

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

LA RÉGULATION DE *RSMA* CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Par
Mariane Séguin

Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jonathan Perreault
Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Sylvie Reverchon Pescheux
Département Biosciences INSA Lyon
Université Lyon 1

Directeur de recherche

Eric Déziel
Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif qui est en mesure de croître dans une vaste gamme d'environnement comme l'eau, le sol et la rhizosphère. Cependant, cette bactérie est aussi un pathogène opportuniste responsable d'infections graves chez les personnes immunodéficientes. Ces infections peuvent être chroniques ou aiguës. *P. aeruginosa* utilise des systèmes de *quorum sensing* complexes pour réguler l'expression de la grande majorité de ses gènes de virulences. Le régulateur post-transcriptionnel RsmA est un des facteurs importants influençant des gènes contrôlés par le *quorum sensing* chez *P. aeruginosa*. Cette protéine agit en liant une région spécifique de certains ARNm cibles, ce qui empêche la traduction de ceux-ci. RsmA contrôlerait le passage entre les différents modes d'infections soit, aiguë et chronique, en réprimant des gènes impliqués dans les infections chroniques comme l'opéron *hcnABC* et le système de sécrétion de type VI. RsmA peut aussi avoir un effet positif, mais seulement de façon indirecte, telle la régulation du système de sécrétion de type III et les pili de type IV. L'activité de RsmA est régulée au niveau post-traductionnel par deux petits ARN non codant, RsmZ et RsmY, qui peuvent séquestrer RsmA et affecter la concentration de protéines actives. Bien que les cibles de RsmA soient en partie identifiées, aucune information n'est disponible sur la régulation même de cette protéine aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. Afin de caractériser les voies de régulation de RsmA, deux fusions de promoteur-*lacZ* ont été développés, créant ainsi deux rapporteurs, un transcriptionnel et un traductionnel. L'expression des rapporteurs a été quantifiée dans différents mutants codant pour d'importants régulateurs du QS. De plus, pour identifier de nouveaux régulateurs de *rsmA*, une mutagenèse aléatoire a été effectuée à l'aide d'un transposon dans la souche sauvage *P. aeruginosa* PA14. Les résultats obtenus démontrent que *rsmA* est régulé au niveau transcriptionnel ainsi qu'au niveau traductionnel par de multiples facteurs. Les sites d'initiations de la transcription ont aussi été identifiés pour ce gène. Finalement, l'effet de la température ainsi que de différentes sources de carbone sur la régulation de *rsmA* ont été étudiés.

Étudiante

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr. Eric Déziel pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Merci pour le soutien et les nombreux conseils. Je remercie aussi le professeur Claude Guertin pour son aide lors des analyses statistiques. Merci au professeur Jonathan Perrault pour ses conseils et son soutien lors des analyses bioinformatiques.

Mon passage dans le laboratoire n'aurait pas été le même sans tous les membres du laboratoire passés et présents. Ce fût un plaisir de travailler avec vous. Merci pour votre aide, votre temps et vos nombreux conseils.

Merci à ma famille et à mes amis pour leurs soutiens et leurs encouragements lors de ce parcours. Un merci bien spécial à Benoit, ton écoute et ton soutien m'ont permis de garder le sourire et ma motivation durant les moments plus difficiles. MERCI!

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Table des figures.....	x
Table des tableaux.....	xii
Liste des abréviations	xiii
1 Revue de littérature	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Adaptation à l'environnement.....	2
1.2.1 La régulation au niveau de la transcription.....	2
1.2.1.1 Les protéines régulatrices	2
1.2.2 Les facteurs sigma (σ)	3
1.2.3 Systèmes à deux composantes	3
1.2.4 Les ARN non-codants.....	3
1.2.5 Le <i>quorum sensing</i>	4
1.3 La régulation post-transcriptionnelle CsrA/RsmA	4
1.3.1 Les cibles de CsrA.....	4
1.3.2 Le mode d'action.....	5
1.3.3 La régulation de CsrA	5
1.3.4 Les homologues de CsrA.....	7
1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.4.1 Adaptation à l'environnement.....	11
1.4.2 <i>Quorum sensing</i>	11
1.4.3 Régulateurs globaux	13

