracts

Overnight bacterial cultures of *P. aeruginosa* PA14 were diluted in 5 mL TSB to an initial OD₆₀₀ of 0.05 and incubated as indicated above, whereas *B. thailandensis* E264 and *B. ambifaria* HSJ1 cultures were diluted to an initial OD₆₀₀ of 0.1. All cultures were grown until they reached stationary phase and extracted twice with ethyl acetate. The extracts were then completely evaporated under a nitrogen gas stream in culture tubes and kept at 4°C.

3.3.3.11. Quantification of the activity of *hmqA-lacZ* and *pqsA-lacZ* reporters

Expression from the promoter regions of *hmqA* and *pqsA* was quantified by measuring the β-galactosidase activity of the chromosomal *hmqA-lacZ* and *pqsA-lacZ* transcriptional fusions in *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* PA14 cultures, respectively. Overnight bacterial cultures of *B. thailandensis* E264 were diluted in TSB to an initial OD₆₀₀ of 0.1 and incubated as indicated above, whereas *P. aeruginosa* PA14 cultures were diluted to an initial OD₆₀₀ of 0.05. The β-galactosidase activity was measured at different time intervals during bacterial growth as previously described (Miller, 1972). All experiments were performed with three replicates and repeated at least twice.

3.3.3.12. Phenotypic assays

Biofilm formation was measured in polystyrene 96-well plates containing 200 μL of TSB inoculated at an OD₆₀₀ of 0.05. After incubation for 24 hrs at 37°C, the plates were carefully washed with water to remove cells in suspension and the adhering cells were stained for 10 min with a 0.1% crystal violet solution. Excess dye was washed away with water and 95% ethanol was used for solubilization of the crystal violet. Absorbance was measured at 595 nm using a multi-mode microplate reader (Cytation 3, BioTek Instruments, Inc.). Swimming motility was assessed using LB solidified with 0.25% (w/v) agar (Bacto, BD Difco). The plates were inoculated with a toothpick dipped in TSB-grown overnight cultures of *B. thailandensis* E264 strains adjusted to an OD₆₀₀ of 3.0. The swimming areas were

measured after incubation for 24 hrs at 37°C. Siderophores production was determined using Chrome Azurol S (CAS) agar as described previously (Vial *et al.*, 2008). On CAS agar, siderophores sequester iron from the CAS dye complex, resulting in a blue-to-orange color change in zones surrounding the colonies. The plates were inoculated with 5 µL of cultures of *B. thailandensis* E264 strains grown overnight in TSB and adjusted to an OD₆₀₀ of 3.0. The plates were incubated for 24 hrs at 37°C. The biosynthesis of siderophores was estimated by measuring the area of the halo (mm²) surrounding the colonies. After 24 hrs, the colonies were recovered and colony-forming unit (CFU) counts were performed. All experiments were carried out in triplicate and conducted at least twice independently.

3.3.3.13. Infection of *D. melanogaster*

The fruit flies were infected by feeding according to the protocol previously described (Pilatova *et al.*, 2012). Briefly, 1 g of fruit fly dry medium was put into infection vials. Bacteria were harvested from LB-grown cultures adjusted to an OD₆₀₀ of 4.0 by centrifugation at 10,000 x g for 5 min. The pellets were suspended in 0.02X PBS containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂, as well as 500 µg/mL ampicillin (Ap) to avoid infection with nonspecific bacteria. Two mL of bacterial suspension were added to the dry food. Six-seven days-old male flies were anesthetized with CO₂ and added to the vials by group of 10. The control vials contained the PBS solution only. Fly survival was scored daily and survival curves were processed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) to perform a statistical log-rank (Mantel-Cox) test.

3.3.3.14. Data analysis

Unless stated otherwise, data are reported as means ± standard deviations (SD). Statistical analyses were performed with the R software version 3.3.3 (<http://www.R-project.org/>) using one-way analysis of variance (ANOVA). Probability values of less than 0.05 were considered significant.

3.3.4. Results

3.3.4.1. Expression of the *hmqABCDEFG* operon and HMAQs biosynthesis are repressed by AHL-mediated QS systems

While expression of the *hmqABCDEFG* operon, which encodes the primary enzymes responsible for HMAQs biosynthesis (Vial *et al.*, 2008), is stimulated by AHLs in both *B. pseudomallei* and *B. ambifaria* (Chapalain *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014b), Majerczyk *et al.* (2014a) reported that AHLs repress the *hmqABCDEFG* operon transcription in *B. thailandensis*.

To ascertain that the HMAQ system is negatively regulated by the main AHL signaling molecules found in *B. thailandensis* E264, namely, 3OHC₁₀-HSL and to lesser extents C₈-HSL and 3OHC₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a), we monitored the *hmqA* gene expression by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) in the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and in the AHL-defective $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant, whereas the production of HMAQ-C_{9:2'}, corresponding to the predominant HMAQ synthesized by *B. thailandensis* E264 (Vial *et al.*, 2008), was quantified in the same backgrounds by LC-MS/MS. We observed that both the transcription of *hmqA* and HMAQ-C_{9:2'} biosynthesis were increased in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant compared to the wild-type strain (Fig. 3.59), confirming that the HMAQ system is repressed by AHLs.

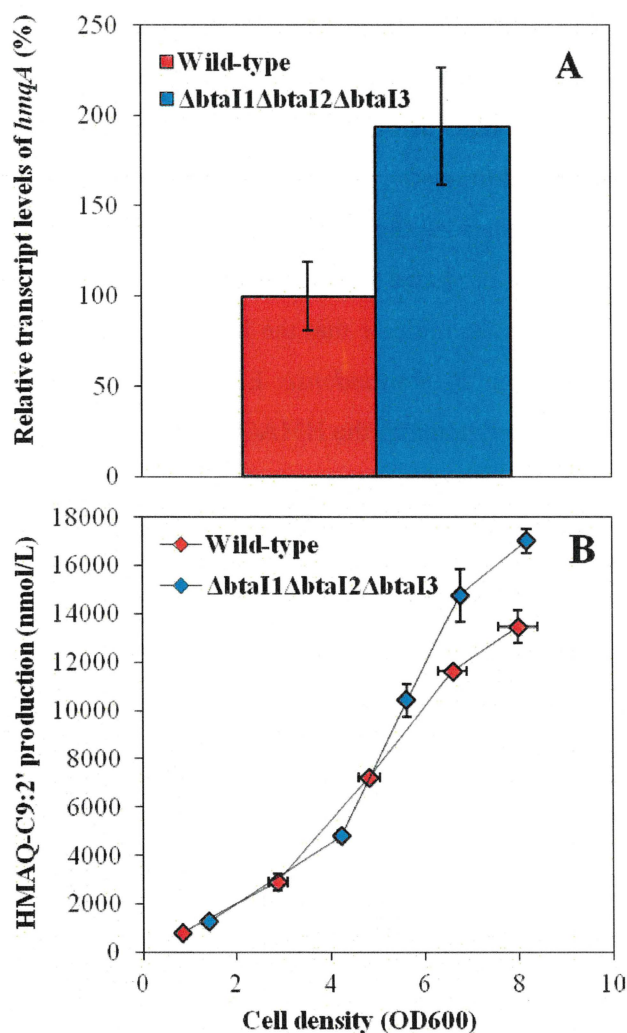


Figure 3.59. Expression of *hmqA* and HMAQ-C₉:2' biosynthesis are repressed by the AHL signaling systems of *B. thailandensis* E264.

(A) The relative transcript levels of *hmqA* were estimated by qRT-PCR during the exponential phase ($OD_{600} \approx 4.0$) in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type and its $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant strains. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The concentrations of HMAQ-C₉:2' were quantified using LC-MS/MS at various time intervals of the bacterial growth in cultures of the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and of the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant.

We recently thoroughly dissected the QS circuitry of *B. thailandensis* and found that the QS-1, QS-2, and QS-3 systems are hierarchically and homeostatically organized, and integrated into an intricate modulatory network, including transcriptional and posttranscriptional interactions (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Le Guillouzer *et al.*, 2018). To further elucidate the impact of AHLs on the HMAQ system, the concentrations of HMAQ-C₉:2' were quantified in the $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$, $\Delta btaI3$, $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutants versus the *B. thailandensis* E264 wild-type strain. While the levels of HMAQ-C₉:2' were not

affected in the non- C_8 -HSL-producing $\Delta btaI1$ mutant in comparison with the wild-type strain, the amounts of HMAQ- $C_9:2'$ were augmented in the absence of both the BtaI2 and BtaI3 synthases, which are mainly responsible for 3OHC $_{10}$ -HSL and 3OHC $_8$ -HSL biosynthesis, respectively (Fig. 3.60A). Additionally, no obvious change in the biosynthesis of HMAQ- $C_9:2'$ was visible in the absence of the BtaR1 transcriptional regulator, whereas both the $\Delta btaR2$ and $\Delta btaR3$ mutants produced more HMAQ- $C_9:2'$ than the wild-type strain (Fig. 3.60B). Collectively, these results indicate that the HMAQ system is negatively regulated by the QS-2 and QS-3 systems in *B. thailandensis* E264, whereas the QS-1 system does not apparently intervene in the modulation of the HMAQ system.

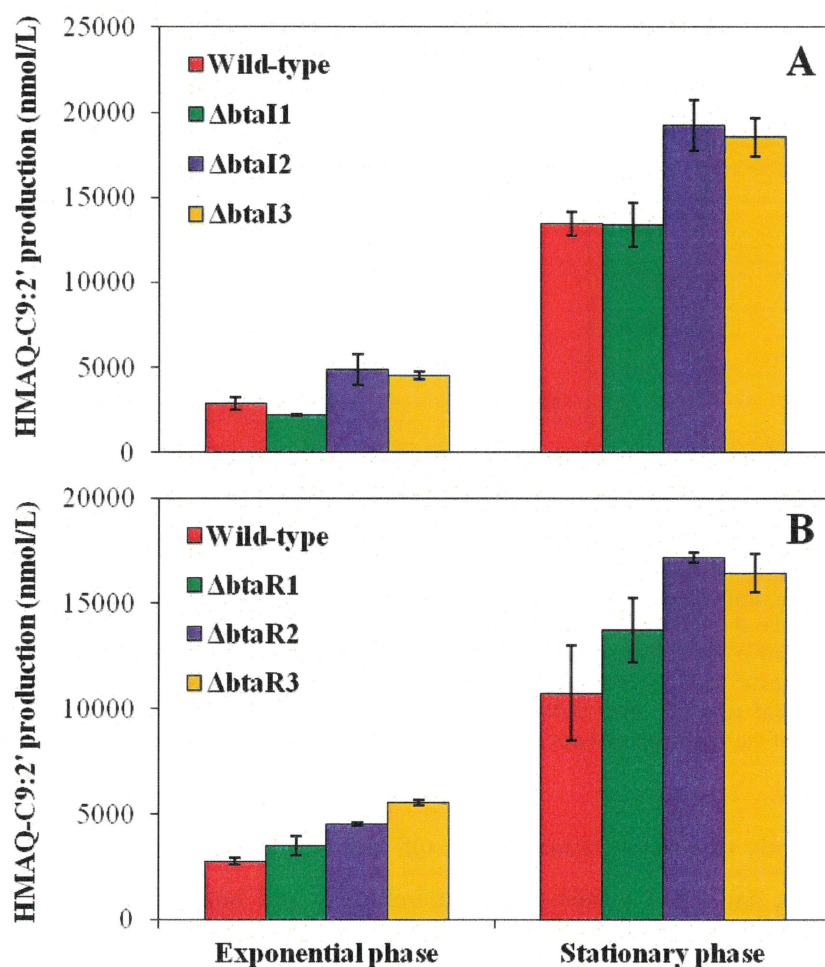


Figure 3.60. HMAQs biosynthesis in the wild-type and QS mutant strains of *B. thailandensis* E264. The production of HMAQ- $C_9:2'$ was assessed using LC-MS/MS during the exponential and stationary ($OD_{600} \approx 8.0$) phases in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and of (A) the $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$, and $\Delta btaI3$ mutants, as well as of (B) the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutants. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates.

3.3.4.2. The HMAQ system activates AHLs biosynthesis but not the transcription of the AHL synthase-coding genes

To further characterize the interplay between the QS-1, QS-2, and QS-3 systems and the HMAQ system, we monitored C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL concentrations in the *hmqA*- mutant strain producing no HMAQs versus the wild-type strain of *B. thailandensis* E264. We observed that the levels of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL were decreased in the *hmqA*- mutant in comparison with the wild-type strain (**Fig. 3.61**), revealing that the biosynthesis of AHLs is positively modulated by the HMAQ system in *B. thailandensis* E264. However, no visible change in C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL amounts was noticed in the absence of the putative methyltransferase HmqG, which is responsible for the methylation of HMAQs (Vial *et al.*, 2008), suggesting that HMAQs are not involved in the HMAQ system-dependent activation of AHLs production (**Fig. 3.62**).

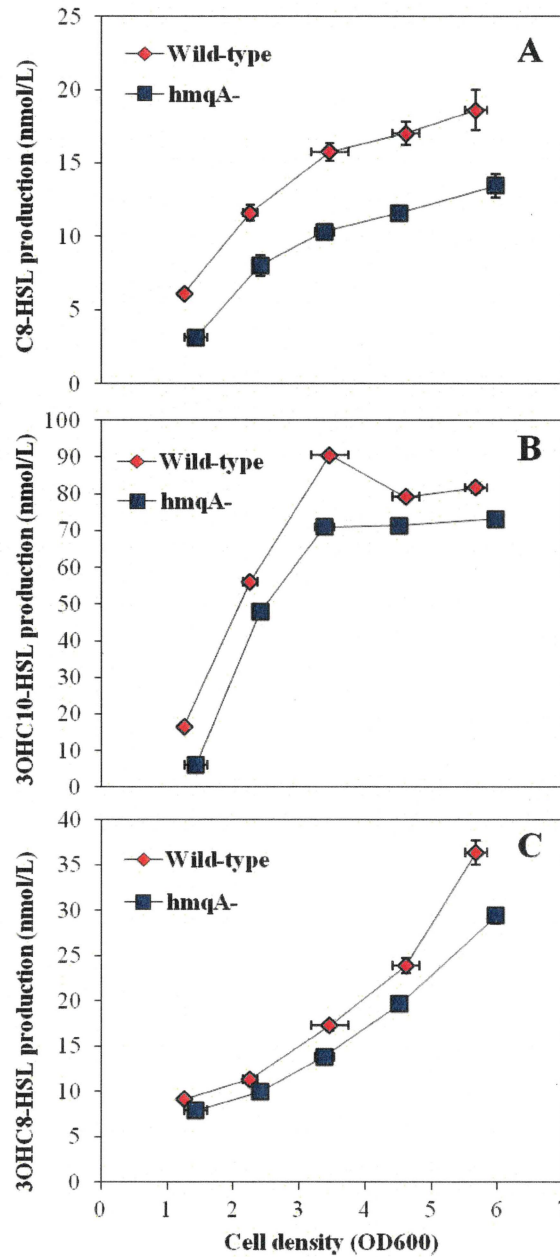


Figure 3.61. AHLs biosynthesis in the wild-type and the *hmqA*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. The production of (A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL, and (C) 3OHC₈-HSL was quantified using LC-MS/MS at various times during growth in cultures of the wild-type strain and of the *hmqA*- mutant strain of *B. thailandensis* E264. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates.

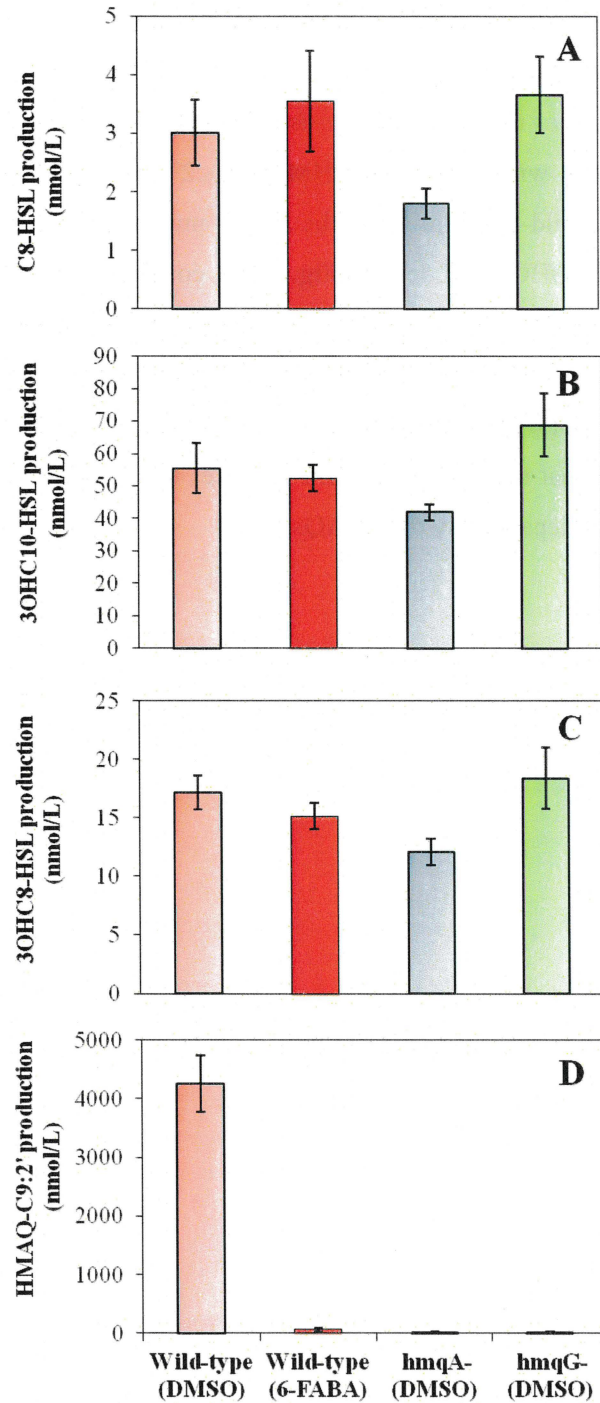


Figure 3.62. The HMAQ system stimulates the *B. thailandensis* E264 QS-1, QS-2, and QS-3 systems independently of HMAQs.

(A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL, (C) 3OHC₈-HSL, and (D) HMAQ-C_{9:2'} concentrations were measured using LC-MS/MS during the logarithmic growth in cultures of the wild-type and of the *hmqA*- and *hmqG*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. Cultures were supplemented with 1 mM 6-FABA. DMSO only was added to the controls. The values represent the means for three replicates.

To verify the involvement of HMAQs in the positive regulation of the QS-1, QS-2, and QS-3 systems, the concentrations of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL were measured in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and of the *hmqA*- mutant strain supplemented with exogenous HMAQ-C₉:2'. Interestingly, adding HMAQ-C₉:2' exogenously to the wild-type strain and the *hmqA*- mutant cultures had no effect on C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL levels (**Fig. 3.63**), confirming that HMAQs do not stimulate the QS-1, QS-2, and QS-3 systems in *B. thailandensis* E264. Furthermore, C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL amounts were unchanged in the presence of 6-FABA, an inhibitor of HMAQs and HAQs biosynthesis (Lesic *et al.*, 2007, Vial *et al.*, 2008) (**Fig. 3.62**). Altogether, these data indicate that the HMAQ system activates the *B. thailandensis* E264 QS-1, QS-2, and QS-3 systems independently of HMAQs.

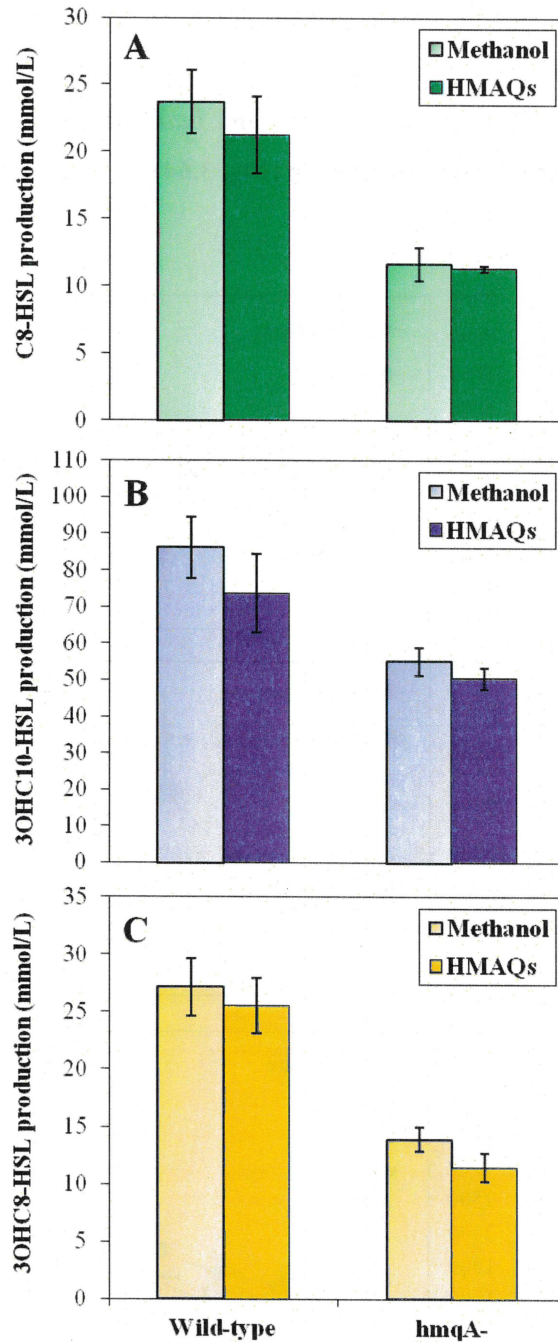


Figure 3.63. The main HMAQ synthesized by *B. thailandensis*, namely, HMAQ-C₉:2' has no impact on C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL production.

The biosynthesis of (A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL, and (C) 3OHC₈-HSL was monitored during the exponential phase in cultures of the wild-type strain and of the *hmqA*- mutant strain of *B. thailandensis* E264. Cultures were supplemented with 50 μM HMAQ-C₉:2'. Methanol only was added to the controls. The values represent the means for three replicates.

To gain insights into the HMAQ system-dependent regulation of AHLs biosynthesis, we monitored the transcription of the AHL synthase-coding genes *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* in

the wild-type strain and in the *hmqA*- mutant strain of *B. thailandensis* E264 using the chromosomal *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, and *btaI3-lux* transcriptional fusions, respectively. Surprisingly, expression from the *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* promoters was unaffected in the *hmqA*- mutant compared to the wild-type strain (Fig. 3.64).

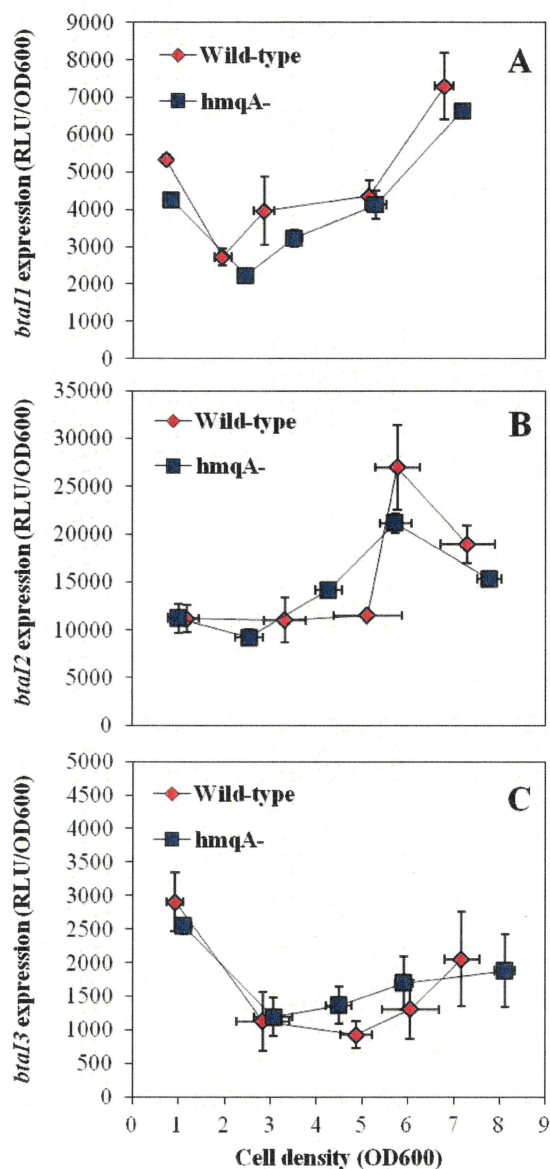


Figure 3.64. Expression from the *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* promoters in the wild-type and the *hmqA*- mutant strains of *B. thailandensis* E264.

The luciferase activity of the chromosomal (A) *btaI1-lux*, (B) *btaI2-lux*, and (C) *btaI3-lux* transcriptional fusions was monitored throughout the bacterial growth phases in cultures of the wild-type strain and of the *hmqA*-mutant strain of *B. thailandensis* E264. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

Moreover, the *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* genes transcription was assessed by qRT-PCR in the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and in the *hmqA*- and *hmqG*- mutants. We noticed no discernible difference in expression of *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* in the *hmqA*- and *hmqG*- mutants in comparison with the wild-type strain (**Fig. 3.65A**), correlating with the *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* genes expression profiles in these backgrounds (**Fig. 3.65B**). All in all, these observations indicate that the production of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL is not controlled by the HMAQ system through modulation of the transcription of the QS-1, QS-2, and QS-3 system genes.

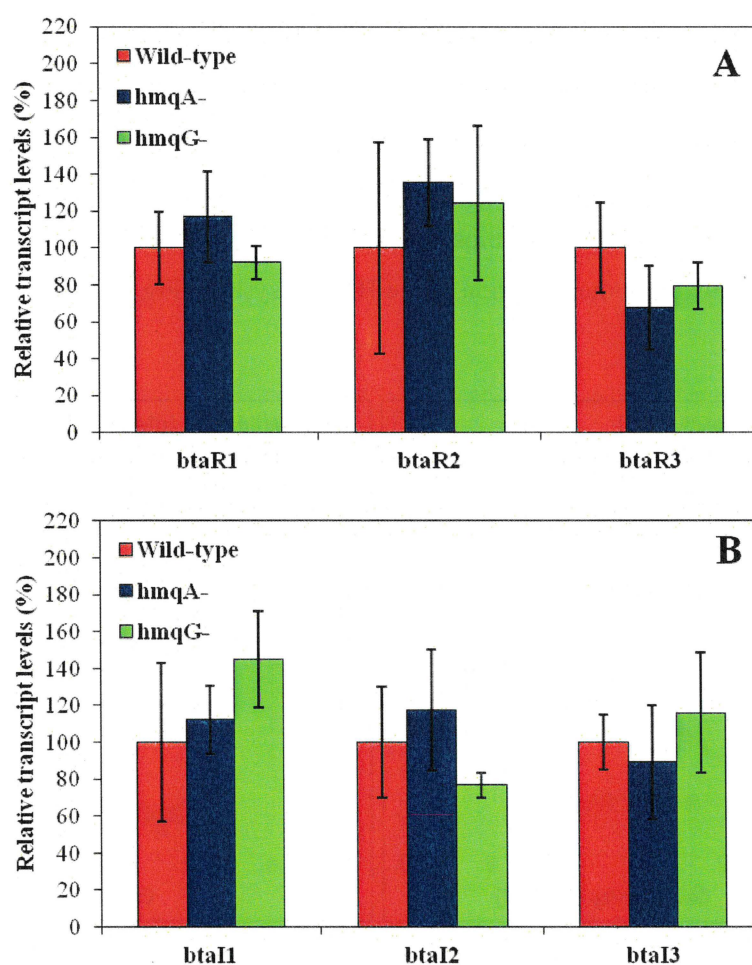


Figure 3.65. The transcription of the QS-1, QS-2, and QS-3 system genes is not modulated by the HMAQ system.

The relative transcript levels of (A) *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3*, as well as of (B) *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* were assessed by qRT-PCR during the exponential phase in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type and its *hmqA*- and *hmqG*- mutant strains. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The values represent the means for three replicates.

3.3.4.3. The LysR-type transcriptional regulator ScmR stimulates expression of the *hmqABCDEFG* operon and HMAQs biosynthesis

To further elucidate the regulatory mechanisms directing *hmqABCDEFG* transcription and the production of HMAQs, we performed a random whole-genome transposon-insertion mutagenesis using the *B. thailandensis* E264 wild-type strain carrying a chromosomal *hmqA-lacZ* transcriptional reporter followed by sequence-based identification of insertion sites. Screening approximately 70,000 *B. thailandensis* E264::pUT-mini-Tn5-Km transposants for altered expression from the *hmqA* promoter resulted in the identification of one mutant, which was severely impaired in the *hmqA* gene transcription in comparison with the wild-type strain (Fig. 3.66A). This transposant had a mini-Tn5-Km insertion in the *scmR* gene encoding the LysR-type transcriptional regulator ScmR. The biosynthesis of HMAQ-C₉:2' was also completely abolished in the *scmR*- mutant compared to the wild-type strain (Fig. 3.66B). Additionally, complementation with a plasmid-borne *scmR* restored both expression from the *hmqA* promoter and HMAQ-C₉:2' biosynthesis, confirming the involvement of the ScmR transcriptional regulator in the induction of the HMAQ system (Fig. 3.66).

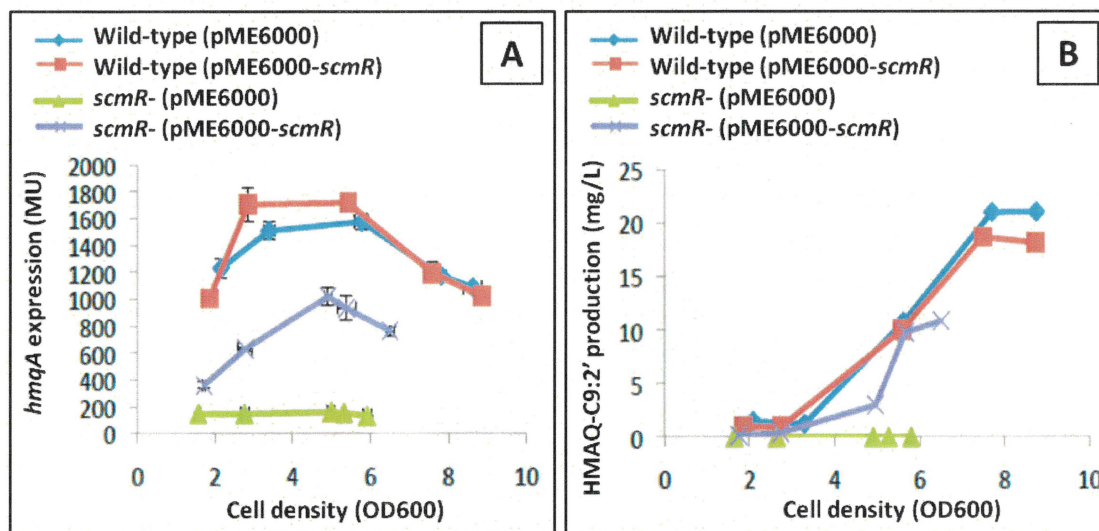


Figure 3.66. Activation of the *hmqABCDEFG* operon transcription and the production of HMAQs requires the LysR-type transcriptional regulator ScmR.

(A) The β -galactosidase activity of the chromosomal *hmqA-lacZ* transcriptional fusion was monitored at various times during growth in cultures of the wild-type strain and of the *scmR*- mutant strain of *B. thailandensis* E264 carrying either pME6000 or pME6000-*scmR*. The β -galactosidase activity is expressed in Miller units (MU). The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The biosynthesis of HMAQ-C₉:2' was quantified using LC-MS/MS in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant carrying either pME6000 or pME6000-*scmR*.

Considering that the LysR-type transcriptional regulator MvfR in conjunction with HHQ or PQS modulates positively and directly expression of the *pqsABCDE* operon in *P. aeruginosa* (Cao *et al.*, 2001, Déziel *et al.*, 2005, Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002, McGrath *et al.*, 2004, Wade *et al.*, 2005), we hypothesized that *hmqABCDEFG* transcription is positively and directly regulated by ScmR in association with HMAQs. A heterologous host *E. coli* expression reporter system was developed to examine the possibility of direct interaction of ScmR with the promoter region of the *hmqA* gene. *E. coli* DH5 α recombinant strains were generated containing the pQF50::*PhmqA* transcriptional reporter and either pME6000 or pME6000-*scmR* for constitutive expression of the ScmR transcriptional regulator. ScmR did not stimulate *hmqA* transcription in *E. coli* DH5 α recombinant strain cultures supplemented with exogenous HMAQ-C₉:2' or not supplemented with HMAQ-C₉:2' (Fig. 3.67), suggesting that ScmR does not directly activate expression of the *hmqABCDEFG* operon or that additional unknown factor(s), which might be absent in the *E. coli* background, are required for the ScmR-dependent activation of *hmqABCDEFG* transcription.

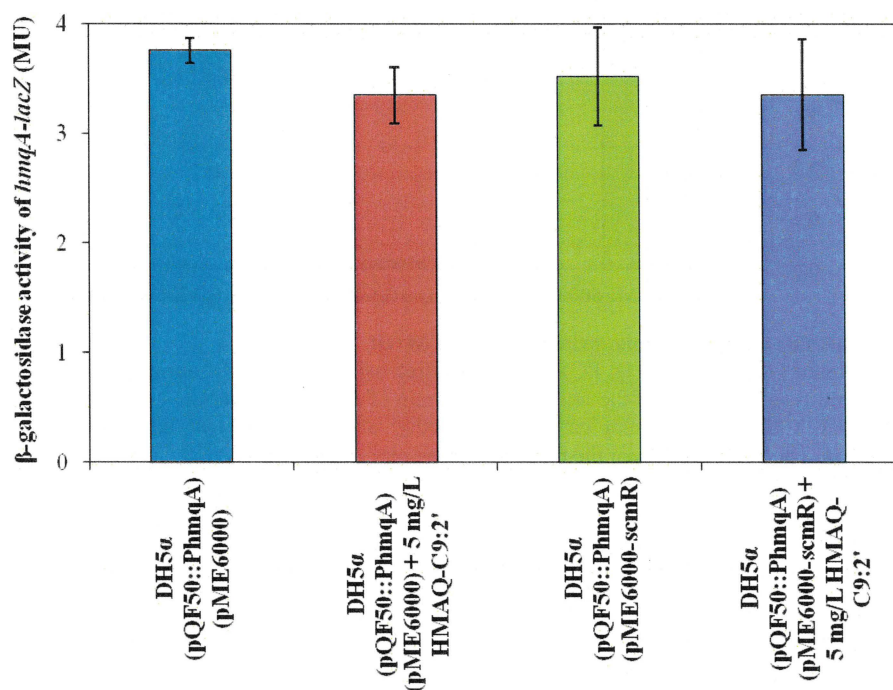


Figure 3.67. The *hmqA* promoter response to the ScmR transcriptional regulator and HMAQs. The β -galactosidase activity of the pQF50::*PhmqA* transcriptional reporter was assessed in cultures of recombinant *E. coli* DH5 α strains containing either pME6000 or pME6000-*scmR*. Cultures were supplemented with 5 mg/L HMAQ-C₉:2'. Methanol only was added to the controls. The values represent the means for three replicates. The β -galactosidase activity is expressed in Miller units (MU).

Additionally, the loss of HAQs production in the *P. aeruginosa* PA14 *mvfR*- mutant could not be restored by complementation with the *scmR* gene from *B. thailandensis* E264, indicating that MvfR and ScmR are very likely functionally different (Fig. 3.68).

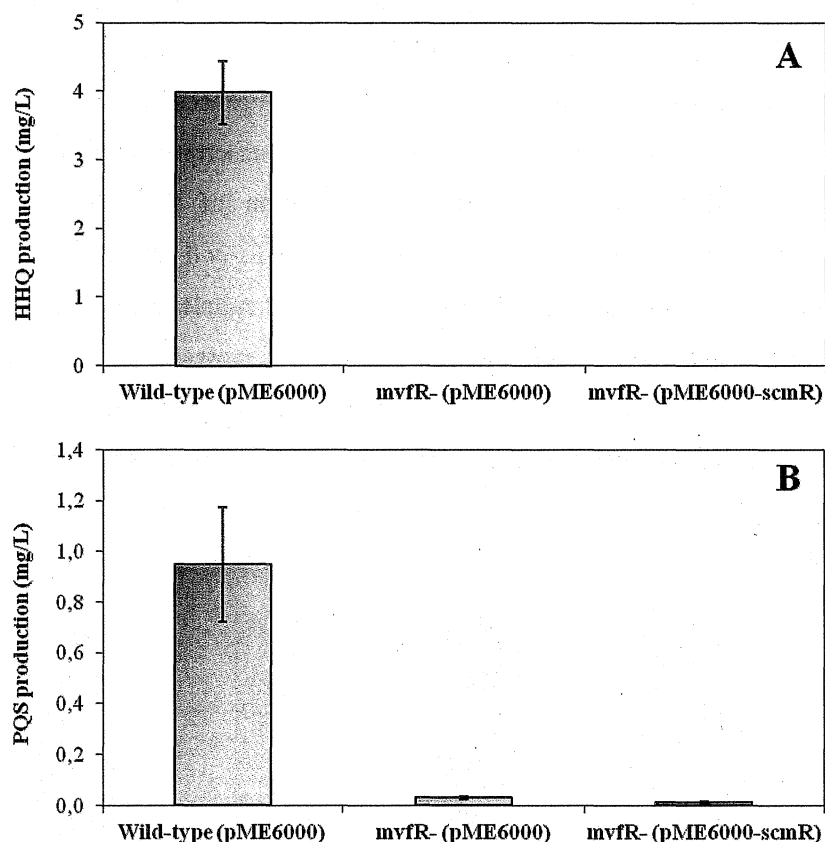


Figure 3.68. ScmR does not complement the function of MvfR.

The concentrations of (A) HHQ and (B) PQS were quantified using LC-MS/MS during the stationary phase in cultures of the wild-type strain and of the *mvfR*- mutant strain of *P. aeruginosa* PA14 carrying either pME6000 or pME6000-*scmR*. Cultures were supplemented with ethyl acetate extracts of the wild-type strain of *B. thailandensis* E264. The values represent the means for three replicates.

3.3.4.4. HMAQs do not influence the *hmqABCDEF* operon transcription

To determine whether HMAQs are able to activate their own production, similarly to HAQs in *P. aeruginosa* (Diggle *et al.*, 2007, Fletcher *et al.*, 2007, Ilangovan *et al.*, 2013, Rampioni *et al.*, 2016, Wade *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 2006a, Xiao *et al.*, 2006b), we monitored the activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional reporter in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and in the *hmqA*- and *hmqG*- mutants. Interestingly, expression from the *hmqA* promoter was increased in the *hmqA*- mutant compared to the wild-

type strain, suggesting that the *hmqABCDEFG* operon is negatively autoregulated in *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.69A**). Nevertheless, we noticed no discernible difference in the *hmqA* gene transcription in the *hmqG*- mutant in comparison with the wild-type strain (**Fig. 3.69A**), as confirmed by qRT-PCR experiments (**Fig. 3.70**). Thus, HMAQs might not be responsible for the negative autoregulation of the *hmqABCDEFG* operon since the latter mutant is only defective in methylation of HAQ at the 3' position. Indeed, no visible change in expression from the *hmqA* promoter was detected in the wild-type strain and the *hmqA*-mutant cultures supplemented with exogenous HMAQ-C₉:2' or not supplemented with HMAQ-C₉:2' (**Figs. 3.69B** and **C**), and the *hmqA* gene transcription was not affected in the presence of 6-FABA as well (**Figs. 3.69D**). Collectively, these observations indicate that the *hmqABCDEFG* operon is not negatively autoregulated via HMAQs.

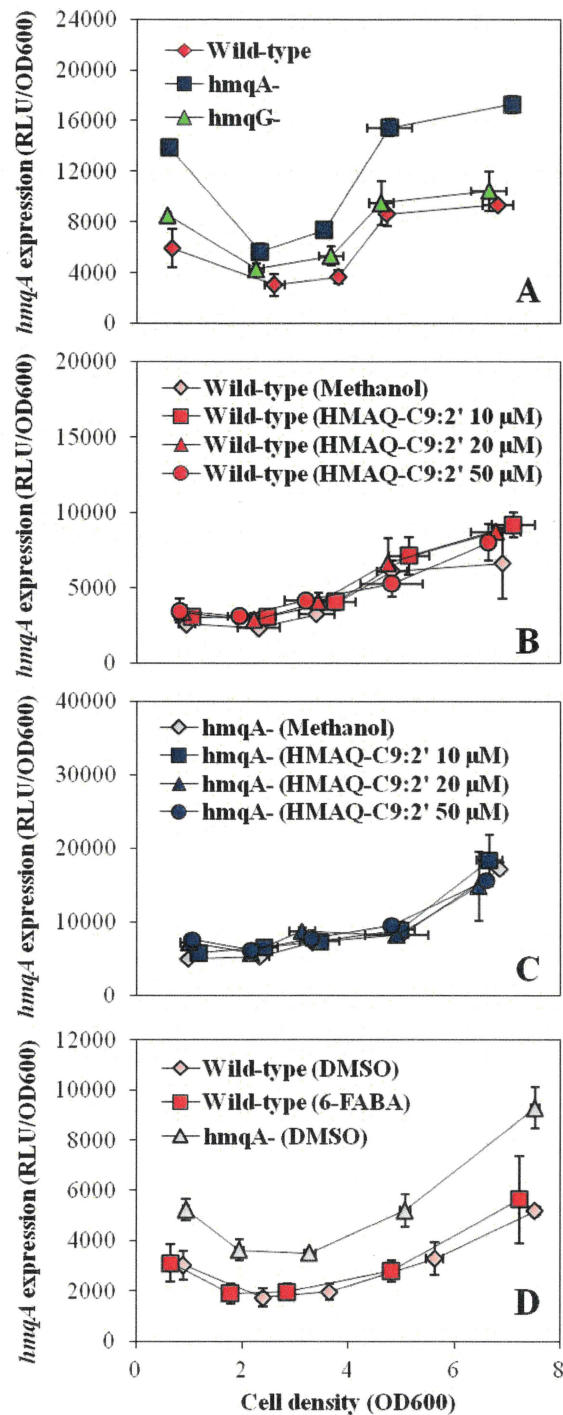


Figure 3.69. HMAQs are not involved in the regulation of the *hmqABCDEF*G operon transcription.

(A) The luciferase activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional fusion was monitored at various times during the bacterial growth in cultures of the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and of the *hmqA*- and *hmqG*- mutant strains. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). The luciferase activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional fusion was measured in cultures of (B) the wild-type and of (C) the *hmqA*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. Cultures were supplemented with 10, 20, or 50 μM HMAQ-C₉:2'. Methanol only was added to the controls. (D) The luciferase activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional fusion was assessed in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and of the *hmqA*-mutant. Cultures were supplemented with 1 mM 6-FABA. DMSO only was added to the controls.

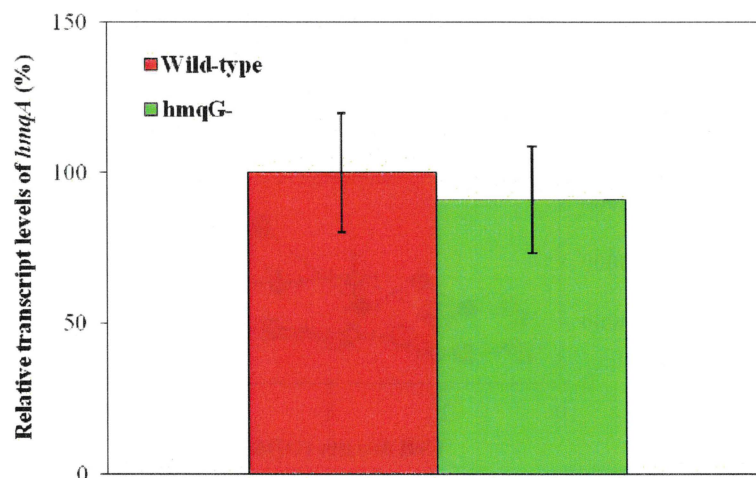


Figure 3.70. Expression of the *hmqA* gene in the wild-type and the *hmqG*⁻ mutant strains of *B. thailandensis* E264.

The relative transcript levels of *hmqA* were assessed by qRT-PCR during the exponential phase in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type and its *hmqG*⁻ mutant strains. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The values represent the means for three replicates.

Since we demonstrated that expression of the *hmqABCDEFG* operon and HMAQ biosynthesis are repressed by the AHL signaling systems of *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.59**), and observed that the concentrations of AHLs were decreased in the *hmqA*⁻ mutant in comparison with the wild-type strain (**Fig. 3.61**), we hypothesized that the HMAQ system is negatively and indirectly autoregulated through AHLs. Therefore, we examined the involvement of AHLs in the negative autoregulation of the *hmqABCDEFG* operon by monitoring expression from the *hmqA* promoter in response to exogenously added C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL to cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and of the *hmqA*⁻ mutant. However, AHLs had no impact on expression from the *hmqA* promoter in both the wild-type strain and the *hmqA*⁻ mutant, showing that upregulation of *hmqABCDEFG* in the *hmqA*⁻ mutant background is not indirectly induced by the positive effect of the HMAQ system on AHLs biosynthesis (**Fig. 3.71**). All in all, these results show that HMAQs do not control their own production, suggesting that they do not constitute intraspecies communication signaling molecules.

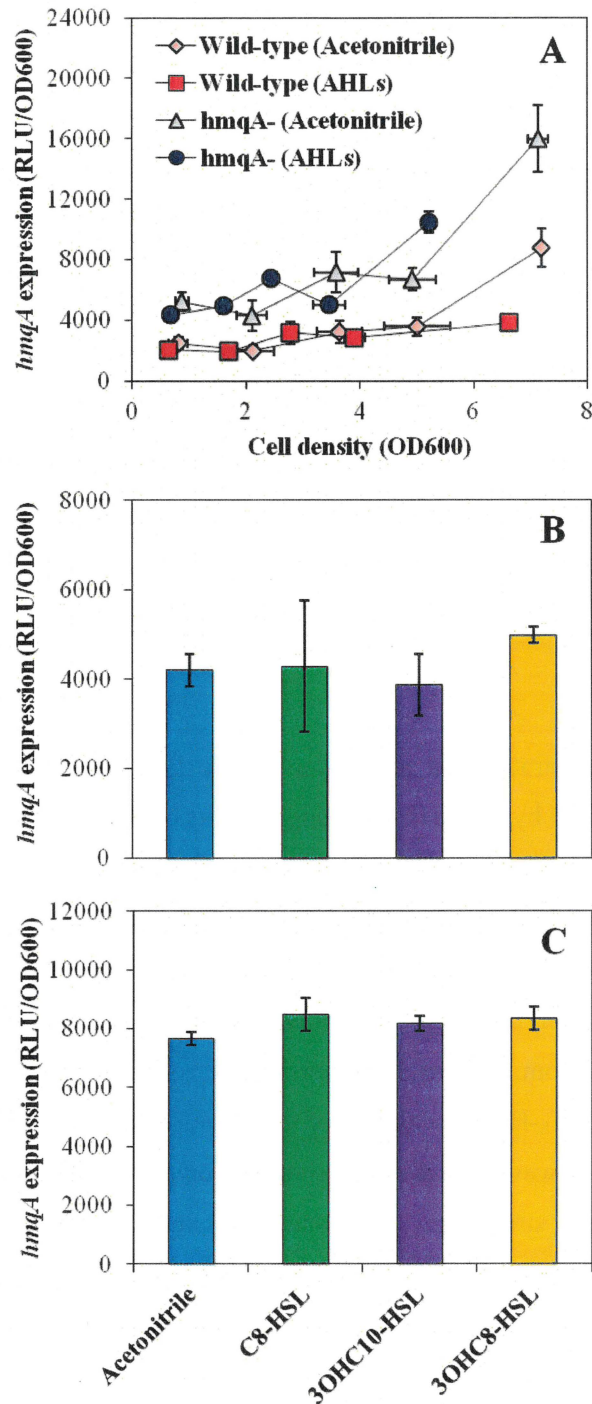


Figure 3.71. Effects of AHLs on expression from the *hmqA* promoter in the wild-type and the *hmqA*-mutant strains of *B. thailandensis* E264.

(A) The luciferase activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional fusion was monitored throughout the bacterial growth phases in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type and of the *hmqA*-mutant strains. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). The luciferase activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional fusion was monitored during the exponential phase in cultures of (B) the wild-type and of (C) the *hmqA*-mutant strains of *B. thailandensis* E264. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls.

3.3.4.5. HMAQs can act as signaling molecules in interspecies communication

While we found that both HHQ and PQS had no impact on expression from the *hmqA* promoter (Fig. 3.72), revealing that neither HAQs, nor HMAQs regulate the *hmqA* gene transcription, we asked whether HMAQs, similarly to HAQs, could activate the *pqsABCDE* operon and, presumably, act as molecular signals in interspecies communication.

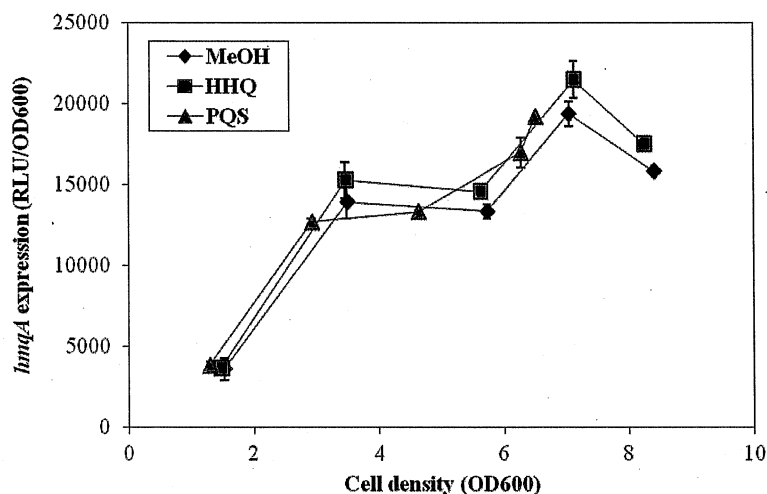


Figure 3.72. Effects of HAQs on expression from the *hmqA* promoter of *B. thailandensis* E264.

The luciferase activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional fusion was monitored throughout the bacterial growth phases in cultures of the *B. thailandensis* E264 *hmqA*-mutant background. Cultures were supplemented with 50 μ M HHQ or PQS. Methanol only was added to the controls. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

We tested the ability of HMAQs specifically produced in the *Burkholderia* genus to activate expression of the *P. aeruginosa pqsABCDE* operon by measuring the activity of the chromosomal *pqsA-lacZ* transcriptional reporter throughout the bacterial growth phases in the HAQ-null *pqsA*-mutant strain of *P. aeruginosa* PA14 supplemented with *P. aeruginosa* PA14, *B. thailandensis* E264, or *B. ambifaria* HSJ1 culture extracts. We observed that expression from the *pqsA* promoter was upregulated in the *pqsA*-mutant background in the presence of a *P. aeruginosa* PA14 wild-type extract containing both HHQ and PQS, in agreement with the auto-inducing properties of these HAQs (Fig. 3.73). Furthermore, adding a wild-type *B. thailandensis* E264 or *B. ambifaria* HSJ1 extract to cultures of the *P. aeruginosa* PA14 *pqsA*-mutant strain also activated expression of the *pqsA-lacZ* transcriptional fusion (Fig. 3.73). Moreover, activation of the *pqsABCDE* operon transcription was much stronger when the added extract was prepared from the *hmqG*-mutant, which does

not synthesize any methylated HAQs but accumulates nonmethylated HAQs (Vial *et al.*, 2008), whereas an extract from the *hmqA*- mutant, producing neither HMAQs nor HAQs (Vial *et al.*, 2008), had no impact on expression of the *pqsABCDE* operon (Fig. 3.73).

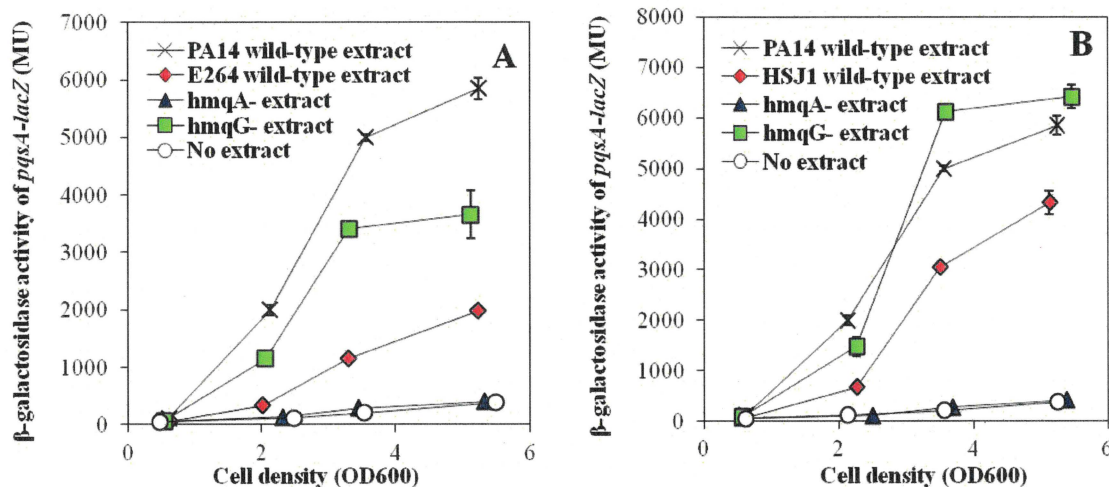


Figure 3.73. HMAQs can act as molecular signals in interspecies communication.

The β -galactosidase activity of the chromosomal *pqsA-lacZ* transcriptional reporter was monitored throughout the bacterial growth phases in cultures of the *P. aeruginosa* PA14 *pqsA*- mutant background. Cultures were supplemented or not with ethyl acetate extracts of the wild-type strain of *P. aeruginosa* PA14, as well as of (A) the wild-type, the *hmqA*- or *hmqG*- mutant strains of *B. thailandensis* E264, and (B) the wild-type, the *hmqA*- or *hmqG*- mutant strains of *B. ambifaria* HSJ1. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The β -galactosidase activity is expressed in Miller units (MU).

The same results were obtained when purified HMAQs were added to the *pqsA*-mutant background (Fig. 3.74). Since HHQ and PQS possess a seven-carbon side chain, it was interesting to note that extracts (Fig. 3.73B) and pure HMAQ-C₇:2' (Fig. 3.74) from *B. ambifaria* HSJ1 were more strongly inducing than extracts (Fig. 3.73A) and pure HMAQ-C₉:2' (Fig. 3.74) from *B. thailandensis* E264, respectively. Taken together, these data indicate that H(M)AQs produced by *Burkholderia* spp., similarly to HHQ and PQS, stimulate the *P. aeruginosa pqsABCDE* operon transcription, although with less efficiency when the molecule is naturally methylated at the 3' position, highlighting that HMAQs might intervene as signaling molecules in interspecies communication.

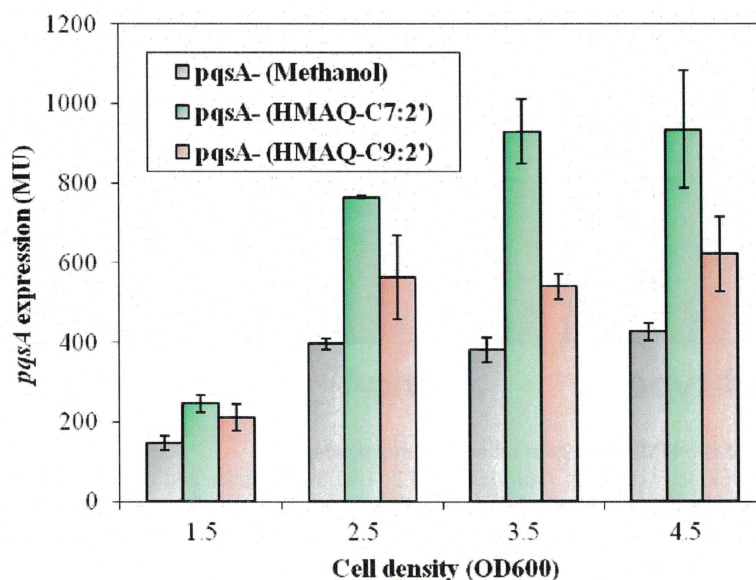


Figure 3.74. Effects of HMAQs on expression from the *pqsA* promoter of *P. aeruginosa* PA14.

The β -galactosidase activity of the chromosomal *pqsA-lacZ* transcriptional reporter was assessed at various times during the bacterial growth in cultures of the *P. aeruginosa* PA14 *pqsA*- mutant background. Cultures were supplemented with 35 μ M HMAQ-C₇:2' or HMAQ-C₉:2'. Methanol only was added to the controls. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The β -galactosidase activity is expressed in Miller units (MU).

3.3.4.6. The HMAQ system influences colony morphology, biofilm and pellicle formation, swimming motility, siderophores production, and virulence in the fruit fly model *Drosophila melanogaster*

While investigating the function of HMAQs, we noticed morphological differences between the wild-type strain and the *hmqA*- and *hmqG*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. The *hmqA*- mutant strain colonies displayed an altered smooth morphology contrasting with the rough appearance of the wild-type strain and the *hmqG*- mutant strain colonies, showing that colony morphology is modulated by the HMAQ system in *B. thailandensis* E264 (Fig. 3.75).

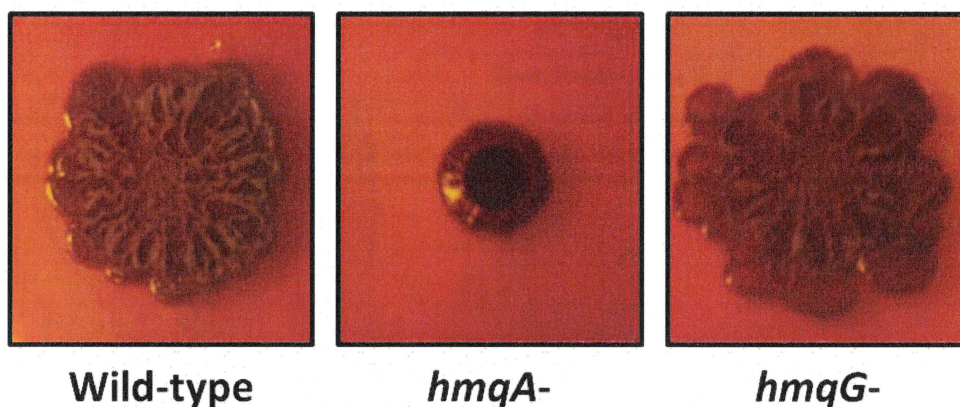


Figure 3.75. Effect of the HMAQ system on colony morphology.

To assess colony morphology of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and of the *hmqA*- and *hmqG*- mutant strains, 5 μ L from TSB-grown overnight cultures adjusted to an OD₆₀₀ of 3.0 were spotted onto Ashdown agar (Ashdown, 1979). The photographs were taken after incubation for 48 hrs at 37°C and an additional 72 hrs at room temperature.