1.4.4	Le régulateur RsmA.....	14
1.4.4.1	Généralité.....	14
1.4.4.2	Les cibles de RsmA	15
1.4.4.3	Les ARNnc RsmZ et RsmY.....	16
1.4.4.4	Les systèmes à deux composantes.....	17
1.4.4.5	La régulation de RsmA	18
1.5	La problématique	20
1.5.1	L'hypothèse du projet.....	20
1.5.2	Les objectifs.....	20
2	Méthodologie.....	21
2.1	Bactéries et plasmides.....	21
2.1.1	Construction des rapporteurs transcriptionnel et traductionnel <i>rsmA-lacZ</i>	23
2.1.1.1	Rapporteur transcriptionnel.....	23
2.1.1.2	Rapporteur traductionnel	24
2.1.2	Déphosphorylation des vecteurs	25
2.1.3	Transformation.....	26
2.1.3.1	Transformation par choc thermique.....	26
2.1.3.1.1	Préparation des cellules compétentes au CaCl ₂	26
2.1.3.1.2	Transformation des cellules compétentes	26
2.1.3.2	Transformation par électroporation.....	26
2.1.3.2.1	Préparation des cellules électro-compétentes.....	26
2.1.3.2.2	Transformation des cellules électro-compétentes.....	27
2.1.4	Conjugaison.....	27
2.2	Milieux de culture	28
2.2.1	Milieux de culture liquide.....	28
2.2.2	Milieux de culture solide.....	28
2.2.3	Géloses alizarine-gal	28
2.2.4	Croissance des bactéries.....	29
2.3	Dosage de la β-galactosidase.....	29

2.3.1	Dosage de la β -galactosidase avec le plasmide pME3859.....	30
2.3.2	Système hétérologue pour étudier l'effet de LasR sur l'expression de <i>rsmA</i>	30
2.3.3	Vérification des transposants lors du criblage	31
2.3.4	Effet de la température sur la régulation de <i>rsmA</i>	31
2.3.5	Effet de différentes source de carbone sur la régulation de <i>rsmA</i>	31
2.4	Criblage	32
2.4.1	Mutagenèse aléatoire	32
2.4.2	Identification du site d'insertion du transposon chez les clones sélectionnés	33
2.4.2.1	Extraction ADN.....	33
2.4.2.2	PCR double ronde semi-arbitraire.....	33
2.4.2.3	Séquençage.....	34
2.4.3	Analyse statistique des dosages de la β -galactosidase.....	34
2.5	Détermination du début de la transcription de <i>rsmA</i>	35
2.5.1	Extraction de l'ARN.....	36
2.5.1.1	Vérification de la pureté de l'ARNm.....	37
2.5.2	5'RACE	37
2.5.3	Clonage	37
2.5.4	Extraction plasmidique et séquençage.....	38
3	Résultats	39
3.1	Effet du <i>quorum sensing</i> sur la régulation de <i>rsmA</i>	39
3.1.1	Caractérisation au niveau traductionnel	40
3.1.1.1	Mutants qui affectent négativement la traduction de <i>rsmA</i>	41
3.1.1.2	Mutants causant un retard dans la traduction de <i>rsmA</i>	42
3.1.1.3	Mutants qui activent l'expression de <i>rsmA</i>	44
3.1.1.4	Résultats différent lorsque pME3859 ou pMS7 est utilisé	45
3.1.2	Caractérisation au niveau transcriptionnel.....	47
3.1.2.1	Mutants qui n'ont aucun effet sur la transcription de <i>rsmA</i>	48
3.1.2.2	Mutants qui diminuent la transcription de <i>rsmA</i>	48
3.2	Lien entre <i>mvaT</i> et <i>rsmA</i>	49