Furthermore, the *hmqA*- mutant, but not the *hmqG*- mutant, was impaired in biofilm formation compared to the wild-type strain (**Fig. 3.76A**). The *hmqA*- mutant was also unable to form a surface pellicle, a biofilm floating at the air-liquid interface (Armitano *et al.*, 2014), in standing liquid cultures in borosilicate glass tubes, whereas both the wild-type strain and the *hmqG*- mutant formed a thick one (**Fig. 3.76B**). Importantly, we detected no difference in growth between the wild-type strain and the *hmqA*- and *hmqG*- mutant strains of *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.76C**). Altogether, these data indicate that the development of biofilm is regulated by the HMAQ system in *B. thailandensis* E264.

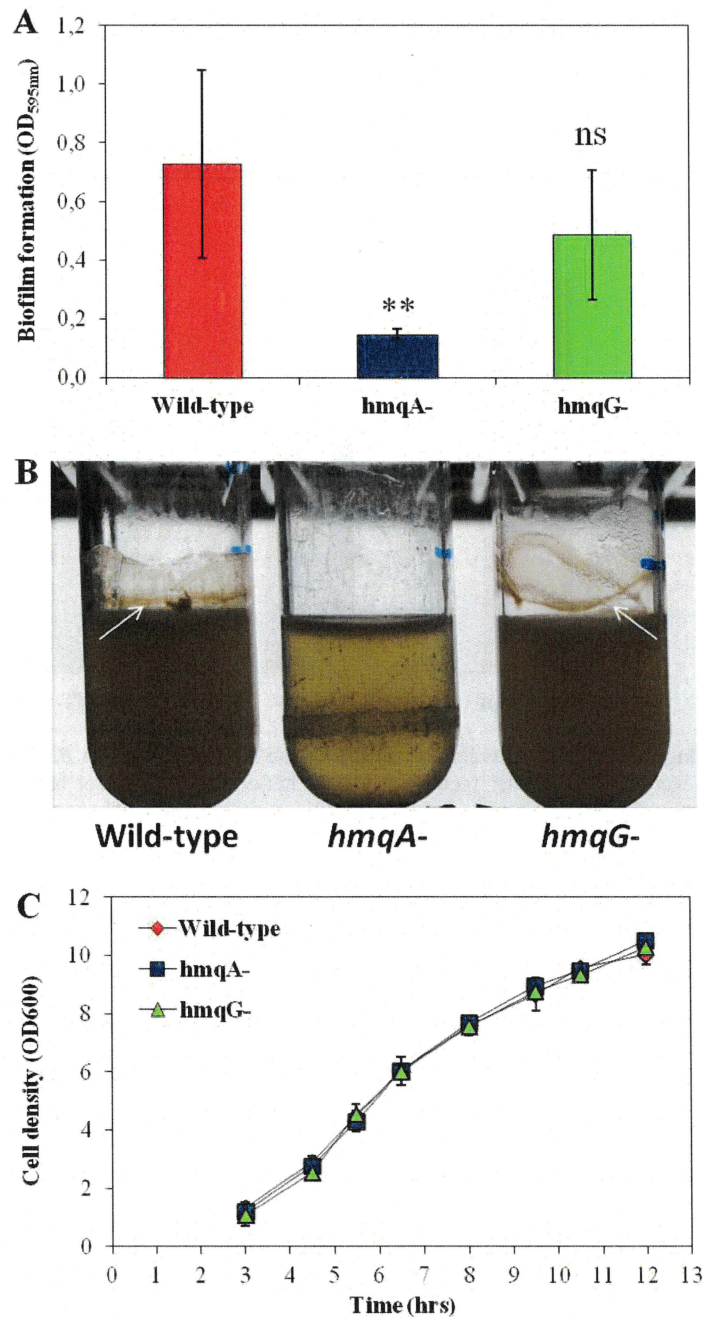


Figure 3.76. Impact of the HMAQ system on biofilm and pellicle formation.

(A) Biofilm formation was determined by OD_{595nm} reading of crystal violet stain solubilized by ethanol. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. **, $P < 0.01$; ns, nonsignificant. (B) To assess pellicle formation, indicated by arrows, by the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *hmqA*- and *hmqG*- mutant strains, overnight bacterial cultures were diluted in TSB to an initial OD₆₀₀ of 0.05 and statically grown for 24 hrs at 37°C. (C) Growth curves of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and its *hmqA*- and *hmqG*- mutant strains.

The *hmqA*- mutant, but not the *hmqG*- mutant, showed a significant decrease in swimming compared to the wild-type strain, revealing that motility is activated by the HMAQ

system (Fig. 3.77). We tested the effect of HMAQs on swarming as well, but we found no reproducible experimental conditions (data not shown).

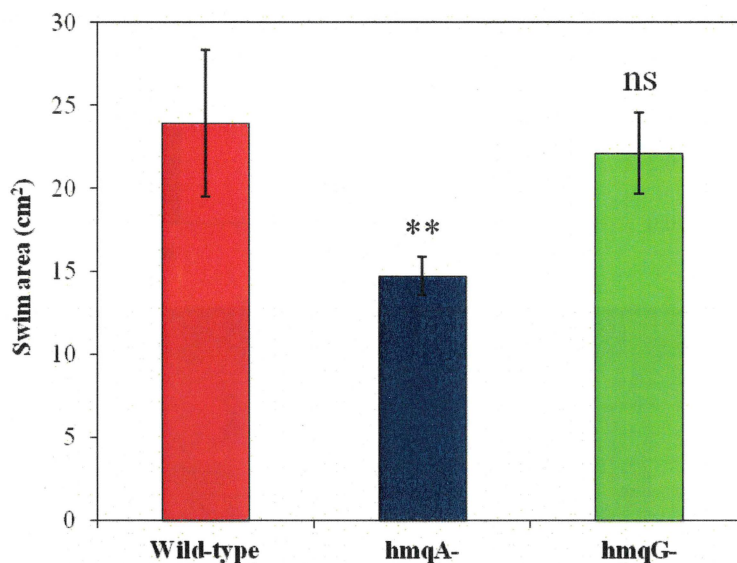


Figure 3.77. Swimming motility is positively controlled by the HMAQ system in *B. thailandensis* E264. The swimming areas were measured after incubation for 24 hrs at 37°C. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. **, $P < 0.01$; ns, nonsignificant.

Additionally, we analyzed the impact of the HMAQ system on the production of several extracellular enzymes, including proteases, elastases, and lipases. No discernible difference was detected in the *hmqA*- mutant in comparison with the wild-type strain (data not shown). Moreover, we noticed no visible change in haemolytic activity and in rhamnolipids biosynthesis in the absence of HMAQs (data not shown). However, siderophores production was strongly influenced in the *hmqA*- mutant compared to the wild-type strain (Fig. 3.78), and cocultivating the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 with the *hmqA*- mutant decreased the biosynthesis of siderophores to a level comparable to the one observed for the wild-type strain alone (Fig. 3.78). This complementation was not attributable to a variation in growth between these strains as CFUs found inside the colony displaying the activity on CAS agar were measured showing no discernible difference (data not shown). Taken together, these results indicate that siderophores production is repressed by the HMAQ system.

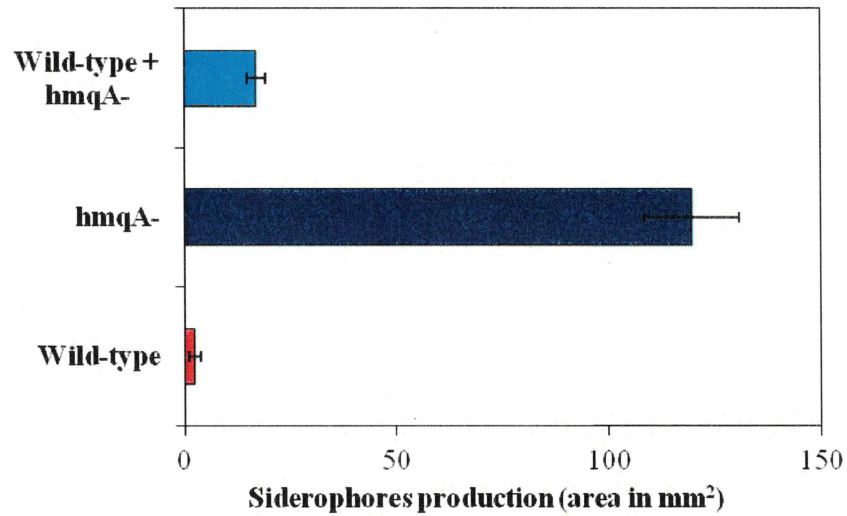


Figure 3.78. The biosynthesis of siderophores is negatively controlled by the HMAQ system in *B. thailandensis* E264.

To assess siderophores production, 5 μ L from TSB-grown overnight cultures adjusted to an OD₆₀₀ of 3.0 were spotted onto CAS agar (Schwyn *et al.*, 1987). The biosynthesis of siderophores was estimated by measuring the area of the halo (mm²) surrounding the colonies after incubation for 24 hrs at 37°C. The values represent the means for three replicates.

Finally, we used the *D. melanogaster* host model to assess the virulence of the wild-type strain and the *hmqA*- mutant of *B. thailandensis* E264. We found that the *hmqA*- mutant was significantly less virulent than the wild-type strain ($P < 0.001$) (**Fig. 3.79**), highlighting that the HMAQ system activates virulence in *B. thailandensis* E264.

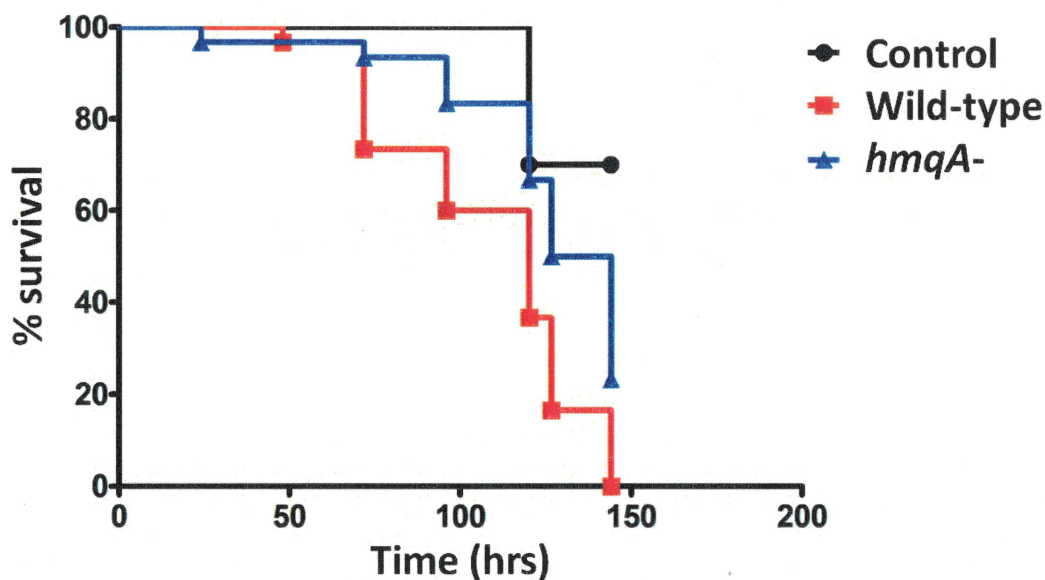


Figure 3.79. Virulence of the wild-type strain and of the *hmqA*- mutant strain of *B. thailandensis* E264 toward the fruit fly *D. melanogaster*.

3.3.5. Discussion

Several *Burkholderia* spp., namely, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei*, and *B. ambifaria*, synthesize HMAQs that are considered putative signaling molecules and potential virulence determinants given their structural analogies with HAQs specifically produced by *P. aeruginosa*. The function of HMAQs had been previously addressed in the opportunistic pathogens *B. pseudomallei* and *B. ambifaria*, showing their possible involvement in bacterial communication as well as in the establishment of host-pathogen interactions (Butt *et al.*, 2016, Chapalain *et al.*, 2017, Diggle *et al.*, 2006b, Vial *et al.*, 2010, Vial *et al.*, 2008). Here, we demonstrated that HMAQs indeed constitute signaling molecules and that the HMAQ system is implicated in bacterial pathogenicity.

We observed an interconnection between AHLs and the HMAQ system in the nonpathogenic soil saprophyte *B. thailandensis* (Fig. 3.80). We confirmed that expression of the *B. thailandensis* E264 *hmqABCDEFGH* operon, which is required for HMAQs production (Vial *et al.*, 2008), is repressed by AHL-mediated QS systems (Majerczyk *et al.*, 2014a). In contrast, AHL signaling systems were shown to activate the transcription of the *hmqABCDEFGH* operon in both *B. ambifaria* HSJ1 and *B. pseudomallei* 1026b (Chapalain *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014b). Therefore, the regulatory mechanisms directing the biosynthesis of HMAQs might be species-dependent, presumably reflecting environmental

adaptations of these *Burkholderia* spp. This is especially striking for *B. pseudomallei*, which is closely related to *B. thailandensis* and expected to behave similarly (Majerczyk *et al.*, 2013a). Nevertheless, we recently reported that the QS regulatory network in *B. thailandensis* and *B. pseudomallei* is actually relatively different (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Le Guillouzer *et al.*, 2018).

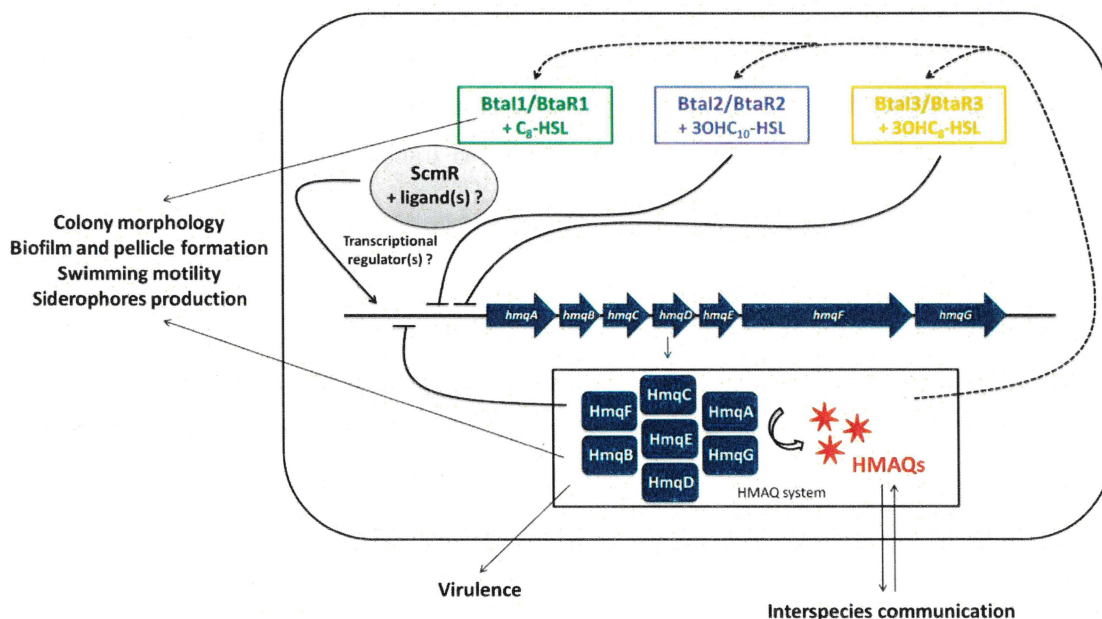


Figure 3.80. Hypothetical regulatory mechanisms directing expression of the *hmqABCDEFG* operon and HMAQs production and the phenotypic traits controlled by the HMAQ system in *B. thailandensis* E264.

Similarly, transcription of the *pqsABCDE* operon, encoding the primary enzymes responsible for HAQs production (Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002), is regulated by the AHL-based QS systems LasI/LasR and RhII/RhIR in *P. aeruginosa* (Gilbert *et al.*, 2009, McGrath *et al.*, 2004, Wade *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 2006b). These QS systems were reported to directly modulate expression of the *pqsABCDE* operon as well as indirectly via the LysR-type transcriptional regulator MvfR (PqsR), which constitutes the main regulator of the biosynthesis of HAQs (Calfee *et al.*, 2001, Cao *et al.*, 2001, Déziel *et al.*, 2005, Déziel *et al.*, 2004, Gallagher *et al.*, 2002, McGrath *et al.*, 2004, Wade *et al.*, 2005). The precise underlying molecular mechanism of action of the *Burkholderia* spp. AHL signaling systems is currently unknown and no homologue of the *mvfR* (*pqsR*) gene has been found among the HMAQ-producing *Burkholderia* species (Chapalain *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a, Majerczyk *et al.*, 2014b, Vial *et al.*, 2008). Mao *et al.* (2017) demonstrated that the *B. thailandensis* E264

hmqABCDEFG operon transcription as well as the biosynthesis of HMAQs are activated by the recently identified LysR-type transcriptional regulator ScmR. Interestingly, a random mutagenesis screening procedure revealed only one mutant with a defect in expression of *hmqABCDEFG* and HMAQs production in exactly the same gene. (Fig. 3.66). Still, we have been unable to show a direct interaction between the ScmR transcriptional regulator and the promoter region of the *hmqA* gene when co-expressed together in a heterologous host system (Fig. 3.67), probably because its impact on the HMAQ system implicates additional modulatory elements, including other transcriptional regulators and/or alternative molecular ligands (Fig. 3.80). More experiments will thus be necessary to further characterize the mode of action of ScmR in the regulation of *hmqABCDEFG* transcription and the biosynthesis of HMAQs.

HMAQs, which are specifically found among the *Burkholderia* genus, are proposed to act as molecular signals, according to their structural analogies with HAQs produced by *P. aeruginosa* (Vial *et al.*, 2008). The signaling molecules HHQ and PQS activate the transcription of *pqsABCDE* via their role as ligands of MvfR, resulting in a typical QS self-inducing loop (Diggle *et al.*, 2007, Fletcher *et al.*, 2007, Rampioni *et al.*, 2016, Wade *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 2006a, Xiao *et al.*, 2006b). As we reported for *B. ambifaria* HSJ1 (Chapalain *et al.*, 2017), HMAQs do not modulate expression of the *hmqABCDEFG* operon in *B. thailandensis* E264 (Fig. 3.69). Thus, we suppose that another regulatory component of the HMAQ system is involved in the negative autoregulation of *hmqABCDEFG* transcription in *Burkholderia* spp.

Since PqsE was shown to repress the *pqsABCDE* operon transcription as well as the biosynthesis of HAQs (Farrow *et al.*, 2008, Hazan *et al.*, 2010, Rampioni *et al.*, 2016, Rampioni *et al.*, 2010), and HmqE of *B. pseudomallei* PP844 was reported to be functionally similar to PqsE of *P. aeruginosa* PAO1 (Diggle *et al.*, 2006b), we hypothesize that HmqE of *B. thailandensis* E264 is responsible for the HMAQ system negative autoregulation, as we previously proposed for *B. ambifaria* HSJ1 as well (Chapalain *et al.*, 2017) (Fig. 3.78). This is also further supported by the finding that transcription from the *hmqA* promoter is increased when the *hmqE* gene is altered (i.e. in the *hmqA*- mutant background), whereas inactivation of *hmqG*, encoding the putative methyltransferase HmqG responsible for methylation of HMAQs (Vial *et al.*, 2008), does not impact expression from the *hmqA* promoter (Figs. 3.69 and 3.70). Unfortunately, we have been unable to verify the actual effect of HmqE on neither the *hmqABCDEFG* operon transcription nor the biosynthesis of HMAQs because our attempts

to construct an *hmqE*- mutant in *B. thailandensis* E264 have yet proved unsuccessful. While HMAQs seem not to intervene in intraspecies communication among the *Burkholderia* spp., the fact that both HMAQ-C₉:2' and HMAQ-C₇:2', which constitute the main HMAQs respectively identified in *B. thailandensis* E264 and *B. ambifaria* HJS1 (Vial *et al.*, 2008), activate expression of the *pqsABCDE* operon of *P. aeruginosa* PA14, is an indication of the ability of these putative signaling molecules to bind MvfR, and, consequently, their possible involvement in interspecies communication (**Fig. 3.74**). It is noteworthy to mention that the impact of HMAQ-C₇:2' on the *pqsABCDE* operon transcription is more pronounced than the effect of HMAQ-C₉:2', which is relevant considering that *P. aeruginosa* and *B. ambifaria* can be found in the lung microbiota of cystic fibrosis (CF) patients (O'Brien *et al.*, 2017). It will be important to determine whether HMAQ-mediated interspecies interactions optimize the virulence of these opportunistic human pathogens during chronic co-infection.

While nonpathogenic to humans, *B. thailandensis* is infectious in a wide range of laboratory model organisms, including insects (*Galleria mellonella*), mammals (*Mus musculus*), protozoa (*Dictyostelium discoideum*), nematodes (*Caenorhabditis elegans*), and plants (*Pereskia aculeata*) (Brett *et al.*, 1997, Chandler *et al.*, 2009, Haraga *et al.*, 2008, Hasselbring *et al.*, 2011, Ishida *et al.*, 2010, Jeddloh *et al.*, 2003, Mao *et al.*, 2017, Molchanova *et al.*, 2015, Pilatova *et al.*, 2012, Wand *et al.*, 2011, West *et al.*, 2008). Using the *D. melanogaster* host model, we highlighted that the putative HMAQ signaling system contributes to pathogenicity in *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.79**), which is in agreement with the observation that the HMAQ system of *B. thailandensis* E264 influences phenotypic traits that are commonly associated with bacterial virulence and/or survival, such as colony morphology (**Fig. 3.75**), biofilm and pellicle formation (**Fig. 3.76**), swimming motility (**Fig. 3.77**), and siderophores production (**Fig. 3.78**), as previously reported in both *B. pseudomallei* and *B. ambifaria* (Butt *et al.*, 2016, Diggle *et al.*, 2006b, Vial *et al.*, 2010, Vial *et al.*, 2008). Interestingly, these phenotypes are controlled by the QS-1 system of *B. thailandensis* E264 (Chandler *et al.*, 2009, Majerczyk *et al.*, 2014a, Tseng *et al.*, 2016), which hints that the *B. thailandensis* E264 HMAQ system might intervene indirectly in pathogenicity through its effect on the biosynthesis of C₈-HSL, the main AHL associated with the QS-1 system (Chandler *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017) and the most strongly affected AHL in the *hmqA*- mutant (**Fig. 3.61**). Still, more experiments will be necessary to uncover the precise underlying molecular mechanism of action of the HMAQ system, and, in particular, to characterize the function of HmqE.

3.3.6. Funding information

This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grants MOP-97888 and MOP-142466 to Éric Déziel. Éric Déziel holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

3.3.7. Acknowledgments

We thank Everett Peter Greenberg (Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA) for providing the *B. thailandensis* E264 strains. We especially thank Sylvain Milot, Koyomi Ozaki, and Tania St-Laurent for their technical help.

3.3.8. Présentation des résultats additionnels de l'article « The putative 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinoline signaling system in *Burkholderia thailandensis* modulates *N*-acyl-L-homoserine lactones biosynthesis, interspecies interactions, and virulence »

Des expériences additionnelles ont été réalisées dans le cadre de l'étude de la modulation du système *hmq* de *B. thailandensis* E264 et sont présentées ici.

3.3.8.1. Détermination de l'impact du système *hmq* sur la transcription du gène de référence *ndh*

Des expériences de quantification de la transcription du gène de référence *ndh* ont été réalisées par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants *hmqA*- et *hmqG*- de *B. thailandensis* E264. Ces expériences montrent que la transcription du gène *ndh* n'est pas sous le contrôle du système *hmq* (Fig. 3.81). Nous l'avons donc retenu pour la normalisation des données de qRT-PCR.

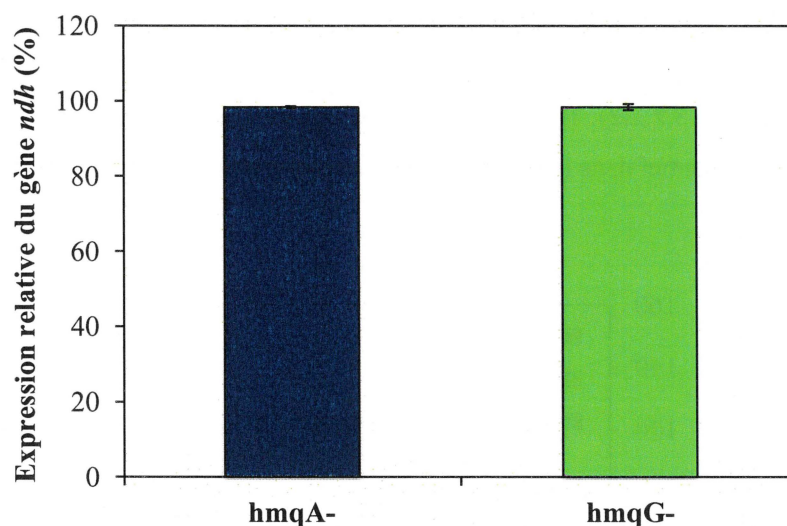


Figure 3.81. L'expression du gène de référence *ndh* est stable chez la souche sauvage et chez les mutants *hmqA*- et *hmqG*- de *B. thailandensis* E264.

L'expression relative du gène de référence *ndh* a été mesurée par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants *hmqA*- et *hmqG*- de *B. thailandensis* E264 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. L'expression du gène *ndh* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.3.8.2. Les protéines RsaM1 et RsaM2 n'affectent pas le système *hmq*

Majerczyk *et al.* (2014a) ont rapporté que la C₈-HSL, la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL inhibent la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG*. En outre, nous avons démontré que l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* ainsi que la biosynthèse des HMAQ sont réprimées *via* le *quorum sensing* chez *B. thailandensis* E264 (cf. la **Figure 3.59** présentée à la section 3.3.4.1). Considérant que les protéines RsaM1 et RsaM2 constituent des éléments régulateurs du *quorum sensing* et répriment, en particulier, la production des AHL (cf. la **Figure 3.39** présentée à la section 3.2.5.1), nous suggérons que l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* ainsi que la biosynthèse des HMAQ sont activées *via* les protéines RsaM1 et/ou RsaM2. Des expériences de quantification de la transcription du gène *hmqA* ont donc été effectuées par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants *rsaM1*- et *rsaM2*- de *B. thailandensis* E264. En outre, des expériences de quantification de la production de la HMAQ-C₉:2' ont été réalisées par LC-MS/MS dans les mêmes contextes génétiques. Il apparaît, néanmoins, que les protéines RsaM1 et RsaM2 n'affectent ni la transcription du gène *hmqA* ni la production de la HMAQ-C₉:2' (**Fig. 3.82**). Ainsi, le système *hmq* n'est pas sous le contrôle des protéines RsaM1 et RsaM2 chez *B. thailandensis* E264. Chez *P. fuscovaginae* UPB0736, Uzelac *et al.*

(2017) ont rapporté que les gènes cibles des systèmes de *quorum sensing* PfvI/PfvR et/ou PfsI/PfsR ne sont pas systématiquement contrôlés *via* la protéine RsaM (cf. la **Figure 1.21** présentée à la section 1.3.2.2.2). Toutefois, ces observations supposent que le *quorum sensing* ne joue pas un rôle essentiel dans la régulation du système *hmq* chez *B. thailandensis* E264.

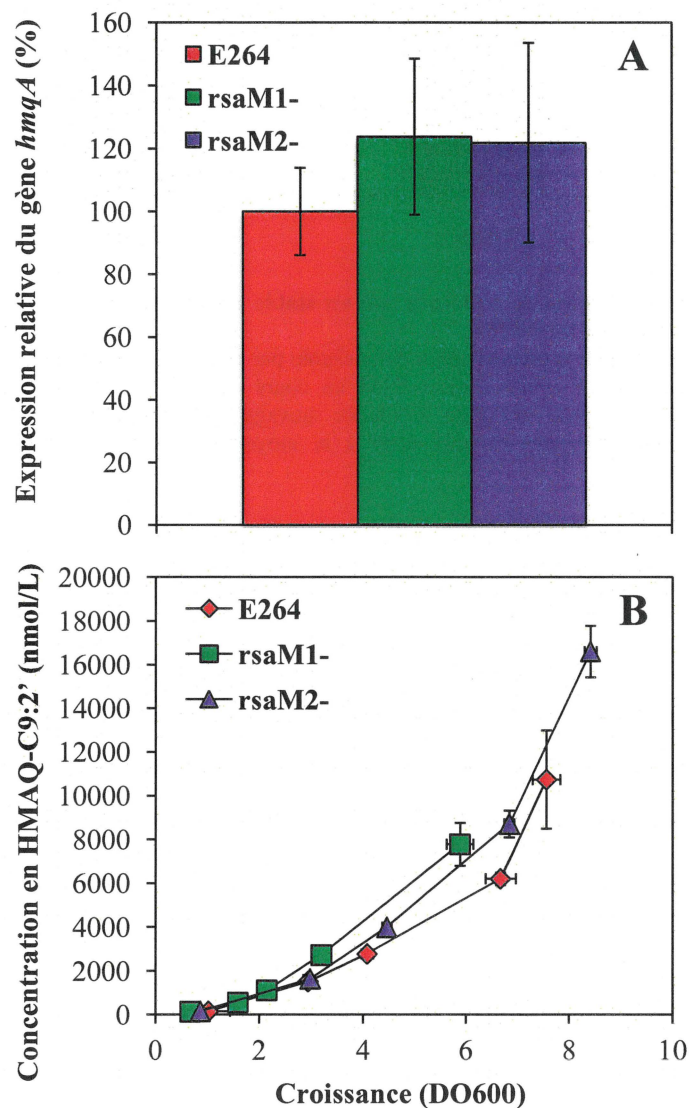


Figure 3.82. Effet des protéines RsaM1 et RsaM2 sur la transcription du gène *hmqA* et sur la production de la HMAQ-C₉:2' chez *B. thailandensis* E264.

(A) L'expression relative du gène *hmqA* a été mesurée par qRT-PCR chez la souche sauvage et chez les mutants *rsaM1*- et *rsaM2*- de *B. thailandensis* E264 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. L'expression du gène *hmqA* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. (B) Les concentrations en HMAQ-C₉:2' ont été mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez les mutants *rsaM1*- et *rsaM2*- de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne.

3.3.8.3. Étude de la fonction de la protéine HmqE

Nous avons démontré qu'une mutation polaire du gène *hmqA*, affectant l'ensemble des gènes de l'opéron *hmqABCDEFG*, et provoquant, en conséquence, une abolition de la biosynthèse des HMAQ, engendre une surexpression de l'opéron *hmqABCDEFG*, suggérant une auto-régulation négative du système *hmq* chez *B. thailandensis* E264 (cf. la **Figure 3.69** présentée à la section 3.3.4.4). Afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle la protéine HmqE est responsable de l'auto-régulation négative du système *hmq* (cf. la **Figure 3.80** présentée à la section 3.3.5), des expériences de quantification de la biosynthèse des HMAQ ont été réalisées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez le mutant *hmqA*- de *B. thailandensis* E264 en présence et en absence du vecteur d'expression constitutive du gène *hmqE* (pMLS7-*hmqE*) (**Tableau 3.19**). En outre, des expériences de quantification de la production des AHL ont été effectuées dans les mêmes contextes génétiques dans le but de tester l'impact de la protéine HmqE sur les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* E264. En effet, nous avons observé que les HMAQ n'affectent pas la biosynthèse des AHL (cf. la **Figure 3.63** présentée à la section 3.3.4.2). Nous suggérons, en conséquence, que la modulation de la production des AHL *via* le système *hmq* implique la protéine HmqE.

Tableau 3.18. Souches utilisées pour étudier la fonction de la protéine HmqE.

Souches	Description	Référence
ED3504	E264 (pMLS7)	Cette étude
ED3505	E264 (pMLS7- <i>hmqE</i>)	Cette étude
ED3506	E264 <i>hmqA</i> - (pMLS7)	Cette étude
ED3507	E264 <i>hmqA</i> - (pMLS7- <i>hmqE</i>)	Cette étude

Nous avons construit le plasmide pMLS7-*hmqE* *via* des réactions de PCR effectuées sur l'ADN génomique de *B. thailandensis* E264 (**Tableau 3.19**).

Tableau 3.19. Plasmides utilisés pour étudier la fonction de la protéine HmqE.

Plasmides	Description	Source
pMLS7	Broad-host-range cloning vector; Tp ^R	(Lefebvre <i>et al.</i> , 2002)
pSLG14	<i>hmqE</i> inserted in <i>EcoRI-HindIII</i> restriction sites in pMLS7; Tp ^R	Cette étude

Les amorces utilisées pour la construction du plasmide pMLS7-*hmqE* ont été conçues grâce à l'outil bioinformatique « Primer3 » (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Tableau 3.20). De plus, les amorces sens (*i.e.* SLG_hmqE_F) et antisens (*i.e.* SLG_hmqE_R) contiennent les sites de restriction *EcoRI* et *HindIII*, respectivement, qui assurent l'insertion du gène *hmqE* dans le site multiple de clonage du plasmide pMLS7 (Lefebvre *et al.*, 2002). Les souches bactériennes de *B. thailandensis* E264, rendues préalablement électro-compétentes, ont été ensuite électroporées par la construction plasmidique pMLS7-*hmqE*.

Tableau 3.20. Amorces utilisées pour étudier la fonction de la protéine HmqE.

Gènes	Oligonucléotides	Séquences (5' vers 3')*	T _m (°C)	%GC
<i>hmqE</i>	SLG_hmqE_F	CGAATTCTGAAGGAGCCGAACGACA	61,57	55,56
	SLG_hmqE_R	CCCAAGCTTGCAGCAACTCGTTGATCGTC	61,97	55,00

*Les nucléotides en gras représentent les sites de coupure spécifiques des enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII*. Les nucléotides en amont de ces sites de restriction ont été rajoutés dans le but d'optimiser l'efficacité de la digestion enzymatique du gène *hmqE*.

Il apparaît que l'expression constitutive du gène *hmqE* entraîne une surproduction des HMAQ, suggérant que la protéine HmqE active la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* (Fig. 3.83A). Ainsi, la protéine HmqE n'est vraisemblablement pas responsable de l'auto-régulation négative du système *hmq*. Toutefois, des expériences de quantification de la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* et de la biosynthèse des HMAQ chez la souche sauvage et chez un mutant non polaire *hmqE*- devront être effectuées afin de confirmer l'impact de la protéine HmqE sur le système *hmq* chez *B. thailandensis* E264. Notons, cependant, que HmqE, à l'instar de PqsE (cf. la Figure 1.16 présentée à la section 1.2.3.2.3), pourrait intervenir dans la production des HMAQ.

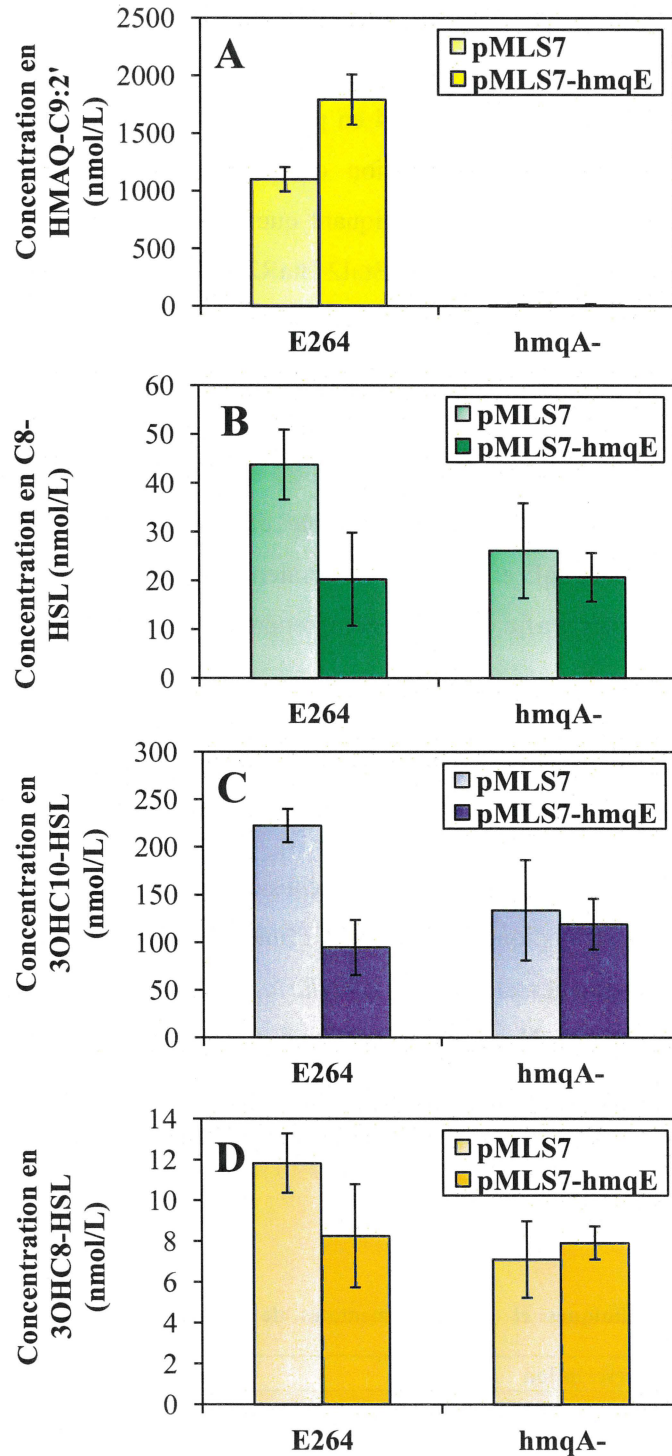


Figure 3.83. Impact de la protéine HmqE sur la biosynthèse des HMAQ et des AHL.

Les concentrations en (A) HMAQ-C₉:2', (B) C₈-HSL, (C) 3OHC₁₀-HSL et (D) 3OHC₈-HSL ont mesurées par LC-MS/MS chez la souche sauvage et chez le mutant *hmqA*- de *B. thailandensis* E264 en présence et en absence du plasmide pMLS7-*hmqE* au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Par ailleurs, l'analyse des profils de biosynthèse de la C₈-HSL (**Fig. 3.83B**), de la 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 3.83C**) et de la 3OHC₈-HSL (**Fig. 3.83D**), effectuée dans des cultures de la souche sauvage de *B. thailandensis* E264 en présence et en absence du plasmide pMLS7-*hmqE*, montre que le vecteur d'expression constitutive du gène *hmqE* engendre une diminution de la production des AHL, indiquant que la protéine HmqE inhibe, selon toute vraisemblance, les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* E264. En revanche, les concentrations en C₈-HSL (**Fig. 3.83B**), 3OHC₁₀-HSL (**Fig. 3.83C**) et 3OHC₈-HSL (**Fig. 3.83D**) sont semblables chez les mutants *hmqA*- (pMLS7) et *hmqA*- (pMLS7-*hmqE*) de *B. thailandensis* E264, suggérant que l'activité de HmqE est dépendante des HMAQ. Chez *P. aeruginosa* PA14, Déziel *et al.* (2005) ont rapporté que les HAQ n'influencent pas l'activité de PqsE. L'ensemble de ces considérations indique que les mécanismes d'action de HmqE et de PqsE ne seraient pas identiques. D'autres expériences seront néanmoins nécessaires afin de mieux comprendre la fonction de la protéine HmqE.

3.3.8.4. Comparaison de la biosynthèse des HMAQ et de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFGF* parmi des souches cliniques et environnementales de *B. ambifaria*

Vial *et al.* (2010) ont rapporté que les souches cliniques de *B. ambifaria*, provenant de patients atteints de fibrose kystique, synthétisent, d'une manière générale, des HMAQ, tandis que les souches environnementales de *B. ambifaria*, issues de la rhizosphère de diverses plantes, n'en produisent pas. Nous avons confirmé que les souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958 (**Tableau 3.21**), par opposition aux souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7 (**Tableau 3.21**), sont capables de produire des HMAQ (**Fig. 3.84**).

Tableau 3.21. Souches cliniques et environnementales de *B. ambifaria* utilisées pour comparer la production des HMAQ.

Souches	Description	Référence
CEP0958	Wild-type	(Coenye <i>et al.</i> , 2001)
HSJ1	Wild-type	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
MC40-6	Wild-type	(Ramette <i>et al.</i> , 2005)
PHP7	Wild-type	(Coenye <i>et al.</i> , 2001)

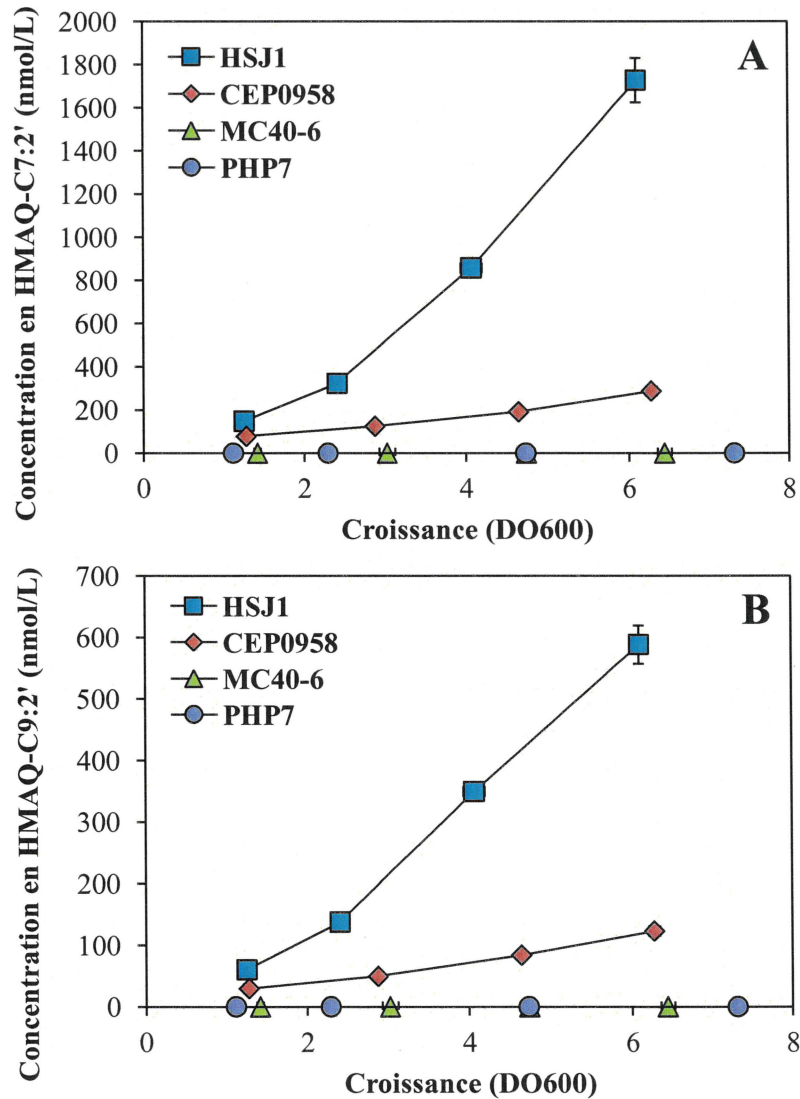


Figure 3.84. Comparaison de la biosynthèse des HMAQ chez les souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958 et chez les souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7. Les concentrations en (A) HMAQ-C₇:2' et (B) HMAQ-C₉:2' ont été mesurées par LC-MS/MS dans des cultures des souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958 ainsi que dans des cultures des souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7 au cours de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Considérant que l'inactivation des gènes *cepI* et *cepR*, qui ne produisent pas de C₈-HSL, engendre une réduction drastique de la transcription de l'opéron *hmqABCDEFGF* corrélée à une suppression de la biosynthèse des HMAQ (cf. la **Figure 1.52** présentée à la section 1.3.3.7.1), nous nous sommes assurés que *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7, au même titre que *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958, sont capables de produire de la C₈-HSL. Il apparaît que *B. ambifaria* HSJ1, *B. ambifaria* CEP0958, *B.*

ambifaria MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7 synthétisent essentiellement de la C₈-HSL (Fig. 3.85). Ainsi, la C₈-HSL n'est pas responsable des différences de production des HMAQ observées entre les souches cliniques et environnementales de *B. ambifaria*.

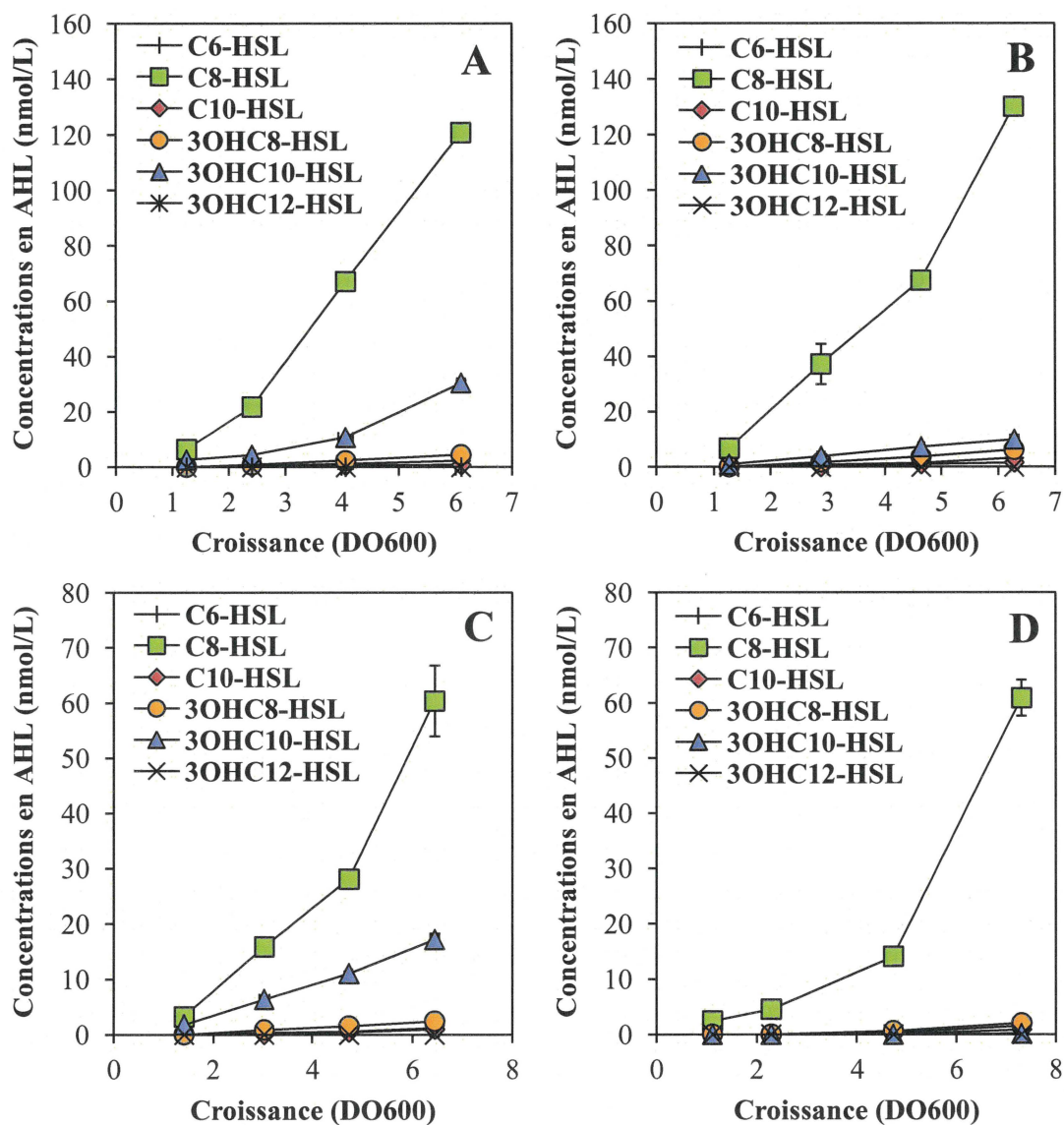


Figure 3.85. Comparaison de la biosynthèse des AHL chez les souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958 et chez les souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7. Les concentrations en AHL ont été mesurées par LC-MS/MS dans des cultures des souches cliniques (A) *B. ambifaria* HSJ1 et (B) *B. ambifaria* CEP0958 ainsi que dans des cultures des souches environnementales (C) *B. ambifaria* MC40-6 et (D) *B. ambifaria* PHP7 au cours de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Des recherches bioinformatiques indiquent que les souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7, au même titre que les souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958, possèdent l'opéron *hmqABCDEFG* responsable de la biosynthèse des HMAQ. Par conséquent, il est raisonnable d'envisager que les gènes *hmqA*, *hmqB*, *hmqC*, *hmqD*, *hmqE*, *hmqF* et *hmqG* ne sont pas transcrits et/ou traduits chez les souches environnementales de *B. ambifaria*. L'activation de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG*, et donc celle de la production des HMAQ, chez les souches environnementales de *B. ambifaria*, pourraient nécessiter des conditions de culture spécifiques différentes de celles utilisées habituellement pour les souches cliniques de *B. ambifaria*. En effet, il est concevable que sous ces conditions de culture, des inhibiteurs agissent sur la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* empêchant, de ce fait, la biosynthèse des HMAQ. Cette inhibition pourrait être levée dans des contextes environnementaux favorables. La fonction des HMAQ, chez les souches environnementales de *B. ambifaria*, pourrait donc être différente de celle des souches cliniques de *B. ambifaria*.

Afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* est réprimée chez les souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7 comparativement aux souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958, des expériences de quantification de l'expression du gène *hmqA* ont été effectuées via l'utilisation du rapporteur transcriptionnel *hmqA-lacZ* au cours de la croissance bactérienne (Chapalain *et al.*, 2017) (Tableau 3.22).

Tableau 3.22. Souches cliniques et environnementales de *B. ambifaria* utilisées pour comparer la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG*.

Souches	Description	Référence
ED2166	CEP0958:: <i>hmqA-lacZ</i>	Cette étude
ED2102	HSJ1:: <i>hmqA-lacZ</i>	Cette étude
ED2167	MC40-6:: <i>hmqA-lacZ</i>	Cette étude
ED2168	PHP7:: <i>hmqA-lacZ</i>	Cette étude

Ces expériences révèlent que la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* est stimulée chez les souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7 comparativement aux souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958 (Fig. 3.86). D'autres expériences seront donc nécessaires pour déterminer si l'opéron

hmqABCDEFG est traduit chez les souches environnementales de *B. ambifaria*. En outre, la comparaison des séquences nucléotidiques de l'opéron *hmqABCDEFG* chez les souches cliniques et environnementales de *B. ambifaria* permettra de déterminer si des mutations, susceptibles d'empêcher la traduction de l'opéron *hmqABCDEFG*, sont présentes dans les gènes *hmqA*, *hmqB*, *hmqC*, *hmqD*, *hmqE*, *hmqF* et/ou *hmqG*. Il est également possible que les protéines HmqA, HmqB, HmqC, HmqD, HmqE, HmqF et HmqG codées par l'opéron *hmqABCDEFG*, chez les souches environnementales de *B. ambifaria*, soient associées à la biosynthèse de molécules alternatives. L'inactivation de l'opéron *hmqABCDEFG* sera, néanmoins, indispensable pour comprendre la fonction des gènes *hmqA*, *hmqB*, *hmqC*, *hmqD*, *hmqE*, *hmqF* et *hmqG* chez les souches environnementales de *B. ambifaria*.

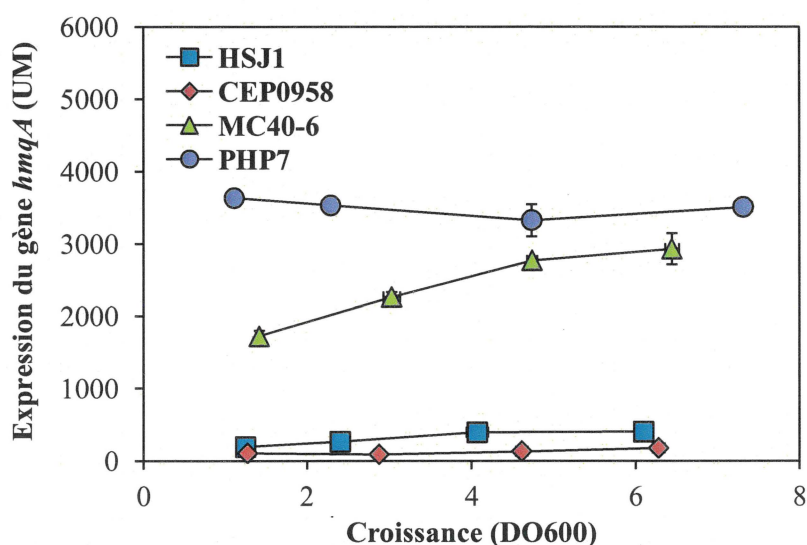


Figure 3.86. Comparaison de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* chez les souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958 et chez les souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7.

Les activités β -galactosidases du rapporteur transcriptionnel *hmqA-lacZ*, exprimées en unités Miller (UM), ont été mesurées dans des cultures des souches cliniques *B. ambifaria* HSJ1 et *B. ambifaria* CEP0958 ainsi que dans des cultures des souches environnementales *B. ambifaria* MC40-6 et *B. ambifaria* PHP7. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.3.8.5. La bactérie *Burkholderia pyrrocinia* est capable de synthétiser des HMAQ

Outre les souches cliniques et environnementales de *B. ambifaria*, d'autres espèces bactériennes appartenant au complexe *Bcc* comme, par exemple, *B. pyrrocinia* (cf la Figure 1.18 présentée à la section 1.3.1), ont été testées pour leur capacité à synthétiser des HMAQ et/ou des HAQ (Vial *et al.*, 2008). Aucune HMAQ et/ou HAQ n'a pu être détectée chez la

souche clinique *B. pyrrocinia* LMG21824. Des recherches bioinformatiques révèlent, néanmoins, que la souche environnementale *B. pyrrocinia* CH-67 possède l'opéron *hmqABCDEFG* et, de ce fait, est susceptible de produire des HMAQ (Song *et al.*, 2012). Des expériences de quantification de la production des HMAQ indiquent effectivement que *B. pyrrocinia* CH-67 est capable de synthétiser des HMAQ (**Fig. 3.87A**). Les différences de production des HMAQ observées entre les souches bactériennes *B. pyrrocinia* LMG21824 et *B. pyrrocinia* CH-67 pourraient s'expliquer par les différentes méthodes employées pour effectuer l'extraction des HMAQ. Toutefois, nous ne savons pas si *B. pyrrocinia* LMG21824 possède l'opéron *hmqABCDEFG*.

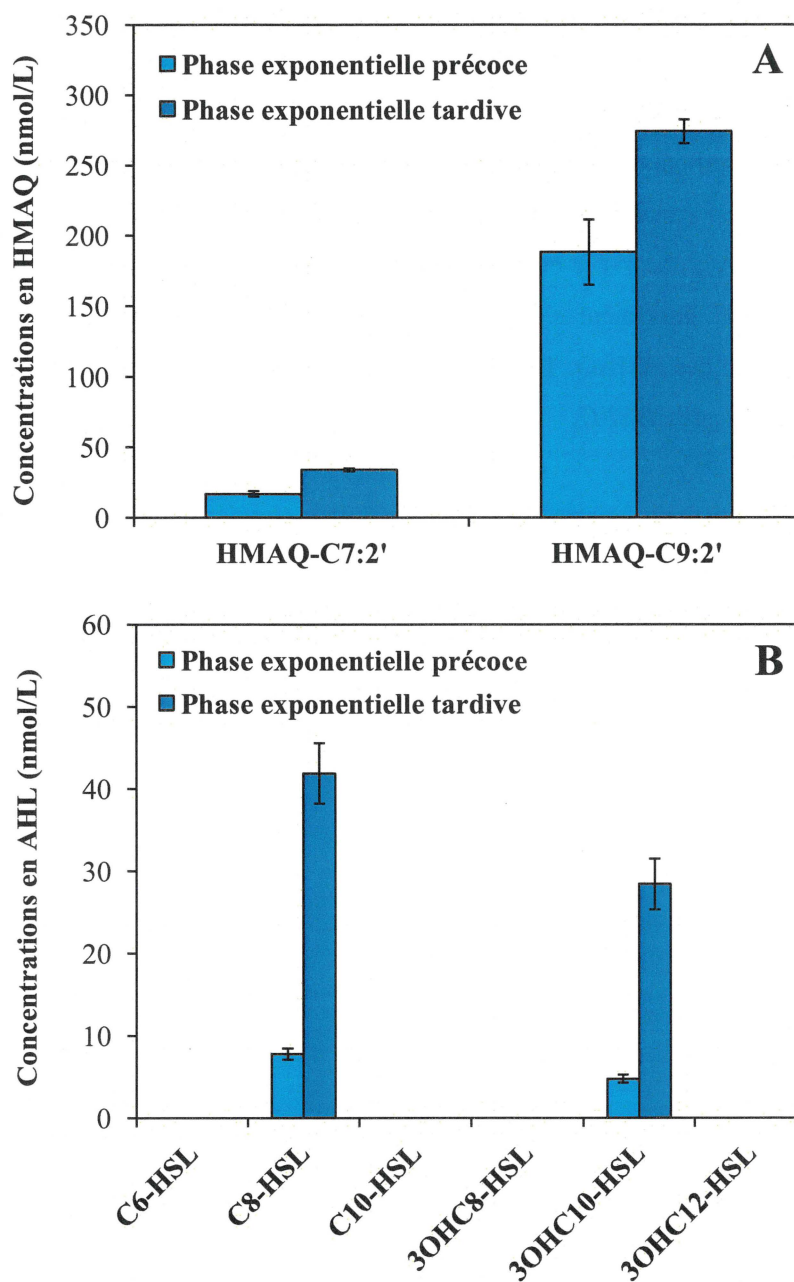


Figure 3.87. La souche bactérienne *B. pyrrocinia* CH-67 synthétise des HMAQ.

Les concentrations en (A) HMAQ et en (B) AHL ont été mesurées par LC-MS/MS dans des cultures de la souche bactérienne *B. pyrrocinia* CH-67 au cours des phases exponentielles précoce ($DO_{600} \approx 2,0$) et tardive ($DO_{600} \approx 4,0$) de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

D'autre part, nous nous sommes intéressés aux AHL produites chez *B. pyrrocinia* CH-67. L'analyse des profils de biosynthèse des AHL montre que *B. pyrrocinia* CH-67 synthétise essentiellement de la C₈-HSL, à l'instar des membres du complexe *Bcc* (Eberl, 2006b, Venturi

et al., 2004), ainsi que de la 3OHC₁₀-HSL, moins abondamment (**Fig. 3.87B**). Des expériences additionnelles permettront de déterminer si les AHL activent également la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* ainsi que la production des HMAQ chez *B. pyrrocinia* CH-67 dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du système *hmq* parmi les bactéries qui appartiennent au complexe *Bcc*.

3.4. Présentation de l'article « ScmR, a global regulator of gene expression, quorum sensing, pH homeostasis, and virulence in *Burkholderia thailandensis* »

Servane Le Guillouzer, Marie-Christine Groleau, Florian Mauffrey & Éric Déziel

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

Soumission : ; Acceptation : ; Publication :

Journal :

Les expériences ont été conçues par S.L.G., M.C.G. et É.D.

S.L.G. et M.C.G. ont effectué les expériences.

Les données ont été interprétées par S.L.G., M.C.G., F.M. et É.D.

S.L.G. et É.D. ont rédigé le manuscrit.