3.3	LasR	51
3.4	Détermination du site d'initiation de la transcription par 5'Race.....	52
3.5	Mutagenèse aléatoire par transposition	54
3.5.1	Criblage	54
3.5.2	Séquençage et analyse des produits PCR obtenus	56
3.5.3	Caractéristiques des transposants affectés dans la traduction de rsmA.....	57
3.5.3.1	<i>Vue d'ensemble</i>	57
3.5.3.2	<i>Caractéristique des transposants du groupe « fort »</i>	58
3.5.3.3	<i>Caractéristique des transposants du groupe « faible »</i>	60
3.5.3.4	<i>Caractéristiques des transposants du groupe « retard »</i>	67
3.5.3.5	<i>Caractéristiques des transposants du groupe « diminution »</i>	70
3.5.3.6	<i>Caractéristiques des transposants du groupe « WT »</i>	74
3.6	Effet des facteurs environnementaux.....	80
3.6.1	Effet de la température.....	80
3.6.2	Effet de différentes sources de carbones	82
4	Discussion	83
4.1	Caractérisation de la régulation de <i>rsmA</i>	83
4.1.1	Le rôle de LasR dans la régulation de <i>rsmA</i>	83
4.1.1.1	<i>L'effet d'une mutation chez lasR sur la régulation de rsmA</i>	83
4.1.1.2	<i>Effet d'une mutation chez les gènes régulés par LasR et qui régulent LasR</i>	85
4.1.1.2.1	RhlR.....	85
4.1.1.2.2	MvfR.....	86
4.1.1.2.3	PqsE.....	88
4.1.1.2.4	Vfr	88
4.1.1.2.5	PA14_69090 et PA14_69070	89
4.1.2	Conclusion LasR.....	89
4.2	Le rôle de MvaT dans la régulation de <i>rsmA</i>	89
4.2.1	MvaT vs MvaU.....	90
4.2.2	Résultats obtenus et fonction de MvaT	90

4.2.3	CbrB et Crc	92
4.2.4	Lien avec criblage	94
4.2.5	Lien avec les sources de carbones	94
4.2.6	Conclusion MvaT	95
4.3	RsmA.....	95
4.3.1	Traduction.....	95
4.3.2	Transcription	96
4.3.3	Sites d'initiation de la transcription pour <i>rsmA</i>	97
4.3.3.1	<i>Généralités</i>	97
4.3.3.2	<i>Les sites d'initiation chez E. coli pour csrA</i>	99
4.3.3.3	<i>Comparaison avec l'étude du transcriptome chez P. aeruginosa PA14</i>	100
4.3.3.4	<i>Conclusions de l'identification des sites d'initiation de la transcription</i>	101
4.3.4	Criblage (GacA)	101
4.3.5	Conclusion	101
4.4	Régulateurs qui affectent le système <i>rhl</i>	102
4.4.1	L'effet d'une mutation dans PA14_48830 sur <i>rsmA</i>	102
4.4.2	L'effet d'une mutation dans DksA sur <i>rsmA</i>	102
4.4.3	L'effet d'une mutation dans GidA sur <i>rsmA</i>	103
4.4.4	Conclusion sur l'implication du système <i>rhl</i>	103
4.5	Le criblage, résultats nouveaux.....	104
4.5.1	La méthode.....	104
4.5.2	La respiration cellulaire	105
4.5.2.1	<i>Expression de rsmA</i>	105
4.5.2.2	<i>Les gènes nuo chez Pseudomonas</i>	107
4.5.2.3	<i>Conclusion sur la respiration cellulaire</i>	108
4.5.3	L'acquisition du fer	108
4.5.3.1	<i>Expression de rsmA</i>	108
4.5.3.2	<i>La relation entre le fer et rsmA</i>	109

4.5.3.2.1	PvdQ.....	110
4.5.3.3	Conclusion sur l'effet du fer sur la régulation de <i>rsmA</i>	111
4.5.4	Un nouveau régulateur?.....	111
4.5.5	Autres gènes retrouvés plus d'une fois	112
4.5.5.1	L'opéron PA14_69090 à PA14_69060.....	112
4.5.5.2	L'opéron <i>pilM-pilQ</i>	112
4.5.6	Conclusion générale sur le criblage	112
4.6	Les facteurs environnementaux	113
4.6.1	La température	113
4.6.2	L'utilisation de différentes sources de carbone.....	114
4.6.3	Conclusion sur les facteurs environnementaux	116
4.7	Proposition d'un modèle portant sur la régulation de <i>rsmA</i>	117
4.8	Conclusion	119
Bibliographie		120
Appendice A : Solutions		138
Appendice B : Réactifs pour PCR, programmes et amorces		139
Appendice C : Analyse statistique avec SAS® Analytics		143
Appendice D : Contexte génomique de l'insertion des transposons		153