RÉSUMÉ

Le saprophyte du sol non pathogène *Burkholderia thailandensis* est un membre du groupe *Burkholderia pseudomallei-thailandensis-mallei* (*Bptm*), qui comprend également les pathogènes humains étroitement apparentés *Burkholderia pseudomallei* et *Burkholderia mallei* responsables de la mélioïdose et de la morve, respectivement. ScmR, un régulateur transcriptionnel de type LysR récemment identifié, constitue un régulateur global de l'expression des gènes au cours de la phase stationnaire de la croissance bactérienne chez *B. thailandensis*, et intervient dans le contrôle de la production d'une large gamme de métabolites secondaires, incluant les *N*-acyl-L-homosérine lactones (AHL) et les molécules de signalisation putatives 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ), la virulence chez l'organisme modèle de laboratoire *Caenorhabditis elegans*, de même que plusieurs phénotypes sous la dépendance du *quorum sensing*. Nous avons étudié le rôle de ScmR chez la souche bactérienne *B. thailandensis* E264 au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. Nous avons effectué des analyses transcriptomiques obtenues par RNA-Seq (*RNA-Sequencing*) pour identifier le régulon de ScmR, que nous avons comparé aux gènes contrôlés *via* le *quorum sensing*, démontrant un chevauchement considérable entre les gènes régulés par ScmR et ceux sous le contrôle du *quorum sensing*. Par ailleurs, nous avons caractérisé plusieurs nouveaux gènes dont l'expression est modulée *via* ScmR par qRT-PCR (*quantitative reverse transcription-PCR*) ou en utilisant des rapporteurs transcriptionnels chromosomiques mini-CTX-*lux*, parmi lesquels figurent notamment le gène de biosynthèse de l'acide oxalique, *obc1*, nécessaire au maintien d'un pH homéostatique, le gène codant le régulateur transcriptionnel de type LuxR orphelin BtaR5, les gènes *bsa* (*Burkholderia secretion apparatus*) du système de sécrétion de type III (SST) essentiels à la pathogénicité autant de *B. pseudomallei* que de *B. mallei*, ainsi que le gène *scmR* lui-même. En outre, nous avons confirmé que l'expression du gène *scmR* est sous le contrôle du *quorum sensing*, probablement pour assurer une modulation fine de l'expression des gènes chez *B. thailandensis*. Enfin, nous avons démontré que ScmR influence la virulence en utilisant l'organisme modèle de laboratoire *Drosophila melanogaster*. Nous en concluons que ScmR représente un important composant du réseau de régulation du *quorum sensing* chez *B. thailandensis*.

3.4.1. Abstract

The nonpathogenic soil saprophyte *Burkholderia thailandensis* is a member of the *Burkholderia pseudomallei-thailandensis-mallei* (Bptm) group, which also comprises the closely related human pathogens *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* responsible for melioidosis and glanders, respectively. ScmR, a recently identified LysR-type transcriptional regulator (LTTR), acts as a global regulator of gene expression during the stationary phase of the bacterial growth in *B. thailandensis*, and modulates the production of a wide range of secondary metabolites, including *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) and the putative 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinoline (HMAQ) signaling molecules, virulence in the nematode worm model *Caenorhabditis elegans*, as well as several quorum sensing (QS)-dependent phenotypes. We have investigated the role of ScmR in *B. thailandensis* strain E264 during the exponential phase of the bacterial growth. We used RNA-Sequencing (RNA-Seq) transcriptomic analyses to identify the ScmR regulon, which was compared to the QS-controlled genes, showing a considerable overlap between the ScmR-regulated genes and those controlled by QS. Furthermore, we characterized several novel genes modulated by ScmR using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) or chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters, such as the oxalate biosynthetic gene *obc1* required for pH homeostasis, the orphan LuxR-type transcriptional regulator BtaR5-encoding gene, the *bsa* (*Burkholderia* secretion apparatus) type III secretion system (TTSS) genes essential for both *B. pseudomallei* and *B. mallei* pathogenicity, as well as the *scmR* gene itself. Moreover, we confirmed that the transcription of *scmR* is under QS control, presumably ensuring fine-tuned modulation of gene expression in *B. thailandensis*. Finally, we demonstrated that ScmR influences pathogenicity using the fruit fly model *Drosophila melanogaster*. We conclude that ScmR represents an important component of the QS regulatory network of *B. thailandensis*.

3.4.2. Introduction

Quorum sensing (QS) is a global regulatory mechanism of gene expression depending on bacterial density (Fuqua *et al.*, 1994). Gram-negative bacteria commonly possess homologues of the LuxI/LuxR system initially characterized in the bioluminescent marine bacterium *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.*, 1970). The signaling molecules *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs), which are typically produced by LuxI-type synthases, accumulate in the environment as bacterial growth progresses until a threshold concentration

is reached allowing bacteria to synchronize their activities and to function as multicellular communities. These AHLs activate LuxR-type transcriptional regulators that modulate the expression of QS target genes, which usually contain a *lux* box sequence in their promoter region (Fuqua *et al.*, 2002).

Burkholderia thailandensis is a nonpathogenic soil saprophyte belonging to the *Burkholderia-pseudomallei-thailandensis-mallei* (*Bptm*) group, which also comprises the closely related human pathogens *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* responsible for melioidosis and glanders, respectively (Majerczyk *et al.*, 2013a). *B. thailandensis* is considered the avirulent version of *B. pseudomallei* (Brett *et al.*, 1998), and is thus commonly used as a surrogate model for the study of *B. pseudomallei*, which is considered a potential bioterrorism agent and whose manipulation is consequently restricted to biosafety level 3 (BSL3) laboratories (Haraga *et al.*, 2008). The members of the *Bptm* group contain multiple LuxI/LuxR QS systems that are associated with the biosynthesis of numerous AHL signaling molecules (Majerczyk *et al.*, 2013a, Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c, Ulrich *et al.*, 2004d). These QS systems are referred to as the BtaI1/BtaR1 (QS-1), BtaI2/BtaR2 (QS-2), and BtaI3/BtaR3 (QS-3) QS systems in *B. thailandensis* (Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a). The QS-1 system is composed of the BtaR1 transcriptional regulator and the BtaI1 synthase, which synthesizes *N*-(octanoyl)-L-homoserine lactone (C₈-HSL) (Chandler *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2018). The BtaR2 transcriptional regulator and the BtaI2 synthase that catalyze the biosynthesis of both *N*-(3-hydroxy-decanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₁₀-HSL) and *N*-(3-hydroxy-octanoyl)-L-homoserine lactone (3OHC₈-HSL) constitute the QS-2 system (Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2018). The QS-3 system is composed of the BtaR3 transcriptional regulator and the BtaI3 synthase also responsible for 3OHC₈-HSL production (Chandler *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2018). Furthermore, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei*, and *B. mallei*, carry orphan *luxR* homologues, namely, *btaR4* (*malR*) and *btaR5* in *B. thailandensis* (Biggins *et al.*, 2012, Truong *et al.*, 2015).

QS is involved in the regulation of several virulence factors in *B. pseudomallei* and *B. mallei*, and is essential to their pathogenicity (Song *et al.*, 2005, Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c, Valade *et al.*, 2004). Other QS-controlled phenotypic traits among the *Bptm* group members were reported, such as colony morphology, the development of biofilm, self-aggregation, motility, pH homeostasis, as well as secondary metabolism (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Goo *et al.*, 2012, Majerczyk *et al.*, 2014a, Majerczyk *et al.*,

2014b, Mongkolrob *et al.*, 2015, Ooi *et al.*, 2013, Ramli *et al.*, 2012, Song *et al.*, 2005, Truong *et al.*, 2015, Tseng *et al.*, 2016, Ulrich, 2004, Ulrich *et al.*, 2004d).

A LysR-type transcriptional regulator (LTTR) involved in secondary metabolism regulation, hence designated ScmR, was recently identified in the *Bptm* group members (Mao *et al.*, 2017). LTTRs are part of a large family and display a well conserved structure with a N-terminal DNA-binding helix-turn-helix motif and a C-terminal cofactor-binding domain (Maddocks *et al.*, 2008). LTTRs are typically negatively autoregulated and frequently positively modulate expression of adjacent genes (Maddocks *et al.*, 2008). However, LTTRs can also act as global regulators in a positive or negative manner (Maddocks *et al.*, 2008). Mao *et al.* (2017) demonstrated that ScmR constitutes a global regulator of gene expression in *B. thailandensis* and influences the production of a wide range of secondary metabolites, including AHLs and the putative 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinoline (HMAQ) signaling molecules, virulence in the nematode worm model *Caenorhabditis elegans*, as well as several QS-dependent phenotypes. Additionally, expression of the *scmR* gene is under QS control (Majerczyk *et al.*, 2014a, Mao *et al.*, 2017).

The central goal of this study was to further characterize the molecular mechanism of action of the *B. thailandensis* E264 ScmR transcriptional regulator. We found that ScmR is a global regulator mediating gene expression through the QS-1, QS-2, and/or QS-3 systems, as well as independently of QS. Furthermore, we identified novel genes modulated by ScmR, including the oxalate biosynthetic gene *obc1* that is essential for pH homeostasis in the *Burkholderia* genus, the orphan LuxR-type transcriptional regulator BtaR5-encoding gene, and the *bsa* (*Burkholderia* secretion apparatus) type III secretion system (TTSS) genes required for both *B. pseudomallei* and *B. mallei* pathogenicity. Moreover, we showed that *scmR* is negatively autoregulated, and we confirmed that its transcription is QS-controlled, ensuring tight regulation of gene expression by ScmR in *B. thailandensis*. Finally, we demonstrated that ScmR represses virulence using the fruit fly model *Drosophila melanogaster*. All in all, this study contributes to a better appreciation of the ScmR regulatory mechanism of the expression of genes in *B. thailandensis*, and in particular those related to pathogenicity in *B. pseudomallei*.

3.4.3. Materials and methods

3.4.3.1. Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used in this study are listed in **Table 3.23**. Unless stated otherwise, all bacteria were cultured at 37°C in tryptic soy broth (TSB; BD Difco, Mississauga, Ontario, Canada), with shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick, Canada), or on petri dishes containing TSB solidified with 1.5% agar. When required, antibiotics were used at the following concentrations: 200 µg/mL tetracycline (Tc), 100 µg/mL kanamycin (Km), and 40 µg/mL chloramphenicol (Cm) for *B. thailandensis* E264, while Tc and trimethoprim (Tp) were used at 15 µg/mL and 50 µg/mL for *E. coli* DH5α, respectively. All measurements of optical density at 600 nm (OD₆₀₀) were acquired with a Thermo Fisher Scientific NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

Tableau 3.23. Bacterial strains used in this study.

Strains	Description	Reference
<i>E. coli</i>		
χ7213	<i>thr-1, leuB6, fhuA21, lacY1, glnV44, recA1, ΔasdA4, Δ(zhf-2::Tn10), thi-1, RP4-2-Tc::Mu [λ pir]</i>	Lab collection
DH5α	F-, φ80dlacZΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR, recA1, endA1, hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1</i>	Lab collection
ED3508	DH5α (pSLG01, pMLS7); Tet ^R , Tp ^R	This study
ED3509	DH5α (pSLG01, pSLG18); Tet ^R , Tp ^R	This study
<i>B. thailandensis</i>		
E264	Wild-type	(Brett <i>et al.</i> , 1998)
ED999	E264 <i>hmqA::pKNOCK-Cm</i> ; Cm ^R	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
ED1023	E264 <i>scmR::pUT-mini-Tn5-Km</i> ; Km ^R	This study
ED1024	E264 <i>hmqA::pKNOCK-Cm</i> ; Cm ^R E264 <i>scmR::pUT-mini-Tn5-Km</i> ; Km ^R	This study
JBT112	E264 Δ <i>btaII ΔbtaI2 ΔbtaI3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT107	E264 Δ <i>btaR1</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT108	E264 Δ <i>btaR2</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
JBT109	E264 Δ <i>btaR3</i>	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ED3330	E264:: <i>btaII-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)

ED3331	E264:: <i>btaI2-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
ED3332	E264:: <i>btaI3-lux</i>	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
ED3510	E264 <i>scmR</i> :: <i>btaI1-lux</i>	This study
ED3511	E264 <i>scmR</i> :: <i>btaI2-lux</i>	This study
ED3512	E264 <i>scmR</i> :: <i>btaI3-lux</i>	This study
ED3501	E264:: <i>hmqA-lux</i>	(cf. le Tableau 3.14 présenté à la section 3.3.3.1)
ED3502	E264 <i>hmqA</i> :: <i>hmqA-lux</i>	(cf. le Tableau 3.14 présenté à la section 3.3.3.1)
ED3513	E264 <i>scmR</i> :: <i>hmqA-lux</i>	This study
ED3514	E264 <i>hmqA-scmR</i> :: <i>hmqA-lux</i>	This study
ED3515	E264:: <i>scmR-lux</i>	This study
ED3517	E264 <i>scmR</i> :: <i>scmR-lux</i>	This study

3.4.3.2. Construction of plasmids

All plasmids used in this study are described in **Table 3.24**.

Table 3.24. Plasmids used in this study.

Plasmids	Description	Source
mini-CTX- <i>lux</i>	Integration vector with promoterless <i>luxCDABE</i> ; Tc ^R	(Becher <i>et al.</i> , 2000)
pSLG02	<i>btaI1</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
pSLG03	<i>btaI2</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
pSLG04	<i>btaI3</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
pSLG05	<i>hmqA</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	(cf. le Tableau 3.15 présenté à la section 3.3.3.2)
pSLG01	<i>scmR</i> promoter inserted in <i>XhoI-BamHI</i> restriction sites in mini-CTX- <i>lux</i> ; Tc ^R	This study
pMLS7	Broad-host-range cloning vector; Tp ^R	(Lefebvre <i>et al.</i> , 2002)
pSLG18	<i>scmR</i> inserted in <i>BamHI-HindIII</i> restriction sites in pMLS7; Tp ^R	This study

Amplification of the promoter region of *scmR* was performed from genomic DNA from *B. thailandensis* E264 using the appropriate primers (Table 3.25). The amplified product was digested with the FastDigest restriction enzymes *XhoI* and *BamHI* (Thermo Fisher Scientific) and inserted by T4 DNA ligase (Bio Basic, Inc., Markham, ON, Canada) within the corresponding restriction sites in the mini-CTX-*lux* plasmid (Becher *et al.*, 2000), generating the transcriptional reporter pSLG01. Amplification of *scmR* was accomplished from genomic DNA of *B. thailandensis* E264 using the primers shown in Table 3.25. The amplified product was digested with the restriction enzymes *BamHI* and *HindIII* before ligation within the corresponding restriction sites in the pMLS7 plasmid (Lefebvre *et al.*, 2002), generating the constitutive expression vector pSLG18. All primers were from Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada).

Table 3.25. Primers used for PCR.

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')*
<i>scmR</i>	PhmqRF	CGCCTCGAGGAGTGATCGGTCGTGGACAT
	PhmqRR	CGCGGATCCTCGATACGCCGAGTTTCC
<i>scmR</i>	BTH_I1403-F-BamHI	CGGGATCCCCGAAGACAAGCCCTGTGCTGAT
	BTH_I1403-R-HindIII	CCCAAGCTTGGGAGGTGCGCGTCAGTTACTT

*Restriction sites designed into the primers are underlined.

3.4.3.3. Construction of reporter strains

Chromosomal integration of the mini-CTX-*btaI1-lux*, mini-CTX-*btaI2-lux*, mini-CTX-*btaI3-lux*, mini-CTX-*hmqA-lux*, and mini-CTX-*scmR-lux* transcriptional reporters at the *attB* locus in *B. thailandensis* E264 strains was performed through conjugation with the auxotrophic *E. coli* χ 7213, as described previously (Le Guillouzer *et al.*, 2018). Successful chromosomal insertion of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, *btaI3-lux*, *hmqA-lux*, and *scmR-lux* was confirmed by PCR using appropriate primers.

3.4.3.4. RNA isolation

Total RNA of *B. thailandensis* E264 cultures at an OD₆₀₀ of 4.0 was extracted with the PureZOL RNA isolation reagent (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) and treated twice with the TURBO DNA-Free kit (Ambion Life Technologies, Inc., Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Extractions were done on two

different bacterial cultures for RNA-Sequencing (RNA-Seq) analysis and on three different bacterial cultures for quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) and reverse transcription-PCR (RT-PCR) experiments. Quality and purity controls were confirmed by agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometric analysis, respectively. Quantification of total RNA was accomplished on a Corbett Life Science Rotor-Gene 6000 thermal cycler using the QuantiFluor RNA system (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's protocol.

3.4.3.5. RNA-Seq libraries construction and sequencing

The RNA-Seq libraries construction and sequencing using an Illumina HiSeq 2000 PE100 were performed by the McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montreal, QC, Canada). The RNA-Seq libraries were prepared using the TruSeq stranded mRNA sample preparation kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) and the Ribo-Zero rRNA removal kit (Epicentre, Madison, WI, USA).

3.4.3.6. RNA-Seq mapping and analyses

All computations were made on the supercomputer Briarée from the Université de Montréal, managed by Calcul Québec and Compute Canada. Raw reads were filtered to remove low quality reads using the FASTX toolkit by discarding any reads with more than 10% nucleotides with a PHRED score < 20. Reads were then aligned with the reference genome (the GenBank accession no. for chromosome 1 of strain E264 is [CP000086.1](#) and for chromosome 2, it is [CP000085.1](#)) using Bowtie (v 2.2.3) with default parameters. Chromosome 1 and chromosome 2 sequence alignments were separately processed to allow expression analysis between the two chromosomes. SAMtools (v 0.1.18) and BEDtools (v 2.20.1) were used for the generation of sam and bam files, respectively. The GC content of *B. thailandensis* E264 genes was calculated using BEDtools (v 2.20.1), prior to normalization. Normalization of the read count was done using the RPKM normalization function of the NOIseq package in R (Tarazona *et al.*, 2011). To exclude features with low read counts, a low count filter was applied using a CPM method with a CPM value of 1 and a cutoff of 100 for the coefficient of variation. Cutoff values of 3-fold were used to consider differential expression biologically significant.

3.4.3.7. Measurement of the activity of *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, *btaI3-lux*, *hmqA-lux*, and *scmR-lux* reporters

Expression from the promoter regions of *btaI1*, *btaI2*, *btaI3*, *hmqA*, or *scmR* was quantified by measuring the luminescence of *B. thailandensis* E264 cultures carrying the corresponding chromosomal mini-CTX-*lux* transcriptional reporters, as described previously (Le Guillouzer *et al.*, 2017). Overnight bacterial cultures were diluted in TSB to an initial OD₆₀₀ of 0.1 and incubated as indicated above. The luminescence was regularly determined from culture samples using a multi-mode microplate reader (Cytation 3; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) and expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). For experiments with additions of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), cultures were buffered or not with 100 mM HEPES (Sigma-Aldrich Co., Oakville, ON, Canada) from a stock prepared in ultrapure water. Water only was added to the controls. All experiments were performed with three biological replicates and repeated at least twice.

3.4.3.8. LC-MS/MS quantification of HMAQs and AHLs

The concentrations of HMAQs and AHLs were determined from samples of *B. thailandensis* E264 cultures obtained at different time points during bacterial growth, by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were prepared and analyzed as described previously (Chapalain *et al.*, 2017). 5,6,7,8-Tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) was used as an internal standard. All experiments were performed in triplicate and conducted at least twice independently.

3.4.3.9. Quantitative reverse transcription-PCR and reverse transcription-PCR experiments

cDNA synthesis was performed using the iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad Laboratories), and amplification was accomplished on a Corbett Life Science Rotor-Gene 6000 thermal cycler using the SsoAdvanced universal SYBR green supermix (Bio-Rad Laboratories), according to the manufacturer's protocol. The reference gene was *ndh* (Subsin *et al.*, 2007). The *ndh* gene displayed stable expression under the different genetic contexts tested. All primers used for cDNA amplification are presented in **Table 3.26**. Differences in

gene expression between *B. thailandensis* E264 strains were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula (Livak *et al.*, 2001). A threshold of 0.5 was chosen as significant. For experiments with AHL additions, cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL (Sigma-Aldrich Co.) or not supplemented with AHLs from stocks prepared in high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile. Acetonitrile only was added to the controls. All experiments were performed in triplicate and conducted at least twice independently.

Tableau 3.26. Primers used for qRT-PCR and RT-PCR.

Genes	Oligonucleotides	Sequences (5' to 3')
<i>ndh</i>	SLG_qRT-PCR_ndh_F SLG_qRT-PCR_ndh_R	ACCAGGGCGAATTGATCTC GATGACGAGCGTGTCTGATT
<i>obc1</i>	SLG_BTH_II1071_F SLG_BTH_II1071_R	CTATCGTCGGTCGATCTGGT GTAGGTGTGGATCCGGTCGT
<i>bsaN</i>	SLG_BTH_II0827_F SLG_BTH_II0827_R	GAAATCGCGAAACTGGATGT TAACGGCACGTCATGAAAAC
BTH_I3204	SLG_BTH_I3204_F SLG_BTH_I3204_R	AAGCAGAACGGCCTGACTAA TGCTATCGAGACCCGTGTAG
BTH_II0639	SLG_BTH_II0639_F SLG_BTH_II0639_R	GACTTTCCTCTCGCTTGCAG GCACGAGGATGATCGGATAC
<i>btaR5</i>	SLG_BTH_II1817_F SLG_BTH_II1817_R	AACTTCCCGAGCAATGGA GTCTCGTTCAGGACGACAGG
<i>scmR</i>	SLG_qRThmqR_F SLG_qRThmqR_R	CTTCGTATGTGTTGCCGAAC ATGAGACGCGTGTTCAGATG
<i>scmR-ldhA</i>	SL_hmqRRTF SL_hmqRRTR	ACGCAGTTGTCCATCGTCTA CGGCTGCTGAAAAGAATCAC

3.4.3.10. Infection of *D. melanogaster*

The fruit flies were infected by feeding according to the protocol previously described (Pilatova *et al.*, 2012). Briefly, 1 g of fruit fly dry medium was put into infection vials. Bacteria were harvested from LB-grown cultures adjusted to an OD₆₀₀ of 4.0 by centrifugation at 10,000 x g for 5 min. The pellets were suspended in 0.02X PBS containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂, as well as 500 μ g/mL ampicillin (Ap) to avoid infection with nonspecific bacteria. Two mL of bacterial suspension were added to the dry food. Six-seven days-old male flies were anesthetized with CO₂ and added to the vials by group of 10. The control vials contained the PBS solution only. Fly survival was scored daily and survival

curves were processed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) to perform a statistical log-rank (Mantel-Cox) test.

3.4.3.11. Data analysis

Unless stated otherwise, data are reported as means \pm standard deviations (SD). Statistical analyses were performed with the R software version 3.3.3 (<http://www.R-project.org/>) using one-way analysis of variance (ANOVA). Probability values of less than 0.05 were considered significant.

3.4.4. Results

3.4.4.1. The ScmR regulon comprises many QS-controlled genes

We used RNA-Seq transcriptomic analyses to further characterize the regulon of the ScmR transcriptional regulator. We identified the ScmR-regulated genes by comparing the transcripts in the wild-type and in the *scmR*- mutant strains of *B. thailandensis* E264 during the exponential growth phase. We found that ScmR both positively and negatively influenced the expression of genes located on the two *B. thailandensis* E264 chromosomes (**Fig. 3.88A**). Using a 3-fold difference in transcription as a cutoff, we identified 907 genes that were positively modulated by ScmR, and 397 genes that were negatively modulated by ScmR (**Fig. 3.88A**). These findings confirm that ScmR constitutes a global regulator of gene expression in *B. thailandensis* E264, as recently reported (Mao *et al.*, 2017). Our RNA-Seq analyses identified genes known to be controlled by ScmR or genes encoding functions known to be controlled by ScmR. Indeed, we recently demonstrated that ScmR stimulates the putative HMAQ signaling system (cf. la **Figure 3.66** présentée à la section 3.3.4.3). RNA-Seq confirmed that expression of the *hmqABCDEFG* operon, which is required for HMAQs production (Vial *et al.*, 2008), is activated by ScmR (cf. les **Annexes**, page 317). Furthermore, ScmR represses the production of burkholdac, a hybrid polyketide/nonribosomal peptide and a potent inhibitor of some histone deacetylases (HDACs) (Mao *et al.*, 2017). Consistently, expression of the *bhc* gene cluster, responsible for burkholdac biosynthesis (Biggins *et al.*, 2011), was increased in the *scmR*- mutant compared to the wild-type strain (cf. les **Annexes**, page 317). Moreover, we observed that ATP synthesis and stress response genes were downregulated in the absence of ScmR (cf. les **Annexes**, page 317), as recently reported (Mao

et al., 2017). Finally, RNA-Seq showed that transcription of the putative exopolysaccharide (EPS) genes *bceABCDEFGHIJ* and *bceNOPRSTU* is affected by ScmR (cf. les Annexes, page 317). This is in agreement with the finding that ScmR influences colony morphology, as well as pellicle and biofilm formation of *B. thailandensis* E264 (Mao *et al.*, 2017).

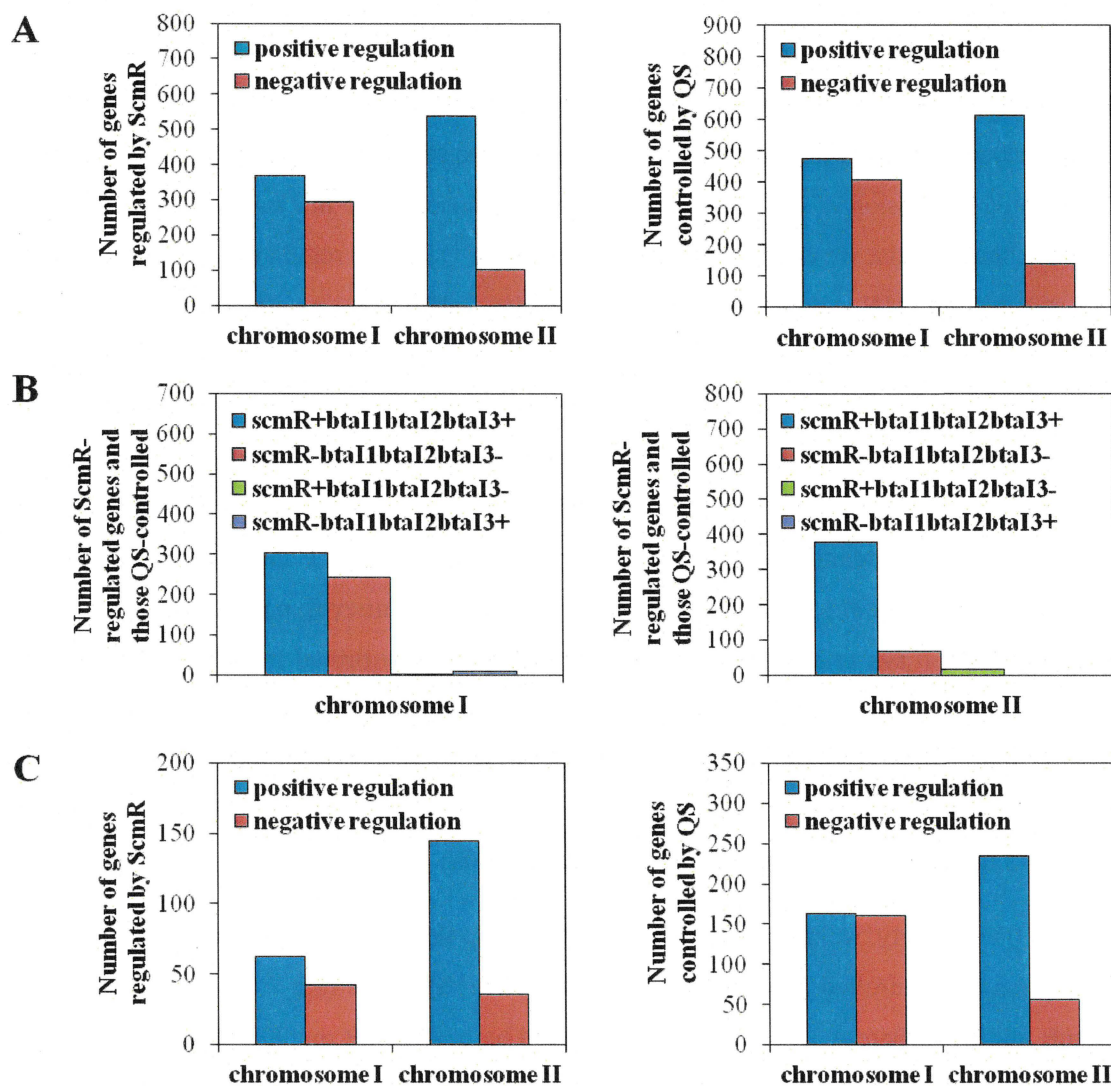


Figure 3.88. Numbers of ScmR-regulated genes and those QS-controlled in *B. thailandensis* E264 according to transcriptomic analyses obtained by RNA-Seq.

(A) Total numbers of genes showing positive or negative regulation in the *scmR*- and $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutants compared to the wild-type strain. (B) Number of genes exhibiting coregulation were grouped as follows: positive regulation by both ScmR and QS (*scmR*+*btaI1btaI2btaI3*+), negative regulation by both ScmR and QS (*scmR*-*btaI1btaI2btaI3*-), positive regulation by ScmR and negative regulation by QS (*scmR*+*btaI1btaI2btaI3*-), and negative regulation by ScmR and positive regulation by QS (*scmR*-*btaI1btaI2btaI3*+). (C) Number of genes displaying independent regulation in the *scmR*- and $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutants in comparison with the wild-type strain.

Since ScmR influences the biosynthesis of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL (Mao *et al.*, 2017), corresponding to the main AHLs found in *B. thailandensis* E264 (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Le Guillouzer *et al.*, 2017, Majerczyk *et al.*, 2014a), we assumed that ScmR intervenes in the regulation of gene expression, *inter alia*, by impacting the QS-1, QS-2, and/or QS-3 systems of *B. thailandensis* E264. Consequently, we also compared the transcripts in the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and in the AHL-defective $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant under the same growth conditions to identify the genes specifically controlled by ScmR independently of its effect on AHLs production. Our RNA-Seq analyses indicated that QS positively regulated expression of 1088 genes and negatively modulated expression of 547 genes on all two chromosomes of *B. thailandensis* E264 (**Fig. 3.88A**). Importantly, we confirmed the involvement of QS in the regulation of genes shown to be affected by AHLs or genes encoding functions shown to be affected by AHLs. QS stimulates contact-dependent growth inhibition (CDI) (Majerczyk *et al.*, 2014a, Majerczyk *et al.*, 2016), and we indeed observed that the CDI genes transcription was decreased in the absence of AHLs (cf. les **Annexes**, page 317). Furthermore, RNA-Seq indicated that the bactobolin biosynthetic genes transcription (Duerkop *et al.*, 2009), as well as expression of the *obc1* gene, encoding the oxalate biosynthetic enzyme Obc1 that is essential to pH homeostasis (Goo *et al.*, 2012), are activated by QS (cf. les **Annexes**, page 317), as previously reported (Majerczyk *et al.*, 2014a). Moreover, RNA-Seq confirmed that expression of both flagellar genes and methyl-accepting chemotaxis protein genes was upregulated in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant in comparison with the wild-type strain (Majerczyk *et al.*, 2014a) (cf. les **Annexes**, page 317), which is consistent with the observation that *B. thailandensis* E264 QS mutants are hypermotile (Chandler *et al.*, 2009).

Interestingly, we noticed a considerable overlap between the genes regulated by ScmR and those QS-controlled (**Fig. 3.88B**). We identified 681 genes that were activated by both ScmR and QS, whereas 310 genes were repressed by both ScmR and QS (**Fig. 3.88B**). Other patterns of coregulation were observed including positive regulation by ScmR and negative regulation by QS, as well as negative regulation by ScmR and positive regulation by QS (**Fig. 3.88B**). While we identified 1019 genes that were coregulated by both ScmR and QS, 901 genes appeared to be independently regulated by either ScmR or QS under the conditions of our experiments (**Fig. 3.88C**). Altogether, these results support the idea that ScmR regulates the transcription of many genes through modulation of the QS-1, QS-2 and/or QS-3 systems in *B. thailandensis* E264. Additionally, we found that ScmR affected the expression of genes

encoding transcriptional factors (cf. les **Annexes**, page 317), thus many genes could be controlled by ScmR indirectly through auxiliary regulators, as recently proposed (Mao *et al.*, 2017).

3.4.4.2. ScmR modulates AHLs biosynthesis but not the transcription of the AHL synthase-coding genes

Mao *et al.* (2017) observed that ScmR activates the production of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL during the stationary phase, but neither expression of the BtaI1-, BtaI2-, and BtaI3-encoding genes, nor the *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* genes transcription were downregulated in an $\Delta scmR$ mutant in comparison with the wild-type strain under the same growth conditions. To gain insights into the ScmR-dependent modulation of AHLs biosynthesis, we determined the expression profiles of the AHL synthase-coding genes *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* throughout the bacterial growth phases in cultures of the *scmR*- mutant versus the *B. thailandensis* E264 wild-type strain harboring a chromosomal *btaI1-lux*, *btaI2-lux*, or *btaI3-lux* transcriptional fusion. No discernible difference in expression from the *btaI1* (**Fig. 3.89A**), *btaI2* (**Fig. 3.89B**), and *btaI3* (**Fig. 3.89C**) promoters was found in the *scmR*- mutant compared to the wild-type strain. Accordingly, our RNA-Seq analyses indicated that ScmR had no impact on *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* transcription (cf. les **Annexes**, page 317). The *btaR1*, *btaR2*, and *btaR3* genes, encoding the BtaR1, BtaR2, and BtaR3 transcriptional regulators, respectively, were not affected by ScmR as well (cf. les **Annexes**, page 317). Taken together, these data confirm that the effect of ScmR on C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL biosynthesis does not result from modulation of expression of the QS-1, QS-2, and/or QS-3 system genes.

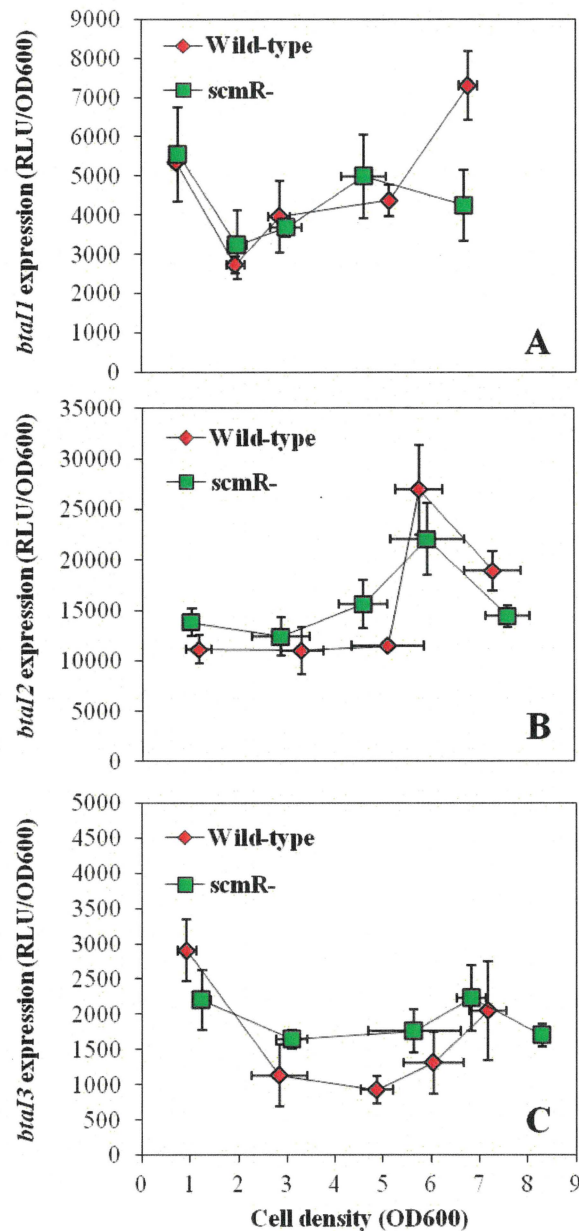


Figure 3.89. Expression from the *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* promoters in the wild-type and the *scmR*- mutant strains of *B. thailandensis* E264.

The luciferase activity of the chromosomal (A) *btaI1-lux*, (B) *btaI2-lux*, and (C) *btaI3-lux* transcriptional fusions was monitored at various times during the bacterial growth in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type and of the *scmR*- mutant strains. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

We recently demonstrated that ScmR activates the HMAQ system (cf. la **Figure 3.66** présentée à la section 3.3.4.3), and we indeed determined that the *hmqABCDEFG* transcription, as well as the production of HMAQs are completely abolished in the absence of ScmR (**Fig. 3.90**).

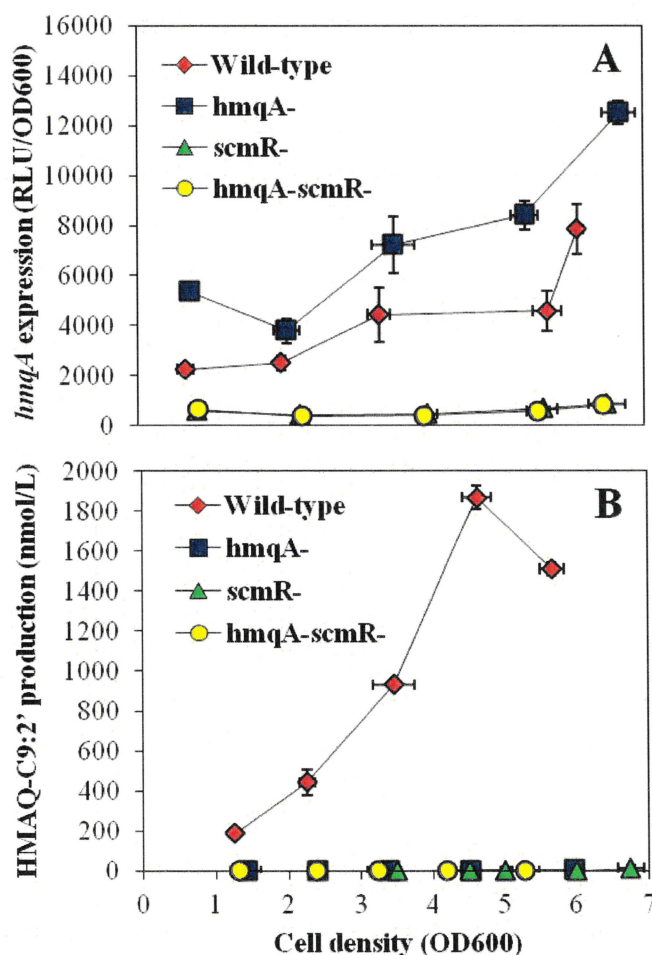


Figure 3.90. ScmR stimulates the HMAQ system in *B. thailandensis* E264.

(A) The luciferase activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional fusion was monitored at various times during growth in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *hmqA*-, *scmR*-, and *hmqA-scmR*-mutant strains. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). (B) The biosynthesis of HMAQ-C₉:2' was quantified using LC/MS-MS in cultures of the wild-type and the *hmqA*-, *scmR*-, and *hmqA-scmR*-mutant strains of *B. thailandensis* E264.

Additionally, we highlighted that C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL biosynthesis is stimulated by the HMAQ system in *B. thailandensis* E264 (cf. la **Figure 3.61** présentée à la section 3.3.4.2), whereas the *btaI1/btaR1*, *btaI2/btaR2*, and *btaI3/btaR3* genes transcription was unchanged in an *hmqA*- mutant in comparison with the wild-type strain (cf. la **Figure 3.65** présentée à la section 3.3.4.2). To verify whether the impact of ScmR on the QS-1, QS-2, and/or QS-3 systems could be mediated by the HMAQ system, we compared the biosynthesis of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL in the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and in the *hmqA*-, *scmR*-, and *hmqA-scmR*- mutants producing no HMAQs during the logarithmic growth phase (**Fig. 3.91A**). We confirmed that C₈-HSL (**Fig.**

3.91B), 3OHC₁₀-HSL (Fig. 3.91C), and 3OHC₈-HSL (Fig. 3.91D) concentrations were decreased in the *hmqA*- mutant compared to the wild-type strain. While the levels of C₈-HSL were also diminished in the *scmR*- and *hmqA-sc mR*- mutants in comparison with the wild-type strain (Fig. 3.91B), 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL amounts were upregulated (Fig. 3.91C and D), revealing that the effect of ScmR on the production of the main AHLs found in *B. thailandensis* E264 might not result from its impact on the HMAQ system, which also influences C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL biosynthesis.

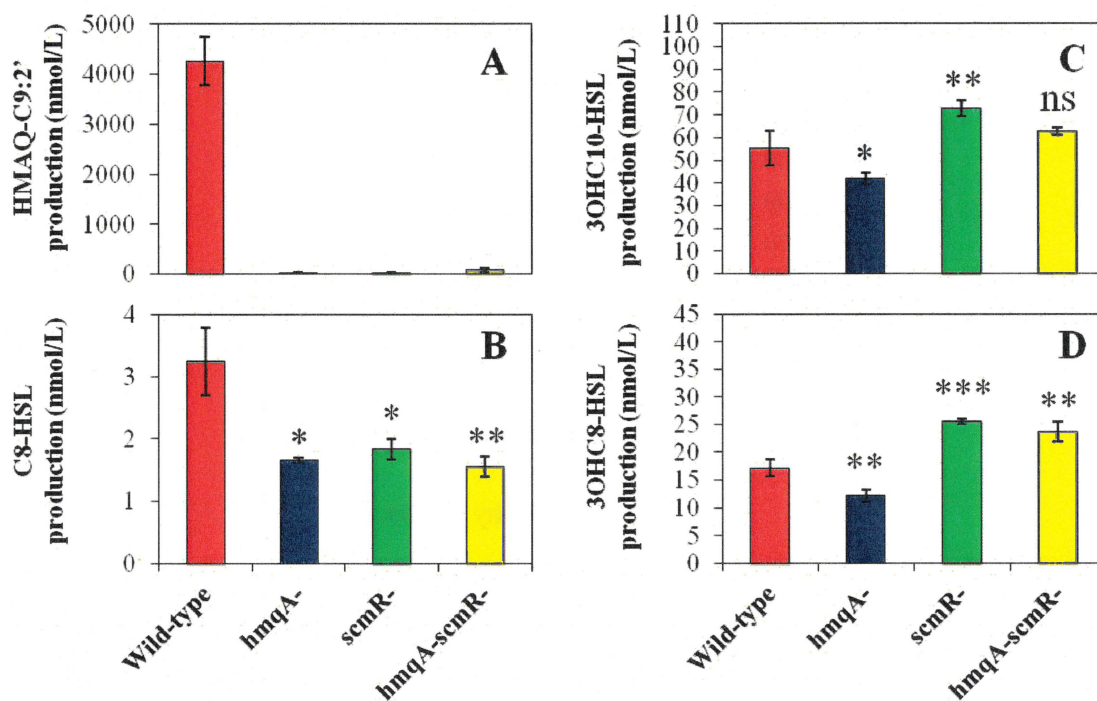


Figure 3.91. ScmR affects the *B. thailandensis* E264 QS-1, QS-2, and/or QS-3 systems independently of its impact on the HMAQ system.

(A) HMAQ-C₉:2', (B) C₈-HSL, (C) 3OHC₁₀-HSL, and (D) 3OHC₈-HSL biosynthesis was measured using LC-MS/MS in cultures of the wild-type and of the *hmqA*-, *scmR*-, and *hmqA-sc mR*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. The values are means ± standard deviations (error bars) for three replicates. Values that are significantly different are indicated by asterisks as follows: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$. Values that are not significantly different (ns) are also indicated.

Interestingly, we noticed growth differences between the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *hmqA*-, *scmR*-, and *hmqA-sc mR*- mutants under the conditions of our experiments. The *hmqA*- mutant growth was comparable to that of the wild-type strain throughout the different stages of the bacterial growth, whereas inactivation of the *scmR* gene resulted in growth inhibition during the stationary phase ($OD_{600} \approx 8.0$), but not during the exponential phase ($OD_{600} \approx 4.0$) (Fig. 3.92).

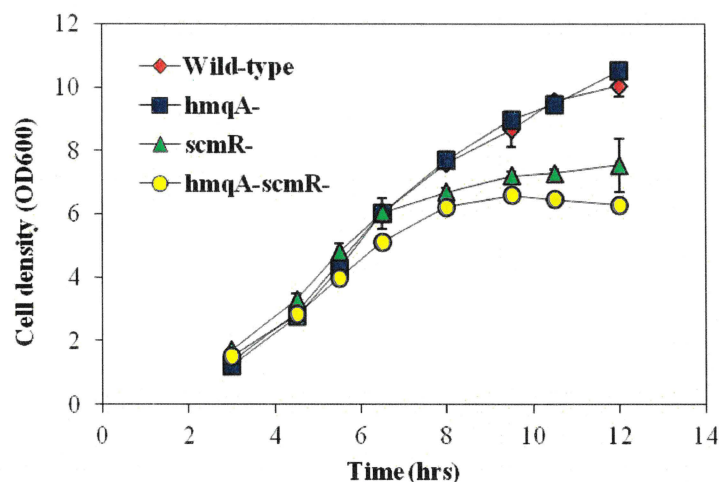


Figure 3.92. Effect of *scmR* inactivation on bacterial growth.

The *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *hmqA*-, *scmR*-, and *hmqA-scmR*- mutant strains growth curves. The values represent the means for three replicates.

3.4.4.3. ScmR contributes to pH homeostasis

pH was reported to significantly affect the growth of *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* 1026b, and *Burkholderia glumae* BGR1 (Goo *et al.*, 2015, Goo *et al.*, 2012). Consequently, we hypothesized that pH could be involved in the *scmR*- mutant growth defect. We analyzed the implication of ScmR in pH homeostasis by measuring the pH in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant throughout the different stages of the bacterial growth. pH in cultures of both the wild-type strain and the *scmR*- mutant was approximately 7.0 during the exponential phase (**Fig. 3.93A**). Interestingly, pH in wild-type strain cultures decreased to between 7.0 and 6.5 during the stationary phase, whereas pH in *scmR*- mutant cultures increased to between 7.5 and 8.0, correlating with the growth inhibition resulting from the *scmR* gene inactivation (**Fig. 3.93A**). To verify whether growth inhibition could be caused by base toxicity, we buffered cultures of the *scmR*- mutant with 100 mM HEPES (pH 7.0) and observed that the growth defect was alleviated (**Figs. 3.93A and B**), supporting the hypothesis that culture medium alkalization is the cause of the *scmR*- mutant growth inhibition.

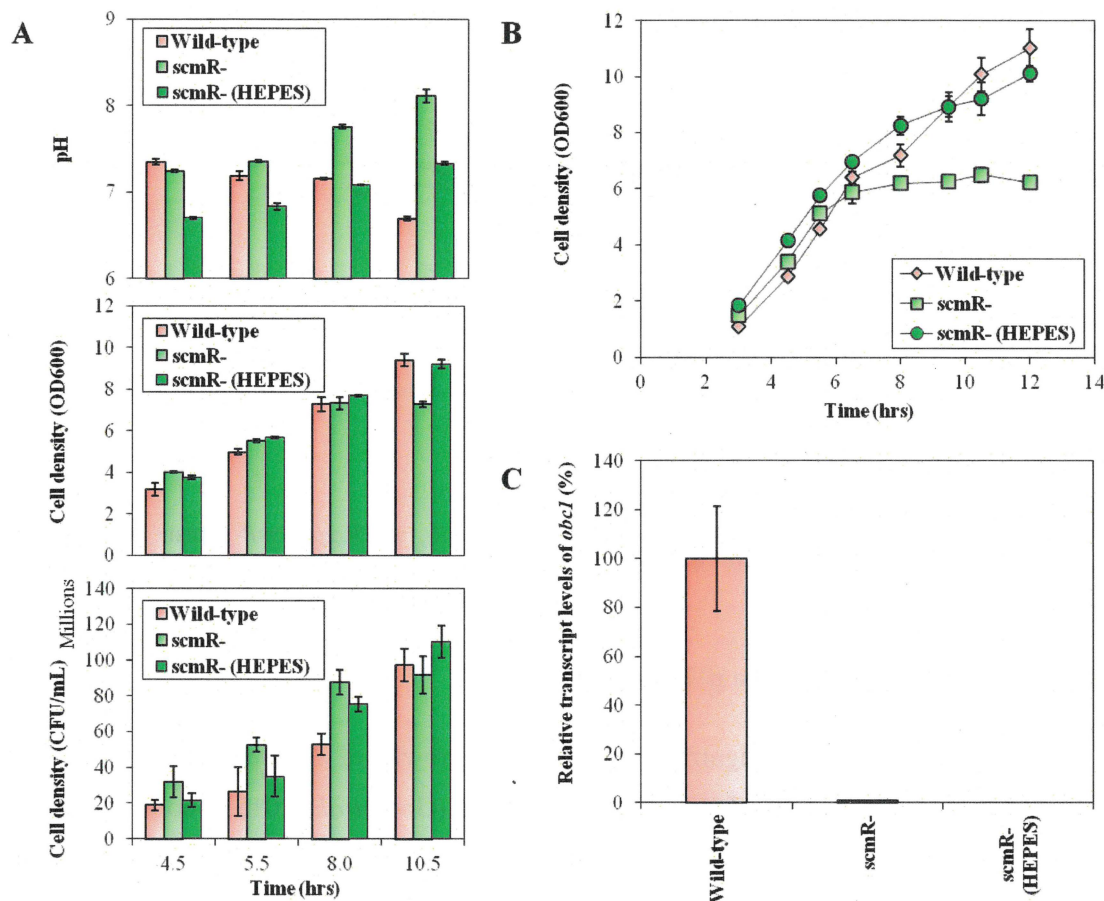


Figure 3.93. ScmR influences pH homeostasis.

(A) pH value was measured with a pH electrode and meter (Mettler-Toledo, Mississauga, ON, Canada). The cell density was monitored by measuring turbidity, expressed in 600 nm absorption units (OD₆₀₀), at various times during growth in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant strain. Colony-forming units (CFUs) were determined by plate-counting methods. Cultures were buffered with 100 mM HEPES. Water only was added to the controls. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and the *scmR*- mutant growth curves. (C) The relative transcript levels of *obc1* from the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and its *scmR*- mutant strain were estimated by qRT-PCR. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%.

To further characterize the underlying regulatory mechanisms directing pH homeostasis through ScmR, we investigated the effect of ScmR on expression of the *obc1* gene, encoding the oxalate biosynthetic enzyme Obc1, which influences the pH in several *Burkholderia* spp. (Goo *et al.*, 2015, Goo *et al.*, 2012). Oxalic acid was indeed reported to be essential to counteract alkalization in stationary-phase cultures of the wild-type strain of *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* 1026b, and *B. glumae* BGR1 (Goo *et al.*, 2015, Goo *et al.*, 2012). Expression of *obc1*, as well as oxalic acid production, were both shown to be QS-controlled (Goo *et al.*, 2012, Majerczyk *et al.*, 2014a). Our RNA-Seq analyses indicated that

obc1 transcription was downregulated in the AHL-defective $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant in comparison with the wild-type strain (approximately 35-fold) (cf. les **Annexes**, page 317), confirming that QS activates the *obc1* gene expression. Furthermore, we noticed a drastic reduction in expression of *obc1* in the *scmR*- mutant compared to the wild-type strain (approximately 72-fold) (cf. les **Annexes**, page 317), revealing that the transcription of *obc1* is also strongly enhanced by ScmR. To ascertain the involvement of ScmR in the regulation of the *obc1* gene, expression of *obc1* was assessed by qRT-PCR in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant buffered with HEPES or not buffered with HEPES during the logarithmic growth phase. We observed that *obc1* transcription was completely abolished in the absence of ScmR (**Fig. 3.93C**), attesting that expression of *obc1* is tightly controlled by ScmR. Moreover, the finding that *obc1* expression is stimulated by ScmR under neutral conditions confirms previous observations that alkaline stress does not induce *obc1* transcription (Goo *et al.*, 2012, Majerczyk *et al.*, 2014a). All in all, these findings suggest that ScmR intervenes in pH homeostasis by regulating oxalic acid biosynthesis.

Considering the effect of the absence of ScmR on pH, we hypothesized that some of the regulatory effects observed in our RNA-Seq analyses could result from pH imbalance. Consequently, we tested the impact of pH on several genes controlled by ScmR chosen arbitrarily, namely, *bsaN*, BTH_I3204, BTH_II0639, and *btaR5*, encoding the TTSS transcriptional regulator BsaN, a lipoprotein, a lipase, and the orphan LuxR-type transcriptional regulator BtaR5, respectively. According to our RNA-Seq analyses, expression of the *bsaN* and BTH_I3204 genes is repressed by ScmR (approximately 17-fold and 26-fold, respectively), whereas expression of the BTH_II0639 and *btaR5* genes is stimulated by ScmR (approximately 16-fold and 27-fold, respectively) (cf. les **Annexes**, page 317). We monitored the transcription of these four genes by qRT-PCR during the exponential phase in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant supplemented or not with HEPES. We observed that buffering *scmR*- mutant cultures did not restore normal expression of these four genes to wild-type levels (**Fig. 3.94**), showing that the effects of the *scmR*- mutant does not result from culture medium alkalization.

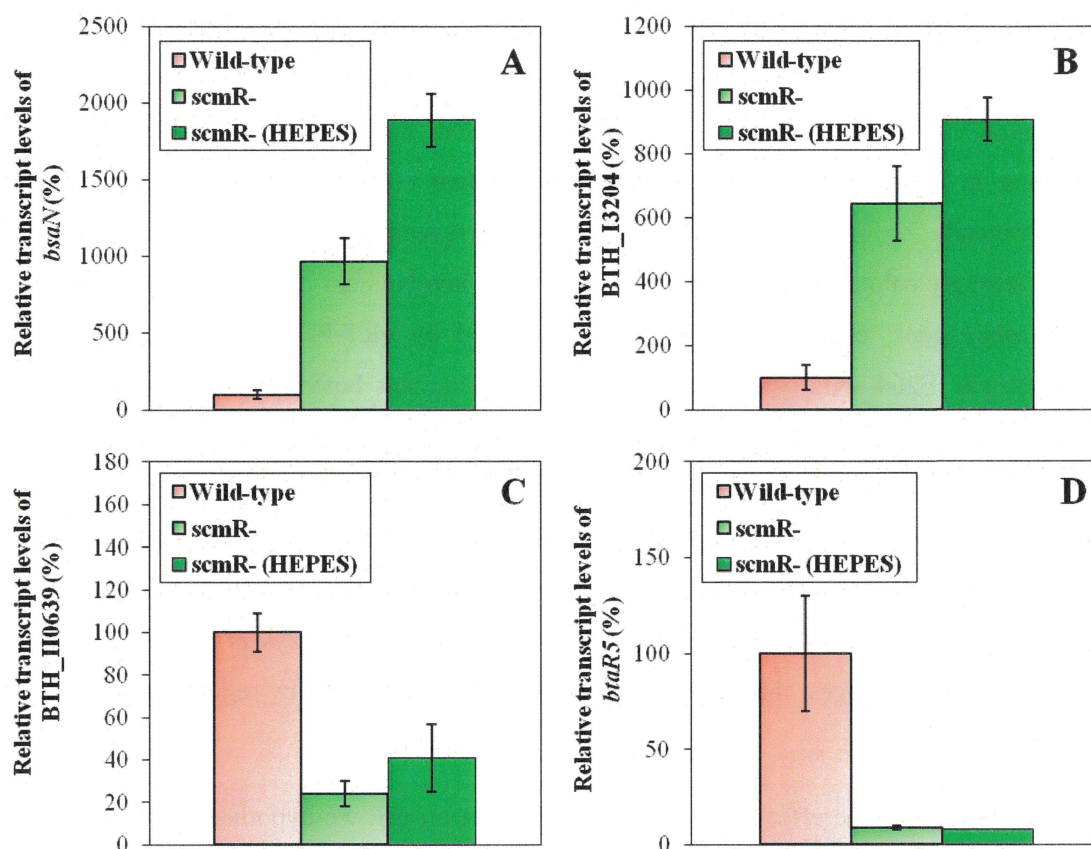


Figure 3.94. Effect of pH on the transcription of several ScmR-regulated genes.

The relative transcript levels of (A) *bsaN*, (B) BTH_I3204, (C) BTH_II0639, and (D) *btaR5* were assessed by qRT-PCR in cultures of the wild-type and of the *scmR*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. Cultures were buffered with 100 mM HEPES. Water only was added to the controls. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates.

Additionally, we verified the involvement of pH in the ScmR-dependent regulation of the *hmqABCDEFG* operon expression and the biosynthesis of HMAQs. We measured the activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional reporter, as well as the concentrations of 4-hydroxy-3-methyl-2-nonenylquinoline (HMAQ-C₉:2'), which constitutes the predominately produced HMAQ in *B. thailandensis* E264 (Vial *et al.*, 2008), in cultures of the wild-type and the *scmR*- mutant strains of *B. thailandensis* E264 buffered or not with HEPES throughout the different stages of the bacterial growth. No discernible difference in expression from the *hmqA* promoter and in HMAQ-C₉:2' concentrations was noticed in the *scmR*- mutant background in the presence or in the absence of HEPES, confirming that the HMAQ system is modulated by ScmR independently of its impact on pH as well (**Fig. 3.95**).

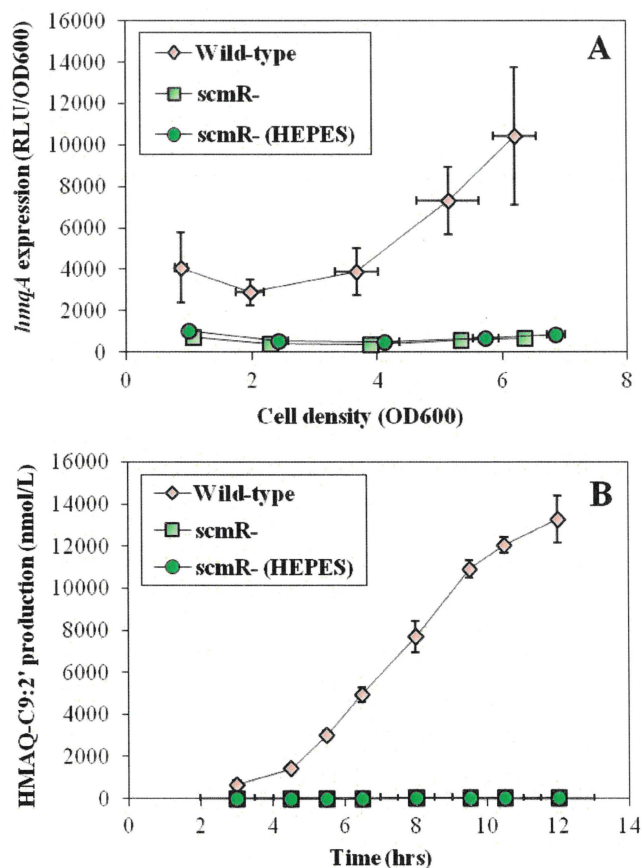


Figure 3.95. pH does not influence the ScmR-dependent modulation of the HMAQ system.

(A) The luciferase activity of the chromosomal *hmqA-lux* transcriptional fusion was monitored at various times during growth in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant strain. Cultures were buffered with 100 mM HEPES. Water only was added to the controls. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀). (B) The biosynthesis of HMAQ-C₉:2' was quantified using LC/MS-MS in cultures of the wild-type and the *scmR*- mutant strains of *B. thailandensis* E264.

pH affects the integrity of AHL signaling molecules. AHLs are stable at neutral and acidic pH, while alkaline conditions cause AHLs hydrolysis (Byers *et al.*, 2002, Yates *et al.*, 2002). Therefore, we asked whether ScmR could influence C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL biosynthesis by impacting pH homeostasis. C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL concentrations were monitored in the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant throughout the different stages of bacterial growth. We confirmed that the levels of C₈-HSL were downregulated in the *scmR*- mutant in comparison with the wild-type strain in the early stages of the bacterial growth (Fig. 3.96A), whereas 3OHC₁₀-HSL and 3OHC₈-HSL amounts were augmented (Figs. 3.96B and C). As expected, the concentrations of all three AHLs were decreased in the *scmR*- mutant compared to the wild-type strain in the late stages of bacterial growth (Figs. 3.96). Consecutively, we examined the effect of

supplementation with HEPES on AHLs biosynthesis in *scmR*- mutant cultures. The production of all three AHLs were increased in buffered cultures of the *scmR*- mutant (Fig. 3.96). Taken together, these observations indicate that the impact of ScmR on the QS-1, QS-2, and/or QS-3 systems might result, *inter alia*, from its influence on pH homeostasis.

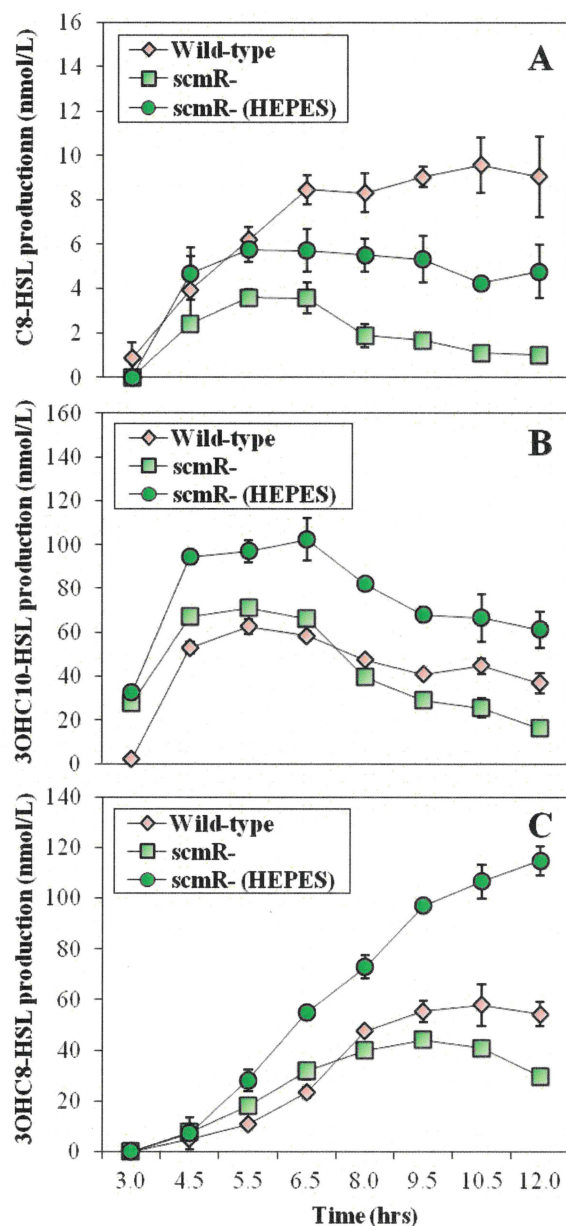


Figure 3.96. Involvement of pH in the ScmR-mediated control of AHLs production.

The biosynthesis of (A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL, and (C) 3OHC₈-HSL was assessed using LC-MS/MS throughout the bacterial growth phases in cultures of the wild-type and of the *scmR*- mutant strains of *B. thailandensis* E264. Cultures were buffered with 100 mM HEPES. Water only was added to the controls. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates.

3.4.4.4. The *scmR* gene is QS-controlled

Expression of the *scmR* gene was reported to be activated by QS (Majerczyk *et al.*, 2014a, Mao *et al.*, 2017). Our RNA-Seq analyses indicated that QS indeed stimulates *scmR* transcription (approximately 4-fold) (cf. les **Annexes**, page 317). To further characterize the QS-dependent regulation of the *scmR* gene, we monitored *scmR* transcription by qRT-PCR in the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and in the AHL-defective $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant supplemented with exogenous AHLs or not supplemented with AHLs during the logarithmic growth phase. We observed that expression of *scmR* was reduced in the absence of AHLs (**Fig. 3.97A**), confirming that *scmR* transcription is positively modulated by QS. Furthermore, the transcription of *scmR* was enhanced in cultures of the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant background supplemented with C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL (**Fig. 3.97A**). To gain insights into the QS-dependent modulation of the *scmR* gene, we also measured its transcription in the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutants versus the *B. thailandensis* E264 wild-type strain during the logarithmic growth phase. While no obvious change in *scmR* transcription was visible in the absence of the BtaR2 transcriptional regulator, expression of *scmR* was decreased in both the $\Delta btaR1$ and $\Delta btaR3$ mutants compared to the wild-type strain (**Fig. 3.97B**). Collectively, these observations indicate that the transcription of *scmR* is stimulated by the QS-1 and QS-3 systems, whereas the QS-2 system is not apparently involved in the modulation of *scmR* expression.

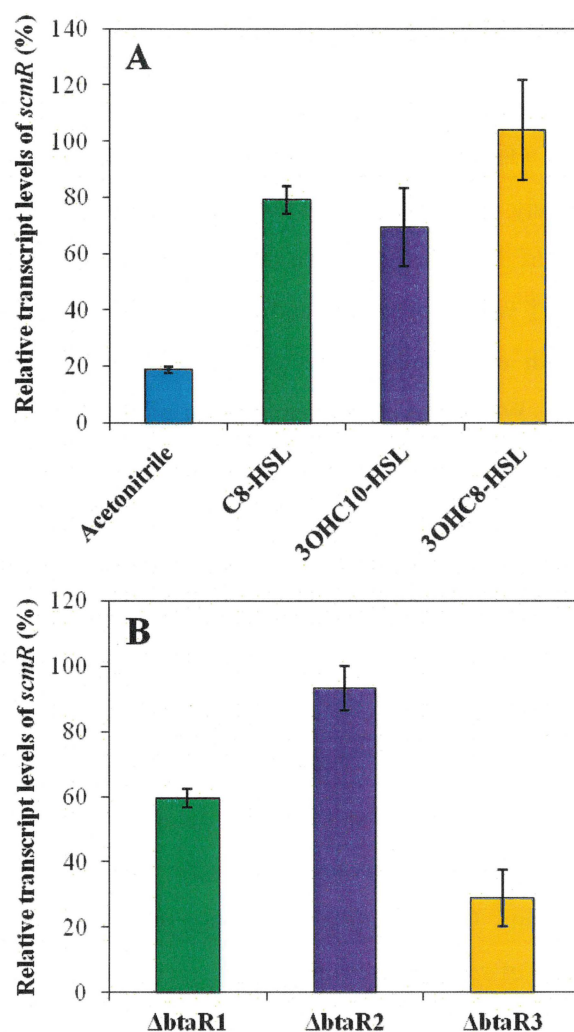


Figure 3.97. QS activates the transcription of *scmR*.

(A) The relative transcript levels of *scmR* from the *B. thailandensis* E264 wild-type and its $\Delta bta11\Delta bta12\Delta bta13$ mutant strains were estimated by qRT-PCR. Cultures were supplemented with 10 μ M C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, or 3OHC₈-HSL. Acetonitrile only was added to the controls. The results are presented as relative quantification of transcription of the gene compared to the wild-type strain, which was set at 100%. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. (B) The relative transcript levels of *scmR* were assessed by qRT-PCR in cultures of the wild-type and of the $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$, and $\Delta btaR3$ mutant strains of *B. thailandensis* E264.

While a putative *lux* box sequence was found in the promoter region of the *B. thailandensis* E264 *scmR* gene (Mao *et al.*, 2017), we do not know whether the BtaR1 and/or BtaR3 transcriptional regulators directly control its transcription. Moreover, we found a putative *lux* box sequence in the *scmR* gene promoter region of both *B. pseudomallei* K96243 and *B. mallei* ATCC 23344 (**Fig. 3.98**), and Majerczyk *et al.* (2014b) demonstrated that the *B. mallei* GB8 *scmR* gene expression is stimulated by QS. *Burkholderia cenocepacia* J2315 also possesses an *scmR* homologue, which was shown to be QS-controlled in *B. cenocepacia* K56-

2 (O'Grady *et al.*, 2009), but no putative *lux* box sequence was found in its promoter region (Chambers *et al.*, 2006). Altogether, these observations suggest that the QS-dependent regulation of the *scmR* gene is conserved among *Burkholderia* spp.

<i>Vibrio fischeri</i>	<i>luxI</i> (-32 to -13)	ACCTGTAGGATCGTACAGGI
<i>Burkholderia mallei</i>	<i>scmR</i> (-82 to -63)	CCAGTGCTGATCCGACAGCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>rhlI</i> (-155 to -136)	CCCTACCAAGATCTGGCAGGI
<i>Burkholderia thailandensis</i>	<i>rsaM1</i> (-54 to -35)	CGCTGTCA ^A CTTGCTAGGI
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>scmR</i> (-82 to -63)	CCAGTGCTGATCCGACAGCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>lasI</i> (-75 to -56)	ATCTA ^T CTCT ^A TTGCTAGT ^T
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>cepI</i> (-82 to -63)	CCCTGTAAAGATTACAGT ^T

Figure 3.98. The promoter region of the *ScmR*-encoding gene contains a putative *lux* box sequence. The *scmR* gene encoding ScmR possesses in its promoter region a putative *lux* box sequence, which is homologous to characterized *lux* box sequences in Proteobacteria. The start and stop positions of each sequence are indicated in parentheses relative to the translational start site.

Since *scmR* is directly adjacent to its downstream gene, namely, *ldhA*, encoding a putative lactate dehydrogenase, on the genome of *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* K96243, *B. mallei* ATCC 2344, and *B. cenocepacia* J2315, and transcribed in the same direction (**Fig. 3.99A**), we asked whether they could be cotranscribed. The *scmR* gene is indeed predicted to be arranged in operon with *ldhA* (<http://www.burkholderia.com/>), and we observed that *ldhA* transcription is also activated by QS (cf. les **Annexes**, page 317). According to our RNA-Seq analyses, *scmR* is not cotranscribed with the *ldhA* gene (**Fig. 3.99B**), as confirmed by RT-PCR experiments (**Fig. 3.99C**).

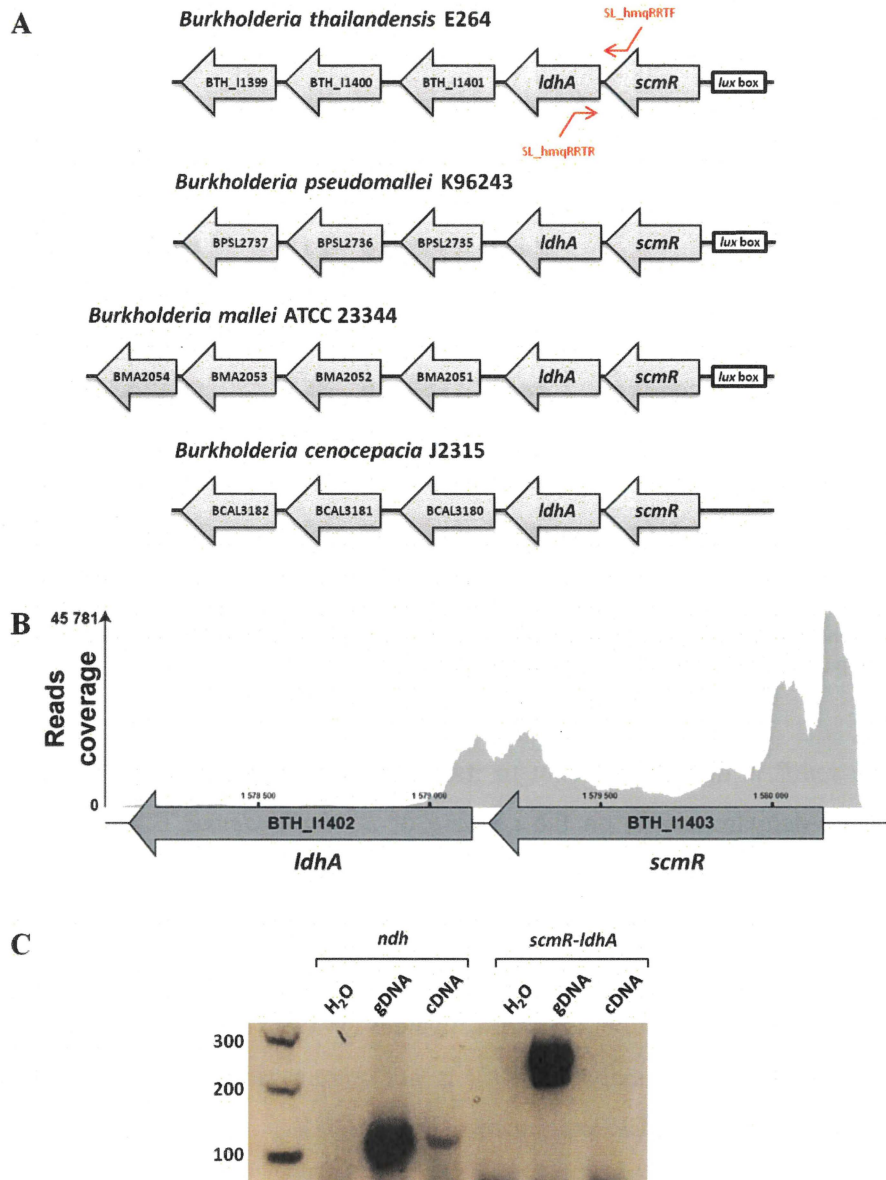


Figure 3.99. Examination of the genetic organization of the *scmR* gene.

(A) The *scmR* gene is directly adjacent to *ldhA* on the genome of *B. thailandensis* E264. The SL_hmqRRTF and SL_hmqRRTR primer pair was used to amplify the intergenic region of the *scmR* and *ldhA* genes. The promoter region of *scmR* contains a putative *lux* box sequence as reported formerly (Mao *et al.*, 2017). *B. pseudomallei* K96243, *B. mallei* ATCC 23344, and *B. cenocepacia* J2315 possess an *scmR* homologue. A putative *lux* box sequence is present in the promoter region of the *B. pseudomallei* K96243 and *B. mallei* ATCC 23344 *ScmR*-encoding gene (CCAGTGCTGATCCGACAGCC), but not in the promoter region of the *B. cenocepacia* J2315 *ScmR*-encoding gene as reported formerly (Chambers *et al.*, 2006). (B) Transcriptomic analyses obtained by RNA-Seq showing the genetic arrangement of the *ScmR*-encoding gene of *B. thailandensis* E264. (C) RT-PCR experiments were performed to examine cotranscription of the *scmR* gene with *ldhA* and analyzed by agarose gel electrophoresis. The notation *ndh* indicates that the PCR reactions were conducted using the SLG_qRT-PCR_ndh_F and SLG_qRT-PCR_ndh_R primer pair with H₂O as a negative control, genomic DNA (gDNA) as a positive control, or complementary DNA (cDNA) of *B. thailandensis* E264. These reactions testify to the efficiency of the RT-PCR experiments as revealed by the presence of a PCR amplification product in the cDNA lane. The notation *scmR-ldhA* indicates that the PCR reactions were carried out with the SL_hmqRRTF and SL_hmqRRTR primer pair. The absence of PCR amplification product in the cDNA lane reveals that *scmR* is not cotranscribed with the *ldhA* gene. The molecular marker is the DNA Ladder 100 bp (New England Biolabs, Inc., Whitby, ON, Canada).

Interestingly, expression of *ldhA* was decreased in the *scmR*- mutant compared to the wild-type strain (cf. les **Annexes**, page 317), highlighting that the *ldhA* gene is positively modulated by ScmR as well. Of note, the reduction in expression of *ldhA* was substantially greater in the *scmR*- mutant (approximately 17-fold) than in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ mutant (approximately 3-fold) in comparison with the wild-type strain (cf. les **Annexes**, page 317), indicating that QS might activate *ldhA* transcription indirectly via positive regulation of the *scmR* gene.

3.4.4.5. *scmR* is negatively autoregulated

As LTRs are typically negatively autoregulated (Maddocks *et al.*, 2008), we investigated the impact of ScmR on its own transcription. Considering that the use of an *scmR*- mutant to perform our RNA-Seq analyses precludes clear assessment, we measured expression of *scmR* in the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and its *scmR*- mutant strain harboring a chromosomal *scmR-lux* transcriptional fusion. We observed an increase in *scmR* expression in the *scmR*- mutant in comparison with the wild-type strain (**Fig. 3.100**), revealing that *scmR* is negatively autoregulated.

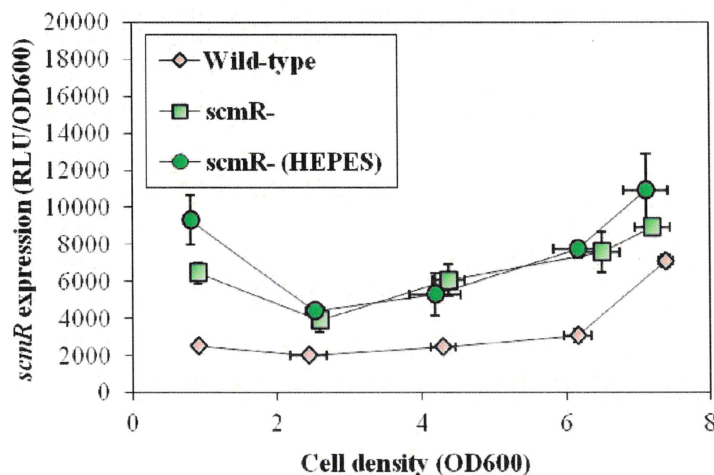


Figure 3.100. The *scmR* gene is negatively autoregulated.

The luciferase activity of the chromosomal *scmR-lux* transcriptional fusion was monitored at various times during growth in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant strain. Cultures were buffered with 100 mM HEPES. Water only was added to the controls. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

A heterologous host *E. coli* expression reporter system was developed to examine the possibility of direct interaction of ScmR with the promoter region of the *scmR* gene. *E. coli* DH5 α recombinant strains were generated containing the chromosomal *scmR-lux* transcriptional reporter and either pMLS7 or pMLS7-*scmR* for constitutive expression of the ScmR transcriptional regulator. ScmR did not repress *scmR* transcription (**Fig. 3.101**), suggesting that ScmR does not directly repress its own expression or that additional unknown factor(s), which might be absent in the *E. coli* background, are required for *scmR* negative autoregulation. Indeed, LTTRs generally function in association with ligands to modulate the expression of genes (Maddocks *et al.*, 2008).

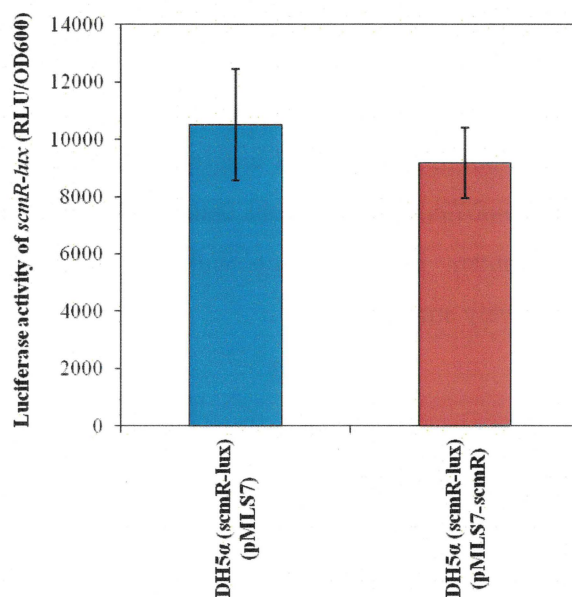


Figure 3.101. The *scmR* promoter response to the ScmR transcriptional regulator.

The luciferase activity of the chromosomal *scmR-lux* transcriptional reporter was assessed in cultures of recombinant *E. coli* DH5 α strains containing either pMLS7 or pMLS7-*scmR*. The values represent the means for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

To address the possibility that the activity of ScmR is regulated by a ligand synthesized by *B. thailandensis* E264, we investigated the impact of the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 and the *scmR*- mutant stationary-phase supernatants on expression of *scmR* in cultures of the *B. thailandensis* E264 wild-type strain and the *scmR*- mutant. Expression of *scmR* was downregulated in cultures of the wild-type strain supplemented with either the wild-type strain supernatant or the *scmR*- mutant supernatant (**Fig. 3.102A**). These observations suggest that unknown factor(s) produced by the wild-type strain of *B.*

thailandensis E264 and the *scmR*- mutant, and thus not under ScmR control, repress *scmR* transcription. The same results were obtained when the wild-type strain and the *scmR*- mutant supernatants were added to the *scmR*- mutant cultures (Fig. 3.102B), showing that the repression of *scmR* transcription exerted by these unknown factor(s) is not likely mediated by ScmR.

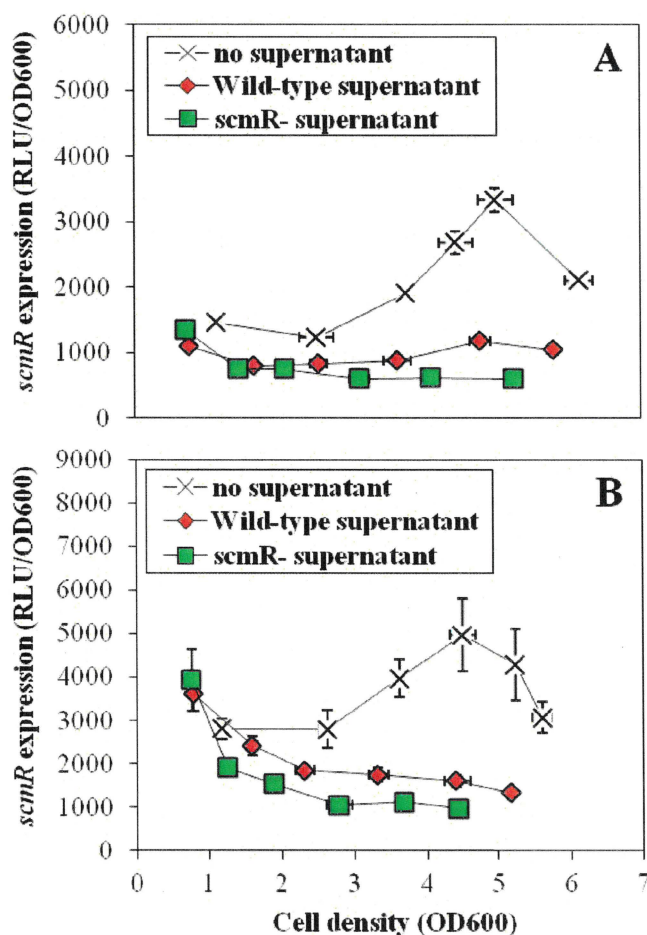


Figure 3.102. Effects of the *B. thailandensis* wild-type E264 strain and the *scmR*- mutant strain supernatants on expression from the *scmR* promoter.

The luciferase activity of the chromosomal *scmR-lux* transcriptional reporter was monitored throughout the bacterial growth phases in cultures of (A) the wild-type strain and of (B) the *scmR*- mutant strain of *B. thailandensis* E264. Cultures were supplemented or not with supernatants of the wild-type strain of *B. thailandensis* E264 or the *scmR*- mutant. The error bars represent the standard deviations of the averages for three replicates. The luminescence is expressed in relative light units per optical density of the culture (RLU/OD₆₀₀).

3.4.4.6. ScmR represses virulence in the fruit fly model *D. melanogaster*

Mao *et al.* (2017) reported that ScmR influences pathogenicity since an $\Delta scmR$ mutant of *B. thailandensis* E264 is hypervirulent toward the nematode worm *C. elegans* in comparison with the wild-type strain, presumably by overproducing the virulence determinant malleilactone. However, according to our RNA-Seq analyses, ScmR has no impact on expression of *btaR4*, encoding the orphan LuxR-type transcriptional regulator BtaR4 (MalR) known to activate the malleilactone biosynthetic genes transcription (Biggins *et al.*, 2012, Truong *et al.*, 2015), as well as on expression of the *mal* gene cluster, indicating that ScmR might not regulate malleilactone production under the conditions of our experiments. Still, we found that the *scmR*- mutant of *B. thailandensis* E264 was significantly more virulent than the wild-type strain using the *D. melanogaster* host model ($P < 0.001$) (Fig. 3.103). Collectively, these data suggest that the ScmR-dependent regulation of pathogenicity in *B. thailandensis* E264 is not exclusively mediated through control of the biosynthesis of malleilactone.

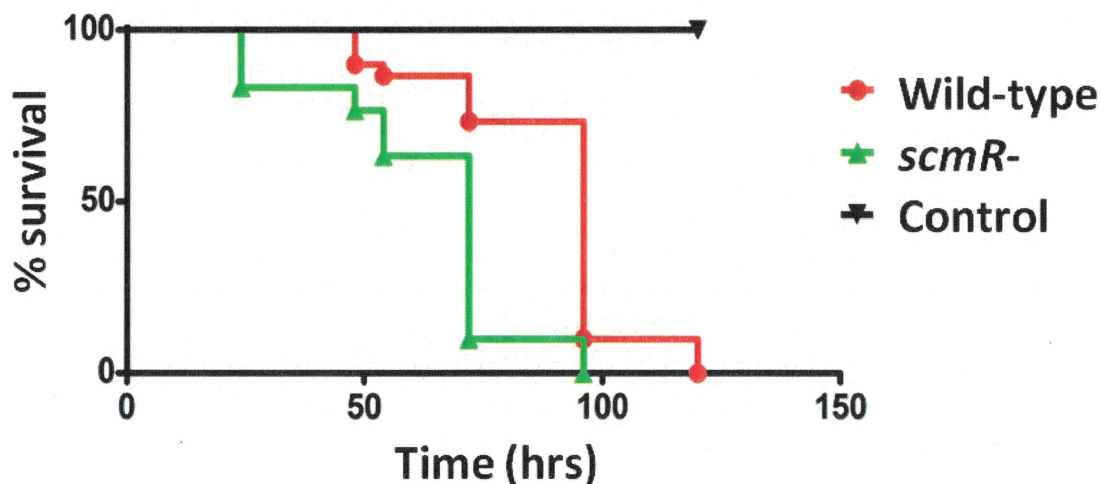


Figure 3.103. Virulence of the wild-type strain and of the *scmR*- mutant strain of *B. thailandensis* E264 toward the fruit fly *D. melanogaster*.

3.4.5. Discussion

The function of the ScmR transcriptional regulator was recently addressed in *B. thailandensis*, revealing its importance in secondary metabolism regulation, as well as its involvement in the modulation of additional QS-controlled phenotypes (Mao *et al.*, 2017). While Mao *et al.* (2017) defined the ScmR regulon during the stationary phase (Mao *et al.*,

2017), we established the impact of ScmR on the expression of genes during the exponential phase. We confirmed that ScmR is a global regulator of gene expression in *B. thailandensis* E264 (cf. les **Annexes**, page 317). Mao *et al.* (2017) highlighted that ScmR modulates the production of the main AHL signaling molecules found in this bacterium, namely, C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL and we confirmed that AHLs biosynthesis is affected by ScmR as well (**Fig. 3.91**), which hints that ScmR might control the transcription of many genes through its effect on the QS-1, QS-2, and/or QS-3 systems. This is also further supported by the finding that ScmR modulates QS-controlled phenotypic traits, such as colony morphology, as well as pellicle and biofilm formation (Mao *et al.*, 2017). Consistently, we noticed a considerable overlap between the ScmR-regulated genes and those controlled by QS (**Fig. 3.88B**). Furthermore, we attested that the *scmR* gene is regulated by QS (**Fig. 3.97**), showing that ScmR is deeply integrated into the QS modulatory network of *B. thailandensis* E264. We assume that the QS-dependent regulation of *scmR* transcription allows tightly controlled coordination of the expression of genes.

Interestingly, we found that expression of many genes that encode transcriptional regulators, including the orphan transcriptional regulator BtaR5-encoding gene (**Fig. 3.94D**), is modulated either positively or negatively by ScmR (cf. les **Annexes**, page 317). Consequently, we propose that ScmR controls many genes through different and not mutually exclusive mechanisms: i.e. (i) regulation of AHL signaling molecules biosynthesis, (ii) direct binding of target genes, and (iii) indirect modulation of some genes via intermediate regulators. It will therefore be important to further investigate the molecular mechanism of action of ScmR, for instance, by performing Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq) analyses in order to decipher between the directly and the indirectly ScmR-regulated genes. Moreover, the characterization of an ScmR-binding motif will contribute to the identification of promoters that are directly modulated versus those that are indirectly modulated.

The biosynthesis of oxalic acid, which is required for pH homeostasis, is under QS control in several *Burkholderia* spp. (Goo *et al.*, 2015, Goo *et al.*, 2012). Our RNA-Seq analyses confirmed the implication of AHLs in the regulation of expression of the oxalate biosynthetic gene *obc1*, and we showed that the transcription of *obc1* is stringently modulated by ScmR as well (**Fig. 3.93C**). Furthermore, we noticed that the impact of ScmR on *obc1* expression was more pronounced than the effect of AHLs (cf. les **Annexes**, page 317), suggesting that QS activates *obc1* transcription indirectly via positive regulation of the *scmR*

gene. Whether the ScmR-dependent control of the *obc1* gene is direct or not remains to be determined. Moreover, the impact of ScmR on the biosynthesis of oxalic acid is still untested. Nevertheless, it is possible that the ScmR-mediated control of the homeostasis of pH is not exclusively dependent on regulation of oxalate production. We indeed observed that several genes involved in ATP synthesis are modulated by ScmR (cf. les **Annexes**, page 317), as formerly highlighted (Mao *et al.*, 2017). Additionally, our RNA-Seq analyses revealed that ScmR stimulates expression of the putative lactate dehydrogenase *LdhA*-encoding gene, which is directly adjacent to *scmR*, and transcribed in the same direction in several *Burkholderia* spp. (**Fig. 3.99**). Because lactate dehydrogenase, by reducing pyruvate to lactate, was suggested to affect pH (Mao *et al.*, 2017), ScmR could also intervene in pH homeostasis by activating *ldhA* transcription. More experiments will thus be necessary to further understand the precise underlying molecular mechanism of action of ScmR in the control of pH homeostasis.

We suppose that the impact of ScmR on the production of C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, and 3OHC₈-HSL might result, *inter alia*, from its influence on pH homeostasis (**Fig. 3.96**), as AHLs are hydrolyzed rapidly under conditions of alkaline pH (Byers *et al.*, 2002, Yates *et al.*, 2002). This would then explain why no visible change in expression from the *btaI1*, *btaI2*, and *btaI3* promoters was observed in the *scmR*-mutant compared to the wild-type strain (**Fig. 3.89**). However, the ScmR-dependent regulation of the QS-1, QS-2, and/or QS-3 systems might be more complex and will need further investigation.

In agreement with the fact that LTTRs are typically negatively autoregulated (Maddocks *et al.*, 2008), we highlighted that ScmR represses its own expression (**Fig. 3.100**). Still, we have been unable to show a direct interaction between the ScmR transcriptional regulator and the promoter region of the *scmR* gene when co-expressed together in a heterologous host *E. coli* expression reporter system (**Fig. 3.101**). An explanation could be that *scmR* negative autoregulation requires additional modulatory elements, including molecular ligands. Indeed, ligands are recognized as being important for the function of LTTRs and frequently appear to contribute to a feedback loop in which a product or an intermediate product of a given metabolic/synthesis pathway that is usually activated by an LTTR acts as the ligand necessary for transcriptional activation or repression (Maddocks *et al.*, 2008). Therefore, it will be important to determine the putative ligands of ScmR in order to uncover the precise regulatory mechanism underlying *scmR* negative autoregulation.

We demonstrated that ScmR contributes to pathogenicity using the *D. melanogaster* host model (**Fig. 3.103**). Considering that we observed that the *mal* gene cluster transcription is not controlled by ScmR under the conditions of our experiments (cf. les **Annexes**, page 317), and supposedly the production of the virulence determinant malleilactone, we hypothesize that ScmR represses pathogenicity by modulating the biosynthesis of additional virulence/survival factors. For instance, we highlighted that expression of the *bsa* TTSS genes, which are crucial for the pathogenicity of both *B. pseudomallei* and *B. mallei* (Ulrich *et al.*, 2004a, Warawa *et al.*, 2005), is repressed by ScmR (cf. les **Annexes**, page 317). The involvement of other potential virulence factors in the ScmR-mediated control of pathogenicity in *B. thailandensis* E264 is currently under investigation.

3.4.6. Funding information

This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grants MOP-97888 and MOP-142466 to Éric Déziel. Éric Déziel holds the Canada Research Chair in Sociomicrobiology. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

3.4.7. Acknowledgments

We thank Everett Peter Greenberg (Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA) for providing the *B. thailandensis* E264 strains. We especially thank Sylvain Milot, François D'Heygere, and Koyomi Ozaki for their technical help.

3.4.8. Présentation des résultats additionnels de l'article « ScmR, a global regulator of gene expression, quorum sensing, pH homeostasis, and virulence in *Burkholderia thailandensis* »

Des expériences additionnelles ont été effectuées dans le cadre de l'étude de la fonction du régulateur transcriptionnel ScmR chez *B. thailandensis* E264 et sont présentées ici.

3.4.8.1. Détermination de l'impact du régulateur transcriptionnel ScmR sur la transcription du gène de référence *ndh*

Des expériences de quantification de la transcription du gène de référence *ndh* ont été réalisées par qRT-PCR dans des cultures de la souche sauvage et du mutant *scmR*- de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en HEPES. Ces expériences montrent que la transcription du gène *ndh* ne présente aucune variation dans les différentes conditions de culture testées (Fig. 3.104). Nous l'avons donc retenu pour la normalisation des données de qRT-PCR.

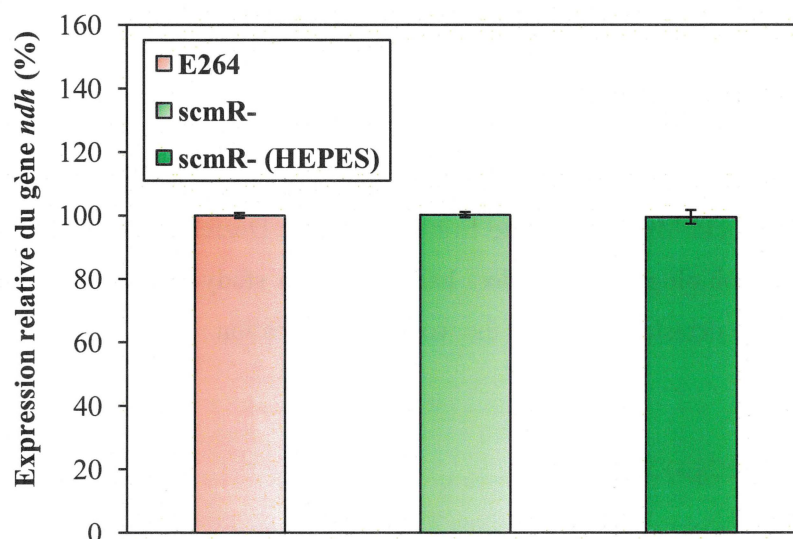


Figure 3.104. L'expression du gène de référence *ndh* est stable dans des cultures de la souche sauvage et du mutant *scmR*- de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en HEPES. L'expression relative du gène de référence *ndh* a été mesurée par qRT-PCR dans des cultures de la souche sauvage et du mutant *scmR*- de *B. thailandensis* E264 supplémentées ou non supplémentées en HEPES au cours de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. L'HEPES a été dilué préalablement dans de l'eau stérile et a été ajouté à une concentration de 100 mM. L'expression du gène *ndh* chez la souche sauvage a été arbitrairement choisie comme 100% d'expression. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.4.8.2. Confirmation des données RNA-Seq

Des analyses RNA-Seq ont permis de déterminer que le régulateur transcriptionnel ScmR contrôle l'expression de nombreux gènes parmi lesquels figurent, entre autres, le gène *obc1* codant l'enzyme Obc1 responsable de la production de l'acide oxalique nécessaire au maintien d'un pH homéostatique, le gène *bsaN* codant le régulateur transcriptionnel BsaN du système de sécrétion de type III (SSTT), les gènes BTH_I3204 et BTH_II0639 qui codent

respectivement une lipoprotéine et une lipase, ainsi que le gène *btaR5* codant le régulateur transcriptionnel de type LuxR orphelin BtaR5 (Fig. 3.105). Nous avons confirmé *via* des expériences de qRT-PCR que l'expression des gènes *obc1*, *bsaN*, BTH_I3204, BTH_II0639 et *btaR5* est effectivement sous le contrôle du régulateur transcriptionnel ScmR (Fig. 3.105).

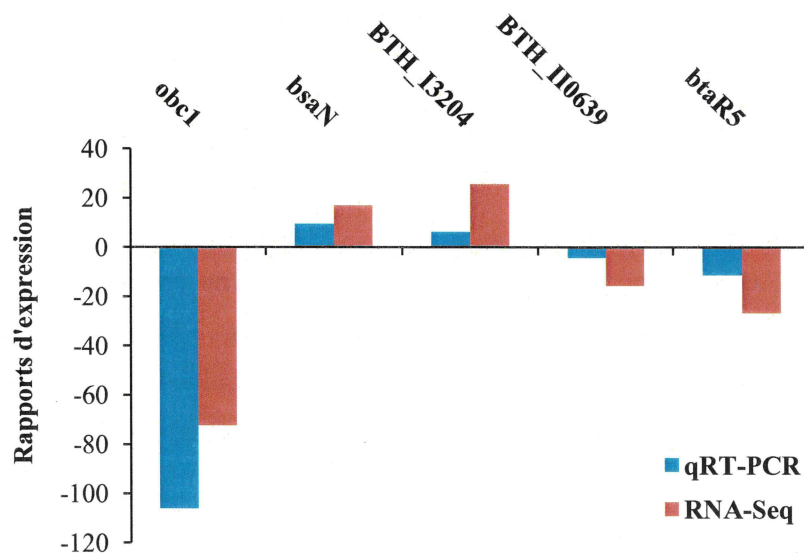


Figure 3.105. Confirmation des données RNA-Seq.

3.4.8.3. La lactate déshydrogénase putative LdhA n'est pas impliquée dans la modulation du pH dépendante du régulateur transcriptionnel ScmR

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le régulateur transcriptionnel ScmR affecte le pH, entre autres, par l'intermédiaire de la lactate déshydrogénase putative LdhA, nous avons comparé le pH dans des cultures de la souche sauvage et des mutants *scmR*- et *ldhA*- de *B. thailandensis* E264 (Tableau 3.27).

Tableau 3.27. Souche utilisée pour étudier l'implication de la lactate déshydrogénase putative LdhA dans la modulation du pH dépendante du régulateur transcriptionnel ScmR.

Souches	Description	Référence
BT08944	E264 <i>ldhA</i> ::ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT; Tp ^R	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)

Il apparaît que l'inactivation du gène *ldhA* n'a pas d'effet significatif sur le pH (Tableau 3.28). Ainsi, dans les conditions de culture testées, qui sont celles décrites dans

l'article « *ScmR*, a global regulator of gene expression, quorum sensing, pH homeostasis, and virulence in *Burkholderia thailandensis* », la lactate déshydrogénase putative LdhA n'influence pas le pH.

Tableau 3.28. Impact de la lactate déshydrogénase putative LdhA sur le pH.

	E264	<i>scmR</i> -	<i>ldhA</i> -
DO _{600nm}	15,34	6,01	14,18
pH*	6,70	8,81	6,66

*Les mesures de pH ont été obtenues avec un pH-mètre dans des cultures de la souche sauvage et des mutants *scmR*- et *ldhA*- de *B. thailandensis* E264 après 24 heures d'incubation à 37°C.

De plus, nous avons observé que le mutant *ldhA*- ne présente pas de défaut de croissance en comparaison avec la souche sauvage (Fig. 3.106). L'ensemble de ces considérations indique donc que la lactate déshydrogénase putative LdhA n'est pas impliquée dans la modulation du pH dépendante du régulateur transcriptionnel *ScmR*.

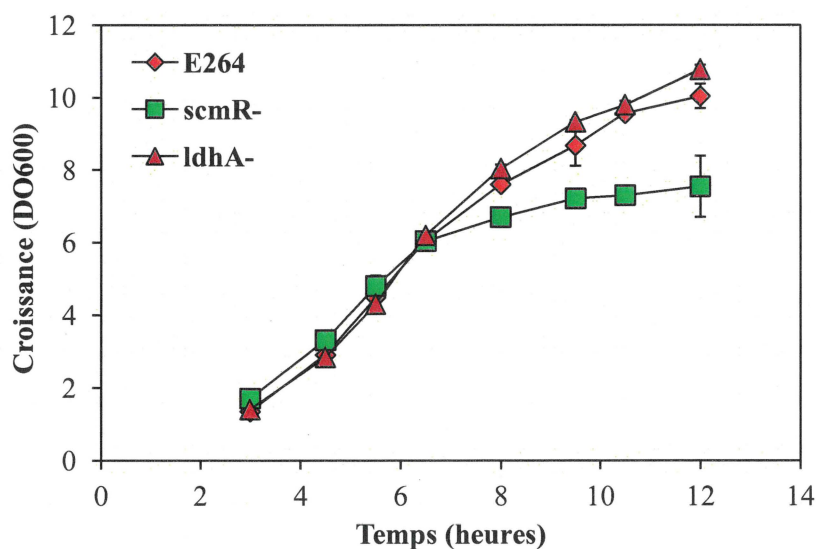


Figure 3.106. Impact de la lactate déshydrogénase putative LdhA sur la croissance bactérienne.

Les densités cellulaires ont été suivies par mesure de la turbidité dans des cultures de la souche sauvage et des mutants *scmR*- et *ldhA*- de *B. thailandensis* E264. Les densités cellulaires sont exprimées en unités d'absorption à 600 nm (DO₆₀₀). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

3.4.8.4. Le système *hmq* ne contrôle pas l'expression du gène *scmR*

Nous avons observé que *B. thailandensis* E264 produit des facteurs inconnus qui inhibent la transcription du gène *scmR* (cf. la **Figure 3.102** présentée à la section 3.4.4.5). Ces facteurs ne peuvent vraisemblablement pas être les AHL puisque nous avons démontré que l'expression du gène *scmR* est activée *via* la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL (cf. la **Figure 3.97A** présentée à la section 3.4.4.4). Afin de déterminer si ces facteurs peuvent être les HMAQ, des expériences de quantification de la transcription du gène *scmR* ont été effectuées chez la souche sauvage et chez les mutants *hmqA*-, *scmR*- et *hmqA-scmR*- de *B. thailandensis* E264 (**Tableau 3.29**).

Tableau 3.29. Souches utilisées pour étudier l'impact du système *hmq* sur la transcription du gène *scmR*.

Souches	Description	Référence
ED3515	E264:: <i>scmR-lux</i>	Cette étude
ED3516	E264 <i>hmqA</i> :: <i>scmR-lux</i>	Cette étude
ED3517	E264 <i>scmR</i> :: <i>scmR-lux</i>	Cette étude
ED3518	E264 <i>hmqA-scmR</i> :: <i>scmR-lux</i>	Cette étude

Ces expériences montrent que le système *hmq* n'affecte pas la transcription du gène *scmR* (**Fig. 3.107**), suggérant que les HMAQ ne contrôlent pas l'expression du gène *scmR*.

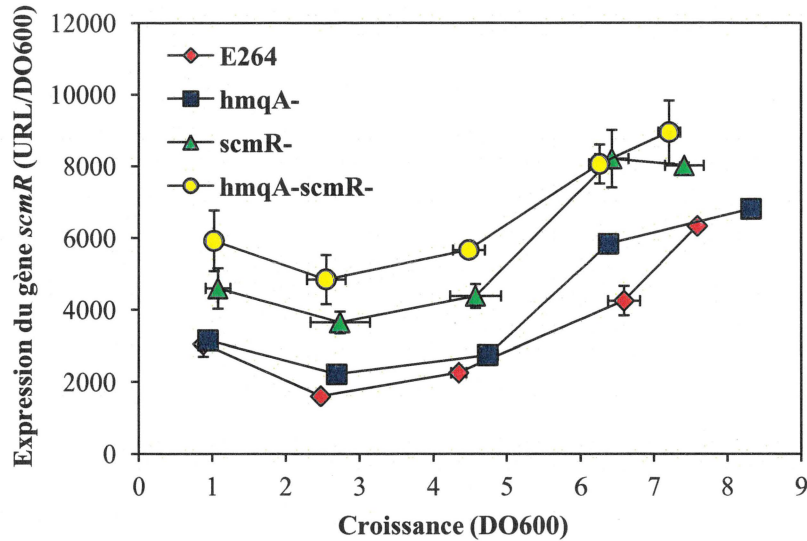


Figure 3.107. Le système *hmq* n'affecte pas la transcription du gène *scmR*.

Les activités luciférasales du rapporteur transcriptionnel *scmR-lux*, exprimées en unités relatives de lumière par la densité cellulaire (URL/DO₆₀₀), ont été mesurées chez la souche sauvage et chez les mutants *hmqA-*, *scmR-* et *hmqA-scmR-* de *B. thailandensis* E264 au cours de la croissance bactérienne. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois réplicats biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Toutefois, puisque les facteurs inconnus qui répriment la transcription du gène *scmR* sont synthétisés autant chez la souche sauvage que chez le mutant *scmR-* (cf. la **Figure 3.102** présentée à la section 3.4.4.5), nous nous attendions à ce que ces facteurs ne soient pas les HMAQ. En effet, l'absence du régulateur transcriptionnel ScmR entraîne une abolition de la production des HMAQ (cf. la **Figure 3.90** présentée à la section 3.4.4.2). Cela n'exclut pas, néanmoins, la possibilité que l'expression du gène *scmR* puisse être sous le contrôle du système *hmq*. D'autres expériences devront donc être effectuées pour identifier ces facteurs qui pourraient contribuer à la compréhension de la régulation de la transcription du gène *scmR*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif général de cette thèse était de caractériser les mécanismes de régulation des multiples systèmes de communication intercellulaire qui coexistent chez *B. thailandensis*.

Le premier objectif de cette thèse était d'approfondir les mécanismes de régulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* qui étaient jusqu'ici relativement peu connus, voire inconnus. Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans « mBio » présentée à la section 3.1. Ces travaux ont révélé la grande complexité des interactions entre les différents systèmes de *quorum sensing* chez *B. thailandensis*. Nous avons démontré que ces systèmes sont interdépendants, suggérant qu'ils coopèrent de façon dynamique et fonctionnent de manière concertée pour moduler finement l'expression des gènes sous le contrôle du *quorum sensing* via un réseau de régulation complexe.

Certains mécanismes moléculaires du *quorum sensing* semblent être conservés chez *B. thailandensis*, chez *B. pseudomallei* et chez *B. mallei* et pourraient donc provenir de leur ancêtre commun. À titre d'exemple, BtaI1, BpsI et BmaI1 synthétisent principalement de la C₈-HSL, BtaI2 et BpsI2 produisent majoritairement de la 3OHC₁₀-HSL et BtaI3, BpsI3 et BmaI3 synthétisent essentiellement de la 3OHC₈-HSL. Citons, également, l'activation de la transcription des gènes *btaI1*, *bpsI* et *bmaI1* via les complexes BtaR1/C₈-HSL, BpsR/C₈-HSL et BmaR1/C₈-HSL, respectivement, ou encore l'activation de la transcription des gènes *btaI2* et *bpsI2* via les complexes BtaR2/3OHC₁₀-HSL et BpsR2/3OHC₁₀-HSL, respectivement. En outre, nous avons confirmé que les systèmes BtaI1/BtaR1 et BtaI3/BtaR3, à l'instar des systèmes BpsI/BpsR et BpsI3/BpsR3 ainsi que des systèmes BmaI1/BmaR1 et BmaI3/BmaR3, sont interdépendants.

À l'inverse, d'autres mécanismes moléculaires du *quorum sensing* apparaissent être différents d'une bactérie à l'autre, et même au sein d'une même espèce bactérienne parmi les membres du groupe *Bptm* comme, par exemple, la régulation des gènes *btaR1* et *bpsR* dont l'expression est inhibée et activée par la C₈-HSL, respectivement. Par ailleurs, nous avons observé que l'absence de BtaR1 entraîne une surproduction de la C₈-HSL, tandis que l'absence de BpsR résulte en une abolition de la production de cette AHL. Notons, aussi, que les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 présentent divers modes d'auto-régulation. En effet, nous avons mis en évidence que BtaR3 stimule la transcription du gène *btaI3* en association avec la 3OHC₈-HSL et la 3OHC₁₀-HSL, révélant une auto-régulation

positive du système BtaI3/BtaR3. En revanche, l'expression du gène *bpsI3* est réprimée par BpsR3, indiquant une régulation négative du système BpsI3/BpsR3. De plus, il semblerait que BmaR3 n'interagisse pas avec la région promotrice du gène *bmaI3*, suggérant que le système BmaI3/BmaR3 n'est pas auto-régulé. Similairement, Malott *et al.* (2007) ont rapporté que le système CepI/CepR, chez *B. vietnamiensis* G4, n'est pas auto-régulé, contrairement aux gènes *cepIR* chez d'autres membres du complexe *Bcc*. Une autre explication pourrait être que *bmaI3* et *bmaR3* sont co-transcrits, à l'image des gènes *cciIR* qui codent le système de *quorum sensing* CciI/CciR chez *B. cenocepacia* K56-2 (Malott *et al.*, 2005).

Les différences entre les mécanismes d'auto-régulation des systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3, par exemple, suggèrent qu'elles ont été acquises au cours de l'évolution et pourraient être attribuées aux divergences dans les modes de vie de *B. thailandensis*, de *B. pseudomallei* et de *B. mallei*. En outre, elles pourraient refléter des variations dans leur fonctionnalité. En effet, Ulrich *et al.* (2004d) ont observé que le mutant *btaR3*- de *B. thailandensis* DW503 produit un pigment orange pâle, ce qui n'est le cas ni pour le mutant *bpsR3*- de *B. pseudomallei* DD503 ni pour le mutant *bmaR3*- de *B. mallei* ATCC 23344, supportant l'idée que les systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 sont fonctionnellement différents. Alors que les systèmes BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 sont requis pour la pathogénicité (Ulrich *et al.*, 2004b, Ulrich *et al.*, 2004c), et pourraient contrôler des facteurs de survie et/ou de virulence qui n'ont pas encore été caractérisés, l'implication du système BtaI3/BtaR3 dans la pathogénicité n'a pas été investiguée. Ainsi, il pourrait être intéressant d'identifier d'autres activités biologiques associées aux systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3. Considérant que la 3OHC₈-HSL n'est pas produite pendant la phase exponentielle chez *B. pseudomallei* KHW et chez *B. mallei* GB8 (Gamage *et al.*, 2011, Majerczyk *et al.*, 2013b), et est substantiellement synthétisée pendant la phase stationnaire chez *B. thailandensis* E264, nous supposons que les processus cellulaires sous le contrôle des systèmes BtaI3/BtaR3, BpsI3/BpsR3 et BmaI3/BmaR3 sont essentiellement liés à la phase stationnaire plutôt qu'à la phase exponentielle.

Outre la caractérisation fonctionnelle du système BtaI3/BtaR3, d'autres investigations pourraient être effectuées afin de préciser les interactions entre les systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 que nous avons mises en évidence. Nous suggérons, en particulier, de préciser les mécanismes de régulation de (i) la transcription des gènes *btaI1* et *btaR1* via le système BtaI3/BtaR3, de (ii) l'expression des gènes *btaI2* et *btaR2* via la C₈-HSL, de (iii) la biosynthèse de la 3OHC₁₀-HSL via les systèmes BtaI1/BtaR1 et BtaI3/BtaR3

ainsi que de (iv) la transcription du gène *btaI3* via la C₈-HSL, la 3OHC₁₀-HSL et la 3OHC₈-HSL.

Le deuxième objectif de cette thèse était de déterminer l'implication des protéines RsaM1 et RsaM2 dans la modulation des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 chez *B. thailandensis* dont le rôle n'avait encore jamais été investigué chez aucun des membres du groupe *Bptm*. Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans « Journal of Bacteriology » présentée à la section 3.2. Ces travaux ont révélé l'importance des protéines régulatrices de type RsaM dans la modulation de la biosynthèse de la C₈-HSL, de la 3OHC₁₀-HSL et de la 3OHC₈-HSL. Nous avons démontré que ces protéines constituent des éléments essentiels du *quorum sensing* chez *B. thailandensis* et jouent un rôle crucial dans l'organisation hiérarchique et homéostatique des systèmes BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3.

Plusieurs mécanismes d'action potentiels des protéines régulatrices de type RsaM ont été proposés, à savoir (i) la modulation de la transcription des gènes *luxI* et/ou *luxR*, (ii) la modulation de l'activité et/ou de la stabilité des synthases de type LuxI et (iii) la modulation de la fonctionnalité des régulateurs transcriptionnels de type LuxR (Inhülsen, 2011, Mattiuzzo *et al.*, 2011, Michalska *et al.*, 2014, Uzelac *et al.*, 2017). Ainsi, des investigations supplémentaires seront nécessaires pour élucider le rôle de RsaM1 et de RsaM2. Afin de déterminer si ces protéines régulent directement la transcription des gènes *btaI123* et/ou *btaR123* en interagissant avec la région promotrice de ces gènes, nous suggérons d'utiliser des systèmes d'expression hétérologue. D'autre part, des analyses RNA-Seq et/ou ChIP-Seq (*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*) permettraient d'identifier d'autres gènes cibles de RsaM1 et de RsaM2. Notons, également, que l'utilisation de systèmes double-hybride pourrait être envisagée dans le but de déterminer si RsaM1 et RsaM2 peuvent établir des interactions protéine-protéine comme, par exemple, avec les synthases BtaI1, BtaI2 et BtaI3 et/ou avec les régulateurs transcriptionnels BtaR1, BtaR2 et BtaR3.

Le troisième objectif de cette thèse était d'identifier les acteurs moléculaires de la régulation de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* et de la biosynthèse des HMAQ ainsi que de caractériser fonctionnellement le système *hmq* chez *B. thailandensis*. Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude sont présentés à la section 3.3. Les deux découvertes majeures de ces travaux sont (i) l'implication des HMAQ dans les interactions inter-espèces, démontrant qu'elles constituent effectivement des molécules de signalisation et (ii) le rôle du

système *hmq* dans la pathogénicité, suggérant que les HMAQ pourraient être des facteurs de virulence. Par ailleurs, ces travaux suggèrent que HmqE représente un élément régulateur important du système *hmq*. En conséquence, les prochaines études devraient se focaliser sur le rôle des HMAQ. À titre d'exemple, des études phénotypiques, de même que des tests de virulence pourraient être réalisés en utilisant des molécules purifiées. Il apparaît également comme essentiel d'étudier la fonction de HmqE afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du système *hmq*. Une analyse comparative des transcriptomes de la souche sauvage et d'un mutant non polaire *hmqE*- serait une première approche pour aborder le rôle de HmqE chez les *Burkholderia* spp. Notons, toutefois, que les HMAQ semblent influencer l'activité de HmqE et que HmqE pourrait intervenir dans la production des HMAQ si bien que des méthodes alternatives pourraient être envisagées afin de distinguer les effets provoqués spécifiquement par les HMAQ et ceux relatifs à la protéine HmqE.

Le quatrième objectif de cette thèse était de préciser la fonction du régulateur transcriptionnel ScmR chez *B. thailandensis*. Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude sont présentés à la section 3.4. Ces travaux ont confirmé l'importance de ScmR dans le réseau de régulation du *quorum sensing*. En outre, nous avons identifié de nouvelles cibles de ScmR, en particulier, une fonction physiologique essentielle, à savoir l'homéostasie du pH. Toutefois, de nombreuses zones d'ombre restent à éclaircir notamment en ce qui concerne le mode d'action de ScmR. Des analyses ChIP-Seq permettraient de distinguer les cibles directement régulées *via* ScmR, de celles régulées indirectement. De plus, l'identification de(s) ligand(s) potentiel(s) de ScmR semble être indispensable pour mieux comprendre son fonctionnement. Compte tenu que nous pensons que ScmR agit indirectement sur la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* et, donc, sur la biosynthèse des HMAQ, il pourrait également être intéressant de déterminer l'impact des régulateurs transcriptionnels identifiés comme étant des cibles de ScmR sur la production des HMAQ. En effet, le régulateur direct de l'opéron *hmqABCDEFG* pourrait figurer parmi ces régulateurs transcriptionnels.

In fine, l'ensemble de ces travaux fournit une illustration détaillée du réseau de régulation du *quorum sensing* chez *B. thailandensis*, figurant parmi les systèmes de communication intercellulaire les plus complexes que l'on peut retrouver chez les bactéries. Ces travaux contribueront à une meilleure appréciation des mécanismes moléculaires du *quorum sensing* qui peuvent intervenir dans le contrôle de l'expression des gènes, en particulier, ceux en liaison avec la virulence bactérienne ou encore ceux nécessaires à

l'adaptation aux variations des conditions environnementales auxquelles les bactéries peuvent être confrontées.

ANNEXES

L'ensemble des gènes dont l'expression est contrôlée *via* le régulateur transcriptionnel ScmR ainsi que l'ensemble des gènes dont l'expression est sous le contrôle des systèmes de *quorum sensing* BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et/ou BtaI3/BtaR3 sont regroupés dans le tableau présenté ici.