TABLE DES FIGURES

Figure 1-1. Mode d'action de CsrA.....	5
Figure 1-2. Structure secondaire de l'ARNnc CsrC	6
Figure 1-3. Régulation de CsrA.....	6
Figure 1-4. <i>Quorum sensing</i> chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Figure 1-5. Structure secondaire de l'ARNnc RsmZ.....	16
Figure 1-6. Structure secondaire de l'ARNnc RsmY chez <i>P. aeruginosa</i>	17
Figure 1-7. Régulation du système RsmA chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Figure 2-1. Fusion traductionnelle <i>rsmA'-lacZ</i> sur pME3859	23
Figure 2-2. Vecteur chromosomique mini CTX- <i>lacZ</i> (A) et rapporteur transcriptionnel pMS6 <i>rsmA-lacZ</i> (B).....	23
Figure 2-3. Rapporteur chromosomique traductionnel pMS7	25
Figure 2-4. Transposon de type <i>mariner</i> (Kulasekara <i>et al.</i> , 2005).....	32
Figure 2-5. Principe du 5'RACE	36
Figure 3-1. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i>	42
Figure 3-2. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i>	43
Figure 3-3. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i>	45
Figure 3-4. Activité du rapporteur traductionnel plasmidique <i>rsmA'-lacZ</i> (pME3859).....	46
Figure 3-5. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i>	47
Figure 3-6. Activité du rapporteur transcriptionnel chromosomique <i>prsmA-lacZ</i>	48
Figure 3-7. Activité du rapporteur transcriptionnel chromosomique <i>prsmA-lacZ</i>	49
Figure 3-8. Activité du rapporteur traductionnel plasmidique <i>rsmA'-lacZ</i> (pME3859).....	50
Figure 3-9. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i>	51
Figure 3-10. Effet de LasR sur l'activité du rapporteur traductionnel <i>rsmA'-lacZ</i> (pME3859) chez <i>E. coli</i> DH5 α en présence de C ₁₂ -HSL.....	52

Figure 3-11. Visualisation de la dernière amplification du 5'RACE	53
Figure 3-12. Longueur des transcrits obtenus lors du 5'RACE	54
Figure 3-13. Géloses de criblage contenant de l'aliz-gal Amplification des gènes	55
Figure 3-14. Exemple de produits PCR obtenus avec la technique de PCR double ronde	56
Figure 3-15. Distributions des transposants dans les différentes classes suite à l'analyse statistique.....	58
Figure 3-16. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i> chez des transposants qui font parties de la catégorie « fort »	60
Figure 3-17. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i> chez des transposants qui font parties de la catégorie « faible ».....	66
Figure 3-18. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i> chez des transposants qui font parties de la catégorie « retard »	69
Figure 3-19. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i> chez des transposants qui font partis de la catégorie « diminution »	74
Figure 3-20. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique <i>rsmA'-lacZ</i> chez des transposants qui font partis de la catégorie « WT ».....	79
Figure 3-21. Activité du rapporteur traductionnel <i>rsmA'-lacZ</i> à différentes températures.....	81
Figure 3-22. Activité du rapporteur <i>rsmA'-lacZ</i> traductionnel chromosomique dans un milieu minéral (M63) complémenté de différentes sources de carbone	82
Figure 4-1. Lien entre la voie CbrA/CbrB, MvaT et RsmA	92
Figure 4-2. Séquence en amont de <i>rsmA</i>	97
Figure 4-3. Régulation de <i>rsmA</i> chez <i>P. aeruginosa</i> PA14 suite aux observations lors de ce mémoire et en lien avec la littérature.....	118