Locus tag ^a	Gene	Operon ^b	Description	Fold-change	
				<i>scmR</i> -/Wild-type ^c	Δ <i>btaI1</i> Δ <i>btaI2</i> Δ <i>btaI3</i> /Wild-type ^d
BTH_I0020			hypothetical protein	10,4	7,4
BTH_I0021			MarR family transcriptional regulator	8,2	4,6
BTH_I0024		BTH_I0024-BTH_I0025	LrgA family protein	5,2	7,1
BTH_I0026	<i>fliL</i>	BTH_I0026-BTH_I0031	flagellar basal body-associated protein FliL		14,0
BTH_I0027	<i>fliM</i>	BTH_I0026-BTH_I0031	flagellar motor switch protein FliM		13,8
BTH_I0028	<i>fliN</i>	BTH_I0026-BTH_I0031	flagellar motor switch protein FliN		9,4
BTH_I0029	<i>fliO</i>	BTH_I0026-BTH_I0031	flagellar biosynthesis protein		10,3
BTH_I0030	<i>fliP</i>	BTH_I0026-BTH_I0031	flagellar biosynthesis protein FliP		10,4
BTH_I0031	<i>fliQ</i>	BTH_I0026-BTH_I0031	flagellar biosynthesis protein FliQ		9,1
BTH_I0032	<i>fliR</i>		flagellar biosynthetic protein FliR		5,1
BTH_I0036		BTH_I0035-BTH_I0037	ABC transporter ATP-binding protein	-3,0	
BTH_I0037		BTH_I0035-BTH_I0037	ABC transporter permease	-5,3	-3,7
BTH_I0041		BTH_I0041-BTH_I0042	type III DNA modification methyltransferase	3,7	3,8
BTH_I0042		BTH_I0041-BTH_I0042	type III restriction-modification system, res subunit	3,2	
BTH_I0049		BTH_I0045-BTH_I0049	branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein		-3,1
BTH_I0060			acyl-CoA dehydrogenase	-3,9	-4,0
BTH_I0071	<i>ecfB</i>	BTH_I0070-BTH_I0071	ECF subfamily RNA polymerase sigma factor		-3,2
BTH_I0072		BTH_I0072-BTH_I0073	catalase		-4,0
BTH_I0077			hypothetical protein	-3,2	-3,5
BTH_I0078			hypothetical protein	-3,9	-3,8
BTH_I0079			lipoprotein	-3,5	
BTH_I0081	<i>speG</i>		spermidine n(1)-acetyltransferase	-8,1	-3,3

BTH_I0082		BTH_I0082-BTH_I0083	hypothetical protein	-174,0	-184,7
BTH_I0083		BTH_I0082-BTH_I0083	YaeQ family protein	-7,0	-3,4
BTH_I0089			hypothetical protein	-7,6	
BTH_I0090			hypothetical protein	-32,7	
BTH_I0092			Fels-2 prophage protein	-3,4	
BTH_I0099			hypothetical protein	-3,4	-3,4
BTH_I0138		BTH_I0137-BTH_I0139	hypothetical protein	3,6	4,0
BTH_I0139		BTH_I0137-BTH_I0139	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase		3,7
BTH_I0143	<i>mrda</i>	BTH_I0142-BTH_I0143	penicillin-binding protein 2	3,8	4,7
BTH_I0144	<i>mreD</i>	BTH_I0144-BTH_I0145	rod shape-determining protein MreD		3,9
BTH_I0145	<i>mreC</i>	BTH_I0144-BTH_I0145	rod shape-determining protein MreC		4,1
BTH_I0146	<i>mreB</i>		rod shape-determining protein MreB	3,4	4,2
BTH_I0147	<i>gatC</i>		aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit C		3,9
BTH_I0179			hypothetical protein	-16,8	-20,3
BTH_I0185		BTH_I0185-BTH_I0186	5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase	-51,0	-31,6
BTH_I0186		BTH_I0185-BTH_I0186	aldehyde dehydrogenase family protein major facilitator superfamily transporter phthalate permease	-61,7	-58,8
BTH_I0187	<i>gudP</i>	BTH_I0187-BTH_I0191	permease	-11,1	-9,6
BTH_I0188		BTH_I0187-BTH_I0191	hypothetical protein	-18,0	-19,2
BTH_I0189	<i>gudD</i>	BTH_I0187-BTH_I0191	glucarate dehydratase	-15,1	-13,7
BTH_I0190	<i>garD</i>	BTH_I0187-BTH_I0191	D-galactarate dehydratase	-10,7	-10,4
BTH_I0191		BTH_I0187-BTH_I0191	hypothetical protein	-12,3	-9,1
BTH_I0192	<i>calB</i>	BTH_I0192-BTH_I0193	coniferyl aldehyde dehydrogenase	-5,6	-3,7
BTH_I0193	<i>aidB</i>	BTH_I0192-BTH_I0193	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	-3,1	-3,0
BTH_I0195	<i>fliK</i>	BTH_I0195-BTH_I0200	flagellar hook-length control protein		8,6
BTH_I0196	<i>fliJ</i>	BTH_I0195-BTH_I0200	flagellar FliJ protein		9,9
BTH_I0197	<i>fliI</i>	BTH_I0195-BTH_I0200	flagellum-specific ATP synthase FliI		9,5
BTH_I0198	<i>fliH</i>	BTH_I0195-BTH_I0200	flagellar assembly protein H		8,6
BTH_I0199	<i>fliG</i>	BTH_I0195-BTH_I0200	flagellar motor switch protein G		8,1
BTH_I0200	<i>fliF</i>	BTH_I0195-BTH_I0200	flagellar MS-ring protein	3,4	15,7
BTH_I0201	<i>fliE</i>		flagellar hook-basal body complex protein		6,6
BTH_I0202	<i>fliS</i>	BTH_I0202-BTH_I0203	flagellar protein FliS		3,6
BTH_I0203		BTH_I0202-BTH_I0203	hypothetical protein		3,5

BTH_I0204		BTH_I0204-BTH_I0205	hypothetical protein		4,9
BTH_I0205	<i>flhB</i>	BTH_I0204-BTH_I0205	flagellar biosynthetic protein FlhB domain-containing protein		3,5
BTH_I0206			PepSY-associated TM helix family protein	3,6	4,3
BTH_I0208		BTH_I0207-BTH_I0208	amino acid permease	5,5	7,5
BTH_I0211	<i>fpr</i>		ferredoxin--NADP reductase		4,1
BTH_I0216		BTH_I0216-BTH_I0218	ATP-dependent protease domain-containing protein	-3,4	
BTH_I0237	<i>flgN</i>	BTH_I0237-BTH_I0238	flagella synthesis protein FlgN		3,2
BTH_I0238	<i>flgM</i>	BTH_I0237-BTH_I0238	negative regulator of flagellin synthesis FlgM		3,5
BTH_I0239	<i>flgA</i>		flagellar basal body P-ring biosynthesis protein FlgA		11,9
BTH_I0240	<i>flgB</i>		flagellar basal body rod protein FlgB		13,4
BTH_I0241	<i>flgC</i>		flagellar basal body rod protein FlgC		7,7
BTH_I0242	<i>flgD</i>	BTH_I0242-BTH_I0246	flagellar basal body rod modification protein		9,0
BTH_I0243	<i>flgE</i>	BTH_I0242-BTH_I0246	flagellar hook protein FlgE		7,1
BTH_I0244	<i>flgF</i>	BTH_I0242-BTH_I0246	flagellar basal body rod protein FlgF		10,0
BTH_I0245	<i>flgG</i>	BTH_I0242-BTH_I0246	flagellar basal body rod protein FlgG		8,6
BTH_I0246	<i>flgH</i>	BTH_I0242-BTH_I0246	flagellar basal body L-ring protein		9,5
BTH_I0247	<i>flgI</i>	BTH_I0247-BTH_I0248	flagellar basal body P-ring protein		13,5
BTH_I0248	<i>flgJ</i>	BTH_I0247-BTH_I0248	flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ		6,0
BTH_I0250	<i>flgK</i>	BTH_I0250-BTH_I0252	flagellar hook-associated protein FlgK		4,1
BTH_I0252		BTH_I0250-BTH_I0252	xanthine/uracil permease family protein	3,7	4,4
BTH_I0260			porin		-4,9
BTH_I0261		BTH_I0261-BTH_I0262	hypothetical protein	-39,6	-58,4
BTH_I0262		BTH_I0261-BTH_I0262	lipoprotein	-14,9	-11,3
BTH_I0263		BTH_I0263-BTH_I0264	hypothetical protein	-5,4	-4,3
BTH_I0264		BTH_I0263-BTH_I0264	group 2 family glycosyl transferase	-4,1	-4,3
BTH_I0271			hypothetical protein	-3,5	-4,0
BTH_I0283			copper-translocating P-type ATPase	-6,2	
BTH_I0284		BTH_I0284-BTH_I0286	LemA family protein	-19,2	
BTH_I0285		BTH_I0284-BTH_I0286	lipoprotein	-13,6	
BTH_I0286		BTH_I0284-BTH_I0286	hypothetical protein	-27,1	
BTH_I0287			streptavidin	-17,0	-4,8
BTH_I0291		BTH_I0290-BTH_I0292	dihydroneopterin aldolase		3,2

BTH_I0292		BTH_I0290-BTH_I0292	hypothetical protein	3,2	3,7
BTH_I0298		BTH_I0298-BTH_I0300	fructokinase		21,5
BTH_I0299		BTH_I0298-BTH_I0300	<i>N</i> -acylglucosamine 2-epimerase family protein		36,7
BTH_I0300		BTH_I0298-BTH_I0300	LacI family transcription regulator		9,7
BTH_I0302			sodium/bile acid symporter family protein	-4,5	-3,1
BTH_I0326		BTH_I0326-BTH_I0327	serine-type carboxypeptidase family protein		-4,7
BTH_I0328			2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase		-4,7
BTH_I0330			EAL domain-containing protein	-4,5	-7,7
BTH_I0341			hypothetical protein	-3,7	
BTH_I0359			hypothetical protein	-3,2	
BTH_I0384			hypothetical protein		-3,9
BTH_I0394		BTH_I0393-BTH_I0396	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein		-3,3
BTH_I0395		BTH_I0393-BTH_I0396	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein		-4,9
BTH_I0396		BTH_I0393-BTH_I0396	CAIB/BAIF family protein		-5,7
BTH_I0397		BTH_I0397-BTH_I0398	hypothetical protein		-12,3
BTH_I0398	<i>actP</i>	BTH_I0397-BTH_I0398	acetate permease		-7,0
BTH_I0412	<i>ptsH</i>	BTH_I0411-BTH_I0412	phosphocarrier protein HPr NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase		4,3
BTH_I0420	<i>gpsA</i>	BTH_I0419-BTH_I0420	cytochrome c oxidase subunit II	3,1	3,5
BTH_I0426		BTH_I0425-BTH_I0427	hypothetical protein		3,5
BTH_I0432		BTH_I0432-BTH_I0436	methyl-accepting chemotaxis protein	4,0	6,8
BTH_I0438			D-methionine ABC transporter periplasmic D- methionine-binding protein	8,4	10,0
BTH_I0439			PTS system, glucose-specific EIIA/HPr/phosphoenolpyruvate-protein		
BTH_I0449		BTH_I0447-BTH_I0449	phosphotransferase components PTS system N-acetylglucosamine-specific transporter subunit IIABC	-3,6	-3,1
BTH_I0450				-6,5	-5,6
BTH_I0452	<i>ygbT</i>	BTH_I0452-BTH_I0455	cyd operon protein YbgT		17,2
BTH_I0453	<i>cydB</i>	BTH_I0452-BTH_I0455	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II		13,3
BTH_I0454	<i>cydA</i>	BTH_I0452-BTH_I0455	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I		11,4
BTH_I0455		BTH_I0452-BTH_I0455	hypothetical protein		11,4
BTH_I0467		BTH_I0467-BTH_I0470	hypothetical protein		3,4

BTH_I0472	<i>pth</i>	BTH_I0471-BTH_I0472	peptidyl-tRNA hydrolase	6,9	4,9
BTH_I0473			50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc	8,2	6,5
BTH_I0474	<i>prs</i>	BTH_I0474-BTH_I0478	ribose-phosphate pyrophosphokinase	5,4	8,2
BTH_I0475		BTH_I0474-BTH_I0478	tRNA-Gln	3,3	
BTH_I0476	<i>ipk</i>	BTH_I0474-BTH_I0478	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	3,6	4,2
BTH_I0485	<i>yfiA</i>		ribosomal subunit interface protein	-5,0	
BTH_I0486	<i>rpoN</i>		RNA polymerase factor sigma-54	-3,2	
BTH_I0498	<i>uvrA</i>		excinuclease ABC, subunit A	3,6	4,0
BTH_I0499			major facilitator family transporter		3,1
BTH_I0500	<i>ssb</i>		single-stranded DNA-binding protein		3,9
BTH_I0503			hypothetical protein	-4,9	-7,4
BTH_I0508		BTH_I0506-BTH_I0508	hypothetical protein	-3,0	-3,2
BTH_I0509		BTH_I0509-BTH_I0510	hypothetical protein	-11,5	-12,0
BTH_I0510		BTH_I0509-BTH_I0510	hypothetical protein	-14,5	-11,2
BTH_I0511			hypothetical protein	-22,4	-37,2
BTH_I0512			hypothetical protein	-12,6	-13,7
BTH_I0513		BTH_I0513-BTH_I0517	FHA domain-containing protein	-10,2	-7,5
BTH_I0514		BTH_I0513-BTH_I0517	protein kinase domain-containing protein	-14,7	-12,1
BTH_I0515		BTH_I0513-BTH_I0517	hypothetical protein	-34,4	-35,0
BTH_I0516		BTH_I0513-BTH_I0517	hypothetical protein	-28,1	-30,9
BTH_I0517		BTH_I0513-BTH_I0517	hypothetical protein	-13,3	-10,6
BTH_I0518			aldolase II superfamily protein	-9,8	-10,6
BTH_I0520		BTH_I0520-BTH_I0523	polysaccharide biosynthesis family protein		-6,3
BTH_I0521		BTH_I0520-BTH_I0523	group 1 family glycosyl transferase mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6- phosphate isomerase		-5,1
BTH_I0522	<i>manC</i>	BTH_I0520-BTH_I0523	ElaA family protein		-14,6
BTH_I0523		BTH_I0520-BTH_I0523	group 1 family glycosyl transferase		-11,6
BTH_I0524		BTH_I0524-BTH_I0525	PAP2 family protein		-20,2
BTH_I0525		BTH_I0524-BTH_I0525	sigma-54 dependent transcriptional regulator		-11,9
BTH_I0526			hypothetical protein		-7,7
BTH_I0527		BTH_I0527-BTH_I0532	hypothetical protein		-14,5
BTH_I0528		BTH_I0527-BTH_I0532	beta-mannosidase-like protein		-19,0
BTH_I0529		BTH_I0527-BTH_I0532	hypothetical protein	-3,4	-33,1

BTH_I0530		BTH_I0527-BTH_I0532	hypothetical protein	-3,2	-41,0
BTH_I0531		BTH_I0527-BTH_I0532	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	-3,3	-50,3
BTH_I0532		BTH_I0527-BTH_I0532	acyl carrier protein	-3,7	-71,4
BTH_I0533			cyclic nucleotide-binding domain-containing protein	-7,1	-107,7
BTH_I0534		BTH_I0534-BTH_I0536	hypothetical protein		-15,3
BTH_I0535		BTH_I0534-BTH_I0536	polysaccharide biosynthesis glycosyltransferase		-7,4
BTH_I0537			group 1 family glycosyl transferase		-8,6
BTH_I0538		BTH_I0538-BTH_I0539	CHRD domain-containing superfamily	-3,3	
BTH_I0541		BTH_I0541-BTH_I0542	EmrB/QacA family drug resistance transporter	4,4	4,3
BTH_I0543			PfpI family intracellular peptidase	-3,3	-3,3
BTH_I0558			hypothetical protein		3,5
BTH_I0559		BTH_I0559-BTH_I0560	hypothetical protein		3,3
BTH_I0567		BTH_I0567-BTH_I0568	enoyl-CoA hydratase	-3,2	-4,3
BTH_I0581		BTH_I0581-BTH_I0585	hypothetical protein		3,2
BTH_I0582		BTH_I0581-BTH_I0585	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase		3,3
BTH_I0583		BTH_I0581-BTH_I0585	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase		3,4
BTH_I0585	<i>glyQ</i>	BTH_I0581-BTH_I0585	glycyl-tRNA synthetase subunit alpha	3,7	4,4
BTH_I0590		BTH_I0590-BTH_I0591	PhoH family protein	3,6	4,7
BTH_I0591	<i>miaB</i>	BTH_I0590-BTH_I0591	(dimethylallyl)adenosine tRNA methylthiotransferase	4,4	5,4
BTH_I0600	<i>glpD</i>	BTH_I0599-BTH_I0600	glycerol-3-phosphate dehydrogenase		3,2
BTH_I0601			hypothetical protein	-5,3	-4,5
BTH_I0602			hypothetical protein	-7,4	
BTH_I0604	<i>ggtI</i>		gamma-glutamyltransferase	-4,9	-4,4
BTH_I0605		BTH_I0605-BTH_I0606	hypothetical protein	-3,2	
BTH_I0607	<i>rhlE1</i>		ATP-dependent RNA helicase RhlE	4,0	3,9
BTH_I0608		BTH_I0608-BTH_I0609	cytochrome c family protein	3,4	3,5
BTH_I0609		BTH_I0608-BTH_I0609	cytochrome c4		4,0
BTH_I0612			hypothetical protein		-4,3
BTH_I0614		BTH_I0614-BTH_I0615	sensor histidine kinase	-5,5	-3,4
BTH_I0615		BTH_I0614-BTH_I0615	response regulator	-8,3	-4,5
BTH_I0617			hypothetical protein	-21,4	-25,9
BTH_I0618			methyl-accepting chemotaxis protein	-5,2	
BTH_I0619			cholesterol oxidase	-20,4	-13,6

BTH_I0621	BTH_I0621-BTH_I0622	ABC transporter ATP-binding protein	-7,8	
BTH_I0622	BTH_I0621-BTH_I0622	ABC transporter permease	-4,9	
BTH_I0623	BTH_I0623-BTH_I0625	erythromycin esterase family protein	-5,1	
BTH_I0624	BTH_I0623-BTH_I0625	hypothetical protein	-9,7	-3,1
BTH_I0625	BTH_I0623-BTH_I0625	nicotinate phosphoribosyltransferase	-7,3	
BTH_I0626		phosphoribosyl transferase domain-containing protein	-5,4	
BTH_I0627		hypothetical protein		-3,7
BTH_I0639		tRNA-Met	4,3	
BTH_I0640		major facilitator family transporter	-3,7	-3,1
BTH_I0645		hypothetical protein		3,4
BTH_I0646	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase subunit beta	3,4	3,8
BTH_I0647	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase subunit alpha		3,2
BTH_I0648		TerC family integral membrane protein		3,2
BTH_I0650		O-antigen polymerase family protein		3,1
BTH_I0675	<i>htrA</i>	serine protease		-3,9
BTH_I0676		hypothetical protein	-3,2	-9,0
BTH_I0677	BTH_I0677-BTH_I0678	hypothetical protein		-3,0
BTH_I0678	BTH_I0677-BTH_I0678	hypothetical protein		-3,4
BTH_I0679	<i>bpeR</i>	TetR family transcriptional regulator	4,0	
BTH_I0680	<i>bpeA</i>	RND family efflux transporter MFP subunit	4,4	
BTH_I0681	<i>bpeB</i>	hydrophobe/amphiphile efflux family protein	3,8	
BTH_I0693	<i>scrK</i>	carbohydrate kinase		-3,4
BTH_I0695	BTH_I0693-BTH_I0699	mannitol ABC transporter periplasmic mannitol-binding protein	-4,2	-6,1
BTH_I0696	BTH_I0693-BTH_I0699	mannitol ABC transporter permease		-3,8
BTH_I0697	BTH_I0693-BTH_I0699	mannitol ABC transporter permease		-3,7
BTH_I0698	BTH_I0693-BTH_I0699	HAD-superfamily hydrolase		-3,5
BTH_I0699	BTH_I0693-BTH_I0699	maltose/mannitol ABC transporter ATP-binding protein		-3,9
BTH_I0703	<i>dalD</i>	mannitol dehydrogenase family protein	-3,9	
BTH_I0705	<i>mdlC</i>	benzoylformate decarboxylase	-3,4	
BTH_I0706	BTH_I0705-BTH_I0707	aldehyde dehydrogenase family protein	-4,2	-3,2
BTH_I0707	<i>panE1</i>	2-dehydropanoate 2-reductase	-4,8	-3,4
BTH_I0708		4-hydroxybenzoate transporter		-3,5

BTH_I0716			cyclopropane fatty acid synthase family protein	-5,4	-8,1
BTH_I0731	<i>murB</i>		UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	3,2	4,1
BTH_I0733			hypothetical protein	3,6	4,0
BTH_I0735	<i>rpsT</i>		30S ribosomal protein S20	7,0	11,0
BTH_I0736	<i>mviN</i>		integral membrane protein MviN		3,5
BTH_I0738			3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase		-3,3
BTH_I0769	<i>lspA</i>	BTH_I0767-BTH_I0770	lipoprotein signal peptidase	3,5	
BTH_I0770	<i>ileS</i>	BTH_I0767-BTH_I0770	isoleucyl-tRNA synthetase	3,5	3,8
BTH_I0771	<i>ribF</i>		bifunctional riboflavin kinase/FMN adenylyltransferase	3,6	4,6
BTH_I0779	<i>rpmG</i>	BTH_I0779-BTH_I0780	50S ribosomal protein L33	9,1	14,1
BTH_I0780	<i>rpmB</i>	BTH_I0779-BTH_I0780	50S ribosomal protein L28	8,3	12,5
BTH_I0789			hypothetical protein	-3,0	-3,5
BTH_I0815		BTH_I0814-BTH_I0816	hypothetical protein	6,2	
BTH_I0816	<i>cysH</i>	BTH_I0814-BTH_I0816	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	6,1	
BTH_I0820	<i>cbiX</i>	BTH_I0820-BTH_I0822	CbiX	3,1	3,3
BTH_I0821		BTH_I0820-BTH_I0822	hypothetical protein	3,7	4,0
BTH_I0822		BTH_I0820-BTH_I0822	permease	3,4	4,3
BTH_I0833		BTH_I0832-BTH_I0833	hypothetical protein		3,1
BTH_I0854		BTH_I0854-BTH_I0855	hypothetical protein		-4,3
BTH_I0865		BTH_I0865-BTH_I0867	fimbrial usher protein	-6,2	-9,2
BTH_I0866		BTH_I0865-BTH_I0867	hypothetical protein	-12,0	-38,5
BTH_I0867		BTH_I0865-BTH_I0867	spore coat protein U domain-contain protein	-6,3	-12,0
BTH_I0868			lipoprotein	-3,4	-11,3
BTH_I0869			transcriptional regulator	-3,3	-7,4
BTH_I0870			UbiE/COQ5 family methyltransferase		-4,1
BTH_I0875		BTH_I0875-BTH_I0877	major facilitator family transporter		-3,5
BTH_I0876	<i>fabG</i>	BTH_I0875-BTH_I0877	3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	-3,3	-4,1
BTH_I0884			porin	-3,2	
BTH_I0888	<i>hisM</i>	BTH_I0887-BTH_I0889	amino acid ABC transporter permease	3,6	4,7
BTH_I0889	<i>hisQ</i>	BTH_I0887-BTH_I0889	amino acid ABC transporter permease	3,4	4,7
BTH_I0890	<i>hisJ</i>		amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	4,3	7,2
BTH_I0900	<i>otsA</i>	BTH_I0900-BTH_I0901	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase	-5,0	-7,6

BTH_I0901		BTH_I0900-BTH_I0901	hypothetical protein	-3,6	-6,5
BTH_I0906			lipoprotein	-3,7	-3,8
BTH_I0931		BTH_I0930-BTH_I0931	hypothetical protein		-3,1
BTH_I0932		BTH_I0932-BTH_I0934	cell wall surface anchor family protein	-3,4	-4,8
BTH_I0933		BTH_I0932-BTH_I0934	C39 family peptidase	-4,9	-4,5
BTH_I0934		BTH_I0932-BTH_I0934	hypothetical protein	-6,4	-5,1
BTH_I0935		BTH_I0935-BTH_I0936	hypothetical protein	-3,3	
BTH_I0946	<i>aphA</i>		acetylpolymine aminohydrolase	-4,5	-4,3
BTH_I0947			chromate transport protein	-7,0	-4,8
BTH_I0957		BTH_I0955-BTH_I0958	hypothetical protein		3,3
BTH_I0958		BTH_I0955-BTH_I0958	hypothetical protein		3,9
BTH_I0959		BTH_I0959-BTH_I0960	hypothetical protein	-15,1	-6,2
BTH_I0960		BTH_I0959-BTH_I0960	sodium:solute symporter family protein	-7,3	-7,0
BTH_I0961			glyoxalase family protein		-5,6
BTH_I0974			glycosyl hydrolase family protein	-3,4	-3,4
BTH_I0981	<i>rhlE2</i>		ATP-dependent RNA helicase RhlE	3,8	4,5
BTH_I0988	<i>waaL</i>	BTH_I0987-BTH_I0990	lipoprotein		4,1
BTH_I0989	<i>wabQ</i>	BTH_I0987-BTH_I0990	group 1 family glycosyl transferase		4,5
BTH_I0992			hypothetical protein	-6,3	-8,3
BTH_I1002			hypothetical protein	-3,4	-4,2
BTH_I1003			hypothetical protein	-4,1	-6,5
BTH_I1005			phospholipase C accessory protein	-7,5	-7,4
BTH_I1007			xanthine/uracil permease family protein subfamily		3,2
BTH_I1019	<i>gor</i>		quinone oxidoreductase		-3,2
BTH_I1020	<i>kdpF</i>	BTH_I1020-BTH_I1023	potassium-transporting ATPase, KdpF subunit-like protein		-26,1
BTH_I1021	<i>kdpA</i>	BTH_I1020-BTH_I1023	potassium-transporting ATPase subunit A	-3,7	-20,7
BTH_I1022	<i>kdpB</i>	BTH_I1020-BTH_I1023	potassium-transporting ATPase subunit B	-4,2	-15,9
BTH_I1023	<i>kdpC</i>	BTH_I1020-BTH_I1023	potassium-transporting ATPase subunit C	-4,8	-23,9
BTH_I1025	<i>kdpE</i>	BTH_I1024-BTH_I1025	DNA-binding response regulator KdpE	-3,4	-3,3
BTH_I1034			hypothetical protein	3,0	3,2
BTH_I1047	<i>ilvC</i>	BTH_I1046-BTH_I1047	ketol-acid reductoisomerase	3,1	3,2
BTH_I1051		BTH_I1051-BTH_I1052	sulfate transporter	4,0	

BTH_I1054		BTH_I1054-BTH_I1055	amino acid-binding protein	3,1	
BTH_I1055	<i>rpsO</i>	BTH_I1054-BTH_I1055	30S ribosomal protein S15	6,7	8,7
BTH_I1056	<i>pnp</i>		polynucleotide phosphorylase/polyadenylase	5,2	4,3
BTH_I1058	<i>tpiA</i>	BTH_I1057-BTH_I1058	triosephosphate isomerase	5,0	5,5
BTH_I1059	<i>secG</i>		preprotein translocase subunit SecG	4,8	5,0
BTH_I1060			tRNA-Leu	3,4	
BTH_I1061	<i>nuoA</i>	BTH_I1061-BTH_I1064	NADH dehydrogenase subunit A	4,4	5,3
BTH_I1062	<i>nuoB</i>	BTH_I1061-BTH_I1064	NADH dehydrogenase subunit B	4,3	4,5
BTH_I1063	<i>nuoC</i>	BTH_I1061-BTH_I1064	NADH dehydrogenase subunit C	4,2	3,8
BTH_I1064	<i>nuoD</i>	BTH_I1061-BTH_I1064	NADH dehydrogenase subunit D	3,8	3,2
BTH_I1065	<i>nuoE</i>	BTH_I1065-BTH_I1076	NADH dehydrogenase subunit E	3,9	
BTH_I1066	<i>nuoF</i>	BTH_I1065-BTH_I1076	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	4,0	
BTH_I1067	<i>nuoG</i>	BTH_I1065-BTH_I1076	NADH dehydrogenase subunit G	4,1	3,2
BTH_I1068	<i>nuoH</i>	BTH_I1065-BTH_I1076	NADH dehydrogenase subunit H	4,0	3,1
BTH_I1069	<i>nuoI</i>	BTH_I1065-BTH_I1076	NADH dehydrogenase subunit I	3,3	
BTH_I1070	<i>nuoJ</i>	BTH_I1065-BTH_I1076	NADH dehydrogenase subunit J	3,4	
BTH_I1072	<i>nuoL</i>	BTH_I1065-BTH_I1076	NADH dehydrogenase subunit L	3,3	
BTH_I1083		BTH_I1083-BTH_I1086	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	-3,2	-3,7
BTH_I1084		BTH_I1083-BTH_I1086	phosphotransferase family protein	-3,1	-3,3
BTH_I1085		BTH_I1083-BTH_I1086	phosphoglycerate mutase		-3,3
BTH_I1087			glutathione S-transferase domain-containing protein		-3,0
BTH_I1097		BTH_I1096-BTH_I1098	tRNA-Ile	7,0	7,1
BTH_I1098		BTH_I1096-BTH_I1098	tRNA-Ala	6,8	6,8
BTH_I1101		BTH_I1101-BTH_I1102	hypothetical protein	-3,4	-3,3
BTH_I1104			TnpC protein	-3,7	-3,6
BTH_I1125	<i>lpxC</i>		UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase		3,5
BTH_I1140	<i>rplU</i>	BTH_I1140-BTH_I1141	50S ribosomal protein L21	7,8	9,7
BTH_I1141	<i>rpmA</i>	BTH_I1140-BTH_I1141	50S ribosomal protein L27	6,1	7,2
BTH_I1153	<i>nrdA</i>		ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	3,2	4,6
BTH_I1173		BTH_I1173-BTH_I1174	serine-type carboxypeptidase family protein		-4,1
BTH_I1175		BTH_I1175-BTH_I1178	IclR family transcriptional regulator	-15,3	-8,4
BTH_I1176	<i>dgok</i>	BTH_I1175-BTH_I1178	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	-16,0	-11,2

BTH_I1177		BTH_I1175-BTH_I1178	2-dehydro-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase	-18,4	-11,8
BTH_I1178		BTH_I1175-BTH_I1178	short chain dehydrogenase	-15,6	-11,6
BTH_I1179	<i>araF</i>		L-arabinose ABC transporter periplasmic L-arabinose-binding protein	-16,6	-20,2
BTH_I1180	<i>araG</i>		L-arabinose transporter ATP-binding protein	-10,3	-17,1
BTH_I1181	<i>araH</i>	BTH_I1181-BTH_I1183	L-arabinose transporter permease	-6,9	-11,8
			short chain dehydrogenase/reductase family		
BTH_I1182		BTH_I1181-BTH_I1183	oxidoreductase	-7,2	-12,4
BTH_I1183		BTH_I1181-BTH_I1183	aldose 1-epimerase	-4,6	-6,4
BTH_I1203	<i>dctA</i>		C4-dicarboxylate transporter DctA	-4,8	-3,6
BTH_I1204		BTH_I1204-BTH_I1205	allantoicase	-5,1	-4,7
BTH_I1211	<i>leuS</i>		leucyl-tRNA synthetase		3,1
BTH_I1212			lipoprotein		3,0
BTH_I1213	<i>holA</i>		DNA polymerase III subunit delta		3,8
BTH_I1216			RpiR family transcriptional regulator	4,3	8,6
BTH_I1217	<i>edd</i>	BTH_I1217-BTH_I1218	phosphogluconate dehydratase	10,2	16,5
			4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase/2-deydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase	11,0	10,3
BTH_I1218	<i>eda</i>	BTH_I1217-BTH_I1218			
BTH_I1219		BTH_I1219-BTH_I1220	gluconate permease	4,9	7,9
BTH_I1220		BTH_I1219-BTH_I1220	thermoresistant gluconokinase		4,5
BTH_I1221	<i>purB</i>	BTH_I1221-BTH_I1222	adenylosuccinate lyase		3,9
BTH_I1224	<i>gdhA</i>		glutamate dehydrogenase	-5,8	-4,4
BTH_I1233	<i>rplM</i>	BTH_I1233-BTH_I1234	50S ribosomal protein L13	9,3	10,1
BTH_I1234	<i>rpsI</i>	BTH_I1233-BTH_I1234	30S ribosomal protein S9	8,4	8,6
BTH_I1237		BTH_I1237-BTH_I1238	glutathione S-transferase		-3,6
BTH_I1238		BTH_I1237-BTH_I1238	hypothetical protein		-3,2
BTH_I1240	<i>tyrS</i>	BTH_I1240-BTH_I1244	tyrosyl-tRNA synthetase		3,2
BTH_I1242	<i>dtd</i>	BTH_I1240-BTH_I1244	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	3,4	3,9
BTH_I1243		BTH_I1240-BTH_I1244	phosphoglycerate mutase bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase		3,5
BTH_I1250	<i>purH</i>	BTH_I1250-BTH_I1252		3,1	4,1
BTH_I1251	<i>fis</i>	BTH_I1250-BTH_I1252	DNA-binding protein Fis	3,1	4,6
BTH_I1252		BTH_I1250-BTH_I1252	dihydrouridine synthase		3,8

BTH_I1259	<i>pntAA</i>	BTH_I1259-BTH_I1261	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha 1		-5,3
BTH_I1260	<i>pntAB</i>	BTH_I1259-BTH_I1261	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha 2	-4,0	-13,3
BTH_I1261	<i>pntB</i>	BTH_I1259-BTH_I1261	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	-3,4	-10,6
BTH_I1276	<i>secD</i>	BTH_I1275-BTH_I1277	preprotein translocase subunit SecD	3,3	3,8
BTH_I1277	<i>yajC</i>	BTH_I1275-BTH_I1277	preprotein translocase subunit YajC		3,1
BTH_I1278	<i>tgt</i>		queuine tRNA-ribosyltransferase		3,4
BTH_I1282	<i>katG</i>		catalase/oxidase HPI		-3,0
BTH_I1284	<i>dpsA</i>		DpsA	-4,8	-5,4
BTH_I1285			transcriptional regulator	-3,8	-6,4
BTH_I1291	<i>glcD</i>	BTH_I1289-BTH_I1292	glycolate oxidase subunit GlcD	-3,2	
BTH_I1295	<i>aroG</i>		phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase		3,2
BTH_I1317	<i>purM</i>		phosphoribosylaminoimidazole synthetase		3,0
BTH_I1350			AraC family transcriptional regulator	3,3	
BTH_I1351	<i>rfbP</i>		undecaprenyl-phosphate galactosephosphotransferase	9,0	7,6
BTH_I1352		BTH_I1352-BTH_I1354	capsular polysaccharide biosynthesis/export periplasmic protein	3,7	3,5
BTH_I1353		BTH_I1352-BTH_I1354	low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	6,4	5,9
BTH_I1354		BTH_I1352-BTH_I1354	exopolysaccharide tyrosine-protein kinase	9,3	8,7
BTH_I1355			hypothetical protein	4,7	4,7
BTH_I1356		BTH_I1356-BTH_I1362	capsule polysaccharide biosynthesis protein	3,5	3,1
BTH_I1357		BTH_I1356-BTH_I1362	satase isoform II	3,3	
BTH_I1379	<i>glyA</i>	BTH_I1379-BTH_I1380	serine hydroxymethyltransferase	4,1	4,2
BTH_I1380	<i>nrpR</i>	BTH_I1379-BTH_I1380	transcriptional regulator NrdR	4,1	4,0
BTH_I1394		BTH_I1394-BTH_I1398	metallo-beta-lactamase family protein	-18,4	-22,1
BTH_I1395		BTH_I1394-BTH_I1398	FAD-dependent oxidoreductase	-12,3	-31,6
BTH_I1396	<i>pcaK</i>	BTH_I1394-BTH_I1398	4-hydroxybenzoate transporter	-8,8	-35,2
BTH_I1397	<i>hmgA</i>	BTH_I1394-BTH_I1398	homogentisate 1,2-dioxygenase	-8,2	-47,4
BTH_I1398	<i>fahA</i>	BTH_I1394-BTH_I1398	fumarylacetoacetase	-6,9	-37,9
BTH_I1402	<i>ldhA</i>	BTH_I1401-BTH_I1403	D-lactate dehydrogenase	-16,8	-3,4
BTH_I1403	<i>scmR</i>	BTH_I1401-BTH_I1403	LysR family transcriptional regulator		-3,7
BTH_I1408	<i>xdhA</i>	BTH_I1408-BTH_I1409	xanthine dehydrogenase, N-terminal subunit	-6,8	-9,2
BTH_I1409	<i>xdhB</i>	BTH_I1408-BTH_I1409	xanthine dehydrogenase, C-terminal subunit	-6,6	-9,7
BTH_I1410			extracellular solute-binding protein	-3,2	-4,0

BTH_I1413		BTH_I1412-BTH_I1415	iron compound ABC transporter ATP-binding protein	3,4	4,3
BTH_I1414		BTH_I1412-BTH_I1415	membrane transport solute-binding protein		3,2
BTH_I1415		BTH_I1412-BTH_I1415	iron compound ABC transporter permease		3,3
BTH_I1420			D-(-)-3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase		-3,2
BTH_I1421			serine-type carboxypeptidase family protein	-13,5	-56,8
BTH_I1431		BTH_I1431-BTH_I1432	hypothetical protein	-3,4	-9,8
BTH_I1432		BTH_I1431-BTH_I1432	lipoprotein	-3,1	-9,8
BTH_I1433			OmpW family outer membrane protein		-11,0
BTH_I1434			activator protein	-9,4	-105,2
BTH_I1435			hypothetical protein	-3,1	-8,2
BTH_I1436			zinc-containing alcohol dehydrogenase		-4,5
BTH_I1439		BTH_I1439-BTH_I1441	TnpC protein	-3,1	
BTH_I1441		BTH_I1439-BTH_I1441	hypothetical protein	-3,1	
BTH_I1445		BTH_I1445-BTH_I1447	hypothetical protein	-3,4	-3,0
BTH_I1446		BTH_I1445-BTH_I1447	TnpB protein		-3,4
BTH_I1449		BTH_I1448-BTH_I1449	TnpC protein	-3,1	
BTH_I1452		BTH_I1450-BTH_I1452	hypothetical protein	-3,5	-3,2
BTH_I1484	<i>wecA</i>	BTH_I1484-BTH_I1486	undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase		3,2
BTH_I1493	<i>ureG</i>	BTH_I1493-BTH_I1498	urease accessory protein UreG		3,3
BTH_I1513	<i>trmB</i>		tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	3,6	5,1
BTH_I1514			tRNA-Gly	4,3	3,8
BTH_I1515			hypothetical protein		-6,5
BTH_I1519			serine protease	-3,5	-5,3
BTH_I1527			transglycosylase SLT domain-containing protein	5,5	5,0
BTH_I1549			amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	-3,0	
BTH_I1573			voltage gated chloride channel family protein		3,5
BTH_I1577			TonB domain-containing protein	-3,1	-3,3
BTH_I1581			tRNA-Ser	3,6	3,8
BTH_I1593			hypothetical protein	-3,2	
BTH_I1601			transglycosylase associated protein family	-7,4	-6,6
BTH_I1602			tRNA-Thr	3,6	3,1
BTH_I1609			hypothetical protein	3,1	3,1

BTH_I1620	<i>pcpB</i>		pentachlorophenol 4-monooxygenase; PcpB	-7,3	-8,9
BTH_I1621	<i>fdsD</i>	BTH_I1621-BTH_I1624	formate dehydrogenase subunit delta	-7,7	-12,6
BTH_I1622	<i>fdsA</i>	BTH_I1621-BTH_I1624	formate dehydrogenase subunit alpha	-4,4	-10,3
BTH_I1623	<i>fdsB</i>	BTH_I1621-BTH_I1624	formate dehydrogenase subunit beta	-4,3	-11,7
BTH_I1624	<i>fdsG</i>	BTH_I1621-BTH_I1624	formate dehydrogenase subunit gamma	-3,7	-7,7
BTH_I1632	<i>gyrA</i>		DNA gyrase subunit A		3,1
BTH_I1634	<i>serC</i>	BTH_I1634-BTH_I1635	phosphoserine aminotransferase	3,1	3,3
BTH_I1635	<i>pheA</i>	BTH_I1634-BTH_I1635	chorismate mutase/prephenate dehydratase	3,3	3,6
BTH_I1637	<i>cmk</i>	BTH_I1636-BTH_I1637	cytidylate kinase	5,5	5,2
BTH_I1638	<i>rpsA</i>	BTH_I1638-BTH_I1639	30S ribosomal protein S1	7,0	6,8
BTH_I1639	<i>ihfB</i>	BTH_I1638-BTH_I1639	integration host factor subunit beta	5,2	4,6
BTH_I1650	<i>metN</i>	BTH_I1650-BTH_I1652	DL-methionine transporter ATP-binding subunit	6,7	6,5
BTH_I1651		BTH_I1650-BTH_I1652	D-methionine ABC transporter permease	7,1	7,0
BTH_I1652		BTH_I1650-BTH_I1652	D-methionine ABC transporter periplasmic D-methionine-binding protein	5,2	5,0
BTH_I1661	<i>rpsP</i>	BTH_I1661-BTH_I1663	30S ribosomal protein S16	4,9	6,2
BTH_I1662	<i>rimM</i>	BTH_I1661-BTH_I1663	16S rRNA-processing protein RimM	5,0	6,0
BTH_I1663	<i>trmD</i>	BTH_I1661-BTH_I1663	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	10,2	11,0
BTH_I1664	<i>rplS</i>		50S ribosomal protein L19	14,4	15,0
BTH_I1686	<i>norM</i>		multidrug resistance protein NorM	4,4	
BTH_I1687			hypothetical protein		3,1
BTH_I1689			hypothetical protein		3,4
BTH_I1694			tRNA-Asn	5,1	3,9
BTH_I1695			tRNA-Asn	5,5	3,8
BTH_I1707	<i>rne</i>		ribonuclease E	4,8	4,3
BTH_I1714			hypothetical protein	6,1	6,7
BTH_I1715	<i>rpmF</i>		50S ribosomal protein L32	4,0	5,8
BTH_I1716	<i>plsX</i>	BTH_I1716-BTH_I1719	glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX		3,3
BTH_I1720	<i>acpP</i>		acyl carrier protein	3,2	3,0
BTH_I1728	<i>lepA</i>	BTH_I1728-BTH_I1729	GTP-binding protein LepA	3,7	3,7
BTH_I1729	<i>lepB</i>	BTH_I1728-BTH_I1729	signal peptidase I	3,5	3,5
BTH_I1737	<i>efp</i>		elongation factor P	4,6	6,9
BTH_I1742		BTH_I1741-BTH_I1742	tRNA-Gly	3,4	

BTH_I1743			tRNA-Cys	4,6	3,1
BTH_I1749		BTH_I1749-BTH_I1751	hypothetical protein		4,4
BTH_I1750		BTH_I1749-BTH_I1751	hypothetical protein		5,0
BTH_I1751		BTH_I1749-BTH_I1751	SCO1/SenC family protein		5,9
BTH_I1761		BTH_I1760-BTH_I1761	amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein		-3,2
BTH_I1762	<i>plcN</i>	BTH_I1762-BTH_I1763	phospholipase C		-3,4
BTH_I1765			luciferase-like monooxygenase		-3,1
BTH_I1771	<i>hisQ</i>	BTH_I1771-BTH_I1774	amino acid ABC transporter permease	-9,6	-8,6
BTH_I1772	<i>hisM</i>	BTH_I1771-BTH_I1774	amino acid ABC transporter permease	-5,2	-5,5
BTH_I1773	<i>hisP</i>	BTH_I1771-BTH_I1774	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-4,2	-4,2
BTH_I1774		BTH_I1771-BTH_I1774	AraC family transcriptional regulator	-3,6	-4,4
BTH_I1775	<i>argD</i>	BTH_I1775-BTH_I1780	bifunctional <i>N</i> -succinyldiaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase protein	-5,6	-5,4
BTH_I1776		BTH_I1775-BTH_I1780	arginine <i>N</i> -succinyltransferase, subunit alpha	-3,2	
BTH_I1777	<i>astA</i>	BTH_I1775-BTH_I1780	arginine <i>N</i> -succinyltransferase subunit beta	-3,6	-3,2
BTH_I1778	<i>astD</i>	BTH_I1775-BTH_I1780	succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase		-3,5
BTH_I1779	<i>astB</i>	BTH_I1775-BTH_I1780	succinylarginine dihydrolase		-3,9
BTH_I1780	<i>astE</i>	BTH_I1775-BTH_I1780	succinylglutamate desuccinylase		-3,2
BTH_I1783			amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	-4,6	-4,6
BTH_I1784		BTH_I1784-BTH_I1788	fatty acid desaturase domain-containing protein		3,9
BTH_I1785	<i>cyoD</i>	BTH_I1784-BTH_I1788	ubiquinol oxidase subunit IV		7,4
BTH_I1786	<i>cyoC</i>	BTH_I1784-BTH_I1788	cytochrome c oxidase subunit III		13,8
BTH_I1787	<i>cyoB</i>	BTH_I1784-BTH_I1788	ubiquinol oxidase subunit I		29,9
BTH_I1788	<i>cyoA</i>	BTH_I1784-BTH_I1788	ubiquinol oxidase subunit II		44,3
BTH_I1789			cation-binding hemerythrin HHE family protein		12,4
BTH_I1791			hypothetical protein	-3,4	
BTH_I1799			methyl-accepting chemotaxis protein		15,7
BTH_I1800	<i>hemN2</i>	BTH_I1800-BTH_I1801	coproporphyrinogen III oxidase		8,3
BTH_I1801		BTH_I1800-BTH_I1801	cyclic nucleotide-binding domain-containing protein	-4,7	5,2
BTH_I1802			hypothetical protein		6,8
BTH_I1803		BTH_I1803-BTH_I1807	2-nitropropane dioxygenase family oxidoreductase		9,9
BTH_I1804		BTH_I1803-BTH_I1807	U32 family peptidase		18,4

BTH_I1805		BTH_I1803-BTH_I1807	U32 family peptidase		12,1
BTH_I1806		BTH_I1803-BTH_I1807	hypothetical protein		13,3
BTH_I1807		BTH_I1803-BTH_I1807	hypothetical protein		14,9
BTH_I1809	<i>nrdD</i>		anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase		3,1
BTH_I1814	<i>alkB</i>		alkane-1 monooxygenase	-4,8	-5,0
BTH_I1817	<i>btaR5</i>	BTH_I1817-BTH_I1819	ATP-dependent transcription regulator LuxR	-26,7	-19,4
BTH_I1818		BTH_I1817-BTH_I1819	hypothetical protein	-3,2	-3,5
BTH_I1820	<i>hutH</i>	BTH_I1820-BTH_I1825	histidine ammonia-lyase	-7,3	-8,7
BTH_I1821	<i>hutC</i>	BTH_I1820-BTH_I1825	histidine utilization repressor	-6,7	-10,8
BTH_I1822	<i>hutU</i>	BTH_I1820-BTH_I1825	urocanate hydratase	-6,4	-12,8
BTH_I1823		BTH_I1820-BTH_I1825	hypothetical protein	-6,6	-11,2
BTH_I1824	<i>hutI</i>	BTH_I1820-BTH_I1825	imidazolonepropionase	-5,6	-10,1
BTH_I1825	<i>hutF</i>	BTH_I1820-BTH_I1825	<i>N</i> -formimino-L-glutamate deiminase	-5,2	-10,8
BTH_I1826	<i>hutG</i>		<i>N</i> -formylglutamate amidohydrolase	-4,2	-9,6
BTH_I1827		BTH_I1827-BTH_I1828	glutamine amidotransferase, class I		-3,9
BTH_I1828		BTH_I1827-BTH_I1828	glutamine synthetase family protein		-4,4
BTH_I1829			aminotransferase		-4,8
BTH_I1831			tRNA-Val	3,9	
BTH_I1849	<i>narL</i>	BTH_I1849-BTH_I1850	DNA-binding response regulator NarL		13,2
BTH_I1850	<i>narX</i>	BTH_I1849-BTH_I1850	nitrate/nitrite sensory protein NarX		5,0
BTH_I1854	<i>narG</i>	BTH_I1851-BTH_I1856	nitrate reductase subunit alpha		3,3
BTH_I1857			tRNA-Met	3,4	
BTH_I1864	<i>aceE</i>		pyruvate dehydrogenase subunit E1	4,1	3,4
BTH_I1865	<i>aceF</i>		dihydrolipoamide acetyltransferase		3,1
			pyruvate dehydrogenase, E3 component,		
			dihydrolipoamide dehydrogenase		3,4
BTH_I1866	<i>lpdA</i>				
BTH_I1879	<i>hscA</i>	BTH_I1878-BTH_I1879	chaperone protein HscA	3,6	
BTH_I1880	<i>fdx</i>	BTH_I1880-BTH_I1881	ferredoxin, 2Fe-2S type, ISC system	3,0	
BTH_I1883	<i>lysS</i>	BTH_I1883-BTH_I1886	lysyl-tRNA synthetase	4,8	5,8
BTH_I1898		BTH_I1896-BTH_I1898	hexapeptide repeat-containing transferase	3,2	
BTH_I1921		BTH_I1921-BTH_I1923	hypothetical protein		3,8
BTH_I1933			hypothetical protein	-38,5	-148,8
BTH_I1936	<i>cysE</i>		serine O-acetyltransferase		-3,4

BTH_I1945	<i>ask</i>		aspartate kinase	3,3	3,4
BTH_I1946			tRNA-Ser	3,4	3,1
BTH_I1947			hypothetical protein		-4,3
BTH_I1948	<i>batA</i>		outer membrane autotransporter		-4,0
BTH_I1949		BTH_I1949-BTH_I1951	hypothetical protein		-6,3
BTH_I1950		BTH_I1949-BTH_I1951	AcrB/AcrD/AcrF family protein		-8,8
BTH_I1951	<i>mexE</i>	BTH_I1949-BTH_I1951	multidrug efflux RND membrane fusion protein MexE		-7,5
BTH_I1952		BTH_I1952-BTH_I1954	adenylylsulfate kinase		-35,0
BTH_I1953		BTH_I1952-BTH_I1954	peptide synthetase-domain-containing protein		-88,1
BTH_I1954		BTH_I1952-BTH_I1954	hypothetical protein		-97,2
BTH_I1955			hypothetical protein	-3,0	-115,2
BTH_I1956		BTH_I1956-BTH_I1967	non-ribosomal peptide synthetase	-3,0	-52,4
BTH_I1957		BTH_I1956-BTH_I1967	hypothetical protein		-69,7
BTH_I1958		BTH_I1956-BTH_I1967	dioxygenase, TauD/TfdA	-3,4	-82,6
BTH_I1959		BTH_I1956-BTH_I1967	hypothetical protein		-58,0
BTH_I1960		BTH_I1956-BTH_I1967	hypothetical protein		-65,4
BTH_I1961		BTH_I1956-BTH_I1967	hypothetical protein		-59,9
BTH_I1962		BTH_I1956-BTH_I1967	transketolase, N-terminal subunit		-49,7
BTH_I1963		BTH_I1956-BTH_I1967	transketolase, C-terminal subunit		-40,7
BTH_I1964		BTH_I1956-BTH_I1967	hypothetical protein		-34,9
BTH_I1965		BTH_I1956-BTH_I1967	acyltransferase family protein		-33,1
BTH_I1966	<i>serC2</i>	BTH_I1956-BTH_I1967	phosphoserine aminotransferase		-57,3
BTH_I1967		BTH_I1956-BTH_I1967	group 2 family glycosyl transferase		-49,5
BTH_I1968	<i>cysD2</i>	BTH_I1968-BTH_I1971	sulfate adenylyltransferase subunit 2		-3,1
BTH_I1969		BTH_I1968-BTH_I1971	kinase		-13,1
BTH_I1970		BTH_I1968-BTH_I1971	cysteine synthase/cystathionine beta-synthase family protein		-42,1
BTH_I1971		BTH_I1968-BTH_I1971	argininosuccinate lyase		-32,3
BTH_I1976			hypothetical protein	-3,1	-3,6
BTH_I1985			tRNA-Ala	4,0	3,1
BTH_I1986			tRNA-Glu	4,3	3,5
BTH_I1987			tRNA-Asp	5,1	4,6
BTH_I1988			tRNA-Glu	7,8	6,8

BTH_I1989		tRNA-Asp	8,0	7,4
BTH_I1999	<i>rhIE</i>	ATP-dependent RNA helicase RhIE	6,4	10,0
BTH_I2011	<i>gpo</i>	glutathione peroxidase		-3,2
BTH_I2027	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	5,8	7,6
BTH_I2028	<i>tsf</i>	elongation factor Ts	4,7	5,3
BTH_I2044		serine protease	-7,1	-11,7
BTH_I2045		phytochelatin synthase		-3,7
BTH_I2068	BTH_I2067-BTH_I2068	hypothetical protein	-3,3	-4,5
BTH_I2071	BTH_I2071-BTH_I2072	hypothetical protein	-3,5	-3,7
BTH_I2073		hydroxydechloroatrazine ethylaminohydrolase		-3,1
BTH_I2075		hypothetical protein	-18,0	-21,4
BTH_I2077		hypothetical protein		-3,4
BTH_I2085	<i>tdcB</i> BTH_I2085-BTH_I2086	threonine dehydratase catabolic	-4,4	-5,7
BTH_I2086	<i>argE</i> BTH_I2085-BTH_I2086	acetylornithine deacetylase	-3,3	-4,0
BTH_I2107		hypothetical protein	-3,2	-4,8
BTH_I2118	<i>tig</i> BTH_I2118-BTH_I2120	trigger factor	4,3	3,9
BTH_I2123		tRNA-Val	5,2	3,2
BTH_I2125		hypothetical protein	-17,4	
BTH_I2128		tRNA-Asp	3,9	3,2
BTH_I2129		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	3,8	3,9
BTH_I2163		lipoprotein	-4,0	-3,8
BTH_I2164		hypothetical protein	-6,0	-6,6
BTH_I2167		LysM domain/BON superfamily protein	-3,7	-4,4
BTH_I2171	<i>glxR</i> BTH_I2171-BTH_I2173	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase		-3,1
BTH_I2179	<i>rpsF</i> BTH_I2179-BTH_I2182	30S ribosomal protein S6	6,6	8,3
BTH_I2180	BTH_I2179-BTH_I2182	primosomal replication protein n	8,8	10,1
BTH_I2181	<i>rpsR</i> BTH_I2179-BTH_I2182	30S ribosomal protein S18	11,0	11,7
BTH_I2182	<i>rplI</i> BTH_I2179-BTH_I2182	50S ribosomal protein L9	9,4	8,8
BTH_I2185	BTH_I2184-BTH_I2185	phosphate transporter family protein	4,0	4,3
BTH_I2187		PhoH family protein	-3,5	
BTH_I2197		aminotransferase AlaT		3,0
BTH_I2198	BTH_I2198-BTH_I2199	homoserine dehydrogenase	3,2	3,9
BTH_I2199	<i>thrC</i> BTH_I2198-BTH_I2199	threonine synthase		3,1

BTH_I2207		hypothetical protein	-3,2	-4,9
BTH_I2212	BTH_I2211-BTH_I2212	hypothetical protein	3,4	3,5
BTH_I2213	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31 type B	10,4	13,4
BTH_I2216	BTH_I2214-BTH_I2216	MerR family transcriptional regulator	3,7	5,3
BTH_I2231	<i>ndk</i> BTH_I2231-BTH_I2232	nucleoside diphosphate kinase	4,8	5,9
BTH_I2232	BTH_I2231-BTH_I2232	radical SAM protein	5,7	6,9
BTH_I2233	BTH_I2233-BTH_I2237	hypothetical protein	3,2	3,6
BTH_I2234	<i>ispG</i> BTH_I2233-BTH_I2237	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	3,0	
BTH_I2244		ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit		3,1
BTH_I2247		potassium uptake protein	4,1	4,0
BTH_I2248		transcription accessory protein, TEX	4,0	3,9
BTH_I2250	BTH_I2249-BTH_I2250	hypothetical protein	-5,0	-8,7
BTH_I2255	<i>phbC</i>	poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I		-4,0
BTH_I2256	BTH_I2256-BTH_I2257	acetyl-CoA acetyltransferase		-4,4
BTH_I2257	BTH_I2256-BTH_I2257	acetyacetyl-CoA reductase		-4,3
BTH_I2258	<i>phaR</i>	polyhydroxyalkanoate synthesis repressor PhaR		-6,0
BTH_I2264		phosphoserine phosphatase	3,9	6,0
BTH_I2265		hypothetical protein	-12,3	-11,3
BTH_I2266	BTH_I2266-BTH_I2267	hypothetical protein		-3,6
BTH_I2269		ABC transporter ATP-binding protein	5,0	6,4
BTH_I2271	<i>aldA</i> BTH_I2271-BTH_I2273	aldehyde dehydrogenase		-3,8
BTH_I2272	BTH_I2271-BTH_I2273	2-nitropropane dioxygenase family oxidoreductase		4,0
BTH_I2273	BTH_I2271-BTH_I2273	OmpW family outer membrane protein	-3,5	9,6
BTH_I2277	BTH_I2276-BTH_I2279	putrescine ABC transporter ATP-binding protein	3,2	
BTH_I2278	BTH_I2276-BTH_I2279	putrescine ABC transporter permease	4,3	3,2
BTH_I2279	BTH_I2276-BTH_I2279	putrescine ABC transporter permease	3,6	
BTH_I2281	BTH_I2280-BTH_I2282	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	-3,2	
BTH_I2282	BTH_I2280-BTH_I2282	metallo-beta-lactamase family protein	-4,2	
BTH_I2288	BTH_I2287-BTH_I2289	AcrB/AcrD/AcrF family protein		4,3
BTH_I2289	BTH_I2287-BTH_I2289	RND family efflux transporter MFP subunit		4,4
BTH_I2291	<i>clcB</i> BTH_I2291-BTH_I2292	voltage-gated ClC-type chloride channel ClcB		3,0
BTH_I2293		LysR family transcriptional regulator	-3,2	
BTH_I2294		hypothetical protein	-3,2	

BTH_I2297		BTH_I2297-BTH_I2298	major facilitator family transporter	-4,2	
BTH_I2298	<i>tkrA</i>	BTH_I2297-BTH_I2298	2-ketogluconate reductase	-4,2	
BTH_I2299		BTH_I2299-BTH_I2301	LacI family transcription regulator		-8,4
BTH_I2303			polyhydroxybutyrate depolymerase	-5,9	-7,1
BTH_I2306		BTH_I2304-BTH_I2306	hypothetical protein		-3,6
BTH_I2307			hypothetical protein	-11,2	-121,5
BTH_I2308			hypothetical protein	-23,5	-48,0
BTH_I2309		BTH_I2309-BTH_I2310	hypothetical protein		-3,7
BTH_I2310	<i>ybgT</i>	BTH_I2309-BTH_I2310	cyd operon protein YbgT		-3,5
BTH_I2314			hypothetical protein		-3,0
BTH_I2315			lipoprotein	-4,1	-3,2
BTH_I2326		BTH_I2326-BTH_I2328	ApbE family protein	-4,8	
BTH_I2327		BTH_I2326-BTH_I2328	ABC transporter ATP-binding protein	-6,4	
BTH_I2328		BTH_I2326-BTH_I2328	transporter	-4,0	
BTH_I2331		BTH_I2330-BTH_I2333	Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	-4,5	-6,1
BTH_I2332		BTH_I2330-BTH_I2333	sodium/hydrogen exchanger	-3,8	-5,8
BTH_I2333		BTH_I2330-BTH_I2333	FAD binding domain-containing protein	-4,8	-6,2
BTH_I2334			hypothetical protein	-6,1	-6,2
BTH_I2338	<i>xylA</i>		xylose isomerase		-3,5
BTH_I2339		BTH_I2339-BTH_I2341	D-xylose ABC transporter periplasmic-D xylose binding protein		-3,2
BTH_I2343		BTH_I2343-BTH_I2345	ATP binding protein of ABC transporter		-4,1
BTH_I2344		BTH_I2343-BTH_I2345	ribose ABC transporter permease	-3,3	-5,3
BTH_I2354		BTH_I2353-BTH_I2355	hypothetical protein		-3,5
BTH_I2355		BTH_I2353-BTH_I2355	alpha/beta fold family hydrolase		-3,5
BTH_I2359	<i>bhcI</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase, class II	3,8	-5,0
BTH_I2360	<i>bhcH</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	nonribosomal peptide synthetase	3,5	-4,3
BTH_I2361	<i>bhcG</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	phosphotransferase family protein	3,8	-3,8
BTH_I2362	<i>bhcF</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	3,3	-3,9
BTH_I2363	<i>bhcE</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	polyketide synthase	4,1	-4,4
BTH_I2364	<i>bhcD</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	peptide synthetase	3,7	-4,4
BTH_I2365	<i>bhcC</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	polyketide synthase	3,0	-6,8
BTH_I2366	<i>bhcB</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	polyketide synthase	3,8	-6,0

BTH_I2367	<i>bhcA</i>	BTH_I2359-BTH_I2367	dihydroaeruginic acid synthetase	4,9	-5,4
BTH_I2368			hypothetical protein	4,7	
BTH_I2369			transcriptional regulator	4,1	
BTH_I2370			outer membrane porin OpcP	3,1	
BTH_I2374		BTH_I2373-BTH_I2374	methyl-accepting chemotaxis protein		3,5
BTH_I2375			hypothetical protein	-8,3	-14,2
BTH_I2376			AMP-binding domain-containing protein		-5,9
BTH_I2377			hypothetical protein	-3,1	-3,9
BTH_I2382			hypothetical protein		7,1
BTH_I2383	<i>arcD</i>	BTH_I2383-BTH_I2386	arginine/ornithine antiporter		9,9
BTH_I2384	<i>arcA</i>	BTH_I2383-BTH_I2386	arginine deiminase	-3,4	10,9
BTH_I2385	<i>arcB</i>	BTH_I2383-BTH_I2386	ornithine carbamoyltransferase		11,5
BTH_I2386	<i>arcC</i>	BTH_I2383-BTH_I2386	carbamate kinase		10,1
BTH_I2387		BTH_I2387-BTH_I2388	short chain dehydrogenase		3,9
BTH_I2402		BTH_I2402-BTH_I2403	glycosyl hydrolase family protein	-59,6	-9,8
BTH_I2408		BTH_I2407-BTH_I2409	cobalamin synthesis protein/P47K family protein	3,1	
BTH_I2409		BTH_I2407-BTH_I2409	high affinity nickel transporter ribose ABC transporter periplasmic ribose-binding protein	3,4	
BTH_I2435		BTH_I2433-BTH_I2435	AraC family transcriptional regulator	-3,2	-5,7
BTH_I2436			hypothetical protein	-3,0	-6,4
BTH_I2438		BTH_I2438-BTH_I2440	hypothetical protein		-22,1
BTH_I2439		BTH_I2438-BTH_I2440	asparagine synthase		-12,3
BTH_I2440		BTH_I2438-BTH_I2440	ABC transporter ATP-binding protein		-7,6
BTH_I2443			RND efflux system outer membrane lipoprotein	3,4	
BTH_I2444		BTH_I2444-BTH_I2445	multidrug efflux protein	5,1	
BTH_I2445		BTH_I2444-BTH_I2445	periplasmic multidrug efflux lipoprotein	4,4	
BTH_I2450			extracellular solute-binding protein	3,4	
BTH_I2461		BTH_I2454-BTH_I2462	CpaA2 pilus assembly protein	-3,6	
BTH_I2467		BTH_I2467-BTH_I2468	SpoVR family protein	-11,9	-6,6
BTH_I2468		BTH_I2467-BTH_I2468	hypothetical protein	-11,5	-8,5
BTH_I2469			protein kinase	-7,6	-8,1
BTH_I2470			methyl-accepting chemotaxis protein		3,7
BTH_I2474			D-xylose ABC transporter ATP-binding protein		3,6

BTH_I2475			binding protein component of ABC ribose transporter	-5,0	-7,6
BTH_I2476	<i>cbl</i>	BTH_I2476-BTH_I2479	transcriptional regulator CysB-like protein	3,5	
BTH_I2477		BTH_I2476-BTH_I2479	sulfate ABC transporter ATP-binding protein	5,8	4,7
BTH_I2478		BTH_I2476-BTH_I2479	sulfate ABC transporter permease	9,0	4,7
BTH_I2479	<i>cysT</i>	BTH_I2476-BTH_I2479	sulfate ABC transporter permease CysT	11,2	4,1
BTH_I2480			sulfate ABC transporter periplasmic sulfate-binding protein	14,5	3,7
BTH_I2484			universal stress protein	-4,8	-4,7
BTH_I2493			sodium:dicarboxylate symporter family protein		6,7
BTH_I2494			tRNA-dihydrouridine synthase A	4,3	6,0
BTH_I2507			tRNA-Met	6,2	4,5
BTH_I2510		BTH_I2508-BTH_I2510	arginyl-tRNA-protein transferase		-4,0
BTH_I2515		BTH_I2514-BTH_I2515	GntR family transcriptional regulator	-3,4	
BTH_I2521			tRNA-Leu	4,1	3,7
BTH_I2526			acetyltransferase	-3,4	-3,6
BTH_I2527			major facilitator family transporter	-6,3	-8,8
BTH_I2528			TetR family transcriptional regulator	-3,5	-10,0
BTH_I2529		BTH_I2529-BTH_I2530	long-chain-fatty-acid--CoA ligase	-7,3	-10,7
BTH_I2530		BTH_I2529-BTH_I2530	hypothetical protein	-8,0	-6,2
BTH_I2546		BTH_I2544-BTH_I2546	pilin		-5,5
BTH_I2550		BTH_I2548-BTH_I2550	hypothetical protein		-3,2
BTH_I2551			lipoprotein	-3,0	-5,0
BTH_I2557	<i>typA</i>		GTP-binding protein TypA	7,4	7,3
BTH_I2558		BTH_I2558-BTH_I2561	MarR family transcriptional regulator	12,1	4,8
BTH_I2559		BTH_I2558-BTH_I2561	RND efflux system outer membrane lipoprotein	4,7	4,0
BTH_I2560		BTH_I2558-BTH_I2561	multidrug resistance protein	5,4	6,2
BTH_I2561		BTH_I2558-BTH_I2561	EmrB/QacA family drug resistance transporter	3,2	4,6
BTH_I2562	<i>truB</i>	BTH_I2562-BTH_I2566	tRNA pseudouridine synthase B	3,5	3,4
BTH_I2564	<i>infB</i>	BTH_I2562-BTH_I2566	translation initiation factor IF-2	3,7	
BTH_I2566		BTH_I2562-BTH_I2566	hypothetical protein	3,1	3,1
BTH_I2570	<i>orfA</i>		ISBm1, transposase orfA, interruption-N	-3,9	
BTH_I2571			hypothetical protein	-4,0	-4,8
BTH_I2572			hypothetical protein	-3,5	-4,6

BTH_I2578		hypothetical protein	3,1	3,3
BTH_I2579	BTH_I2579-BTH_I2580	hypothetical protein		-3,1
BTH_I2580	BTH_I2579-BTH_I2580	lipoprotein	-3,9	-5,1
BTH_I2581		tRNA-Pro	4,9	4,1
BTH_I2587		lipoprotein	-4,6	-6,2
BTH_I2592	<i>rplT</i> BTH_I2592-BTH_I2593	50S ribosomal protein L20	3,9	4,0
BTH_I2593	<i>rpmI</i> BTH_I2592-BTH_I2593	50S ribosomal protein L35	4,6	4,5
BTH_I2599		alpha/beta fold family hydrolase	-3,2	-3,0
BTH_I2601	BTH_I2601-BTH_I2602	flavoprotein reductase	-11,0	-11,6
BTH_I2602	BTH_I2601-BTH_I2602	hypothetical protein	-4,0	-5,4
BTH_I2604		hypothetical protein	-5,4	-5,9
BTH_I2605	BTH_I2605-BTH_I2606	polysaccharide deacetylase family protein	-7,3	-8,0
BTH_I2606	BTH_I2605-BTH_I2606	short chain dehydrogenase	-7,0	-9,1
BTH_I2607	<i>scoB</i> BTH_I2607-BTH_I2608	3-oxoadipate CoA-succinyl transferase subunit beta	-27,5	-35,8
BTH_I2608	<i>scoA</i> BTH_I2607-BTH_I2608	3-oxoadipate CoA-succinyl transferase subunit alpha	-26,0	-32,6
BTH_I2609		LuxR family transcriptional regulator	-5,2	-4,5
BTH_I2610		hypothetical protein		-4,2
BTH_I2611	BTH_I2611-BTH_I2612	thioesterase family protein	-4,8	-6,7
BTH_I2612	BTH_I2611-BTH_I2612	short chain dehydrogenase	-3,6	-4,6
BTH_I2616		CBS domain-containing protein	-3,1	
BTH_I2617		hypothetical protein	-5,6	-6,0
BTH_I2618		YihY family protein	-3,3	
BTH_I2622	BTH_I2619-BTH_I2622	Ser/Thr protein phosphatase family protein	-3,3	-3,1
BTH_I2639		hypothetical protein	-6,1	-9,3
BTH_I2641	BTH_I2641-BTH_I2643	myo-inositol dehydrogenase	-6,3	-9,1
BTH_I2642	BTH_I2641-BTH_I2643	myo-inositol dehydrogenase	-8,8	-13,5
BTH_I2643	BTH_I2641-BTH_I2643	SIS domain-containing protein	-7,5	-10,5
BTH_I2644	BTH_I2644-BTH_I2650	sugar ABC transporter periplasmic sugar-binding protein	-32,9	-56,7
BTH_I2645	BTH_I2644-BTH_I2650	sugar ABC transporter permease	-17,1	-39,7
BTH_I2646	BTH_I2644-BTH_I2650	sugar ABC transporter ATP-binding protein	-17,4	-43,1
BTH_I2647	<i>iolC</i> BTH_I2644-BTH_I2650	iolC protein	-13,9	-26,4
BTH_I2648	<i>iolD</i> BTH_I2644-BTH_I2650	iolD protein	-14,8	-29,6

BTH_I2649		BTH_I2644-BTH_I2650	hypothetical protein	-13,9	-22,0
BTH_I2650	<i>iolB</i>	BTH_I2644-BTH_I2650	iolB protein	-4,4	-5,5
BTH_I2651		BTH_I2651-BTH_I2655	branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-3,4	-4,8
BTH_I2654		BTH_I2651-BTH_I2655	thioesterase family protein	-3,4	-4,1
BTH_I2655		BTH_I2651-BTH_I2655	iron-containing alcohol dehydrogenase	-3,3	-4,2
BTH_I2658			protease signal peptide protein	-8,7	-8,2
BTH_I2662			CAIB/BAIF family protein	-3,9	-5,8
BTH_I2663			lipoprotein		-3,5
BTH_I2664			hypothetical protein	-3,5	
BTH_I2669			hypothetical protein	-3,0	-3,3
BTH_I2670			di-heme cytochrome c peroxidase family protein	-3,3	-5,0
BTH_I2671	<i>acpA</i>		acid phosphatase AcpA	-4,2	-6,4
BTH_I2673			trans-aconitate methyltransferase		-5,6
BTH_I2674		BTH_I2674-BTH_I2675	DNA-binding response regulator	-3,2	-24,3
BTH_I2675		BTH_I2674-BTH_I2675	sensor histidine kinase/response regulator	-3,2	-20,1
BTH_I2676		BTH_I2676-BTH_I2677	spore coat protein U domain-contain protein		-18,1
BTH_I2677		BTH_I2676-BTH_I2677	fimbrial usher protein		-16,3
BTH_I2678		BTH_I2678-BTH_I2680	fimbrial assembly chaperone		-15,5
BTH_I2679		BTH_I2678-BTH_I2680	spore coat protein U domain-contain protein		-21,0
BTH_I2680		BTH_I2678-BTH_I2680	hypothetical protein		-25,9
BTH_I2681			hypothetical protein		-28,4
BTH_I2683			hypothetical protein	-11,0	-5,2
BTH_I2684		BTH_I2684-BTH_I2685	major facilitator family transporter	-7,9	
BTH_I2685		BTH_I2684-BTH_I2685	hydrolase	-7,1	
BTH_I2686	<i>hns</i>		H-NS histone family protein	-7,9	
BTH_I2687	<i>mntH</i>		manganese transport protein MntH	-3,3	
BTH_I2688		BTH_I2688-BTH_I2690	TnpC protein	-3,0	
BTH_I2689		BTH_I2688-BTH_I2690	TnpB protein	-3,1	-3,8
BTH_I2690		BTH_I2688-BTH_I2690	hypothetical protein	-3,3	-3,6
BTH_I2691		BTH_I2691-BTH_I2695	hypothetical protein	-4,0	-7,9
BTH_I2692		BTH_I2691-BTH_I2695	hypothetical protein	-3,2	-7,3
BTH_I2693		BTH_I2691-BTH_I2695	Rhs element Vgr protein		-5,7

BTH_I2694	BTH_I2691-BTH_I2695	hypothetical protein	-3,6	-6,7
BTH_I2695	BTH_I2691-BTH_I2695	hypothetical protein	-4,8	-9,8
BTH_I2696	BTH_I2696-BTH_I2697	hypothetical protein	-3,5	-5,4
BTH_I2697	BTH_I2696-BTH_I2697	Rhs element Vgr protein	-3,9	-7,3
BTH_I2700	BTH_I2698-BTH_I2700	lipoprotein		-6,7
BTH_I2701	BTH_I2701-BTH_I2705	hypothetical protein		-5,8
BTH_I2702	BTH_I2701-BTH_I2705	lipoprotein		-3,9
BTH_I2703	BTH_I2701-BTH_I2705	hypothetical protein		-4,8
BTH_I2704	BTH_I2701-BTH_I2705	hypothetical protein		-5,4
BTH_I2705	BTH_I2701-BTH_I2705	Rhs element Vgr protein		-4,1
BTH_I2708		hypothetical protein	-5,6	-6,9
BTH_I2711		hypothetical protein	-9,0	-7,6
BTH_I2713	<i>phaZ</i>	poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	-26,7	-31,7
BTH_I2715		major facilitator family transporter	-25,0	-44,8
BTH_I2716		LysR family transcriptional regulator	-14,6	-19,6
BTH_I2718		acetyltransferase	-7,1	-10,7
BTH_I2719	BTH_I2719-BTH_I2720	pathogenesis-like protein	-11,7	-19,9
BTH_I2720	BTH_I2719-BTH_I2720	hypothetical protein	-10,9	-20,0
BTH_I2721	<i>cdiB</i>	outer membrane hemolysin activator protein	-12,2	-33,0
BTH_I2723	<i>cdiA</i>	filamentous hemagglutinin	-6,5	-27,1
BTH_I2725		hypothetical protein	-6,1	-8,4
BTH_I2726	BTH_I2726-BTH_I2727	hypothetical protein	-5,2	-5,9
BTH_I2727	BTH_I2726-BTH_I2727	hypothetical protein	-3,4	-3,4
BTH_I2728		hypothetical protein	-4,1	-4,7
BTH_I2729		hypothetical protein		-3,7
BTH_I2732		hypothetical protein	-3,3	-4,9
BTH_I2733		helix-turn-helix domain-containing protein	-3,1	-3,3
BTH_I2734		lipoprotein	-4,7	-5,2
BTH_I2736	BTH_I2735-BTH_I2737	TnpB protein	-4,5	-5,7
BTH_I2737	BTH_I2735-BTH_I2737	hypothetical protein	-3,8	-3,6
BTH_I2738		hypothetical protein	-5,6	-9,3
BTH_I2739		DNA mismatch repair protein	-5,0	-8,5
BTH_I2740	BTH_I2740-BTH_I2742	type I restriction-modification system endonuclease	-5,9	-7,9

BTH_I2741	BTH_I2740-BTH_I2742	hypothetical protein	-5,0	-7,7
BTH_I2742	BTH_I2740-BTH_I2742	type I restriction-modification system specificity determinant	-6,0	-8,7
BTH_I2743		type I restriction system adenine methylase	-4,3	-6,2
BTH_I2746	BTH_I2746-BTH_I2747	recombinase		-3,0
BTH_I2747	BTH_I2746-BTH_I2747	stage 0 sporulation protein J	-4,2	-4,3
BTH_I2749		tRNA-Arg	4,0	3,4
BTH_I2750	<i>uppP</i>	undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	-3,0	
BTH_I2753	<i>acsA</i>	acetyl-coenzyme A synthetase	-3,9	-3,7
BTH_I2757	BTH_I2757-BTH_I2758	hypothetical protein	-3,7	-4,2
BTH_I2758	<i>sixA</i> BTH_I2757-BTH_I2758	phosphohistidine phosphatase SixA		-4,1
BTH_I2760		hypothetical protein	-3,1	-3,3
BTH_I2766	<i>ppk</i>	polyphosphate kinase	-3,9	-4,0
BTH_I2781	<i>carB</i>	carbamoyl phosphate synthase large subunit	5,0	4,0
BTH_I2782	<i>leuE</i> BTH_I2782-BTH_I2783	leucine export protein LeuE	5,9	4,6
BTH_I2783	<i>carA</i> BTH_I2782-BTH_I2783	carbamoyl phosphate synthase small subunit	4,7	4,4
BTH_I2793		proline/betaine transporter	3,5	3,4
BTH_I2796	BTH_I2796-BTH_I2798	hypothetical protein	3,8	4,3
BTH_I2807	BTH_I2807-BTH_I2808	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase family protein		-3,6
BTH_I2808	<i>pckG</i> BTH_I2807-BTH_I2808	phosphoenolpyruvate carboxykinase	-6,2	-6,3
BTH_I2809	BTH_I2809-BTH_I2810	HSP20 family protein	-4,3	-4,4
BTH_I2810	BTH_I2809-BTH_I2810	HSP20 family protein	-5,4	-7,3
BTH_I2811	BTH_I2811-BTH_I2812	hypothetical protein	-6,5	-6,6
BTH_I2812	BTH_I2811-BTH_I2812	hypothetical protein	-5,4	-7,3
BTH_I2816		hypothetical protein	3,1	3,5
BTH_I2824		GGDEF domain-containing protein	-6,0	-10,2
BTH_I2831		hypothetical protein	-4,4	-8,8
BTH_I2844	<i>thiC</i>	thiamine biosynthesis protein ThiC	3,1	3,2
BTH_I2845	<i>osmB</i>	lipoprotein	-3,4	-6,2
BTH_I2854		amino acid permease	-4,7	-3,6
BTH_I2856	BTH_I2856-BTH_I2858	iron compound ABC transporter periplasmic iron-compound-binding protein	5,6	4,7
BTH_I2857	BTH_I2856-BTH_I2858	iron compound ABC transporter permease	6,2	5,3
BTH_I2858	BTH_I2856-BTH_I2858	iron compound ABC transporter ATP-binding protein	3,6	3,5

BTH_I2871		BTH_I2871-BTH_I2872	EAL domain-containing protein		3,6
BTH_I2872		BTH_I2871-BTH_I2872	hypothetical protein	3,1	4,6
BTH_I2885	<i>serA</i>		D-3-phosphoglycerate dehydrogenase		-3,4
BTH_I2889		BTH_I2889-BTH_I2891	hypothetical protein	-3,3	-3,6
BTH_I2896		BTH_I2896-BTH_I2898	tRNA-Ala	6,8	6,8
BTH_I2897		BTH_I2896-BTH_I2898	tRNA-Ile	6,8	6,9
BTH_I2899	<i>paaF</i>		enoyl-CoA hydratase		-3,3
BTH_I2900	<i>paaN</i>		phenylacetic acid degradation protein paaN		-3,2
BTH_I2901		BTH_I2901-BTH_I2903	beta-ketoadipyl CoA thiolase		-3,2
BTH_I2902	<i>paaB</i>	BTH_I2901-BTH_I2903	enoyl-CoA hydratase		-3,1
BTH_I2920	<i>ychF</i>		GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD		3,8
BTH_I2921	<i>gabP</i>		GABA permease		-4,4
BTH_I2929	<i>hemA</i>	BTH_I2929-BTH_I2933	glutamyl-tRNA reductase		3,3
BTH_I2931	<i>hemK</i>	BTH_I2929-BTH_I2933	hemK protein		4,3
BTH_I2935			amino acid permease	3,5	3,2
BTH_I2936	<i>cspD</i>		cold-shock domain-contain protein		11,5
BTH_I2937		BTH_I2937-BTH_I2938	chaperone protein	3,5	4,4
BTH_I2938		BTH_I2937-BTH_I2938	nitroreductase family protein		-4,9
BTH_I2945			M1 family peptidase	-3,4	-18,5
BTH_I2947			fructose-specific IIABC component	-7,6	-276,2
BTH_I2948		BTH_I2948-BTH_I2950	secretion protein		-12,2
BTH_I2949		BTH_I2948-BTH_I2950	toxin secretion ABC transporter ATP-binding protein		-9,8
BTH_I2976	<i>petB</i>	BTH_I2975-BTH_I2977	ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome b	-3,1	-5,9
BTH_I2995	<i>mura</i>	BTH_I2993-BTH_I2996	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	3,6	4,2
BTH_I2996		BTH_I2993-BTH_I2996	BolA/YrbA family protein-like protein	3,4	4,2
BTH_I2997		BTH_I2997-BTH_I2998	ABC transporter permease	4,3	4,8
BTH_I2998		BTH_I2997-BTH_I2998	ABC transporter ATP-binding protein	3,4	3,6
BTH_I3006	<i>thiG</i>	BTH_I3005-BTH_I3008	thiazole synthase		3,2
BTH_I3008	<i>thiO</i>	BTH_I3005-BTH_I3008	FAD-binding oxidoreductase		4,1
BTH_I3013	<i>gltD</i>	BTH_I3013-BTH_I3014	glutamate synthase subunit beta	7,6	17,1
BTH_I3014	<i>gltB</i>	BTH_I3013-BTH_I3014	glutamate synthase large subunit	8,4	12,1
BTH_I3015			hypothetical protein	-3,6	-5,1
BTH_I3029	<i>mrcA</i>		1A family penicillin-binding protein		3,7

BTH_I3031	<i>lysA</i>		diaminopimelate decarboxylase		3,2
BTH_I3041	<i>rplQ</i>		50S ribosomal protein L17	5,3	4,9
BTH_I3042	<i>rpoA</i>		DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	4,5	3,6
BTH_I3043	<i>rpsD</i>		30S ribosomal protein S4	6,3	4,7
BTH_I3044	<i>rpsK</i>	BTH_I3044-BTH_I3045	30S ribosomal protein S11	5,9	4,7
BTH_I3045	<i>rpsM</i>	BTH_I3044-BTH_I3045	30S ribosomal protein S13	5,0	4,4
BTH_I3046	<i>rpmJ</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	50S ribosomal protein L36	5,1	4,0
BTH_I3047	<i>infA</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	translation initiation factor IF-1	6,1	4,4
BTH_I3048	<i>secY</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	preprotein translocase subunit SecY	5,7	3,9
BTH_I3049	<i>rplO</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	50S ribosomal protein L15	10,6	7,6
BTH_I3050	<i>rpmD</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	50S ribosomal protein L30	11,7	7,0
BTH_I3051	<i>rpsE</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	30S ribosomal protein S5	13,0	7,5
BTH_I3052	<i>rplR</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	50S ribosomal protein L18	14,2	8,4
BTH_I3053	<i>rplF</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	50S ribosomal protein L6	11,6	7,2
BTH_I3054	<i>rpsH</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	30S ribosomal protein S8	9,7	6,4
BTH_I3055	<i>rpsN</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	30S ribosomal protein S14	11,6	8,3
BTH_I3056	<i>rplE</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	50S ribosomal protein L5	13,7	11,0
BTH_I3057	<i>rplX</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	50S ribosomal protein L24	13,0	13,3
BTH_I3058	<i>rplN</i>	BTH_I3046-BTH_I3058	50S ribosomal protein L14	10,3	12,5
BTH_I3059	<i>rpsQ</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	30S ribosomal protein S17	9,2	10,9
BTH_I3060	<i>rpmC</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	50S ribosomal protein L29	10,0	11,8
BTH_I3061	<i>rplP</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	50S ribosomal protein L16	9,7	10,6
BTH_I3062	<i>rpsC</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	30S ribosomal protein S3	11,0	8,8
BTH_I3063	<i>rplV</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	50S ribosomal protein L22	10,0	7,5
BTH_I3064	<i>rpsS</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	30S ribosomal protein S19	10,5	8,1
BTH_I3065	<i>rplB</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	50S ribosomal protein L2	14,9	11,2
BTH_I3066	<i>rplW</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	50S ribosomal protein L23	15,0	10,8
BTH_I3067	<i>rplD</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	50S ribosomal protein L4	16,8	12,6
BTH_I3068	<i>rplC</i>	BTH_I3059-BTH_I3068	50S ribosomal protein L3	10,4	10,1
BTH_I3069	<i>rpsJ</i>		30S ribosomal protein S10	4,9	5,5
BTH_I3070	<i>tufI</i>		elongation factor Tu	6,3	6,7
BTH_I3071	<i>fusA2</i>		elongation factor G	8,8	7,3
BTH_I3072	<i>rpsG</i>		30S ribosomal protein S7	9,3	7,6

BTH_I3073	<i>rpsL</i>		30S ribosomal protein S12	8,7	8,0
BTH_I3077	<i>rplL</i>	BTH_I3077-BTH_I3078	50S ribosomal protein L7/L12	4,2	5,4
BTH_I3078	<i>rplJ</i>	BTH_I3077-BTH_I3078	50S ribosomal protein L10	5,1	6,0
BTH_I3079	<i>rplA</i>	BTH_I3079-BTH_I3080	50S ribosomal protein L1	7,1	5,2
BTH_I3080	<i>rplK</i>	BTH_I3079-BTH_I3080	50S ribosomal protein L11	6,8	5,4
BTH_I3081	<i>musG</i>	BTH_I3081-BTH_I3087	transcription antitermination protein NusG	4,5	5,0
BTH_I3082	<i>secE</i>	BTH_I3081-BTH_I3087	preprotein translocase subunit SecE	4,8	4,6
BTH_I3083		BTH_I3081-BTH_I3087	tRNA-Trp	6,2	5,8
BTH_I3084	<i>tuf2</i>	BTH_I3081-BTH_I3087	elongation factor Tu	6,3	6,8
BTH_I3085		BTH_I3081-BTH_I3087	tRNA-Thr	4,9	4,3
BTH_I3086		BTH_I3081-BTH_I3087	tRNA-Gly	3,7	3,2
BTH_I3089		BTH_I3089-BTH_I3090	hypothetical protein	-3,3	-3,6
BTH_I3090		BTH_I3089-BTH_I3090	TnpB protein	-3,1	-4,0
BTH_I3093		BTH_I3093-BTH_I3095	tRNA-Ala	6,9	6,9
BTH_I3094		BTH_I3093-BTH_I3095	tRNA-Ile	6,9	7,1
BTH_I3097	<i>paaA</i>	BTH_I3097-BTH_I3101	phenylacetate-CoA oxygenase subunit PaaA		-4,1
BTH_I3098	<i>paaB</i>	BTH_I3097-BTH_I3101	phenylacetate-CoA oxygenase subunit PaaB		-4,6
BTH_I3099	<i>paaI</i>	BTH_I3097-BTH_I3101	phenylacetate-CoA oxygenase subunit PaaI		-3,7
BTH_I3100	<i>paaD</i>	BTH_I3097-BTH_I3101	phenylacetic acid degradation protein PaaD		-3,1
BTH_I3104			acetyltransferase	3,9	
BTH_I3106	<i>hppD</i>		4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	-4,2	-4,5
BTH_I3111	<i>pyrE</i>		orotate phosphoribosyltransferase		4,5
BTH_I3113		BTH_I3112-BTH_I3113	flavodoxin domain-containing protein	-3,3	
BTH_I3128			hypothetical protein	-7,8	-4,7
BTH_I3142		BTH_I3139-BTH_I3143	hypothetical protein	-3,1	
BTH_I3150			rare lipoprotein A family protein		3,4
BTH_I3158			amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein		-3,4
BTH_I3166	<i>fliA</i>	BTH_I3166-BTH_I3170	flagellar biosynthesis sigma factor		9,0
BTH_I3167	<i>flhG</i>	BTH_I3166-BTH_I3170	flagellar biosynthesis protein FlhG		13,1
BTH_I3168	<i>flhF</i>	BTH_I3166-BTH_I3170	flagellar biosynthesis regulator FlhF		11,0
BTH_I3169	<i>flhA</i>	BTH_I3166-BTH_I3170	flagellar biosynthesis protein FlhA		15,2
BTH_I3170	<i>flhB</i>	BTH_I3166-BTH_I3170	flagellar biosynthesis protein FlhB	3,8	19,8

BTH_I3178	<i>cheD</i>	BTH_I3175-BTH_I3182	chemoreceptor glutamine deamidase CheD		3,2
BTH_I3179	<i>cheR</i>	BTH_I3175-BTH_I3182	chemotaxis protein methyltransferase CheR		3,3
BTH_I3184	<i>motB</i>	BTH_I3183-BTH_I3185	flagellar motor protein MotB		3,9
BTH_I3185	<i>motA</i>	BTH_I3183-BTH_I3185	flagellar motor protein MotA		4,8
BTH_I3186	<i>flhC</i>		transcriptional activator FlhC	4,9	5,8
BTH_I3187	<i>flhD</i>		transcriptional activator FlhD	5,8	9,0
BTH_I3188			group 1 family glycosyl transferase	-3,4	-4,3
BTH_I3189	<i>hns</i>		H-NS histone family protein	-4,3	-6,5
BTH_I3190	<i>aqpZ</i>		aquaporin Z	-4,5	-9,2
BTH_I3195	<i>rpsU</i>		30S ribosomal protein S21	7,9	10,3
BTH_I3196	<i>fliC</i>		flagellin		3,5
BTH_I3197	<i>fliD</i>	BTH_I3197-BTH_I3198	flagellar hook-associated protein 2		3,4
BTH_I3198		BTH_I3197-BTH_I3198	hypothetical protein		3,3
BTH_I3203		BTH_I3202-BTH_I3203	hypothetical protein	3,5	3,1
BTH_I3204		BTH_I3204-BTH_I3206	lipoprotein	25,7	19,2
BTH_I3205		BTH_I3204-BTH_I3206	hypothetical protein	33,4	22,7
BTH_I3206	<i>csgG</i>	BTH_I3204-BTH_I3206	curli production assembly/transport component CsgG	28,2	20,9
BTH_I3210		BTH_I3210-BTH_I3215	TPR domain-containing protein		7,4
BTH_I3211		BTH_I3210-BTH_I3215	aminotransferase		3,8
BTH_I3212	<i>wbnG</i>	BTH_I3210-BTH_I3215	WbnG		4,4
BTH_I3213		BTH_I3210-BTH_I3215	hypothetical protein		6,1
BTH_I3214		BTH_I3210-BTH_I3215	transferase		5,6
BTH_I3215		BTH_I3210-BTH_I3215	hypothetical protein		6,8
BTH_I3216			streptogramin acetyl transferase		17,7
BTH_I3219			chitin binding protein	-30,2	-15,2
BTH_I3226		BTH_I3225-BTH_I3226	hypothetical protein		-3,3
BTH_I3227		BTH_I3227-BTH_I3228	hypothetical protein		-3,1
BTH_I3228		BTH_I3227-BTH_I3228	PAAR motif-containing protein		-3,9
BTH_I3235	<i>yidC</i>	BTH_I3235-BTH_I3238	inner membrane protein translocase component YidC	6,1	6,3
BTH_I3236		BTH_I3235-BTH_I3238	hypothetical protein	4,4	5,6
BTH_I3237	<i>rnpA</i>	BTH_I3235-BTH_I3238	ribonuclease P protein component	7,8	9,6
BTH_I3238	<i>rpmH</i>	BTH_I3235-BTH_I3238	50S ribosomal protein L34	8,4	8,1
BTH_I3247	<i>acoD</i>		aldehyde dehydrogenase family protein	-5,2	-29,3

BTH_I3248	<i>eutR</i>		HTH-type transcriptional regulator <i>eutR</i>		-3,9
BTH_I3249		BTH_I3249-BTH_I3250	hypothetical protein	-3,0	
BTH_I3250	<i>ilvG</i>	BTH_I3249-BTH_I3250	thiamine pyrophosphate protein	-3,2	
BTH_I3252		BTH_I3251-BTH_I3252	hypothetical protein		3,1
BTH_I3253	<i>gcvP</i>		glycine dehydrogenase		5,6
BTH_I3260	<i>rep</i>		ATP-dependent DNA helicase <i>Rep</i>		3,2
BTH_I3261			cytochrome c family protein	-4,5	-11,5
BTH_I3265		BTH_I3265-BTH_I3266	hypothetical protein		-8,1
BTH_I3267			hypothetical protein		-4,9
BTH_I3281	<i>eutC</i>	BTH_I3281-BTH_I3283	ethanolamine ammonia-lyase small subunit	-5,1	-7,1
BTH_I3282	<i>eutB</i>	BTH_I3281-BTH_I3283	ethanolamine ammonia-lyase large subunit	-4,5	-7,0
BTH_I3283		BTH_I3281-BTH_I3283	ethanolamine transporter	-3,4	-5,5
BTH_I3284			acyltransferase family protein	-13,1	-30,8
BTH_I3286		BTH_I3285-BTH_I3286	hypothetical protein	-18,4	-28,0
BTH_I3287			hypothetical protein	-3,5	-3,3
BTH_I3294		BTH_I3293-BTH_I3295	lysine-arginine-ornithine-binding periplasmic protein		-3,2
BTH_I3302			hypothetical protein		-7,1
BTH_I3307	<i>atpC</i>		F0F1 ATP synthase subunit epsilon	3,5	4,3
BTH_I3308	<i>atpD</i>	BTH_I3308-BTH_I3310	F0F1 ATP synthase subunit beta	4,5	4,8
BTH_I3309	<i>atpG</i>	BTH_I3308-BTH_I3310	F0F1 ATP synthase subunit gamma	4,5	4,1
BTH_I3310	<i>atpA</i>	BTH_I3308-BTH_I3310	F0F1 ATP synthase subunit alpha	6,0	4,6
BTH_I3311	<i>atpH</i>	BTH_I3311-BTH_I3312	F0F1 ATP synthase subunit delta	7,7	5,2
BTH_I3312	<i>atpF</i>	BTH_I3311-BTH_I3312	F0F1 ATP synthase subunit B	7,1	5,0
BTH_I3313	<i>atpE</i>		F0F1 ATP synthase subunit C	7,0	7,2
BTH_I3314	<i>atpB</i>		F0F1 ATP synthase subunit A	6,4	6,8
BTH_I3322		BTH_I3321-BTH_I3323	branched-chain amino acid ABC transporter permease/ATP-binding protein		-5,7
BTH_I3323		BTH_I3321-BTH_I3323	branched-chain amino acid ABC transporter permease		-6,4
BTH_I3324			branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	-4,8	-8,8
BTH_I3327		BTH_I3327-BTH_I3328	branched-chain amino acid ABC transporter permease	-17,2	-25,4
BTH_I3328		BTH_I3327-BTH_I3328	branched-chain amino acid ABC transporter permease	-30,2	-63,6
BTH_I3329			branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	-52,5	-82,1

BTH_I3330	BTH_I3330-BTH_I3331	branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-33,4	-27,8
BTH_I3331	BTH_I3330-BTH_I3331	branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-39,2	-22,9
BTH_I3332		GMC family oxidoreductase	-3,1	-4,1
BTH_I3333	<i>mmsA1</i>	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase		-3,0
BTH_I3335		adenylate cyclase		-3,1
BTH_I3345		tRNA-Leu	4,7	4,6
BTH_II0009		YceI like family protein	-3,4	
BTH_II0011	BTH_II0010-BTH_II0011	hypothetical protein	-4,1	
BTH_II0019	BTH_II0018-BTH_II0020	3-hydroxybutyrate dehydrogenase		-3,7
BTH_II0027		hypothetical protein	-26,7	-30,3
BTH_II0028		hypothetical protein	-60,1	-69,2
BTH_II0029	BTH_II0029-BTH_II0031	hypothetical protein	-33,4	-24,6
BTH_II0030	BTH_II0029-BTH_II0031	radical SAM domain/B12 binding domain-containing protein	-15,6	-11,7
BTH_II0031	BTH_II0029-BTH_II0031	hypothetical protein	-4,8	
BTH_II0035		Crp/FNR family transcriptional regulator		3,4
BTH_II0036		universal stress protein	-4,0	
BTH_II0038	BTH_II0037-BTH_II0038	aldehyde dehydrogenase	-9,8	-5,1
BTH_II0039		hypothetical protein	-5,9	-4,1
BTH_II0040	BTH_II0040-BTH_II0041	hypothetical protein	-6,2	-6,7
BTH_II0041	BTH_II0040-BTH_II0041	serine O-acetyltransferase	-3,9	-3,4
BTH_II0044	BTH_II0042-BTH_II0044	LysR family transcriptional regulator	-4,2	-3,7
BTH_II0045	<i>pobA</i>	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	-4,2	-4,2
BTH_II0046	<i>pcaI</i> BTH_II0046-BTH_II0050	3-oxoadipate CoA-transferase subunit alpha	-11,6	-15,2
BTH_II0047	<i>pcaJ</i> BTH_II0046-BTH_II0050	3-oxoadipate CoA-succinyl transferase subunit beta	-11,8	-16,3
BTH_II0048	<i>pcaB</i> BTH_II0046-BTH_II0050	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	-8,9	-11,5
BTH_II0049	BTH_II0046-BTH_II0050	3-oxoadipate enol-lactone hydrolase/4-carboxymuconolactone decarboxylase	-12,0	-17,9
BTH_II0050	<i>pcaC</i> BTH_II0046-BTH_II0050	4-carboxymuconolactone decarboxylase	-10,6	-19,1
BTH_II0051	<i>pcaK</i>	4-hydroxybenzoate transporter	-12,9	-30,2
BTH_II0052		hypothetical protein	-8,0	-8,3
BTH_II0053		LysE family protein	-5,1	-5,9

BTH_II0054	BTH_II0054-BTH_II0055	thioredoxin	-4,2	-3,8
BTH_II0055	BTH_II0054-BTH_II0055	sulfide:quinone oxidoreductase	-7,3	-3,4
BTH_II0056	BTH_II0056-BTH_II0059	porin (omp) ABC transporter protein	-6,6	
BTH_II0057	BTH_II0056-BTH_II0059	hypothetical protein	-10,0	
BTH_II0058	BTH_II0056-BTH_II0059	AcrB/AcrD/AcrF family transporter	-4,7	
BTH_II0059	BTH_II0056-BTH_II0059	RND family efflux transporter MFP subunit	-12,4	
BTH_II0062	BTH_II0062-BTH_II0064	ABC transporter ATP-binding protein	-13,6	
BTH_II0063	BTH_II0062-BTH_II0064	permease domain-containing protein	-3,0	
BTH_II0064	BTH_II0062-BTH_II0064	RND family efflux transporter MFP subunit	-16,7	
BTH_II0065		creA protein	-6,3	
BTH_II0066	BTH_II0066-BTH_II0068	hypothetical protein	-6,6	
BTH_II0067	<i>cybP</i> BTH_II0066-BTH_II0068	CybP	-6,4	
BTH_II0069		cation efflux family protein	-3,7	
BTH_II0077		hypothetical protein	-4,1	-4,3
BTH_II0080		transposase subunit	-3,2	
BTH_II0083		acetyltransferase	-3,0	
BTH_II0084	BTH_II0084-BTH_II0086	putrescine ABC transporter permease	-5,8	-4,6
BTH_II0085	<i>potC</i> BTH_II0084-BTH_II0086	ABC transporter permease	-5,5	-5,5
BTH_II0086	BTH_II0084-BTH_II0086	putrescine ABC transporter periplasmic putrescine-binding protein	-5,2	-4,9
BTH_II0087		transposase	-3,3	-3,5
BTH_II0090	BTH_II0089-BTH_II0090	hypothetical protein		-3,4
BTH_II0091	BTH_II0091-BTH_II0092	hypothetical protein		-3,4
BTH_II0092	BTH_II0091-BTH_II0092	PAAR motif-containing protein		-4,1
BTH_II0098	BTH_II0097-BTH_II0098	PAAR motif-containing protein		-3,2
BTH_II0099	BTH_II0099-BTH_II0100	hypothetical protein	-5,2	-4,4
BTH_II0100	<i>trx</i> BTH_II0099-BTH_II0100	thioredoxin	-4,2	-3,6
BTH_II0101		putative lipoprotein	-3,5	-3,8
BTH_II0102		hypothetical protein	-4,1	-6,1
BTH_II0121	BTH_II0121-BTH_II0122	hypothetical protein	-3,6	
BTH_II0122	<i>tssC</i> BTH_II0121-BTH_II0122	hypothetical protein	-3,0	
BTH_II0134	<i>tssA</i> BTH_II0132-BTH_II0139	ImpA-like N-terminal family protein	-3,9	-5,8
BTH_II0135	<i>tssG</i> BTH_II0132-BTH_II0139	putative cytoplasmic protein	-4,0	-5,8

BTH_II0136	<i>tssF</i>	BTH_II0132-BTH_II0139	hypothetical protein	-5,5	-9,7
BTH_II0137	<i>tssE</i>	BTH_II0132-BTH_II0139	hypothetical protein	-8,7	-17,9
BTH_II0138	<i>tagJ</i>	BTH_II0132-BTH_II0139	ImpE protein superfamily protein	-13,2	-29,2
BTH_II0139	<i>tagK</i>	BTH_II0132-BTH_II0139	hypothetical protein	-11,7	-21,1
BTH_II0142			DNA-binding response regulator	-4,3	-4,2
BTH_II0163	<i>flhA</i>	BTH_II0163-BTH_II0169	flagellar biosynthesis protein FlhA		3,5
BTH_II0197			transcriptional regulator	-3,3	
BTH_II0198			DNA-binding response regulator		-4,3
BTH_II0204		BTH_II0204-BTH_II0206	peptide synthetase	-10,1	-10,9
BTH_II0205		BTH_II0204-BTH_II0206	hypothetical protein	-14,9	-19,1
BTH_II0206		BTH_II0204-BTH_II0206	hypothetical protein	-13,8	-16,8
BTH_II0207			hypothetical protein	-14,2	-30,0
BTH_II0208			GGDEF domain-containing protein	-9,5	-7,7
BTH_II0209			ribose ABC transporter periplasmic ribose-binding protein	-66,8	-225,0
BTH_II0210		BTH_II0210-BTH_II0212	ribose ABC transporter permease	-49,7	-159,3
BTH_II0211		BTH_II0210-BTH_II0212	ribose ABC transporter ATP-binding protein	-66,3	-101,5
BTH_II0212		BTH_II0210-BTH_II0212	transcription regulator ROK family protein	-54,3	-38,6
BTH_II0213			glucan 1,4- a-glucosidase	-7,4	-9,1
BTH_II0216		BTH_II0216-BTH_II0217	major facilitator family transporter	-4,7	-43,4
BTH_II0217	<i>hipO</i>	BTH_II0216-BTH_II0217	hippurate hydrolase	-5,3	-112,6
BTH_II0218			LysR family transcriptional regulator		-3,8
BTH_II0219			hypothetical protein		-3,1
BTH_II0227			hypothetical protein	-5,0	-6,0
BTH_II0228			alpha-1,2-mannosidase family protein	-3,8	-14,3
BTH_II0229	<i>pvcA</i>	BTH_II0229-BTH_II0234	pyoverdine chromophore biosynthetic protein PvcA	-7,4	-6,7
BTH_II0230	<i>pvcB</i>	BTH_II0229-BTH_II0234	pyoverdine biosynthesis protein PvcB	-4,9	-4,3
BTH_II0233		BTH_II0229-BTH_II0234	quinone oxidoreductase		-3,0
BTH_II0237		BTH_II0237-BTH_II0239	hypothetical protein	-3,2	-3,7
BTH_II0238		BTH_II0237-BTH_II0239	pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit		-4,7
BTH_II0239		BTH_II0237-BTH_II0239	E2		-5,2
BTH_II0240			L-lactate dehydrogenase		-15,3
BTH_II0241			major facilitator family transporter		-8,6

BTH_Π0249	<i>fhA</i>		FHA domain-containing protein	-3,1	
BTH_Π0250	<i>tagI</i>		putative lipoprotein	-4,5	-4,6
BTH_Π0274		BTH_Π0274-BTH_Π0281	hypothetical protein	-5,2	-6,0
BTH_Π0275		BTH_Π0274-BTH_Π0281	comA operon protein 2	-6,8	-9,3
BTH_Π0276		BTH_Π0274-BTH_Π0281	AMP-binding domain-containing protein	-4,9	-4,7
BTH_Π0277		BTH_Π0274-BTH_Π0281	amidohydrolase	-6,7	-8,3
BTH_Π0278		BTH_Π0274-BTH_Π0281	JamB	-7,4	-11,3
BTH_Π0279		BTH_Π0274-BTH_Π0281	methoxy mycolic acid synthase 2	-6,7	-10,1
BTH_Π0280		BTH_Π0274-BTH_Π0281	polyketide synthase	-10,3	-13,8
BTH_Π0281		BTH_Π0274-BTH_Π0281	JamB	-11,4	-19,6
BTH_Π0283			isochorismatase family protein family	-3,4	
BTH_Π0294			putative transcription regulator protein	-3,2	
BTH_Π0295		BTH_Π0295-BTH_Π0296	EmrB/QacA family drug resistance transporter	-3,7	-3,6
BTH_Π0296		BTH_Π0295-BTH_Π0296	hypothetical protein	-4,4	-3,6
BTH_Π0300			hypothetical protein		-3,3
BTH_Π0301			UbiE/COQ5 family methyltransferase	-4,0	-5,4
BTH_Π0302		BTH_Π0302-BTH_Π0308	hypothetical protein	-8,8	-15,4
BTH_Π0303		BTH_Π0302-BTH_Π0308	hypothetical protein	-5,3	-7,0
BTH_Π0304		BTH_Π0302-BTH_Π0308	ThiS domain-containing protein	-8,0	-10,5
BTH_Π0305		BTH_Π0302-BTH_Π0308	isovaleryl-CoA dehydrogenase	-6,9	-7,0
BTH_Π0306		BTH_Π0302-BTH_Π0308	hypothetical protein	-7,7	-8,4
BTH_Π0307		BTH_Π0302-BTH_Π0308	carbohydrate kinase	-9,0	-9,6
BTH_Π0309			sphingosine-1-phosphate lyase	-4,0	-3,6
BTH_Π0310			antifungal protein	-15,1	-14,0
BTH_Π0311			sphingosine-1-phosphate lyase	-8,6	-7,6
BTH_Π0317			LuxR family DNA-binding response regulator		-3,5
BTH_Π0335		BTH_Π0334-BTH_Π0335	AraC family transcriptional regulator		3,1
BTH_Π0379	<i>mprA</i>	BTH_Π0379-BTH_Π0380	serine metalloprotease		-6,9
BTH_Π0380		BTH_Π0379-BTH_Π0380	x-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase		-6,7
BTH_Π0392			signal peptide protein	-3,4	
BTH_Π0394			exopolysaccharide tyrosine-protein kinase		-7,9
BTH_Π0395		BTH_Π0395-BTH_Π0396	hypothetical protein		-16,0
BTH_Π0396		BTH_Π0395-BTH_Π0396	hypothetical protein		-14,5

BTH_II0399		serine protease		-8,5
BTH_II0401		GGDEF domain-containing protein		7,0
BTH_II0402	BTH_II0402-BTH_II0404	alpha/beta fold family hydrolase	-3,0	
BTH_II0403	BTH_II0402-BTH_II0404	arylesterase/monooxygenase		-3,2
BTH_II0407	BTH_II0407-BTH_II0408	glutathione S-transferase	-4,5	-3,6
BTH_II0414		OsmY domain-containing protein	-8,9	
BTH_II0415		6-phosphofructokinase	-6,9	
BTH_II0416	<i>ackA</i> BTH_II0416-BTH_II0418	acetate kinase	-17,7	
		bifunctional enoyl-CoA hydratase/phosphate		
BTH_II0417	BTH_II0416-BTH_II0418	acetyltransferase	-22,8	
BTH_II0418	<i>phbC</i> BTH_II0416-BTH_II0418	poly-beta-hydroxybutyrate polymerase	-18,4	
BTH_II0419	<i>atpD</i> BTH_II0419-BTH_II0427	F0F1 ATP synthase subunit beta	-12,2	
BTH_II0420	BTH_II0419-BTH_II0427	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	-13,4	
BTH_II0421	BTH_II0419-BTH_II0427	ATP synthase gene 1	-11,9	
BTH_II0422	BTH_II0419-BTH_II0427	putative lipoprotein	-12,2	
BTH_II0423	<i>atpB</i> BTH_II0419-BTH_II0427	F0F1 ATP synthase subunit A	-12,7	3,6
BTH_II0424	BTH_II0419-BTH_II0427	F0F1 ATP synthase subunit C	-15,5	3,1
BTH_II0425	BTH_II0419-BTH_II0427	ATP synthase F0 subunit B	-11,4	3,3
BTH_II0426	<i>atpA</i> BTH_II0419-BTH_II0427	F0F1 ATP synthase subunit alpha	-12,0	3,1
BTH_II0427	<i>atpG</i> BTH_II0419-BTH_II0427	ATP synthase F1 subunit gamma	-14,9	
BTH_II0428	<i>adhA</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	-18,3	
BTH_II0429		hypothetical protein	-10,1	
BTH_II0436	BTH_II0435-BTH_II0436	IS4 family transposase	-3,2	
BTH_II0437	BTH_II0437-BTH_II0440	ABC transporter permease	-9,8	
		RND efflux system, cytoplasmic membrane extrusion protein		
BTH_II0438	BTH_II0437-BTH_II0440		-17,2	
BTH_II0439	BTH_II0437-BTH_II0440	Type I antifreeze protein:HlyD family secretion protein	-18,9	
BTH_II0440	BTH_II0437-BTH_II0440	Type I antifreeze protein:HlyD family secretion protein	-8,9	
BTH_II0441	BTH_II0441-BTH_II0447	TetR family transcriptional regulator	-6,4	3,1
BTH_II0442	BTH_II0441-BTH_II0447	universal stress protein	-8,8	3,1
BTH_II0443	BTH_II0441-BTH_II0447	hypothetical protein	-8,9	
BTH_II0444	BTH_II0441-BTH_II0447	ABC transporter permease	-7,3	3,0
BTH_II0445	BTH_II0441-BTH_II0447	ABC transporter ATP-binding protein	-8,4	3,1
BTH_II0446	BTH_II0441-BTH_II0447	membrane protein	-8,1	4,6

BTH_II0447	BTH_II0441-BTH_II0447	RND efflux system outer membrane lipoprotein	-10,9	3,9
BTH_II0449	BTH_II0449-BTH_II0452	methyl-accepting chemotaxis protein		3,5
BTH_II0450	BTH_II0449-BTH_II0452	adenylylsulfate kinase		7,7
BTH_II0451	BTH_II0449-BTH_II0452	hypothetical protein		4,6
BTH_II0452	BTH_II0449-BTH_II0452	sulfotransferase domain-containing protein	-4,0	
BTH_II0453		OsmY domain-containing protein	-25,7	
BTH_II0454		decarboxylase family protein	-12,8	
BTH_II0456	BTH_II0456-BTH_II0457	hypothetical protein	-19,7	
BTH_II0457	BTH_II0456-BTH_II0457	cytochrome c family protein	-14,6	
BTH_II0458	BTH_II0458-BTH_II0459	hypothetical protein	-15,7	
BTH_II0459	BTH_II0458-BTH_II0459	zinc-containing alcohol dehydrogenase	-24,1	
BTH_II0460		Crp/FNR family transcriptional regulator	-23,2	-6,1
BTH_II0461		acetoacetyl-CoA reductase	-34,0	-7,9
BTH_II0462		metallo-beta-lactamase family protein	-12,6	
BTH_II0479	BTH_II0479-BTH_II0482	ubiquinol oxidase, subunit II		35,3
BTH_II0480	BTH_II0479-BTH_II0482	ubiquinol oxidase, subunit I		20,7
BTH_II0481	BTH_II0479-BTH_II0482	ubiquinol oxidase, subunit III		6,1
BTH_II0482	<i>cyoD</i> BTH_II0479-BTH_II0482	ubiquinol oxidase, subunit IV		3,8
BTH_II0483	<i>catC</i> BTH_II0483-BTH_II0485	muconolactone delta-isomerase	-24,1	-24,8
BTH_II0484	BTH_II0483-BTH_II0485	catechol 1,2-dioxygenase	-40,2	-38,1
BTH_II0485	<i>catB</i> BTH_II0483-BTH_II0485	muconate cycloisomerase	-28,8	-29,7
BTH_II0487		AraC family transcriptional regulator	-5,2	-6,0
BTH_II0488	<i>ohbB</i> BTH_II0488-BTH_II0491	ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase alpha-ISP protein		
		OhbB	-6,5	-23,5
BTH_II0489	<i>ohbA</i> BTH_II0488-BTH_II0491	ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase beta-ISP protein		
		OhbA	-6,3	-33,6
BTH_II0490	BTH_II0488-BTH_II0491	Rieske family iron-sulfur cluster-binding protein	-4,2	-23,4
BTH_II0491	BTH_II0488-BTH_II0491	ferredoxin reductase	-3,6	-12,8
BTH_II0508		voltage-gated chloride channel		3,3
BTH_II0509	BTH_II0509-BTH_II0510	CAAX amino terminal protease family protein	3,5	4,0
BTH_II0530	BTH_II0530-BTH_II0531	putative lipoprotein	-4,3	-4,2
BTH_II0531	BTH_II0530-BTH_II0531	hypothetical protein	-7,0	-10,3
BTH_II0532		extracellular nuclease	-4,7	-6,6
BTH_II0533		DGPF domain-containing protein	-4,5	-4,2

BTH_II0534	BTH_II0534-BTH_II0535	DGPF domain-containing protein	-6,4	-5,1
BTH_II0535	BTH_II0534-BTH_II0535	hypothetical protein	-6,8	-5,4
BTH_II0536		ECF subfamily RNA polymerase sigma factor <i>N</i> -acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain- containing protein	-5,6	-5,3
BTH_II0537			-4,0	-6,5
BTH_II0538	BTH_II0538-BTH_II0540	rubrerythrin	-11,7	-12,1
BTH_II0539	BTH_II0538-BTH_II0540	hypothetical protein	-5,9	-9,5
BTH_II0540	BTH_II0538-BTH_II0540	hypothetical protein	-5,3	-8,3
BTH_II0541		hypothetical protein	-9,1	-12,5
BTH_II0542	<i>bceA</i>	mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6- phosphate isomerase	-17,9	-27,5
BTH_II0543	<i>bceB</i> BTH_II0543-BTH_II0552	hypothetical protein	-21,2	-26,4
BTH_II0545	<i>bceD</i> BTH_II0543-BTH_II0552	low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase wzb capsular polysaccharide biosynthesis/export periplasmic protein	-11,7	-14,8
BTH_II0546	<i>bceE</i> BTH_II0543-BTH_II0552		-14,9	-15,8
BTH_II0547	<i>bceF</i> BTH_II0543-BTH_II0552	exopolysaccharide tyrosine-protein kinase	-17,1	-22,5
BTH_II0548	<i>bceG</i> BTH_II0543-BTH_II0552	group 2 family glycosyl transferase	-14,9	-16,7
BTH_II0549	<i>bceH</i> BTH_II0543-BTH_II0552	hypothetical protein	-14,4	-15,4
BTH_II0550	<i>bceI</i> BTH_II0543-BTH_II0552	hypothetical protein	-6,6	-7,2
BTH_II0551	<i>bceJ</i> BTH_II0543-BTH_II0552	glycosyltransferase	-8,3	-8,8
BTH_II0552	BTH_II0543-BTH_II0552	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-4,0	
BTH_II0558		serine/threonine protein phosphatase 1	-4,4	-4,7
BTH_II0561	BTH_II0560-BTH_II0561	ArsR family transcriptional regulator	-3,4	-3,6
BTH_II0562	BTH_II0562-BTH_II0563	BarD		-10,3
BTH_II0563	BTH_II0562-BTH_II0563	peptide synthetase		-14,9
BTH_II0564	BTH_II0564-BTH_II0572	BarB2		-18,9
BTH_II0565	BTH_II0564-BTH_II0572	BarC		-13,2
BTH_II0566	BTH_II0564-BTH_II0572	demethylmenaquinone methyltransferase		-5,8
BTH_II0567	<i>ilvE</i> BTH_II0564-BTH_II0572	branched-chain amino acid aminotransferase		-10,1
BTH_II0568	BTH_II0564-BTH_II0572	BarC		-10,7
BTH_II0569	<i>mhpF</i> BTH_II0564-BTH_II0572	acetaldehyde dehydrogenase		-6,2
BTH_II0570	<i>mhpE</i> BTH_II0564-BTH_II0572	4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase		-9,3
BTH_II0571	<i>kdgF</i> BTH_II0564-BTH_II0572	pectin degradation protein kdgF		-8,5
BTH_II0572	BTH_II0564-BTH_II0572	LysE family protein		-6,3

BTH_II0575	BTH_II0573-BTH_II0575	hypothetical protein	-4,6	-5,3
BTH_II0576		AraC family transcriptional regulator	-3,3	-3,4
BTH_II0577		hypothetical protein	-4,9	-30,6
BTH_II0578		hypothetical protein	-5,7	-22,2
BTH_II0579		FMN-dependent dehydrogenase	-3,6	-7,4
BTH_II0582		alpha amylase family protein	-3,7	-3,4
BTH_II0586	BTH_II0586-BTH_II0587	hypothetical protein		3,2
BTH_II0596		hypothetical protein	8,2	4,9
BTH_II0597		organic hydroperoxide resistance protein		-3,1
BTH_II0600	<i>thrB</i> BTH_II0599-BTH_II0600	homoserine kinase		3,4
BTH_II0608	BTH_II0607-BTH_II0608	hypothetical protein	-3,2	
BTH_II0611		Rieske family iron-sulfur cluster-binding protein	4,0	4,9
BTH_II0613	BTH_II0612-BTH_II0615	geranyltranstransferase		3,1
BTH_II0614	<i>dxs</i> BTH_II0612-BTH_II0615	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase		3,0
BTH_II0615	BTH_II0612-BTH_II0615	putative GTP cyclohydrolase	5,6	7,2
BTH_II0616	<i>gcp</i>	putative DNA-binding/iron metalloprotein/AP endonuclease	3,1	4,5
BTH_II0626		acyltransferase	-32,1	-30,7
BTH_II0627		hypothetical protein	-192,5	-61,9
BTH_II0628	BTH_II0628-BTH_II0630	cytosine/purines/uracil/thiamine/allantoin permease family protein	-5,5	-5,4
BTH_II0629	BTH_II0628-BTH_II0630	NAD-dependent deacetylase	-4,2	-4,3
BTH_II0630	BTH_II0628-BTH_II0630	hypothetical protein	-5,5	-5,6
BTH_II0637	BTH_II0637-BTH_II0638	hypothetical protein		3,4
BTH_II0638	BTH_II0637-BTH_II0638	TonB-dependent copper receptor	3,6	11,9
BTH_II0639	BTH_II0639-BTH_II0640	lipase	-15,6	-12,2
BTH_II0640	BTH_II0639-BTH_II0640	lipase chaperone	-7,0	-3,9
BTH_II0642	BTH_II0642-BTH_II0643	spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding protein	-19,3	-41,1
BTH_II0643	BTH_II0642-BTH_II0643	spermidine/putrescine ABC transporter periplasmic		
BTH_II0644	BTH_II0644-BTH_II0645	spermidine/putrescine-binding protein	-25,6	-75,5
BTH_II0645	BTH_II0644-BTH_II0645	spermidine/putrescine ABC transporter permease	-18,7	-40,6
BTH_II0648	BTH_II0644-BTH_II0645	polyamine ABC transporter permease	-12,3	-22,1
		hypothetical protein	-3,4	-8,4

BTH_II0652		cytochrome c family protein	-4,0	
BTH_II0660	BTH_II0660-BTH_II0665	succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit	3,8	3,3
		succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane		
BTH_II0661	BTH_II0660-BTH_II0665	anchor protein	3,3	3,1
BTH_II0662	<i>sdhA</i> BTH_II0660-BTH_II0665	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	3,2	3,1
BTH_II0663	<i>sdhB</i> BTH_II0660-BTH_II0665	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit		3,1
BTH_II0665	<i>gltA</i> BTH_II0660-BTH_II0665	type II citrate synthase		3,1
BTH_II0689	BTH_II0689-BTH_II0691	GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase	-4,6	-4,5
BTH_II0690	<i>bceN</i> BTH_II0689-BTH_II0691	GDP-mannose 4,6-dehydratase	-5,6	-5,9
BTH_II0691	<i>bceO</i> BTH_II0689-BTH_II0691	acyltransferase family protein	-14,1	-20,3
BTH_II0693	<i>bceP</i> BTH_II0693-BTH_II0696	hypothetical protein	-23,2	-29,1
BTH_II0694	<i>bceQ</i> BTH_II0693-BTH_II0696	polysaccharide biosynthesis family protein	-13,2	-13,0
BTH_II0695	<i>bceR</i> BTH_II0693-BTH_II0696	group 1 family glycosyl transferase	-8,8	-11,2
BTH_II0697	<i>bceS</i>	O-antigen acetylase	-11,6	-16,0
BTH_II0698	<i>bceT</i>	hypothetical protein	-44,5	-63,6
BTH_II0699	<i>bceU</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-7,0	-6,3
BTH_II0700		acyltransferase family protein	-4,4	-4,0
BTH_II0717	BTH_II0716-BTH_II0717	transposase	-3,3	-3,2
BTH_II0718		hypothetical protein	-45,8	-108,9
BTH_II0719		streptavidin	-29,0	-39,2
BTH_II0720		hypothetical protein		-4,9
BTH_II0721		glutamyl-tRNA	-8,7	-16,0
BTH_II0722		hypothetical protein	-19,8	-350,6
BTH_II0723	<i>bglB</i>	beta-glucosidase	-5,7	-8,2
BTH_II0725	BTH_II0725-BTH_II0726	cytochrome P450	-8,3	-8,1
BTH_II0726	BTH_II0725-BTH_II0726	4-hydroxybenzoate transporter	-7,3	-21,6
BTH_II0727		patatin-like phospholipase	-11,6	-59,5
BTH_II0728	BTH_II0728-BTH_II0730	hypothetical protein	-5,5	-29,6
BTH_II0729	BTH_II0728-BTH_II0730	hypothetical protein		-9,3
BTH_II0730	BTH_II0728-BTH_II0730	lectin repeat-containing protein		-7,5
BTH_II0731	BTH_II0731-BTH_II0733	response regulator	-7,1	-3,4
BTH_II0732	BTH_II0731-BTH_II0733	hypothetical protein	-8,1	-6,7
BTH_II0733	BTH_II0731-BTH_II0733	sensory box sensor histidine kinase	-4,1	-4,0

BTH_Π0745	<i>hrpB</i>	BTH_Π0742-BTH_Π0749	type III secretion system protein HrpB	6,1	
BTH_Π0747		BTH_Π0742-BTH_Π0749	lipoprotein transmembrane protein	3,4	
BTH_Π0769	<i>pilN</i>	BTH_Π0769-BTH_Π0773	type IV pilus biogenesis protein PilN	6,4	5,0
BTH_Π0770	<i>pilO</i>	BTH_Π0769-BTH_Π0773	pilO family protein	5,8	4,5
BTH_Π0771		BTH_Π0769-BTH_Π0773	hypothetical protein	4,6	3,7
BTH_Π0772	<i>pilQ</i>	BTH_Π0769-BTH_Π0773	type II/IV secretion system protein	4,2	3,3
BTH_Π0773		BTH_Π0769-BTH_Π0773	type IV pilus biogenesis protein	3,7	3,2
BTH_Π0774		BTH_Π0774-BTH_Π0776	type IV pilus biogenesis protein	3,1	
BTH_Π0775		BTH_Π0774-BTH_Π0776	hypothetical protein	3,3	
BTH_Π0776		BTH_Π0774-BTH_Π0776	type IV prepilin	3,6	3,5
BTH_Π0778			hypothetical protein		-9,2
BTH_Π0783			hypothetical protein		-3,5
BTH_Π0786			hypothetical protein	-9,9	
BTH_Π0787		BTH_Π0787-BTH_Π0788	ATP-dependent protease	-6,0	
BTH_Π0788		BTH_Π0787-BTH_Π0788	hypothetical protein	-5,1	
BTH_Π0790			hypothetical protein	13,9	21,4
BTH_Π0791		BTH_Π0791-BTH_Π0793	cellulose synthase regulator protein	16,2	19,0
BTH_Π0792		BTH_Π0791-BTH_Π0793	endo-1,4-D-glucanase	24,1	24,7
BTH_Π0793		BTH_Π0791-BTH_Π0793	cellulose synthase operon protein C	14,2	18,8
BTH_Π0794		BTH_Π0794-BTH_Π0798	hypothetical protein	5,2	8,3
BTH_Π0795		BTH_Π0794-BTH_Π0798	hypothetical protein	5,3	10,2
BTH_Π0796		BTH_Π0794-BTH_Π0798	cellulose biosynthesis protein	4,9	8,8
BTH_Π0797		BTH_Π0794-BTH_Π0798	group 2 family glycosyl transferase	4,6	7,8
BTH_Π0798		BTH_Π0794-BTH_Π0798	hypothetical protein		4,4
BTH_Π0799	<i>tauD</i>		taurine dioxygenase	4,4	7,3
BTH_Π0804	<i>btaI3</i>		<i>N</i> -acyl homoserine lactone synthase		-42,4
BTH_Π0805	<i>btaR3</i>		LuxR family transcriptional regulator		-3,3
BTH_Π0812			serine-type carboxypeptidase family protein	-4,4	-7,9
BTH_Π0813			FMN-dependent family dehydrogenase		-4,6
BTH_Π0816			thermolysin metalloproteinase	-3,1	-7,6
BTH_Π0821	<i>orgB</i>	BTH_Π0821-BTH_Π0826	oxygen-regulated invasion protein OrgB	3,5	
BTH_Π0822	<i>orgA</i>	BTH_Π0821-BTH_Π0826	oxygen-regulated invasion protein OrgA	4,2	3,1
BTH_Π0823	<i>bsaJ</i>	BTH_Π0821-BTH_Π0826	type III secretion system BasJ	8,2	5,0

BTH_II0824	<i>bsaK</i>	BTH_II0821-BTH_II0826	type III secretion system protein BsaK	10,9	6,3
BTH_II0825	<i>bsaL</i>	BTH_II0821-BTH_II0826	type III secretion system needle protein	13,5	9,8
BTH_II0826	<i>bsaM</i>	BTH_II0821-BTH_II0826	type III secretion system protein BsaM	15,1	11,1
BTH_II0827	<i>bsaN</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	type III secretion system transcriptional regulator BsaN	17,0	12,0
BTH_II0828	<i>bsaO</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	type III secretion system protein BsaO	13,0	9,0
BTH_II0829	<i>bsaP</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	type III secretion system protein BsaP	11,3	7,0
BTH_II0830	<i>bsaQ</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	type III secretion system protein BsaQ	5,3	3,4
BTH_II0831	<i>bsaR</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	type III secretion system protein BsaR	6,4	3,6
BTH_II0832	<i>bsaS</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	ATP synthase SpaL	9,4	5,9
BTH_II0833	<i>bsaT</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	surface presentation of antigens protein	4,9	3,9
BTH_II0834	<i>bsaU</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	BsaU protein	12,2	6,5
BTH_II0835	<i>bsaV</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	type III secretion system protein BsaV	6,7	3,9
BTH_II0836	<i>bsaW</i>	BTH_II0827-BTH_II0836	surface presentation of antigens protein SpaP	6,2	3,3
BTH_II0837	<i>bsaX</i>	BTH_II0837-BTH_II0839	type III secretion system protein BsaX	3,4	
BTH_II0838	<i>bsaY</i>	BTH_II0837-BTH_II0839	type III secretion system protein BsaY	7,9	5,3
BTH_II0839	<i>bsaZ</i>	BTH_II0837-BTH_II0839	surface presentation of antigens protein SpaS	8,4	5,9
BTH_II0840	<i>bicA</i>	BTH_II0840-BTH_II0842	type III secretion chaperone BicA	8,8	3,9
BTH_II0841	<i>bipB</i>	BTH_II0840-BTH_II0842	BipB protein	7,0	
BTH_II0842	<i>bipC</i>	BTH_II0840-BTH_II0842	type III secretion target BipC	5,2	
BTH_II0843	<i>bprA</i>		DNA-binding protein BprA	6,0	
BTH_II0844	<i>bipD</i>	BTH_II0844-BTH_II0847	BprD protein	4,4	
BTH_II0845		BTH_II0844-BTH_II0847	hypothetical protein	4,4	
BTH_II0847	<i>bapC</i>	BTH_II0844-BTH_II0847	BapC protein	3,4	
BTH_II0848	<i>bopE</i>		type III secretion target BopE	4,3	
BTH_II0849	<i>bopA</i>		BopA protein	3,6	
BTH_II0850	<i>bicP</i>		type III secretion chaperone BicP	4,5	
BTH_II0852	<i>bprD</i>		hypothetical protein	4,2	
BTH_II0853	<i>bprC</i>		AraC family transcriptional regulator	4,8	
BTH_II0854			ubiquitin-specific proteinase 31	4,1	
BTH_II0874			hypothetical protein	6,1	
BTH_II0876			hypothetical protein	4,0	
BTH_II0877			<i>N</i> -acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain-containing protein	8,6	

BTH_II0895	BTH_II0895-BTH_II0898	hypothetical protein	-3,9	-7,7
BTH_II0896	BTH_II0895-BTH_II0898	aminotransferase family protein		-5,4
BTH_II0898	BTH_II0895-BTH_II0898	piperideine-6-carboxylate dehydrogenase PTS system, glucose-specific EIIA/HPr/phosphoenolpyruvate-protein		-4,1
BTH_II0906	BTH_II0906-BTH_II0908	phosphotransferase components	-3,2	-4,7
BTH_II0907	<i>pfkB</i> BTH_II0906-BTH_II0908	1-phosphofructokinase		-5,7
BTH_II0908	BTH_II0906-BTH_II0908	protein-N p-phosphohistidine-sugar phosphotransferase		-6,0
BTH_II0909		acetyltransferase		-3,2
BTH_II0912	BTH_II0911-BTH_II0912	hypothetical protein		4,5
BTH_II0916	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL	-3,1	
BTH_II0917		hypothetical protein	-7,9	
BTH_II0918		ribose-phosphate pyrophosphokinase	-7,0	
BTH_II0919	<i>nadE</i>	NAD synthetase	-5,3	
BTH_II0920		CBS domain-containing protein	-31,8	
BTH_II0921	BTH_II0921-BTH_II0922	hypothetical protein	-32,4	
BTH_II0922	<i>ald</i> BTH_II0921-BTH_II0922	alanine dehydrogenase	-16,7	
BTH_II0923		hypothetical protein	-15,4	
BTH_II0924		heat shock protein	-40,0	
BTH_II0926		hypothetical protein	-3,5	
BTH_II0927	BTH_II0927-BTH_II0931	acetyl-CoA synthetase	-11,0	
BTH_II0928	BTH_II0927-BTH_II0931	pyruvate dehydrogenase, E1 component subunit alpha pyruvate dehydrogenase complex, E1 component,	-15,8	
BTH_II0929	BTH_II0927-BTH_II0931	pyruvate dehydrogenase subunit beta branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit	-8,1	
BTH_II0930	BTH_II0927-BTH_II0931	E2	-3,8	
BTH_II0940	BTH_II0940-BTH_II0941	glycogen synthase	-9,9	
BTH_II0941	BTH_II0940-BTH_II0941	glycogen phosphorylase family protein	-8,1	
BTH_II0942	BTH_II0942-BTH_II0943	hypothetical protein	-5,2	-3,8
BTH_II0943	BTH_II0942-BTH_II0943	AMP-binding domain-containing protein	-10,2	-3,0
BTH_II0944		multicopper oxidase domain-containing protein	-9,7	-9,7
BTH_II0945	<i>norB</i>	nitric oxide reductase	-9,6	-9,8
BTH_II0946		TetR family transcriptional regulator	-8,1	-4,6
BTH_II0947	BTH_II0947-BTH_II0949	isovaleryl-CoA dehydrogenase	-6,6	-4,4

BTH_II0948	BTH_II0947-BTH_II0949	carboxyl transferase domain-containing protein	-5,4	-4,8
BTH_II0949	BTH_II0947-BTH_II0949	enoyl-CoA hydratase	-5,9	-6,4
BTH_II0950		biotin carboxylase	-6,1	-9,0
BTH_II0951		hypothetical protein	-3,5	-4,5
BTH_II0956	BTH_II0956-BTH_II0957	hypothetical protein		-4,9
		glycine betaine/L-proline ABC transporter ATP-binding		
BTH_II0966	BTH_II0966-BTH_II0967	protein	-3,5	-5,5
BTH_II0967	BTH_II0966-BTH_II0967	glycine betaine/L-proline ABC transporter permease	-3,1	-5,6
BTH_II0978	BTH_II0974-BTH_II0978	GntR family transcriptional regulator	-6,2	
BTH_II0979		HAD-superfamily hydrolase	-3,3	
BTH_II0982		D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-3,2	-3,4
BTH_II0984		TRAP transporter DctM family protein	-4,3	-3,7
BTH_II0985		solute-binding family 7 protein	-10,3	-8,4
BTH_II0987		glutathione S-transferase P subunit	-3,1	-3,3
BTH_II1001	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21		4,2
BTH_II1002		cold-shock domain-contain protein		4,8
BTH_II1007	BTH_II1007-BTH_II1009	sensory box histidine kinase	-3,0	-4,0
BTH_II1008	BTH_II1007-BTH_II1009	response regulator	-4,6	-6,1
BTH_II1009	BTH_II1007-BTH_II1009	sensory box histidine kinase/response regulator	-4,8	-5,5
BTH_II1012	BTH_II1012-BTH_II1016	gp38		-4,1
BTH_II1015	BTH_II1012-BTH_II1016	gp41		-6,5
BTH_II1016	BTH_II1012-BTH_II1016	gp42		-3,2
BTH_II1017	BTH_II1017-BTH_II1018	bacteriophage/transposase fusion protein	-3,5	-5,9
BTH_II1018	BTH_II1017-BTH_II1018	phage protein		-3,7
BTH_II1020	BTH_II1019-BTH_II1021	gp56-like protein	-3,3	-5,2
BTH_II1021	BTH_II1019-BTH_II1021	gp49	-4,7	-8,7
BTH_II1027	BTH_II1027-BTH_II1030	gp65		-11,8
BTH_II1028	BTH_II1027-BTH_II1030	Mte8-like protein		-13,6
BTH_II1029	BTH_II1027-BTH_II1030	gp56		-8,4
BTH_II1030	BTH_II1027-BTH_II1030	gp57		-7,4
BTH_II1031	BTH_II1031-BTH_II1032	gp58		-4,5
BTH_II1032	BTH_II1031-BTH_II1032	gp69		-6,2
BTH_II1033	BTH_II1033-BTH_II1039	gp60		-5,6

BTH_II1034	BTH_II1033-BTH_II1039	gp72		-7,2
BTH_II1035	BTH_II1033-BTH_II1039	gp62		-3,5
BTH_II1038	BTH_II1033-BTH_II1039	gp65		-4,0
BTH_II1039	BTH_II1033-BTH_II1039	hypothetical protein		-3,0
BTH_II1043	BTH_II1043-BTH_II1047	hypothetical protein		-3,8
BTH_II1044	BTH_II1043-BTH_II1047	phage terminase large subunit		-3,8
BTH_II1045	BTH_II1043-BTH_II1047	head portal protein		-5,8
BTH_II1046	BTH_II1043-BTH_II1047	ClpP protease		-7,2
BTH_II1047	BTH_II1043-BTH_II1047	HK97 family phage major capsid protein		-4,9
BTH_II1049	BTH_II1048-BTH_II1059	hypothetical protein		-4,1
BTH_II1050	BTH_II1048-BTH_II1059	phage head-tail adaptor		-3,9
BTH_II1051	BTH_II1048-BTH_II1059	HK97 family phage protein		-8,9
BTH_II1052	BTH_II1048-BTH_II1059	gp10		-11,6
BTH_II1053	BTH_II1048-BTH_II1059	gp11		-11,7
BTH_II1054	BTH_II1048-BTH_II1059	phage tail assembly chaperone		-9,5
BTH_II1056	BTH_II1048-BTH_II1059	hypothetical protein		-4,6
BTH_II1058	BTH_II1048-BTH_II1059	hypothetical protein		-3,8
BTH_II1059	BTH_II1048-BTH_II1059	phage minor tail protein L		-4,1
BTH_II1060	BTH_II1060-BTH_II1067	hypothetical protein		-15,9
BTH_II1061	BTH_II1060-BTH_II1067	bacteriophage lambda tail assembly protein I		-24,0
BTH_II1062	BTH_II1060-BTH_II1067	host specificity protein J		-3,2
BTH_II1066	BTH_II1060-BTH_II1067	hypothetical protein		-4,1
BTH_II1068		DNA adenine methylase		-4,1
BTH_II1071	<i>obc1</i>	hypothetical protein	-72,3	-35,3
BTH_II1094	BTH_II1094-BTH_II1096	hydrolase	-7,7	-5,1
BTH_II1095	BTH_II1094-BTH_II1096	major facilitator family transporter	-5,8	-3,3
BTH_II1096	BTH_II1094-BTH_II1096	GntR family transcriptional regulator	-6,0	
BTH_II1097		major facilitator family transporter	-6,3	-4,2
BTH_II1098		HAD superfamily hydrolase	3,7	3,7
BTH_II1105		hypothetical protein	-3,0	
BTH_II1106		phosphoesterase family protein	-3,4	-3,8
BTH_II1110	BTH_II1110-BTH_II1112	SIS domain-containing protein	-8,4	-10,2
BTH_II1111	BTH_II1110-BTH_II1112	asparaginase family protein	-8,6	-12,5

BTH_III112	BTH_III110-BTH_III112	dipeptide ABC transporter ATP-binding protein	-7,0	-8,4
BTH_III113	BTH_III113-BTH_III117	dipeptide ABC transporter periplasmic dipeptide-binding protein	-10,0	-13,6
BTH_III114	BTH_III113-BTH_III117	dipeptide ABC transporter permease	-7,5	-14,2
BTH_III115	BTH_III113-BTH_III117	dipeptide ABC transporter permease	-7,0	-10,9
BTH_III116	BTH_III113-BTH_III117	D-aminopeptidase	-6,1	-10,0
BTH_III117	BTH_III113-BTH_III117	dipeptide transport protein	-5,4	-7,7
BTH_III118	BTH_III118-BTH_III119	protocatechuate 3,4-dioxygenase subunit alpha		-3,4
BTH_III127		GGDEF domain-containing protein	3,3	6,4
BTH_III128		hypothetical protein	4,7	
BTH_III129		amino acid permease	5,8	3,6
BTH_III133		hypothetical protein		3,6
BTH_III134	<i>ggt</i>	gamma-glutamyltransferase	-3,7	-6,4
BTH_III135	<i>tolC</i>	outer membrane protein TolC		-4,9
BTH_III136		hypothetical protein		-8,5
BTH_III137		hypothetical protein		-3,7
BTH_III138		ABC transporter permease protein/ATP-binding protein		-3,1
BTH_III139	BTH_III139-BTH_III141	hypothetical protein		-3,9
BTH_III140	BTH_III139-BTH_III141	secretion protein		-4,0
BTH_III141	BTH_III139-BTH_III141	putative lipoprotein		-5,0
BTH_III147	BTH_III147-BTH_III150	hypothetical protein	4,3	3,3
BTH_III148	BTH_III147-BTH_III150	hypothetical protein	4,9	4,0
BTH_III149	BTH_III147-BTH_III150	hypothetical protein	6,7	6,4
BTH_III150	BTH_III147-BTH_III150	hypothetical protein	6,2	9,3
BTH_III151		hypothetical protein		3,1
BTH_III159	BTH_III159-BTH_III160	ABC transporter periplasmic substrate-binding protein		-4,1
BTH_III161		LysR family transcriptional regulator	-5,9	-8,4
BTH_III162	BTH_III162-BTH_III164	major facilitator family transporter	-5,6	-11,9
BTH_III163	<i>amaB</i> BTH_III162-BTH_III164	allantoate amidohydrolase	-5,5	-13,0
BTH_III164	BTH_III162-BTH_III164	acetylpolymine aminohydrolase	-5,1	-10,3
BTH_III165		putative lipoprotein	-6,2	-20,3
BTH_III166	<i>nasS</i> BTH_III166-BTH_III168	regulatory protein NasS	-3,5	
BTH_III169	BTH_III169-BTH_III171	nitrate transporter		-7,5

BTH_II1170	<i>nirB</i>	BTH_II1169-BTH_II1171	nitrite reductase [NAD(P)H], large subunit		-18,2
BTH_II1171	<i>nirD</i>	BTH_II1169-BTH_II1171	nitrite reductase [NAD(P)H], small subunit		-52,7
BTH_II1172			nitrate reductase		-17,3
BTH_II1176		BTH_II1173-BTH_II1178	zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase		-3,2
BTH_II1185		BTH_II1183-BTH_II1187	metal ion efflux membrane fusion protein family	-3,3	
BTH_II1191		BTH_II1191-BTH_II1193	hypothetical protein	-4,1	-3,6
BTH_II1195		BTH_II1195-BTH_II1196	short chain dehydrogenase	-3,1	
BTH_II1196		BTH_II1195-BTH_II1196	L-arabinose ABC transporter periplasmic L-arabinose-binding protein	-3,7	-3,6
BTH_II1201		BTH_II1201-BTH_II1203	putative hydroxylase	7,1	6,0
BTH_II1202		BTH_II1201-BTH_II1203	hypothetical protein	6,6	5,4
BTH_II1203		BTH_II1201-BTH_II1203	outer membrane ferric siderophore receptor	6,9	6,9
BTH_II1204	<i>pyrB</i>		aspartate carbamoyltransferase		4,1
BTH_II1205			entericidin-like protein	3,1	
BTH_II1209		BTH_II1209-BTH_II1219	hypothetical protein	-274,2	-328,8
BTH_II1210		BTH_II1209-BTH_II1219	hypothetical protein	-123,4	-120,7
BTH_II1211		BTH_II1209-BTH_II1219	polyketide synthase	-61,7	-46,2
BTH_II1212		BTH_II1209-BTH_II1219	syringomycin biosynthesis enzyme	-47,6	-75,6
BTH_II1213		BTH_II1209-BTH_II1219	peptide synthetase-like protein	-37,6	-65,6
BTH_II1214		BTH_II1209-BTH_II1219	peptide synthetase	-29,2	-39,8
BTH_II1215		BTH_II1209-BTH_II1219	hypothetical protein	-34,8	-46,7
BTH_II1216		BTH_II1209-BTH_II1219	D-cysteine desulphydrase	-17,2	-27,2
BTH_II1217		BTH_II1209-BTH_II1219	luciferase family protein	-18,6	-30,3
BTH_II1218		BTH_II1209-BTH_II1219	AMP-binding domain-containing protein	-39,3	-65,2
BTH_II1219		BTH_II1209-BTH_II1219	phosphopantetheine attachment site domain-containing protein	-41,1	-75,5
BTH_II1220		BTH_II1220-BTH_II1221	IcIR family transcriptional regulator		-8,5
BTH_II1222			4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase		-26,1
BTH_II1223			hypothetical protein		-161,9
BTH_II1224	<i>btaA</i>		CmaB		-277,8
BTH_II1225	<i>btaC</i>		phosphopantetheine-containing protein		-389,2
BTH_II1226	<i>btaE</i>	BTH_II1226-BTH_II1228	peptide synthetase		-305,4
BTH_II1227	<i>btaI2</i>	BTH_II1226-BTH_II1228	N-acyl homoserine lactone synthase		-620,2
BTH_II1228	<i>rsaM2</i>	BTH_II1226-BTH_II1228	hypothetical protein		-13,3

BTH_II1229	<i>btaG</i>	BTH_II1229-BTH_II1230	sodium/hydrogen exchanger		-99,9
BTH_II1230	<i>btaH</i>	BTH_II1229-BTH_II1230	hypothetical protein		-15,9
BTH_II1231	<i>btaR2</i>		ATP-dependent transcription regulator LuxR		-5,3
BTH_II1232	<i>btaJ</i>		oligopeptidase A		-20,5
BTH_II1233	<i>btaK</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	peptide synthetase		-248,5
BTH_II1234	<i>btaL</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	JamP		-187,8
BTH_II1235	<i>btaM</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	JamP		-107,0
BTH_II1236	<i>btaN</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	nonribosomal peptide synthetase		-213,9
BTH_II1237	<i>btaO</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	thiotemplate mechanism natural product synthetase		-122,8
BTH_II1238	<i>btaP</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	polyketide synthase		-129,2
BTH_II1239	<i>btaQ</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	acetyltransferase		-127,1
BTH_II1240	<i>btaS</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	thioesterase II		-119,5
BTH_II1241	<i>btaT</i>	BTH_II1233-BTH_II1241	Bcr/CflA family protein drug resistance transporter		-148,8
BTH_II1242	<i>btaU</i>		TauD/TfdA family dioxygenase		-258,3
BTH_II1243			putative ABC transporter ATP-binding protein	-3,3	-12,9
BTH_II1245		BTH_II1244-BTH_II1248	DNA-binding response regulator		-3,3
BTH_II1249		BTH_II1249-BTH_II1251	respiratory nitrate reductase, subunit alpha		-4,6
BTH_II1250	<i>narH</i>	BTH_II1249-BTH_II1251	nitrate reductase subunit beta	-4,7	-7,0
BTH_II1251		BTH_II1249-BTH_II1251	nitrate reductase subunit delta	-5,4	-10,5
BTH_II1252	<i>narI</i>		respiratory nitrate reductase subunit gamma	-5,7	-13,2
BTH_II1253		BTH_II1253-BTH_II1254	peptidylprolyl isomerase	-5,7	-11,2
BTH_II1254		BTH_II1253-BTH_II1254	nitrate/nitrite transporter	-3,2	
BTH_II1257			transferase		5,8
BTH_II1258		BTH_II1258-BTH_II1259	phosphocarrier protein HPr		3,9
BTH_II1259		BTH_II1258-BTH_II1259	hypothetical protein		4,7
BTH_II1260			hypothetical protein		3,3
BTH_II1265			hydrogenase-3 subunit E	-3,2	
BTH_II1268			universal stress protein	-10,5	
BTH_II1277		BTH_II1277-BTH_II1280	hypothetical protein		-5,7
BTH_II1278		BTH_II1277-BTH_II1280	major facilitator superfamily protein		-25,2
BTH_II1279		BTH_II1277-BTH_II1280	glyoxalase family protein		-41,3
BTH_II1280		BTH_II1277-BTH_II1280	O-methyltransferase family protein		-3,7
BTH_II1281	<i>ribD</i>		riboflavin biosynthesis protein RibD		-5,2

BTH_II1283	BTH_II1282-BTH_II1285	hypothetical protein		-3,6
BTH_II1291	BTH_II1291-BTH_II1295	HlyD family secretion protein	-8,4	
BTH_II1292	BTH_II1291-BTH_II1295	ABC transporter ATP binding/permease	-5,7	
BTH_II1293	BTH_II1291-BTH_II1295	ABC transporter ATP-binding protein	-9,3	
BTH_II1294	BTH_II1291-BTH_II1295	ABC transporter ATP-binding protein	-6,9	
BTH_II1295	BTH_II1291-BTH_II1295	ABC transporter permease	-3,4	
BTH_II1296		hypothetical protein	-9,5	
BTH_II1297	BTH_II1297-BTH_II1298	hypothetical protein	-30,0	
BTH_II1298	<i>ftsH</i> BTH_II1297-BTH_II1298	ATP-dependent metalloprotease FtsH	-11,7	
BTH_II1299		serine protease	-3,0	
BTH_II1300		amino acid permease	-3,3	
BTH_II1307		hypothetical protein		-15,9
BTH_II1309	<i>pacL</i> BTH_II1308-BTH_II1310	cation-transporting P-ATPase PacL	-7,5	
BTH_II1310	BTH_II1308-BTH_II1310	hypothetical protein	-5,5	
BTH_II1311	BTH_II1311-BTH_II1312	Mg ²⁺ -importing ATPase	-5,7	
BTH_II1312	BTH_II1311-BTH_II1312	hypothetical protein	-6,3	
BTH_II1313	BTH_II1313-BTH_II1315	hypothetical protein	-8,3	
BTH_II1314	BTH_II1313-BTH_II1315	hypothetical protein	-4,7	
BTH_II1315	BTH_II1313-BTH_II1315	hypothetical protein	-5,4	-3,2
BTH_II1317		hypothetical protein	-11,2	
BTH_II1318		polyglutamate synthase	-5,3	
BTH_II1331	BTH_II1329-BTH_II1331	phage tail sheath protein	3,3	
BTH_II1336	BTH_II1332-BTH_II1337	hypothetical protein		-4,2
BTH_II1337	BTH_II1332-BTH_II1337	hypothetical protein		-3,2
BTH_II1338		site-specific DNA-methyltransferase	-6,6	-235,3
BTH_II1339		hypothetical protein	-8,3	-423,6
BTH_II1340	BTH_II1340-BTH_II1341	phage virion morphogenesis protein		-3,5
BTH_II1345	BTH_II1342-BTH_II1351	hypothetical protein	3,6	
BTH_II1346	BTH_II1342-BTH_II1351	phage tail protein X	3,9	
BTH_II1347	BTH_II1342-BTH_II1351	hypothetical protein	3,7	
BTH_II1348	BTH_II1342-BTH_II1351	fels-2 prophage protein	3,9	
BTH_II1356	BTH_II1356-BTH_II1358	gp31		-3,9
BTH_II1357	BTH_II1356-BTH_II1358	gp30		-4,1

BTH_II1358	BTH_II1356-BTH_II1358	hypothetical protein		-4,6
BTH_II1369		YbaK/prolyl-tRNA synthetase associated domain-containing protein		-3,1
BTH_II1371		hypothetical protein	-7,1	-13,5
BTH_II1381		TonB-dependent siderophore receptor		3,9
BTH_II1382	BTH_II1382-BTH_II1383	FecR family protein	4,5	3,5
BTH_II1383	BTH_II1382-BTH_II1383	ECF subfamily RNA polymerase sigma factor	8,0	6,1
BTH_II1387		ECF subfamily RNA polymerase sigma factor	-3,1	
BTH_II1395	BTH_II1395-BTH_II1397	HPP family protein	3,1	
BTH_II1396	BTH_II1395-BTH_II1397	hypothetical protein	3,1	
BTH_II1404		hypothetical protein	-4,5	-12,1
BTH_II1405	BTH_II1405-BTH_II1406	hypothetical protein	-3,1	-5,4
BTH_II1406	BTH_II1405-BTH_II1406	hypothetical protein		-3,1
BTH_II1408	<i>hisP</i> BTH_II1408-BTH_II1410	histidine ABC transporter ATP-binding protein	-5,0	-6,4
BTH_II1409	<i>hisM</i> BTH_II1408-BTH_II1410	histidine ABC transporter permease	-8,0	-9,2
BTH_II1410	<i>hisQ</i> BTH_II1408-BTH_II1410	histidine ABC transporter permease	-6,5	-5,3
BTH_II1412	BTH_II1412-BTH_II1416	porin		-7,2
BTH_II1413	BTH_II1412-BTH_II1416	DoxD-like family protein		-7,4
BTH_II1414	BTH_II1412-BTH_II1416	cytochrome c family protein	9,1	
BTH_II1415	BTH_II1412-BTH_II1416	hypothetical protein	9,6	
BTH_II1416	BTH_II1412-BTH_II1416	oxidoreductase	10,4	3,1
BTH_II1425	BTH_II1425-BTH_II1426	manganese/iron transporter		-5,1
BTH_II1426	BTH_II1425-BTH_II1426	cupin family protein	-4,7	-14,8
BTH_II1429		serine protease		-4,0
BTH_II1435	BTH_II1435-BTH_II1436	hypothetical protein		-3,2
BTH_II1440	BTH_II1440-BTH_II1446	hypothetical protein	-6,6	-9,5
BTH_II1441	BTH_II1440-BTH_II1446	D-alanyl-D-alanine dipeptidase	-10,2	-15,1
BTH_II1442	BTH_II1440-BTH_II1446	ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	-12,0	-15,3
BTH_II1443	BTH_II1440-BTH_II1446	ABC transporter permease	-5,8	-6,0
BTH_II1444	BTH_II1440-BTH_II1446	ABC transporter permease	-6,0	-7,0
BTH_II1445	BTH_II1440-BTH_II1446	ABC transporter ATP-binding protein	-4,0	-5,5
BTH_II1446	BTH_II1440-BTH_II1446	ABC transporter ATP-binding protein	-4,5	-5,8
BTH_II1450		class A beta-lactamase		4,4

BTH_II1451	<i>nlpD</i>	lipoprotein NlpD	-4,0	-4,3
BTH_II1464		methyl-accepting chemotaxis protein		5,2
BTH_II1466		hypothetical protein	-5,8	-5,0
BTH_II1479	BTH_II1479-BTH_II1480	hypothetical protein		-3,1
BTH_II1481	BTH_II1481-BTH_II1482	<i>N</i> -hydroxyarylamine O-acetyltransferase	-3,1	-4,5
BTH_II1482	BTH_II1481-BTH_II1482	hypothetical protein	-4,3	-4,4
BTH_II1483		hypothetical protein	-35,4	-36,1
BTH_II1484		methionine gamma-lyase	-6,4	-6,4
BTH_II1485		AsnC family transcriptional regulator		-3,2
BTH_II1488	BTH_II1488-BTH_II1489	OmpA/SmpA/OmlA family outer membrane lipoprotein		-17,5
BTH_II1489	BTH_II1488-BTH_II1489	Hep_Hag family protein		-12,1
BTH_II1496	BTH_II1490-BTH_II1503	short chain dehydrogenase		-3,2
BTH_II1499	BTH_II1490-BTH_II1503	hypothetical protein	-3,6	-3,6
BTH_II1511	<i>rsaMI</i>	hypothetical protein		-5,6
BTH_II1512	<i>btaII</i> BTH_II1512-BTH_II1513	<i>N</i> -acyl homoserine lactone synthase		-125,2
BTH_II1513	BTH_II1512-BTH_II1513	hypothetical protein		-4,2
BTH_II1515		CBS domain-containing protein	-7,0	-15,6
BTH_II1517		nucleoside diphosphate kinase regulator	3,8	4,0
BTH_II1520	<i>opcP</i>	outer membrane porin OpcP	3,3	
BTH_II1536		hypothetical protein		-3,9
BTH_II1537	BTH_II1537-BTH_II1538	phenylacetaldehyde dehydrogenase		-3,8
BTH_II1547	BTH_II1546-BTH_II1548	L-2-amino-thiazoline-4-carboxylic acid hydrolase	-4,7	-4,5
BTH_II1552		hypothetical protein		3,1
BTH_II1565		zinc-containing alcohol dehydrogenase	-11,9	
BTH_II1566		universal stress protein family protein	-23,9	
BTH_II1567	BTH_II1567-BTH_II1568	universal stress protein	-22,1	
BTH_II1568	BTH_II1567-BTH_II1568	universal stress protein family protein	-21,8	
BTH_II1569		universal stress protein	-11,2	
BTH_II1571		hypothetical protein	-6,2	
BTH_II1573		hypothetical protein	-8,3	
BTH_II1574		hypothetical protein	-9,8	
BTH_II1577		hypothetical protein	-4,5	
BTH_II1578		collagenase	-8,5	

BTH_III1582		hypothetical protein	4,9	
BTH_III1587	BTH_II1586-BTH_II1588	response regulator		-3,1
BTH_III1589		hypothetical protein		-4,1
BTH_III1590		hypothetical protein	-7,4	-4,2
BTH_III1591		2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase	-4,3	-7,8
BTH_III1592	BTH_II1592-BTH_II1594	hypothetical protein		-5,5
BTH_III1593	BTH_II1592-BTH_II1594	aromatic amino acid aminotransferase		-4,8
BTH_III1594	BTH_II1592-BTH_II1594	aromatic amino acid transport protein		-4,7
BTH_III1598		amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein		-3,4
BTH_III1603	BTH_II1603-BTH_III1604	fumarylacetoacetate hydrolase family protein	-3,9	-4,2
BTH_III1604	BTH_II1603-BTH_III1604	short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase	-6,6	-7,3
BTH_III1605	BTH_II1605-BTH_III1610	hydrolase	-5,4	-5,3
BTH_III1606	BTH_II1605-BTH_III1610	dehydratase	-7,7	-8,1
BTH_III1607	BTH_II1605-BTH_III1610	D-galactarate dehydratase/Altronate hydrolase family protein	-5,8	-7,5
BTH_III1608	BTH_II1605-BTH_III1610	sugar ABC transporter permease	-9,4	-7,6
BTH_III1609	BTH_II1605-BTH_III1610	sugar ABC transporter ATP-binding protein	-8,2	-5,5
BTH_III1610	BTH_II1605-BTH_III1610	sugar ABC transporter periplasmic sugar-binding protein	-11,0	-7,9
BTH_III1624		hypothetical protein		-3,8
BTH_III1627	<i>araG</i> BTH_II1626-BTH_III1628	L-arabinose transporter ATP-binding protein		-3,1
BTH_III1628	BTH_II1626-BTH_III1628	L-arabinose ABC transporter periplasmic L-arabinose-binding protein	-4,4	-5,0
BTH_III1630	BTH_II1629-BTH_III1630	dihydrodipicolinate synthase	-3,1	-3,0
BTH_III1631	BTH_II1631-BTH_III1632	aldehyde dehydrogenase family protein	-7,1	-8,1
BTH_III1638		hypothetical protein	-34,5	-103,2
BTH_III1653		hypothetical protein	-11,2	-17,7
BTH_III1655		glutamate/aspartate ABC transporter periplasmic glutamate/aspartate-binding protein	-13,5	
BTH_III1662	BTH_II1662-BTH_II1672	hypothetical protein		-7,7
BTH_III1663	BTH_II1662-BTH_II1672	2-oxoacid ferredoxin oxidoreductase		-8,7
BTH_III1664	BTH_II1662-BTH_II1672	polyketide synthase		-7,2
BTH_III1666	BTH_II1662-BTH_II1672	polyketide synthase		-5,1

BTH_III1667	BTH_III1662-BTH_II1672	polyketide synthase		-3,5
BTH_III1668	BTH_III1662-BTH_II1672	polyketide biosynthesis enoyl-CoA hydratase		-5,0
BTH_III1669	BTH_III1662-BTH_II1672	polyketide biosynthesis enoyl-CoA hydratase		-4,3
BTH_III1670	BTH_III1662-BTH_II1672	polyketide biosynthesis protein		-4,5
BTH_III1671	BTH_III1662-BTH_II1672	polyketide beta-ketoacyl:acyl carrier protein synthase		-4,4
BTH_III1672	BTH_III1662-BTH_II1672	acyl carrier protein		-5,0
BTH_III1674	BTH_III1673-BTH_II1674	polyketide synthase		-3,6
BTH_III1676	BTH_III1675-BTH_II1676	4-phosphopantetheinyl transferase family protein		-4,1
BTH_III1684		methyl-accepting chemotaxis protein I	4,2	7,4
BTH_III1685		hypothetical protein	4,0	4,6
BTH_III1698		enoyl-(acyl carrier protein) reductase	-15,8	
BTH_III1700		DJ-1/PfpI family protein	-5,8	-6,6
BTH_III1703		hypothetical protein	-3,8	-3,9
BTH_III1704	BTH_III1704-BTH_II1705	MmcH	-6,0	-6,2
BTH_III1706		radical SAM domain-containing protein	-21,7	-25,6
BTH_III1707	BTH_III1707-BTH_II1710	radical SAM domain-containing protein	-11,7	-11,7
BTH_III1708	BTH_III1707-BTH_II1710	hypothetical protein	-6,5	-7,1
BTH_III1709	BTH_III1707-BTH_II1710	ThiS domain-containing protein	-21,5	-19,1
BTH_III1710	BTH_III1707-BTH_II1710	carbamoyltransferase family protein	-5,5	-4,9
BTH_III1711		hypothetical protein		-3,6
BTH_III1712	BTH_III1712-BTH_II1713	hypothetical protein	-3,4	-5,4
BTH_III1713	BTH_III1712-BTH_II1713	hypothetical protein	-3,8	-5,0
BTH_III1717	BTH_III1716-BTH_II1717	enoyl-CoA hydratase	-3,5	
BTH_III1719		hypothetical protein		3,3
BTH_III1720	<i>opcP</i>	outer membrane porin OpcP		5,5
BTH_III1725	BTH_III1725-BTH_II1727	ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	-4,1	-3,6
BTH_III1726	BTH_III1725-BTH_II1727	iron		-3,4
BTH_III1736	<i>hpaR</i>	homoprotocatechuate degradation operon regulator, HpaR	-4,0	-3,8
BTH_III1743		hypothetical protein	-8,1	-4,5
BTH_III1746	BTH_III1746-BTH_II1747	isoquinoline 1-oxidoreductase subunit alpha		-3,8
BTH_III1747	BTH_III1746-BTH_II1747	isoquinoline 1-oxidoreductase subunit beta		-4,1
BTH_III1748		response regulator protein	-4,8	-4,7

BTH_II1749	<i>asnB</i>	asparagine synthase	-18,1	-15,1
BTH_II1750		hypothetical protein	-3,8	-4,1
BTH_II1752		trehalase	-4,4	-7,4
BTH_II1762		immunity protein		-5,0
BTH_II1763		hypothetical protein	-3,2	-9,4
BTH_II1767	BTH_II1767-BTH_II1768	hypothetical protein	-3,0	
BTH_II1768	BTH_II1767-BTH_II1768	glutathione S-transferase	-3,1	
BTH_II1772	BTH_II1772-BTH_II1773	HD domain-containing protein	-13,1	-8,6
BTH_II1773	BTH_II1772-BTH_II1773	HD domain-containing protein	-28,4	-8,4
BTH_II1774		serine protease	-7,2	-10,7
BTH_II1776		hypothetical protein	-26,5	-25,7
BTH_II1778	BTH_II1778-BTH_II1779	cytochrome c	-40,7	-22,5
BTH_II1779	BTH_II1778-BTH_II1779	cytochrome c family protein	-18,1	-11,5
BTH_II1782		two-component system sensor histidine kinase		4,0
BTH_II1783		DNA-binding response regulator	3,4	3,4
BTH_II1797	BTH_II1791-BTH_II1797	acyl-CoA synthetase	-7,7	-16,3
BTH_II1798	BTH_II1798-BTH_II1801	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	-21,4	-149,8
BTH_II1799	BTH_II1798-BTH_II1801	enoyl-CoA hydratase	-24,0	-134,6
BTH_II1800	<i>mmsB</i> BTH_II1798-BTH_II1801	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-27,0	-167,9
BTH_II1801	<i>mmsA</i> BTH_II1798-BTH_II1801	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	-27,4	-146,0
BTH_II1802		AMP-binding enzyme	-39,6	-80,3
BTH_II1803		acyl-CoA dehydrogenase	-32,0	-51,3
BTH_II1805	<i>nfeD</i>	nodulation competitiveness protein nfeD	-4,4	-4,3
BTH_II1806		SPFH domain-containing protein/band 7 family protein	-3,6	-3,7
BTH_II1811		hypothetical protein	-3,2	-4,3
BTH_II1812		hypothetical protein	-3,8	-6,2
BTH_II1816		hypothetical protein	-4,6	-5,3
BTH_II1817		putative integral membrane protein		-3,9
BTH_II1818		hypothetical protein	-3,9	-5,6
BTH_II1819		sigma-54 activated regulatory protein	-3,2	-4,6
BTH_II1833	BTH_II1830-BTH_II1833	salicylate biosynthesis isochorismate synthase		-5,9
BTH_II1834	<i>lasA</i>	LasA protease	-3,7	-11,9
BTH_II1848	BTH_II1848-BTH_II1849	hypothetical protein		-3,0

BTH_II1850		AraC family transcriptional regulator	-4,6	-4,6
BTH_II1851		metallopeptidase domain-containing protein	-7,2	-31,7
BTH_II1852		leucine aminopeptidase	-8,4	-30,4
BTH_II1853	<i>opcP</i>	BTH_III1853-BTH_II1855 outer membrane porin OpcP	-3,6	-4,9
BTH_II1854		BTH_III1853-BTH_II1855 glycine betaine/L-proline ABC transporter periplasmic glycine betaine/L-proline-binding protein	-4,2	-3,4
BTH_II1859		ABC transporter periplasmic glycine/betaine-binding protein	-4,0	-3,4
BTH_II1860		BTH_III1860-BTH_II1866 iron-sulfur cluster-binding protein		-3,2
BTH_II1861		BTH_III1860-BTH_II1866 Rieske family iron-sulfur cluster-binding protein	-3,3	-4,6
BTH_II1866		BTH_III1860-BTH_II1866 V4R domain-containing protein		-3,1
BTH_II1867		BTH_III1867-BTH_II1868 renal dipeptidase family protein	-4,0	-4,0
BTH_II1868	<i>glyA</i>	BTH_III1867-BTH_II1868 serine hydroxymethyltransferase	-4,1	-5,8
BTH_II1869		AraC family transcriptional regulator	-5,6	-4,0
BTH_II1874		hypothetical protein	3,5	
BTH_II1882		hypothetical protein		-3,6
BTH_II1883		BTH_III1883-BTH_II1888 hypothetical protein		-4,3
BTH_II1884		BTH_III1883-BTH_II1888 hypothetical protein		-6,1
BTH_II1885	<i>tssM</i>	BTH_III1883-BTH_II1888 ImcF-like family protein		-5,6
BTH_II1886	<i>tssL</i>	BTH_III1883-BTH_II1888 hypothetical protein		-5,0
BTH_II1887	<i>tssK</i>	BTH_III1883-BTH_II1888 hypothetical protein		-3,7
BTH_II1888	<i>tssJ</i>	BTH_III1883-BTH_II1888 putative lipoprotein		-6,9
BTH_II1889	<i>tagD</i>	BTH_III1889-BTH_II1892 hypothetical protein		-6,4
BTH_II1890	<i>tagC</i>	BTH_III1889-BTH_II1892 hypothetical protein		-13,0
BTH_II1891	<i>tagB</i>	BTH_III1889-BTH_II1892 pentapeptide repeat-containing protein		-7,2
BTH_II1892	<i>tagA</i>	BTH_III1889-BTH_II1892 hypothetical protein		-5,1
BTH_II1893		Rhs element Vgr protein		-4,4
BTH_II1894	<i>vgrG</i>	BTH_III1894-BTH_II1899 Rhs element Vgr protein		-3,7
BTH_II1895	<i>clpV</i>	BTH_III1894-BTH_II1899 ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpB		-6,3
BTH_II1896	<i>tssG</i>	BTH_III1894-BTH_II1899 hypothetical protein		-5,7
BTH_II1897	<i>tssF</i>	BTH_III1894-BTH_II1899 hypothetical protein		-7,6
BTH_II1898	<i>tssE</i>	BTH_III1894-BTH_II1899 hypothetical protein		-6,8
BTH_II1899	<i>hcp</i>	BTH_III1894-BTH_II1899 hypothetical protein		-9,5

BTH_II1900	<i>tssC</i>	BTH_II1900-BTH_II1902	hypothetical protein		-3,3
BTH_II1901	<i>tssB</i>	BTH_II1900-BTH_II1902	hypothetical protein		-3,8
BTH_II1907		BTH_II1904-BTH_II1910	hypothetical protein		3,0
BTH_II1920		BTH_II1920-BTH_II1922	transglutaminase-like domain-containing protein	-3,8	-6,1
BTH_II1921		BTH_II1920-BTH_II1922	hypothetical protein	-3,3	-3,8
BTH_II1922		BTH_II1920-BTH_II1922	hypothetical protein	-4,9	-6,4
BTH_II1923		BTH_II1923-BTH_II1924	nitroreductase family protein		-3,2
BTH_II1924		BTH_II1923-BTH_II1924	hypothetical protein		-4,0
BTH_II1925			chitin binding domain-containing protein		-140,0
BTH_II1926	<i>ahpC</i>	BTH_II1926-BTH_II1927	alkyl hydroperoxide reductase, subunit c		-3,3
BTH_II1929	<i>hmqG</i>	BTH_II1929-BTH_II1935	hypothetical protein	-22,0	
BTH_II1930	<i>hmqF</i>	BTH_II1929-BTH_II1935	AMP-binding domain-containing protein	-12,7	3,2
BTH_II1931	<i>hmqE</i>	BTH_II1929-BTH_II1935	metallo-beta-lactamase domain-containing protein	-11,3	4,9
BTH_II1932	<i>hmqD</i>	BTH_II1929-BTH_II1935	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III	-9,7	4,2
BTH_II1933	<i>hmqC</i>	BTH_II1929-BTH_II1935	hypothetical protein	-7,6	5,3
BTH_II1934	<i>hmqB</i>	BTH_II1929-BTH_II1935	hypothetical protein	-7,2	6,3
BTH_II1935	<i>hmqA</i>	BTH_II1929-BTH_II1935	acetyl-CoA synthetase	-8,0	7,6
BTH_II1936			ribonucleotide reductase system	-3,8	
BTH_II1939	<i>groES</i>	BTH_II1938-BTH_II1939	co-chaperonin GroES	-3,0	
BTH_II1940			hypothetical protein	-12,6	-10,8
BTH_II1941			agmatinase	-12,0	-10,4
BTH_II1942			aldehyde dehydrogenase family protein	-12,0	-9,8
BTH_II1943			Cro/CI family transcriptional regulator	-9,9	-7,0
BTH_II1944			hypothetical protein	-12,8	-11,9
BTH_II1946		BTH_II1945-BTH_II1948	glutamine synthetase family protein		-4,2
BTH_II1947		BTH_II1945-BTH_II1948	putative aminotransferase		-4,8
BTH_II1955		BTH_II1955-BTH_II1958	methyl-accepting chemotaxis protein		5,4
BTH_II1963		BTH_II1962-BTH_II1963	phosphotransferase domain-containing protein	-8,7	
BTH_II1964		BTH_II1964-BTH_II1965	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	-5,6	-6,1
BTH_II1966			DJ-1/Pfpl family protein	-3,0	
BTH_II1968			hypothetical protein	-3,3	
BTH_II1969			hypothetical protein	-3,4	
BTH_II1971			hypothetical protein	-3,3	-3,0

BTH_II1972	BTH_II1972-BTH_II1973	hypothetical protein	-12,5	-9,2
BTH_II1973	BTH_II1972-BTH_II1973	hypothetical protein	-13,8	-4,4
BTH_II1974	BTH_II1974-BTH_II1978	hypothetical protein	-16,1	-7,6
BTH_II1975	BTH_II1974-BTH_II1978	hypothetical protein	-38,5	-20,1
BTH_II1976	BTH_II1974-BTH_II1978	galactoside O-acetyltransferase	-95,2	-48,0
BTH_II1977	BTH_II1974-BTH_II1978	lipopolysaccharide core biosynthesis heptosyltransferase	-134,2	-105,2
BTH_II1978	<i>rfaC2</i> BTH_II1974-BTH_II1978	lipopolysaccharide heptosyltransferase II <i>rfaC2</i>	-89,2	-76,5
BTH_II1979	BTH_II1979-BTH_II1980	glycosyl transferase family protein	-55,7	-43,4
BTH_II1980	BTH_II1979-BTH_II1980	hypothetical protein	-32,9	-30,1
BTH_II1981		perosamine synthetase	-40,8	-33,8
BTH_II1982	<i>rfbH</i> BTH_II1982-BTH_II1986	lipopolysaccharide biosynthesis protein	-34,9	-27,7
BTH_II1983	<i>rfbG</i> BTH_II1982-BTH_II1986	CDP-glucose 4,6-dehydratase	-51,4	-33,3
BTH_II1984	<i>rfbF</i> BTH_II1982-BTH_II1986	glucose-1-phosphate cytidilyltransferase	-42,8	-28,7
BTH_II1985	BTH_II1982-BTH_II1986	chain length determinant domain-containing protein	-30,8	-21,1
BTH_II1986	BTH_II1982-BTH_II1986	polysaccharide biosynthesis protein	-15,4	-10,1
BTH_II1987	BTH_II1987-BTH_II1988	hypothetical protein	-5,5	-4,2
BTH_II1988	BTH_II1987-BTH_II1988	otnG protein	-4,5	
BTH_II1989		acetolactate synthase II large subunit	-10,8	-8,7
BTH_II1990		hypothetical protein	-15,3	-11,5
BTH_II1991		hypothetical protein	-4,5	-3,5
BTH_II1992		hypothetical protein	-30,7	-110,5
BTH_II1993	BTH_II1993-BTH_II1995	hypothetical protein	-20,2	-28,3
BTH_II1994	BTH_II1993-BTH_II1995	LysM domain-containing protein	-11,4	-14,1
BTH_II1995	BTH_II1993-BTH_II1995	hypothetical protein		-3,1
BTH_II2002		gp31		-3,1
BTH_II2005		hypothetical protein		-4,1
BTH_II2019	BTH_II2019-BTH_II2022	hypothetical protein	3,6	5,6
BTH_II2020	BTH_II2019-BTH_II2022	tartrate/fumarate family Fe-S type hydro-lyase	4,7	6,2
BTH_II2025	BTH_II2024-BTH_II2026	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	5,6	4,1
BTH_II2026	BTH_II2024-BTH_II2026	biopolymer ExbD/TolR family transporter	6,2	4,8
BTH_II2035	BTH_II2032-BTH_II2035	antigen		3,8
BTH_II2038		3-hydroxybutyrate dehydrogenase		-3,5
BTH_II2045	BTH_II2045-BTH_II2047	tRNA-Ala	6,8	6,9

BTH_II2046	BTH_II2045-BTH_II2047	tRNA-Ile	6,9	7,0
BTH_II2060	BTH_II2060-BTH_II2061	L-lactate transporter	-4,0	-6,0
BTH_II2061	<i>glcB</i> BTH_II2060-BTH_II2061	malate synthase G	-3,4	-3,3
BTH_II2062		hypothetical protein		-7,3
BTH_II2077	BTH_II2076-BTH_II2077	lactate permease family protein	-8,3	
BTH_II2078	BTH_II2078-BTH_II2080	hypothetical protein	-13,5	
BTH_II2079	BTH_II2078-BTH_II2080	iron-sulfur cluster binding protein	-12,8	
BTH_II2112		putative lipoprotein		-3,4
BTH_II2119	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase	-5,7	-13,1
BTH_II2120		succinate-semialdehyde dehydrogenase	-3,0	-4,3
BTH_II2121		Rieske (2Fe-2S) domain-containing protein	-25,3	-20,3
BTH_II2124		O-methyltransferase family protein	-3,1	
BTH_II2125		methyl-accepting chemotaxis protein	-5,1	
BTH_II2126		beta-ketoacyl CoA thiolase		-3,5
BTH_II2127		IcIR family transcriptional regulator		-3,0
BTH_II2131		amino acid ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	-8,0	-8,4
BTH_II2132		O-antigen acetylase	-4,9	-6,2
BTH_II2136		hypothetical protein		-3,8
BTH_II2141	BTH_II2139-BTH_II2141	hemin ABC transporter periplasmic hemin-binding protein		3,4
BTH_II2142		hemin ABC transporter permease		4,6
BTH_II2143	<i>hmuV</i>	hemin importer ATP-binding subunit		5,8
BTH_II2144	BTH_II2144-BTH_II2145	hypothetical protein		9,1
BTH_II2145	BTH_II2144-BTH_II2145	1A family penicillin-binding protein		6,6
BTH_II2148	BTH_II2148-BTH_II2150	ubiquinol oxidase family protein		6,4
BTH_II2149	<i>cydB</i> BTH_II2148-BTH_II2150	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II		13,2
BTH_II2171		hypothetical protein		6,5
BTH_II2180		methyl-accepting chemotaxis protein	4,0	7,8
BTH_II2182	BTH_II2181-BTH_II2184	hypothetical protein	-15,0	-19,5
BTH_II2183	BTH_II2181-BTH_II2184	hypothetical protein	-21,0	-38,7
BTH_II2186	<i>prpF</i> BTH_II2186-BTH_II2189	AcnD-accessory protein PrpF	-8,4	-5,4
BTH_II2187	<i>acnD</i> BTH_II2186-BTH_II2189	aconitate hydratase	-10,3	-7,2
BTH_II2188	<i>prpC</i> BTH_II2186-BTH_II2189	methylcitrate synthase	-16,7	-11,8

BTH_II2189	<i>prpB</i>	BTH_II2186-BTH_II2189	2-methylisocitrate lyase	-18,5	-6,6
BTH_II2192			hypothetical protein	-3,3	
BTH_II2193			proline iminopeptidase	-3,7	
BTH_II2194			hypothetical protein	-5,2	-5,7
BTH_II2201			IclR family transcriptional regulator	9,1	
BTH_II2205			hypothetical protein		4,2
BTH_II2208			hypothetical protein	-3,6	-4,3
BTH_II2211			hypothetical protein	-3,6	-4,5
BTH_II2214	<i>oprD</i>		OprD family outer membrane porin		-4,1
BTH_II2215		BTH_II2215-BTH_II2219	peptide ABC transporter ATP-binding protein	-3,2	-5,3
BTH_II2216	<i>oppD</i>	BTH_II2215-BTH_II2219	oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein		-5,7
BTH_II2217	<i>oppC</i>	BTH_II2215-BTH_II2219	oligopeptide ABC transporter permease		-6,0
BTH_II2218	<i>oppB</i>	BTH_II2215-BTH_II2219	oligopeptide ABC transporter permease		-6,0
BTH_II2219	<i>oppA</i>	BTH_II2215-BTH_II2219	oligopeptide ABC transporter periplasmic oligopeptide-binding protein	-3,8	-6,2
BTH_II2220			DNA-binding protein	-4,3	-4,1
BTH_II2223			LysR family transcriptional regulator	-6,0	-3,5
BTH_II2226		BTH_II2224-BTH_II2227	citrate lyase subunit beta	-3,0	
BTH_II2231			major facilitator family transporter	-3,3	-3,1
BTH_II2235			citrate lyase subunit beta	-5,7	
BTH_II2236		BTH_II2236-BTH_II2237	porin	-4,2	-3,8
BTH_II2237		BTH_II2236-BTH_II2237	MmgE/PrpD family protein		-5,2
BTH_II2243	<i>ispH</i>	BTH_II2243-BTH_II2244	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase		3,1
BTH_II2244		BTH_II2243-BTH_II2244	radical SAM domain-containing protein		3,0
BTH_II2251		BTH_II2251-BTH_II2252	hypothetical protein		-3,7
BTH_II2252	<i>cstA</i>	BTH_II2251-BTH_II2252	carbon starvation protein A		-3,5
BTH_II2254		BTH_II2253-BTH_II2254	epoxide hydrolase		-3,5
BTH_II2255			MlrC C-terminus family protein		-4,6
BTH_II2257			glyoxalase family protein superfamily	-3,5	-4,6
BTH_II2258		BTH_II2258-BTH_II2262	GtrA-like protein family protein	-3,2	
BTH_II2283		BTH_II2282-BTH_II2283	amino acid permease	-4,1	-5,0
BTH_II2285		BTH_II2285-BTH_II2286	MlrC C-terminus family protein	-7,8	-7,0
BTH_II2286		BTH_II2285-BTH_II2286	major facilitator family transporter	-5,9	-5,1

BTH_II2289		hypothetical protein	-5,2	-9,8
BTH_II2290		MipA family MltA-interacting protein	-4,0	-4,4
BTH_II2295		nitritotriacetate monooxygenase component A		-8,5
BTH_II2296		4-phosphopantetheinyl transferase family protein	-3,9	-6,4
BTH_II2297	BTH_II2297-BTH_II2299	hypothetical protein	-3,9	-8,5
BTH_II2298	BTH_II2297-BTH_II2299	flavin reductase domain-containing protein	-3,9	-6,0
BTH_II2299	BTH_II2297-BTH_II2299	hypothetical protein	-3,1	-5,4
BTH_II2301	<i>lpdA</i> BTH_II2301-BTH_II2304	dihydrolipoamide dehydrogenase branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit	-8,4	-17,3
BTH_II2302	BTH_II2301-BTH_II2304	E2 2-oxoisovalerate dehydrogenase, E1 component subunit	-10,6	-29,4
BTH_II2303	BTH_II2301-BTH_II2304	beta 2-oxoisovalerate dehydrogenase, E1 component subunit	-12,3	-34,3
BTH_II2304	<i>bdkA</i> BTH_II2301-BTH_II2304	alpha	-12,1	-19,1
BTH_II2305		hypothetical protein	-4,0	-3,8
BTH_II2306		hypothetical protein	-3,1	-3,3
BTH_II2307		hypothetical protein	-3,0	-3,4
BTH_II2308		LysR family transcriptional regulator pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family	-3,8	-5,2
BTH_II2310	BTH_II2310-BTH_II2311	protein	-7,2	
BTH_II2311	BTH_II2310-BTH_II2311	C4-type zinc finger DksA/TraR family protein	-4,4	
BTH_II2312	BTH_II2312-BTH_II2314	intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase	-6,9	-3,1
BTH_II2314	BTH_II2312-BTH_II2314	hypothetical protein	-11,1	
BTH_II2315	BTH_II2315-BTH_II2316	hypothetical protein	-18,7	
BTH_II2316	BTH_II2315-BTH_II2316	sulfate permease family protein	-27,7	
BTH_II2317		CBS domain-containing protein	-30,7	
BTH_II2318		hypothetical protein	-22,3	
BTH_II2319	BTH_II2319-BTH_II2320	hypothetical protein	-16,3	
BTH_II2320	BTH_II2319-BTH_II2320	hypothetical protein	-37,6	
BTH_II2322		polysaccharide deacetylase family protein	-5,6	
BTH_II2339		lipase		-4,2
BTH_II2340		4-phosphopantetheinyl transferase family protein		-4,6
BTH_II2341		hypothetical protein	-3,2	-4,3
BTH_II2342	BTH_II2342-BTH_II2348	hypothetical protein		-3,1

BTH_II2343	BTH_II2342-BTH_II2348	hypothetical protein		-9,0
BTH_II2344	BTH_II2342-BTH_II2348	ABC transporter permease		-10,5
BTH_II2345	BTH_II2342-BTH_II2348	ABC transporter ATP-binding protein		-3,2
BTH_II2346	BTH_II2342-BTH_II2348	monooxygenase flavin-binding family protein		-4,2
BTH_II2347	BTH_II2342-BTH_II2348	cytochrome P450-like protein		-6,1
BTH_II2348	BTH_II2342-BTH_II2348	polyketide synthase		-5,4
BTH_II2349		acyl transferase domain-containing protein		-3,2
BTH_II2350	BTH_II2350-BTH_II2351	hypothetical protein		3,1
BTH_II2351	<i>vacJ</i> BTH_II2350-BTH_II2351	lipoprotein VacJ		3,2
BTH_II2361	BTH_II2358-BTH_II2361	phytoene synthase		3,1
BTH_II2364	BTH_II2363-BTH_II2365	CheC family protein		3,6
BTH_II2365	BTH_II2363-BTH_II2365	response regulator		5,8
BTH_II2367		NADPH-dependent FMN reductase domain-containing protein	-5,1	-5,2
BTH_II2371	<i>parA</i> BTH_II2371-BTH_II2372	ParA family protein	3,2	4,1
BTH_II2372	<i>parB</i> BTH_II2371-BTH_II2372	ParB family protein		3,2

^aLocus tags correspond to the *B. thailandensis* E264 genome.

^bWhen indicated, the loci in a predicted operon are given.

^cFold change value and induction or repression in the *scmR*- mutant compared to the wild-type strain.

^dFold change value and induction or repression in the $\Delta btaI1\Delta btaI2\Delta btaI3$ compared to the wild-type strain.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal A, Kahyaoglu C & Hansen DB (2012) Characterization of HmqF, a protein involved in the biosynthesis of unsaturated quinolones produced by *Burkholderia thailandensis*. *Biochemistry* 51(8):1648-1657.
- Aguilar C, Bertani I & Venturi V (2003a) Quorum-sensing system and stationary-phase sigma factor (*rpoS*) of the onion pathogen *Burkholderia cepacia* genomovar I type strain, ATCC 25416. *Appl Environ Microbiol* 69(3):1739-1747.
- Aguilar C, Friscina A, Devescovi G, Kojic M & Venturi V (2003b) Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. *J Bacteriol* 185(21):6456-6462.
- Antunes LC & Ferreira RB (2009) Intercellular communication in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 35(2):69-80.
- Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM & Finlay BB (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156(Pt 8):2271-2282.
- Armitano J, Mejean V & Jourlin-Castelli C (2014) Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environmental microbiology reports* 6(6):534-544.
- Ashdown LR (1979) An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology* 11(2):293-297.
- Bainton NJ, Stead P, Chhabra SR, Bycroft BW, Salmond GP, Stewart GS & Williams P (1992) *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* 288 (Pt 3):997-1004.
- Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J & Mahenthiralingam E (2004) The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* 72(3):1537-1547.
- Bassler BL, Greenberg EP & Stevens AM (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 179(12):4043-4045.
- Bassler BL, Wright M & Silverman MR (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* 13(2):273-286.
- Becher A & Schweizer HP (2000) Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *BioTechniques* 29(5):948-950, 952.

- Bernier SP, Silo-Suh L, Woods DE, Ohman DE & Sokol PA (2003) Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. *Infect Immun* 71(9):5306-5313.
- Bertani I & Venturi V (2004) Regulation of the *N*-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA. *Appl Environ Microbiol* 70(9):5493-5502.
- Biggins JB, Gleber CD & Brady SF (2011) Acyldepsipeptide HDAC inhibitor production induced in *Burkholderia thailandensis*. *Org Lett* 13(6):1536-1539.
- Biggins JB, Ternei MA & Brady SF (2012) Malleilactone, a polyketide synthase-derived virulence factor encoded by the cryptic secondary metabolome of *Burkholderia pseudomallei* group pathogens. *J Am Chem Soc* 134(32):13192-13195.
- Bondi R, Messina M, De Fino I, Bragonzi A, Rampioni G & Leoni L (2014) Affecting *Pseudomonas aeruginosa* phenotypic plasticity by quorum sensing dysregulation hampers pathogenicity in murine chronic lung infection. *PLoS One* 9(11):e112105.
- Brett PJ, Deshazer D & Woods DE (1997) Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiology and infection* 118(2):137-148.
- Brett PJ, DeShazer D & Woods DE (1998) *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *International journal of systematic bacteriology* 48 Pt 1:317-320.
- Brint JM & Ohman DE (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 177(24):7155-7163.
- Brouwer S, Pustelny C, Ritter C, Klinkert B, Narberhaus F & Haussler S (2014) The PqsR and RhIR transcriptional regulators determine the level of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* by producing two different *pqsABCDE* mRNA isoforms. *J Bacteriol* 196(23):4163-4171.
- Burtnick M, Bolton A, Brett P, Watanabe D & Woods D (2001) Identification of the acid phosphatase (*acpA*) gene homologues in pathogenic and non-pathogenic *Burkholderia* spp. facilitates *TnphoA* mutagenesis. *Microbiology* 147(Pt 1):111-120.
- Butt A, Halliday N, Williams P, Atkins HS, Bancroft GJ & Titball RW (2016) *Burkholderia pseudomallei* *kynB* plays a role in AQ production, biofilm formation, bacterial swarming and persistence. *Res Microbiol* 167(3):159-167.

- Byers JT, Lucas C, Salmond GP & Welch M (2002) Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol* 184(4):1163-1171.
- Caballero-Mellado J, Martinez-Aguilar L, Paredes-Valdez G & Santos PE (2004) *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 4):1165-1172.
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de Los Santos P & Martinez-Aguilar L (2007) The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 73(16):5308-5319.
- Calfee MW, Coleman JP & Pesci EC (2001) Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20):11633-11637.
- Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R & Rahme LG (2001) A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25):14613-14618.
- Carr G, Seyedsayamdost MR, Chandler JR, Greenberg EP & Clardy J (2011) Sources of diversity in bactobolin biosynthesis by *Burkholderia thailandensis* E264. *Org Lett* 13(12):3048-3051.
- Chambers CE, Lutter EI, Visser MB, Law PP & Sokol PA (2006) Identification of potential CepR regulated genes using a cep box motif-based search of the *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol* 6:104.
- Chandler JR, Duerkop BA, Hinz A, West TE, Herman JP, Churchill ME, Skerrett SJ & Greenberg EP (2009) Mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation. *J Bacteriol* 191(19):5901-5909.
- Chandler JR, Heilmann S, Mittler JE & Greenberg EP (2012a) Acyl-homoserine lactone-dependent eavesdropping promotes competition in a laboratory co-culture model. *ISME J* 6(12):2219-2228.
- Chandler JR, Truong TT, Silva PM, Seyedsayamdost MR, Carr G, Radey M, Jacobs MA, Sims EH, Clardy J & Greenberg EP (2012b) Bactobolin resistance is conferred by mutations in the L2 ribosomal protein. *mBio* 3(6).
- Chang C & Stewart RC (1998) The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol* 117(3):723-731.

- Chapalain A, Groleau MC, Le Guillouzer S, Miomandre A, Vial L, Milot S & Déziel E (2017) Interplay between 4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinoline and *N*-Acyl-Homoserine Lactone Signaling in a *Burkholderia cepacia* Complex Clinical Strain. *Front Microbiol* 8:1021.
- Chapalain A, Vial L, Laprade N, Dekimpe V, Perreault J & Déziel E (2013) Identification of quorum sensing-controlled genes in *Burkholderia ambifaria*. *Microbiologyopen* 2(2):226-242.
- Chatterjee A, Cui Y, Hasegawa H, Leigh N, Dixit V & Chatterjee AK (2005) Comparative analysis of two classes of quorum-sensing signaling systems that control production of extracellular proteins and secondary metabolites in *Erwinia carotovora* subspecies. *J Bacteriol* 187(23):8026-8038.
- Chen R, Barphagha IK, Karki HS & Ham JH (2012) Dissection of quorum-sensing genes in *Burkholderia glumae* reveals non-canonical regulation and the new regulatory gene *tofM* for toxoflavin production. *PLoS One* 7(12):e52150.
- Cheng AC & Currie BJ (2005a) Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clinical microbiology reviews* 18(2):383-416.
- Cheng AC, Dance DA & Currie BJ (2005b) Bioterrorism, Glanders and melioidosis. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 10(3):E1-2; author reply E1-2.
- Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S & Visca P (2006) *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol* 14(6):277-286.
- Choi KH, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff-Schweizer RR & Schweizer HP (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature methods* 2(6):443-448.
- Choi KH, Mima T, Casart Y, Rholi D, Kumar A, Beacham IR & Schweizer HP (2008) Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and environmental microbiology* 74(4):1064-1075.
- Choudhary KS, Hudaiberdiev S, Gelencsér Z, Goncalves Coutinho B, Venturi V & Pongor S (2013) The organization of the quorum sensing *luxI/R* family genes in *Burkholderia*. *Int J Mol Sci* 14(7):13727-13747.
- Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C & Greenberg EP (2001) QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2752-2757.

- Coenye T, Henry D, Speert DP & Vandamme P (2004) *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *Systematic and applied microbiology* 27(6):623-627.
- Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D, LiPuma JJ, Laevens S, Gillis M, Speert DP & Vandamme P (2001) *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 4):1481-1490.
- Coenye T & Vandamme P (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 5(9):719-729.
- Coleman JP, Hudson LL, McKnight SL, Farrow JM, 3rd, Calfee MW, Lindsey CA & Pesci EC (2008) *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase. *J Bacteriol* 190(4):1247-1255.
- Collier DN, Anderson L, McKnight SL, Noah TL, Knowles M, Boucher R, Schwab U, Gilligan P & Pesci EC (2002) A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* 215(1):41-46.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clement C & Ait Barka E (2008) Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol Rev* 32(4):607-626.
- Conway BA & Greenberg EP (2002) Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. *J Bacteriol* 184(4):1187-1191.
- Costerton JW (2001) Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* 9(2):50-52.
- Coutinho BG, Mitter B, Talbi C, Sessitsch A, Bedmar EJ, Halliday N, James EK, Camara M & Venturi V (2013) Regulon studies and in planta role of the BraI/R quorum-sensing system in the plant-beneficial *Burkholderia* cluster. *Appl Environ Microbiol* 79(14):4421-4432.
- Currie BJ, Ward L & Cheng AC (2010) The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. *PLoS neglected tropical diseases* 4(11):e900.
- D'Argenio DA, Calfee MW, Rainey PB & Pesci EC (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* 184(23):6481-6489.
- de Kievit T & Iglewski BH (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68(9):4839-4849.

- de Kievit T, Seed PC, Nezezon J, Passador L & Iglewski BH (1999) RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181(7):2175-2184.
- de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U & Timmis KN (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of bacteriology* 172(11):6568-6572.
- Dekimpe V & Déziel E (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155(Pt 3):712-723.
- Depoorter E, Bull MJ, Peeters C, Coenye T, Vandamme P & Mahenthiralingam E (2016) *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Applied microbiology and biotechnology* 100(12):5215-5229.
- DeShazer D & Waag D (2005) Glanders: new insights into an old disease. In Lindler, L.E., Lebeda, F.J., and Korch, G.W. (ed), *Biological Weapons Defense: Infectious Diseases and Counterbioterrorism*. Humana Press, Totowa, NJ.:p 209-237.
- DeShazer D, Waag DM, Fritz DL & Woods DE (2001) Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *Microbial pathogenesis* 30(5):253-269.
- Devine JH, Shadel GS & Baldwin TO (1989) Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15):5688-5692.
- Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G & Rahme LG (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 55(4):998-1014.
- Déziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG & Rahme LG (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5):1339-1344.
- Diggle SP, Cornelis P, Williams P & Camara M (2006a) 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int J Med Microbiol* 296(2-3):83-91.

- Diggle SP, Lumjiaktase P, Dipilato F, Winzer K, Kunakorn M, Barrett DA, Chhabra SR, Camara M & Williams P (2006b) Functional genetic analysis reveals a 2-Alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chem Biol* 13(7):701-710.
- Diggle SP, Matthijs S, Wright VJ, Fletcher MP, Chhabra SR, Lamont IL, Kong X, Hider RC, Cornelis P, Camara M & Williams P (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* 14(1):87-96.
- Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Camara M & Williams P (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 50(1):29-43.
- Drees SL & Fetzner S (2015) PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* Acts as Pathway-Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Alkylquinolone Signaling Molecules. *Chem Biol* 22(5):611-618.
- Dubeau D, Déziel E, Woods DE & Lépine F (2009) *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol* 9:263.
- Dubern JF & Diggle SP (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* 4(9):882-888.
- Dubern JF, Lugtenberg BJ & Bloemberg GV (2006) The *ppuL-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. *J Bacteriol* 188(8):2898-2906.
- Duerkop BA, Herman JP, Ulrich RL, Churchill ME & Greenberg EP (2008) The *Burkholderia mallei* BmaR3-BmaI3 quorum-sensing system produces and responds to N-3-hydroxy-octanoyl homoserine lactone. *J Bacteriol* 190(14):5137-5141.
- Duerkop BA, Ulrich RL & Greenberg EP (2007) Octanoyl-homoserine lactone is the cognate signal for *Burkholderia mallei* BmaR1-BmaI1 quorum sensing. *J Bacteriol* 189(14):5034-5040.
- Duerkop BA, Varga J, Chandler JR, Peterson SB, Herman JP, Churchill ME, Parsek MR, Nierman WC & Greenberg EP (2009) Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *J Bacteriol* 191(12):3909-3918.

- Dulcey CE, Dekimpe V, Fauvelle DA, Milot S, Groleau MC, Doucet N, Rahme LG, Lépine F & Déziel E (2013) The end of an old hypothesis: the *pseudomonas* signaling molecules 4-hydroxy-2-alkylquinolines derive from fatty acids, not 3-ketofatty acids. *Chem Biol* 20(12):1481-1491.
- Dumais JP (2010) Étude de la régulation de la production des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines chez *Burkholderia ambifaria* et *B. thailandensis*. *Mémoire de maîtrise, INRS - Institut Armand-Frappier, Canada*.
- Dunny GM & Leonard BA (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 51:527-564.
- Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH & Oppenheimer NJ (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20(9):2444-2449.
- Eberl L (2006a) From a local dialect to a common language. *Chem Biol* 13(8):803-804.
- Eberl L (2006b) Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *Int J Med Microbiol* 296(2-3):103-110.
- Eberl L & Vandamme P (2016) Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research* 5.
- Egland KA & Greenberg EP (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol Microbiol* 31(4):1197-1204.
- Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B & Gibson RL (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 34(2):91-100.
- Engbrecht J, Nealson K & Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32(3):773-781.
- Engbrecht J & Silverman M (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(13):4154-4158.
- Essar DW, Eberly L, Hadero A & Crawford IP (1990a) Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 172(2):884-900.
- Essar DW, Eberly L, Han CY & Crawford IP (1990b) DNA sequences and characterization of four early genes of the tryptophan pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 172(2):853-866.

- Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J & Poole K (1998) Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180(20):5443-5447.
- Farinha MA & Kropinski AM (1990) Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *Journal of bacteriology* 172(6):3496-3499.
- Farrow JM, 3rd & Pesci EC (2007) Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol* 189(9):3425-3433.
- Farrow JM, 3rd, Sund ZM, Ellison ML, Wade DS, Coleman JP & Pesci EC (2008) PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *J Bacteriol* 190(21):7043-7051.
- Fletcher MP, Diggle SP, Crusz SA, Chhabra SR, Camara M & Williams P (2007) A dual biosensor for 2-alkyl-4-quinolone quorum-sensing signal molecules. *Environ Microbiol* 9(11):2683-2693.
- Folch B, Déziel E & Doucet N (2013) Systematic mutational analysis of the putative hydrolase PqsE: toward a deeper molecular understanding of virulence acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 8(9):e73727.
- Franke J, Ishida K, Ishida-Ito M & Hertweck C (2013) Nitro versus hydroxamate in siderophores of pathogenic bacteria: effect of missing hydroxylamine protection in malleobactin biosynthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 52(32):8271-8275.
- Fritz DL, Vogel P, Brown DR, Deshazer D & Waag DM (2000) Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). *Veterinary pathology* 37(6):626-636.
- Fritz DL, Vogel P, Brown DR & Waag DM (1999) The hamster model of intraperitoneal *Burkholderia mallei* (glanders). *Veterinary pathology* 36(4):276-291.
- Fugere A, Lalonde Seguin D, Mitchell G, Déziel E, Dekimpe V, Cantin AM, Frost E & Malouin F (2014) Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. *PLoS One* 9(1):e86705.
- Fuqua WC & Greenberg EP (1998) Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol* 1(2):183-189.
- Fuqua WC & Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9):685-695.

- Fuqua WC, Parsek MR & Greenberg EP (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 35:439-468.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176(2):269-275.
- Furukawa S, Kuchma SL & O'Toole GA (2006) Keeping their options open: acute versus persistent infections. *J Bacteriol* 188(4):1211-1217.
- Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC & Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184(23):6472-6480.
- Gallagher LA, Ramage E, Patrapuvich R, Weiss E, Brittnacher M & Manoil C (2013) Sequence-defined transposon mutant library of *Burkholderia thailandensis*. *mBio* 4(6):e00604-00613.
- Galyov EE, Brett PJ & DeShazer D (2010) Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 64:495-517.
- Gamage AM, Shui G, Wenk MR & Chua KL (2011) *N*-Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI-BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 157(Pt 4):1176-1186.
- Gambello MJ & Iglewski BH (1991) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173(9):3000-3009.
- Gambello MJ, Kaye S & Iglewski BH (1993) LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* 61(4):1180-1184.
- Gauthier YP, Hagen RM, Brochier GS, Neubauer H, Splettstoesser WD, Finke EJ & Vidal DR (2001) Study on the pathophysiology of experimental *Burkholderia pseudomallei* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30(1):53-63.
- Gelencsér Z, Choudhary KS, Coutinho BG, Hudaiberdiev S, Galbats B, Venturi V & Pongor S (2012) Classifying the topology of AHL-driven quorum sensing circuits in proteobacterial genomes. *Sensors (Basel)* 12(5):5432-5444.
- Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP & Schuster M (2009) Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol Microbiol* 73(6):1072-1085.

- Gilson L, Kuo A & Dunlap PV (1995) AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* 177(23):6946-6951.
- Godoy D, Randle G, Simpson AJ, Aanensen DM, Pitt TL, Kinoshita R & Spratt BG (2003) Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Journal of clinical microbiology* 41(5):2068-2079.
- Goo E, An JH, Kang Y & Hwang I (2015) Control of bacterial metabolism by quorum sensing. *Trends Microbiol* 23(9):567-576.
- Goo E, Majerczyk C, An JH, Chandler JR, Seo YS, Ham H, Lim JY, Kim H, Lee B, Jang MS, Greenberg EP & Hwang I (2012) Bacterial quorum sensing, cooperativity, and anticipation of stationary-phase stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(48):19775-19780.
- Goris J, De Vos P, Caballero-Mellado J, Park J, Falsen E, Quensen JF, 3rd, Tiedje JM & Vandamme P (2004) Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 5):1677-1681.
- Gotschlich A, Huber B, Geisenberger O, Togl A, Steidle A, Riedel K, Hill P, Tummler B, Vandamme P, Middleton B, Camara M, Williams P, Hardman A & Eberl L (2001) Synthesis of multiple *N*-acylhomoserine lactones is wide-spread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Systematic and applied microbiology* 24(1):1-14.
- Govan JR & Deretic V (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60(3):539-574.
- Gray KM, Pearson JP, Downie JA, Boboye BE & Greenberg EP (1996) Cell-to-cell signaling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rhizosphere-expressed genes. *J Bacteriol* 178(2):372-376.
- Gregory BC & Waag D (2008) Glanders. In Dembek, Z.F., Lenhart, M., Lounsbury, D., and Martin, J. (ed), *Medical Aspects of Biological Warfare*. Office of the Surgeon General, Washington, DC.:p 121-146.
- Guo Q, Kong W, Jin S, Chen L, Xu Y & Duan K (2014) PqsR-dependent and PqsR-independent regulation of motility and biofilm formation by PQS in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of basic microbiology* 54(7):633-643.
- Gupta R & Schuster M (2013) Negative regulation of bacterial quorum sensing tunes public goods cooperation. *ISME J* 7(11):2159-2168.

- Ha C, Park SJ, Im SJ, Park SJ & Lee JH (2012) Interspecies signaling through QscR, a quorum receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cells* 33(1):53-59.
- Hanzelka BL, Parsek MR, Val DL, Dunlap PV, Cronan JE, Jr. & Greenberg EP (1999) Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* 181(18):5766-5770.
- Haraga A, West TE, Brittnacher MJ, Skerrett SJ & Miller SI (2008) *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 76(11):5402-5411.
- Hasselbring BM, Patel MK & Schell MA (2011) *Dictyostelium discoideum* as a model system for identification of *Burkholderia pseudomallei* virulence factors. *Infect Immun* 79(5):2079-2088.
- Haussler S & Becker T (2008) The *pseudomonas* quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations. *PLoS Pathog* 4(9):e1000166.
- Hazan R, He J, Xiao G, Dekimpe V, Apidianakis Y, Lesic B, Astrakas C, Déziel E, Lépine F & Rahme LG (2010) Homeostatic interplay between bacterial cell-cell signaling and iron in virulence. *PLoS Pathog* 6(3):e1000810.
- Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, Diggle SP, Williams P & Camara M (2011) Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev* 35(2):247-274.
- Henikoff S, Wallace JC & Brown JP (1990) Finding protein similarities with nucleotide sequence databases. *Methods Enzymol* 183:111-132.
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Hoiby N & Givskov M (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 22(15):3803-3815.
- Hoffman LR, Déziel E, D'Argenio DA, Lépine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW & Miller SI (2006) Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(52):19890-19895.
- Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeno-Tarraga AM, Atkins T, Crossman LC, Pitt T, Churcher C, Mungall K, Bentley SD, Sebahia M, Thomson NR, Bason N, Beacham IR, Brooks K, Brown KA, Brown NF, Challis GL, Cherevach I, Chillingworth T, Cronin A, Crossett B, Davis P, DeShazer D, Feltwell T, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Keith KE, Maddison M, Moule S, Price C, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Simmonds M, Songsivilai S, Stevens K,

- Tumapa S, Vesaratchavest M, Whitehead S, Yeats C, Barrell BG, Oyston PC & Parkhill J (2004) Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39):14240-14245.
- Holland DJ, Wesley A, Drinkovic D & Currie BJ (2002) Cystic Fibrosis and *Burkholderia pseudomallei* Infection: An Emerging Problem? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35(12):e138-140.
- Hooi DS, Bycroft BW, Chhabra SR, Williams P & Pritchard DI (2004) Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun* 72(11):6463-6470.
- Hoppe I, Brenneke B, Rohde M, Kreft A, Haussler S, Reganzerowski A & Steinmetz I (1999) Characterization of a murine model of melioidosis: comparison of different strains of mice. *Infect Immun* 67(6):2891-2900.
- Horton RE, Grant GD, Matthews B, Batzloff M, Owen SJ, Kyan S, Flegg CP, Clark AM, Ulett GC, Morrison N, Peak IR & Beacham IR (2013) Quorum sensing negatively regulates multinucleate cell formation during intracellular growth of *Burkholderia pseudomallei* in macrophage-like cells. *PLoS One* 8(5):e63394.
- Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Molin S & Eberl L (2001) The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147(Pt 9):2517-2528.
- Hughes DT & Sperandio V (2008) Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* 6(2):111-120.
- Hwang I, Li PL, Zhang L, Piper KR, Cook DM, Tate ME & Farrand SK (1994) TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid *N*-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11):4639-4643.
- Ilangovan A, Fletcher M, Rampioni G, Pustelny C, Rumbaugh K, Heeb S, Camara M, Truman A, Chhabra SR, Emsley J & Williams P (2013) Structural basis for native agonist and synthetic inhibitor recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator PqsR (MvfR). *PLoS Pathog* 9(7):e1003508.
- Inhülsen S (2011) Investigations on the quorum sensing circuitry in *Burkholderia cenocepacia* H111. *PhD dissertation, University of Zurich, Switzerland*.
- Ishida K, Lincke T, Behnken S & Hertweck C (2010) Induced biosynthesis of cryptic polyketide metabolites in a *Burkholderia thailandensis* quorum sensing mutant. *J Am Chem Soc* 132(40):13966-13968.

- Jander G, Rahme LG & Ausubel FM (2000) Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* 182(13):3843-3845.
- Jeddeloh JA, Fritz DL, Waag DM, Hartings JM & Andrews GP (2003) Biodefense-driven murine model of pneumonic melioidosis. *Infect Immun* 71(1):584-587.
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH & Quax WJ (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 76(1):46-65.
- Juhas M, Eberl L & Tummli B (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 7(4):459-471.
- Juhas M, Wiehlmann L, Huber B, Jordan D, Lauber J, Salunkhe P, Limpert AS, von Gotz F, Steinmetz I, Eberl L & Tummli B (2004) Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150(Pt 4):831-841.
- Kilani-Feki O, Culioli G, Ortalo-Magne A, Zouari N, Blache Y & Jaoua S (2011) Environmental *Burkholderia cepacia* strain Cs5 acting by two analogous alkyl-quinolones and a didecyl-phthalate against a broad spectrum of phytopathogens fungi. *Current microbiology* 62(5):1490-1495.
- Kim K, Kim YU, Koh BH, Hwang SS, Kim SH, Lépine F, Cho YH & Lee GR (2010) HHQ and PQS, two *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules, down-regulate the innate immune responses through the nuclear factor-kappaB pathway. *Immunology* 129(4):578-588.
- Kiratisin P & Sanmee S (2008) Roles and interactions of *Burkholderia pseudomallei* BpsIR quorum-sensing system determinants. *J Bacteriol* 190(21):7291-7297.
- Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP & de Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24(5):895-904.
- Kooi C, Subsin B, Chen R, Pohorelic B & Sokol PA (2006) *Burkholderia cenocepacia* ZmpB is a broad-specificity zinc metalloprotease involved in virulence. *Infect Immun* 74(7):4083-4093.
- Kothe M, Antl M, Huber B, Stoecker K, Ebrecht D, Steinmetz I & Eberl L (2003) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the cep quorum-sensing system. *Cell Microbiol* 5(5):343-351.

- Kurnasov O, Jablonski L, Polanuyer B, Dorrestein P, Begley T & Osterman A (2003) Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol Lett* 227(2):219-227.
- Kwon YM & Ricke SC (2000) Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences. *Journal of microbiological methods* 41(3):195-199.
- Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P & Lazdunski A (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21(6):1137-1146.
- Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GS, Lazdunski A & Williams P (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 17(2):333-343.
- Laue BE, Jiang Y, Chhabra SR, Jacob S, Stewart GS, Hardman A, Downie JA, O'Gara F & Williams P (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146 (Pt 10):2469-2480.
- Lautier A & Nasser W (2005) Régulation des gènes de virulence par la phase de croissance chez les bactéries à Gram négatif. *Regard sur la biochimie* 1:24-33.
- Lazar Adler NR, Govan B, Cullinane M, Harper M, Adler B & Boyce JD (2009) The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease? *FEMS Microbiol Rev* 33(6):1079-1099.
- Le Berre R, Faure K, Nguyen S, Pierre M, Ader F & Guery B (2006) Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*? *Med Mal Infect* 36(7):349-357.
- Le Guillouzer S, Groleau MC & Déziel E (2017) The Complex Quorum Sensing Circuitry of *Burkholderia thailandensis* Is Both Hierarchically and Homeostatically Organized. *mBio* 8(6).
- Le Guillouzer S, Groleau MC & Déziel E (2018) Two *rsaM* homologues encode central regulatory elements modulating quorum sensing in *Burkholderia thailandensis*. *J Bacteriol* 10.1128/JB.00727-17.
- Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN & Lazdunski A (2003) Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Mol Microbiol* 48(1):199-210.

- Leelarasamee A (2004) Recent development in melioidosis. *Current opinion in infectious diseases* 17(2):131-136.
- Lefebvre MD & Valvano MA (2002) Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl Environ Microbiol* 68(12):5956-5964.
- Lépine F, Déziel E, Milot S & Rahme LG (2003) A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochim Biophys Acta* 1622(1):36-41.
- Lépine F, Milot S, Déziel E, He J & Rahme LG (2004) Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Soc Mass Spectrom* 15(6):862-869.
- Lequette Y, Lee JH, Ledgham F, Lazdunski A & Greenberg EP (2006) A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J Bacteriol* 188(9):3365-3370.
- Lesic B, Lépine F, Déziel E, Zhang J, Zhang Q, Padfield K, Castonguay MH, Milot S, Stachel S, Tzika AA, Tompkins RG & Rahme LG (2007) Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog* 3(9):1229-1239.
- Lesprit P, Faurisson F, Join-Lambert O, Roudot-Thoraval F, Foglino M, Vissuzaine C & Carbon C (2003) Role of the quorum-sensing system in experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 167(11):1478-1482.
- Lever MS, Nelson M, Ireland PI, Stagg AJ, Beedham RJ, Hall GA, Knight G & Titball RW (2003) Experimental aerogenic *Burkholderia mallei* (glanders) infection in the BALB/c mouse. *J Med Microbiol* 52(Pt 12):1109-1115.
- Lewenza S, Conway B, Greenberg EP & Sokol PA (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* 181(3):748-756.
- Lewenza S & Sokol PA (2001) Regulation of ornibactin biosynthesis and *N*-acyl-L-homoserine lactone production by CepR in *Burkholderia cepacia*. *J Bacteriol* 183(7):2212-2218.
- Li LL, Malone JE & Iglewski BH (2007) Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J Bacteriol* 189(12):4367-4374.
- Liang H, Deng X, Ji Q, Sun F, Shen T & He C (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* global regulator VqsR directly inhibits QscR to control quorum-sensing and virulence gene expression. *J Bacteriol* 194(12):3098-3108.

- Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, Chaowagul W, Day NP & Peacock SJ (2010) Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 82(6):1113-1117.
- Liu H, Coulthurst SJ, Pritchard L, Hedley PE, Ravensdale M, Humphris S, Burr T, Takle G, Brurberg MB, Birch PR, Salmond GP & Toth IK (2008) Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathog* 4(6):e1000093.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.
- Losada L, Ronning CM, DeShazer D, Woods D, Fedorova N, Kim HS, Shabalina SA, Pearson TR, Brinkac L, Tan P, Nandi T, Crabtree J, Badger J, Beckstrom-Sternberg S, Saqib M, Schutzer SE, Keim P & Nierman WC (2010) Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. *Genome biology and evolution* 2:102-116.
- Lumjiaktase P, Diggle SP, Loprasert S, Tungpradabkul S, Daykin M, Camara M, Williams P & Kunakorn M (2006) Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 152(Pt 12):3651-3659.
- Luo ZQ & Farrand SK (1999) Signal-dependent DNA binding and functional domains of the quorum-sensing activator TraR as identified by repressor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(16):9009-9014.
- Lutter E, Lewenza S, Dennis JJ, Visser MB & Sokol PA (2001) Distribution of quorum-sensing genes in the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect Immun* 69(7):4661-4666.
- Lyczak JB, Cannon CL & Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2(9):1051-1060.
- Machan ZA, Taylor GW, Pitt TL, Cole PJ & Wilson R (1992) 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 30(5):615-623.
- Maddocks SE & Oyston PC (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154(Pt 12):3609-3623.
- Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG & Ausubel FM (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96(1):47-56.

- Mahenthiralingam E, Song L, Sass A, White J, Wilmot C, Marchbank A, Boaisa O, Paine J, Knight D & Challis GL (2011) Enacyloxins are products of an unusual hybrid modular polyketide synthase encoded by a cryptic *Burkholderia ambifaria* Genomic Island. *Chem Biol* 18(5):665-677.
- Mahenthiralingam E, Urban TA & Goldberg JB (2005a) The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 3(2):144-156.
- Mahenthiralingam E & Vandamme P (2005b) Taxonomy and pathogenesis of the *Burkholderia cepacia* complex. *Chronic respiratory disease* 2(4):209-217.
- Majerczyk CD, Brittnacher M, Jacobs M, Armour CD, Radey M, Schneider E, Phattarasokul S, Bunt R & Greenberg EP (2014a) Global analysis of the *Burkholderia thailandensis* quorum sensing-controlled regulon. *J Bacteriol* 196(7):1412-1424.
- Majerczyk CD, Brittnacher MJ, Jacobs MA, Armour CD, Radey MC, Bunt R, Hayden HS, Bydalek R & Greenberg EP (2014b) Cross-species comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei* quorum-sensing regulons. *J Bacteriol* 196(22):3862-3871.
- Majerczyk CD, Greenberg EP & Chandler JR (2013a) Quorum Sensing in *Burkholderia*. In Vasil, M., and Darwin, A. (ed), *Regulation of Bacterial Virulence*. ASM Press, Washington, DC. 10.1128/9781555818524.ch3:p 40-57.
- Majerczyk CD, Kinman L, Han T, Bunt R & Greenberg EP (2013b) Virulence of *Burkholderia mallei* quorum-sensing mutants. *Infect Immun* 81(5):1471-1478.
- Majerczyk CD, Schneider E & Greenberg EP (2016) Quorum sensing control of Type VI secretion factors restricts the proliferation of quorum-sensing mutants. *Elife* 5.
- Malott RJ, Baldwin A, Mahenthiralingam E & Sokol PA (2005) Characterization of the *cciIR* quorum-sensing system in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* 73(8):4982-4992.
- Malott RJ, O'Grady EP, Toller J, Inhülsen S, Eberl L & Sokol PA (2009) A *Burkholderia cenocepacia* orphan LuxR homolog is involved in quorum-sensing regulation. *J Bacteriol* 191(8):2447-2460.
- Malott RJ & Sokol PA (2007) Expression of the *bviIR* and *cepIR* quorum-sensing systems of *Burkholderia vietnamiensis*. *J Bacteriol* 189(8):3006-3016.
- Mao D, Bushin LB, Moon K, Wu Y & Seyedsayamdost MR (2017) Discovery of *scmR* as a global regulator of secondary metabolism and virulence in *Burkholderia thailandensis* E264. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(14):E2920-E2928.
- Mattiuzzo M, Bertani I, Ferluga S, Cabrio L, Bigirimana J, Guarnaccia C, Pongor S, Maraite H & Venturi V (2011) The plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae* contains two

- conserved quorum sensing systems involved in virulence and negatively regulated by RsaL and the novel regulator RsaM. *Environ Microbiol* 13(1):145-162.
- Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D & Defago G (1998) Salicylic Acid Biosynthetic Genes Expressed in *Pseudomonas fluorescens* Strain P3 Improve the Induction of Systemic Resistance in Tobacco Against Tobacco Necrosis Virus. *Phytopathology* 88(7):678-684.
- McGowan S, Sebahia M, Jones S, Yu B, Bainton N, Chan PF, Bycroft B, Stewart GS, Williams P & Salmond GP (1995) Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiology* 141 (Pt 3):541-550.
- McGrath S, Wade DS & Pesci EC (2004) Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett* 230(1):27-34.
- McKnight SL, Iglewski BH & Pesci EC (2000) The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182(10):2702-2708.
- Medina G, Juarez K, Diaz R & Soberon-Chavez G (2003a) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149(Pt 11):3073-3081.
- Medina G, Juarez K, Valderrama B & Soberon-Chavez G (2003b) Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter. *J Bacteriol* 185(20):5976-5983.
- Michalska K, Chhor G, Clancy S, Jedrzejczak R, Babnigg G, Winans SC & Joachimiak A (2014) RsaM: a transcriptional regulator of *Burkholderia* spp. with novel fold. *FEBS J* 281(18):4293-4306.
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Milton DL, Chalker VJ, Kirke D, Hardman A, Camara M & Williams P (2001) The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone. *J Bacteriol* 183(12):3537-3547.
- Mitchell G, Seguin DL, Asselin AE, Déziel E, Cantin AM, Frost EH, Michaud S & Malouin F (2010) *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol* 10:33.

- Molchanova EV & Ageeva NP (2015) Use of the phytopathogenic effect for studies of *Burkholderia* virulence. *Bulletin of experimental biology and medicine* 158(4):517-519.
- Mongkolrob R, Taweechaisupapong S & Tungpradabkul S (2015) Correlation between biofilm production, antibiotic susceptibility and exopolysaccharide composition in *Burkholderia pseudomallei* *bpsI*, *ppk*, and *rpoS* mutant strains. *Microbiol Immunol* 59(11):653-663.
- Monson R, Burr T, Carlton T, Liu H, Hedley P, Toth I & Salmond GP (2013) Identification of genes in the VirR regulon of *Pectobacterium atrosepticum* and characterization of their roles in quorum sensing-dependent virulence. *Environ Microbiol* 15(3):687-701.
- More MI, Finger LD, Stryker JL, Fuqua C, Eberhard A & Winans SC (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 272(5268):1655-1658.
- Murray TS, Egan M & Kazmierczak BI (2007) *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Current opinion in pediatrics* 19(1):83-88.
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104(1):313-322.
- Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, Davidsen TD, Deboy RT, Dimitrov G, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Khouri H, Kolonay JF, Madupu R, Mohammoud Y, Nelson WC, Radune D, Romero CM, Sarria S, Selengut J, Shamblin C, Sullivan SA, White O, Yu Y, Zafar N, Zhou L & Fraser CM (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39):14246-14251.
- Nzula S, Vandamme P & Govan JR (2002) Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother* 50(2):265-269.
- O'Brien S & Fothergill JL (2017) The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol Lett* 364(15).
- O'Carroll MR, Kidd TJ, Coulter C, Smith HV, Rose BR, Harbour C & Bell SC (2003) *Burkholderia pseudomallei*: another emerging pathogen in cystic fibrosis. *Thorax* 58(12):1087-1091.

- O'Grady EP, Viteri DF, Malott RJ & Sokol PA (2009) Reciprocal regulation by the CepIR and CciIR quorum sensing systems in *Burkholderia cenocepacia*. *BMC Genomics* 10:441.
- O'Grady EP, Viteri DF & Sokol PA (2012) A unique regulator contributes to quorum sensing and virulence in *Burkholderia cenocepacia*. *PLoS One* 7(5):e37611.
- Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A & Reiser J (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176(7):2044-2054.
- Ochsner UA & Reiser J (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14):6424-6428.
- Ong C, Ooi CH, Wang D, Chong H, Ng KC, Rodrigues F, Lee MA & Tan P (2004) Patterns of large-scale genomic variation in virulent and avirulent *Burkholderia* species. *Genome Res* 14(11):2295-2307.
- Onofre-Lemus J, Hernandez-Lucas I, Girard L & Caballero-Mellado J (2009) ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Appl Environ Microbiol* 75(20):6581-6590.
- Ooi WF, Ong C, Nandi T, Kreisberg JF, Chua HH, Sun G, Chen Y, Mueller C, Conejero L, Eshaghi M, Ang RM, Liu J, Sobral BW, Korbsrisate S, Gan YH, Titball RW, Bancroft GJ, Valade E & Tan P (2013) The condition-dependent transcriptional landscape of *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS genetics* 9(9):e1003795.
- Palmer GC, Jorth PA & Whiteley M (2013) The role of two *Pseudomonas aeruginosa* anthranilate synthases in tryptophan and quorum signal production. *Microbiology* 159(Pt 5):959-969.
- Park JH, Hwang I, Kim JW, Lee SO, Conway B, Greenberg EP & Lee K (2001) Characterization of quorum-sensing signaling molecules produced by *Burkholderia cenocepacia* G4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(5):804-811.
- Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Jr. & Greenberg EP (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8):4360-4365.
- Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L & Iglewski BH (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260(5111):1127-1130.
- Patankar AV & Gonzalez JE (2009) Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol Rev* 33(4):739-756.

- Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH & Prince A (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* 68(7):4331-4334.
- Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH & Greenberg EP (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1):197-201.
- Pearson JP, Passador L, Iglewski BH & Greenberg EP (1995) A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5):1490-1494.
- Pearson JP, Pesci EC & Iglewski BH (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 179(18):5756-5767.
- Pearson JP, Van Delden C & Iglewski BH (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 181(4):1203-1210.
- Perez-Pantoja D, Nikel PI, Chavarria M & de Lorenzo V (2013) Endogenous stress caused by faulty oxidation reactions fosters evolution of 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria. *PLoS genetics* 9(8):e1003764.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP & Iglewski BH (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20):11229-11234.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC & Iglewski BH (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179(10):3127-3132.
- Pessi G & Haas D (2000) Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182(24):6940-6949.
- Pierson LS, 3rd, Keppenne VD & Wood DW (1994) Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* 176(13):3966-3974.
- Pilatova M & Dionne MS (2012) *Burkholderia thailandensis* is virulent in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 7(11):e49745.
- Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R & Palva ET (1993) A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J* 12(6):2467-2476.

- Podnecky NL, Rhodes KA & Schweizer HP (2015) Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front Microbiol* 6:305.
- Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S & Schaefer AL (1997) A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 179(23):7530-7537.
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG & Ausubel FM (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219):1899-1902.
- Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG, Calderwood SB & Ausubel FM (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24):13245-13250.
- Raja NS, Ahmed MZ & Singh NN (2005) Melioidosis: an emerging infectious disease. *Journal of postgraduate medicine* 51(2):140-145.
- Ramette A, LiPuma JJ & Tiedje JM (2005) Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl Environ Microbiol* 71(3):1193-1201.
- Ramli NS, Eng Guan C, Nathan S & Vadivelu J (2012) The effect of environmental conditions on biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates. *PLoS One* 7(9):e44104.
- Rampioni G, Bertani I, Pillai CR, Venturi V, Zennaro E & Leoni L (2012) Functional characterization of the quorum sensing regulator RsaL in the plant-beneficial strain *Pseudomonas putida* WCS358. *Appl Environ Microbiol* 78(3):726-734.
- Rampioni G, Bertani I, Zennaro E, Polticelli F, Venturi V & Leoni L (2006) The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J Bacteriol* 188(2):815-819.
- Rampioni G, Falcone M, Heeb S, Frangipani E, Fletcher MP, Dubern JF, Visca P, Leoni L, Camara M & Williams P (2016) Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 12(11):e1006029.
- Rampioni G, Polticelli F, Bertani I, Righetti K, Venturi V, Zennaro E & Leoni L (2007a) The *Pseudomonas* quorum-sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins. *J Bacteriol* 189(5):1922-1930.
- Rampioni G, Pustelny C, Fletcher MP, Wright VJ, Bruce M, Rumbaugh KP, Heeb S, Camara M & Williams P (2010) Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of

- Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. *Environ Microbiol* 12(6):1659-1673.
- Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Bertani I, Grasso M, Venturi V, Zennaro E & Leoni L (2007b) RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 66(6):1557-1565.
- Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Zennaro E & Leoni L (2009) Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 301(2):210-217.
- Reis VM, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VL, Schmid M, Baldani JI, Balandreau J, Hartmann A & Caballero-Mellado J (2004) *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 6):2155-2162.
- Riedel K, Arevalo-Ferro C, Reil G, Gorg A, Lottspeich F & Eberl L (2003) Analysis of the quorum-sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* H111 by proteomics. *Electrophoresis* 24(4):740-750.
- Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Hoiby N, Givskov M, Molin S & Eberl L (2001) *N*-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147(Pt 12):3249-3262.
- Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM & Hughes JM (2002) Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 8(2):225-230.
- Ruimy R & Andremont A (2004) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* : molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation* 13:176-184.
- Rumbaugh KP (2007) Convergence of hormones and autoinducers at the host/pathogen interface. *Anal Bioanal Chem* 387(2):425-435.
- Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH & Hamood AN (1999) Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* 67(11):5854-5862.
- Schaefer AL, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Jr. & Greenberg EP (1996) Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9505-9509.

- Schell MA, Ulrich RL, Ribot WJ, Brueggemann EE, Hines HB, Chen D, Lipscomb L, Kim HS, Mrazek J, Nierman WC & Deshazer D (2007) Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol Microbiol* 64(6):1466-1485.
- Schripsema J, de Rudder KE, van Vliet TB, Lankhorst PP, de Vroom E, Kijne JW & van Brussel AA (1996) Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of *N*-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. *J Bacteriol* 178(2):366-371.
- Schuster M, Lostroh CP, Ogi T & Greenberg EP (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 185(7):2066-2079.
- Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* 160(1):47-56.
- Seed PC, Passador L & Iglewski BH (1995) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* 177(3):654-659.
- Seyedsayamdost MR (2014) High-throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(20):7266-7271.
- Seyedsayamdost MR, Chandler JR, Blodgett JA, Lima PS, Duerkop BA, Oinuma K, Greenberg EP & Clardy J (2010) Quorum-sensing-regulated bactobolin production by *Burkholderia thailandensis* E264. *Org Lett* 12(4):716-719.
- Siehnell R, Traxler B, An DD, Parsek MR, Schaefer AL & Singh PK (2010) A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17):7916-7921.
- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ & Greenberg EP (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407(6805):762-764.
- Skindersoe ME, Zeuthen LH, Brix S, Fink LN, Lazenby J, Whittall C, Williams P, Diggle SP, Froekiaer H, Cooley M & Givskov M (2009) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55(3):335-345.
- Smith RS, Harris SG, Phipps R & Iglewski B (2002) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* 184(4):1132-1139.

- Smith RS & Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6(1):56-60.
- Sokol PA, Sajjan U, Visser MB, Gingues S, Forstner J & Kooi C (2003) The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. *Microbiology* 149(Pt 12):3649-3658.
- Song Y, Xie C, Ong YM, Gan YH & Chua KL (2005) The BpsIR quorum-sensing system of *Burkholderia pseudomallei*. *J Bacteriol* 187(2):785-790.
- Sousa SA, Feliciano JR, Pita T, Guerreiro SI & Leitao JH (2017) *Burkholderia cepacia* Complex Regulation of Virulence Gene Expression: A Review. *Genes* 8(1).
- Steidle A, Allesen-Holm M, Riedel K, Berg G, Givskov M, Molin S & Eberl L (2002) Identification and characterization of an *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl Environ Microbiol* 68(12):6371-6382.
- Stevens AM, Fujita N, Ishihama A & Greenberg EP (1999) Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J Bacteriol* 181(15):4704-4707.
- Stevens AM & Greenberg EP (1997) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* 179(2):557-562.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S & Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959-964.
- Suarez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonca-Previato L, James EK & Venturi V (2012) Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microbial ecology* 63(2):249-266.
- Suarez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J & Venturi V (2008) The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum-sensing system, which is tightly regulated by the RsaL repressor. *Microbiology* 154(Pt 7):2048-2059.
- Suarez-Moreno ZR, Devescovi G, Myers M, Hallack L, Mendonca-Previato L, Caballero-Mellado J & Venturi V (2010) Commonalities and differences in regulation of *N*-acyl

- homoserine lactone quorum sensing in the beneficial plant-associated *Burkholderia* species cluster. *Appl Environ Microbiol* 76(13):4302-4317.
- Subsin B, Chambers CE, Visser MB & Sokol PA (2007) Identification of genes regulated by the *cepIR* quorum-sensing system in *Burkholderia cenocepacia* by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* 189(3):968-979.
- Suputtamongkol Y, Chaowagul W, Chetchotisakd P, Lertpatanasuwun N, Intaranongpai S, Ruchutrakool T, Budhsarawong D, Mootsikapun P, Wuthiekanun V, Teerawatasook N & Lulitanond A (1999) Risk factors for melioidosis and bacteremic melioidosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 29(2):408-413.
- Surette MG, Miller MB & Bassler BL (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1639-1644.
- Tan MW, Mahajan-Miklos S & Ausubel FM (1999) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2):715-720.
- Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB & Prince A (1996) Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64(1):37-43.
- Tarazona S, Garcia-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A & Conesa A (2011) Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res* 21(12):2213-2223.
- Toder DS, Gambello MJ & Iglewski BH (1991) *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol Microbiol* 5(8):2003-2010.
- Truong TT, Seyedsayamdost M, Greenberg EP & Chandler JR (2015) A *Burkholderia thailandensis* Acyl-Homoserine Lactone-Independent Orphan LuxR Homolog That Activates Production of the Cytotoxin Malleilactone. *J Bacteriol* 197(21):3456-3462.
- Tsai CS & Winans SC (2010) LuxR-type quorum-sensing regulators that are detached from common scents. *Mol Microbiol* 77(5):1072-1082.
- Tseng BS, Majerczyk CD, Passos da Silva D, Chandler JR, Greenberg EP & Parsek MR (2016) Quorum Sensing Influences *Burkholderia thailandensis* Biofilm Development and Matrix Production. *J Bacteriol* 198(19):2643-2650.
- Ulrich RL (2004) Quorum quenching: enzymatic disruption of *N*-acylhomoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Appl Environ Microbiol* 70(10):6173-6180.

- Ulrich RL & DeShazer D (2004a) Type III secretion: a virulence factor delivery system essential for the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect Immun* 72(2):1150-1154.
- Ulrich RL, Deshazer D, Brueggemann EE, Hines HB, Oyston PC & Jeddelloh JA (2004b) Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J Med Microbiol* 53(Pt 11):1053-1064.
- Ulrich RL, Deshazer D, Hines HB & Jeddelloh JA (2004c) Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect Immun* 72(11):6589-6596.
- Ulrich RL, Hines HB, Parthasarathy N & Jeddelloh JA (2004d) Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. *J Bacteriol* 186(13):4350-4360.
- Utainsincharoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W, Chaisuriya P & Sirisinha S (2001) *Burkholderia pseudomallei* interferes with inducible nitric oxide synthase (iNOS) production: a possible mechanism of evading macrophage killing. *Microbiol Immunol* 45(4):307-313.
- Uzelac G, Patel HK, Devescovi G, Licastro D & Venturi V (2017) Quorum sensing and RsaM regulons of the rice pathogen *Pseudomonas fuscovaginae*. *Microbiology* 10.1099/mic.0.000454.
- Valade E, Thibault FM, Gauthier YP, Palencia M, Popoff MY & Vidal DR (2004) The PmlI-PmlR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease. *J Bacteriol* 186(8):2288-2294.
- Van Delden C & Iglewski BH (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 4(4):551-560.
- Vandamme P, Opelt K, Knochel N, Berg C, Schonmann S, De Brandt E, Eberl L, Falsen E & Berg G (2007) *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 10):2228-2235.
- Vanlaere E, van der Meer JR, Falsen E, Salles JF, de Brandt E & Vandamme P (2008) *Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 2):420-423.
- Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM & Hardie KR (2005) Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3(5):383-396.

- Ventre I, Ledgham F, Prima V, Lazdunski A, Foglino M & Sturgis JN (2003) Dimerization of the quorum sensing regulator RhIR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol Microbiol* 48(1):187-198.
- Venturi V (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* 30(2):274-291.
- Venturi V, Friscina A, Bertani I, Devescovi G & Aguilar C (2004) Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Res Microbiol* 155(4):238-244.
- Venturi V, Rampioni G, Pongor S & Leoni L (2011) The virtue of temperance: built-in negative regulators of quorum sensing in *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* 82(5):1060-1070.
- Vial L, Chapalain A, Groleau MC & Déziel E (2011) The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environ Microbiol* 13(1):1-12.
- Vial L, Groleau MC, Dekimpe V & Déziel E (2007) *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *J Microbiol Biotechnol* 17(9):1407-1429.
- Vial L, Groleau MC, Lamarche MG, Filion G, Castonguay-Vanier J, Dekimpe V, Daigle F, Charette SJ & Déziel E (2010) Phase variation has a role in *Burkholderia ambifaria* niche adaptation. *ISME J* 4(1):49-60.
- Vial L, Lépine F, Milot S, Groleau MC, Dekimpe V, Woods DE & Déziel E (2008) *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *J Bacteriol* 190(15):5339-5352.
- Waag D & DeShazer D (2005) Glanders: new insights into an old disease. In Lindler, L. E., Lebeda, F. J., Korch, G. W. (ed), *Biological weapons defense: infections diseases and counterbioterrorism*. Humana Press, Totowa, NJ.:p 209-237.
- Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP & Pesci EC (2005) Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187(13):4372-4380.
- Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI & Iglewski BH (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185(7):2080-2095.
- Wand ME, Muller CM, Titball RW & Michell SL (2011) Macrophage and *Galleria mellonella* infection models reflect the virulence of naturally occurring isolates of *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. oklahomensis*. *BMC Microbiol* 11(1):11.

- Warawa J & Woods DE (2005) Type III secretion system cluster 3 is required for maximal virulence of *Burkholderia pseudomallei* in a hamster infection model. *FEMS Microbiol Lett* 242(1):101-108.
- Wei Y, Ryan GT, Flores-Mireles AL, Costa ED, Schneider DJ & Winans SC (2011) Saturation mutagenesis of a CepR binding site as a means to identify new quorum-regulated promoters in *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol* 79(3):616-632.
- Weingart CL, White CE, Liu S, Chai Y, Cho H, Tsai CS, Wei Y, Delay NR, Gronquist MR, Eberhard A & Winans SC (2005) Direct binding of the quorum sensing regulator CepR of *Burkholderia cenocepacia* to two target promoters in vitro. *Mol Microbiol* 57(2):452-467.
- Welch M, Todd DE, Whitehead NA, McGowan SJ, Bycroft BW & Salmond GP (2000) *N*-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *EMBO J* 19(4):631-641.
- West TE, Frevert CW, Liggitt HD & Skerrett SJ (2008) Inhalation of *Burkholderia thailandensis* results in lethal necrotizing pneumonia in mice: a surrogate model for pneumonic melioidosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102 Suppl 1:S119-126.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ & Salmond GP (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25(4):365-404.
- Whiteley M, Lee KM & Greenberg EP (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24):13904-13909.
- Whitlock GC, Estes DM & Torres AG (2007) Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiol Lett* 277(2):115-122.
- Wiersinga WJ, Currie BJ & Peacock SJ (2012) Melioidosis. *The New England journal of medicine* 367(11):1035-1044.
- Wiersinga WJ, van der Poll T, White NJ, Day NP & Peacock SJ (2006) Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat Rev Microbiol* 4(4):272-282.
- Winans SC (2002) Bacterial esperanto. *Nat Struct Biol* 9(2):83-84.
- Winson MK, Camara M, Latifi A, Foglino M, Chhabra SR, Daykin M, Bally M, Chapon V, Salmond GP, Bycroft BW & et al. (1995) Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20):9427-9431.

- Wongtrakoongate P, Tumapa S & Tungpradabkul S (2012) Regulation of a quorum sensing system by stationary phase sigma factor RpoS and their co-regulation of target genes in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol Immunol* 56(5):281-294.
- Wopperer J, Cardona ST, Huber B, Jacobi CA, Valvano MA & Eberl L (2006) A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum-sensing-regulated functions within the *Burkholderia cepacia* complex. *Appl Environ Microbiol* 72(2):1579-1587.
- Wu H, Song Z, Givskov M, Doring G, Worlitzsch D, Mathee K, Rygaard J & Hoiby N (2001) *Pseudomonas aeruginosa* mutations in *lasI* and *rhlI* quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. *Microbiology* 147(Pt 5):1105-1113.
- Wurtzel O, Yoder-Himes DR, Han K, Dandekar AA, Edelheit S, Greenberg EP, Sorek R & Lory S (2012) The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog* 8(9):e1002945.
- Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DA, Walsh AL, Pitt TL & White NJ (1996) Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J Med Microbiol* 45(6):408-412.
- Xavier KB & Bassler BL (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6(2):191-197.
- Xiao G, Déziel E, He J, Lépine F, Lesic B, Castonguay MH, Milot S, Tampakaki AP, Stachel SE & Rahme LG (2006a) MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol Microbiol* 62(6):1689-1699.
- Xiao G, He J & Rahme LG (2006b) Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* 152(Pt 6):1679-1686.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T & Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36(12):1251-1275.
- Yao F, Zhou H & Lessie TG (2002) Characterization of *N*-acyl homoserine lactone overproducing mutants of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *FEMS Microbiol Lett* 206(2):201-207.
- Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux Y, Camara M, Smith H & Williams P (2002) *N*-acylhomoserine lactones undergo

- lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 70(10):5635-5646.
- Yu Y, Kim HS, Chua HH, Lin CH, Sim SH, Lin D, Derr A, Engels R, DeShazer D, Birren B, Nierman WC & Tan P (2006) Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis*. *BMC Microbiol* 6:46.
- Zhang YM, Frank MW, Zhu K, Mayasundari A & Rock CO (2008) PqsD is responsible for the synthesis of 2,4-dihydroxyquinoline, an extracellular metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 283(43):28788-28794.
- Zhou H, Yao F, Roberts DP & Lessie TG (2003) AHL-deficient mutants of *Burkholderia ambifaria* BC-F have decreased antifungal activity. *Current microbiology* 47(3):174-179.
- Zhu J & Winans SC (1999) Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9):4832-4837.
- Zhu J & Winans SC (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4):1507-1512.