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1-1. Résumé des homologues de CsrA, BarA/UvrY, CsrB/CsrC chez d'autres bactéries.	8
Tableau 1-2. Cibles de RsmA chez <i>P. aeruginosa</i>	15
Tableau 2-1. Bactéries	21
Tableau 2-2. Plasmides.....	22
Tableau 3-1. Fonction des gènes sélectionnés	39
Tableau 3-2. Résumé des effets observés au niveau de la traduction de <i>rsmA</i>	40
Tableau 3-3. Résumé des effets sur la transcription de <i>rsmA</i> des mutations qui ont un effet sur la traduction de <i>rsmA</i> (voir tableau 3-2).....	47
Tableau 3-4. Caractéristiques des transposants qui font parties de la classe « fort ».....	59
Tableau 3-5. Caractéristiques des transposants de la catégorie « faible ».....	62
Tableau 3-6. Caractéristique des transposants de la catégorie « retard »	68
Tableau 3-7. Caractéristiques des transposants de la catégorie « diminution ».....	71
Tableau 3-8. Caractéristiques des transposants dans la catégorie WT	76
Tableau 4-1. Gènes surexprimés uniquement chez le mutant <i>mvaT</i> (Castang <i>et al.</i> , 2008)	90
Tableau 4-2. Gènes codant pour des protéines prédites ou connues pour posséder un domaine de type Irp (COG1522) (Winsor <i>et al.</i> , 2011)	98
Tableau 4-3. Gènes codant pour des protéines prédites ou connues pour posséder un domaine de type ompR (COG0745) (Winsor <i>et al.</i> , 2011).....	98
Tableau 4-4. Ensemble des transposants pour les gènes <i>nuo</i> ainsi que leur ratio T	106
Tableau 4-5. Ensemble des mutants avec une insertion dans un gène en lien avec les sidérophores.	109

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-oxo-C12-HSL: N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone
C4-HSL: N-butanoyl-L-homosérine lactone
5'RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire
Aliz-gal: alizarine- β -D-galactoside
ARN: Acide ribonucléique
ARNnc: Acide ribonucléique non codant
ARNm : Acide ribonucléique messenger
c-di-GMP: di-guanosine monophosphate cyclique
DAP : acide diaminopimelique
DO₆₀₀ : Densité optique à 600 nm
HAQ : 4-hydroxy-2-alkylquinoline
HHQ : 4-hydroxy-2-heptylquinoline
IRCM : Institut de recherches cliniques de Montréal
LB: *Lysogeny Broth*
ONPG: o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
PBS : Tampon phosphate salin
PQS : *Pseudomonas quinolone signal*, 3,4-dihydroxy-2-alkylquinoline
SST3: Système de sécrétion de type III
SST6: Système de sécrétion de type VI
TCE: Trichloroéthylène
TSB : *Tryptic soy broth*
UM : unités Miller
WT: *Wild type*
 α : Alpha
 β : Beta
 γ : Gamma
 Δ : Delta
 σ : Sigma
x: Chi

1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Les bactéries sont des microorganismes retrouvés dans tous les types d'environnements et ils sont très diversifiés. Ils sont en mesure de croître dans des conditions extrêmes comme les sources hydrothermales, les eaux glacées, les milieux aux pH et salinités extrêmes. Puisqu'ils sont présents dans divers environnements, les bactéries se sont adaptées à ces conditions et ont développé des moyens pour compétitionner avec les autres êtres vivants. Pour ce faire, les bactéries produisent une variété de métabolites secondaires qui peut être utilisée par l'homme dans plusieurs champs d'applications (Pettit, 2011). Par exemple, beaucoup de microorganismes sont utilisés à des fins de biocontrôle pour protéger les plantes d'infection causées par des insectes ou certains champignons (Kamilova *et al.*, 2006). De plus, lorsque des sols sont contaminés par des produits dangereux, certains microorganismes sont utilisés afin d'éliminer et de transformer ces polluants (Zhuang *et al.*, 2010). Finalement, dans le domaine alimentaire, les bactéries sont étudiées pour leurs propriétés bénéfiques en tant que probiotique ainsi que pour la conservation des aliments.

Cependant, malgré des bénéfices certains, les bactéries peuvent aussi causer des infections, parfois mortelles. Par exemple, chez l'homme, la tuberculose est l'une des causes de décès importante dû à une infection bactérienne. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'en 2010 6,2 million de personnes ont été diagnostiquées avec la tuberculose (OMS, 2011). Bien que des antibiotiques soient disponibles pour traiter ces maladies, les bactéries deviennent de plus en plus résistantes à ceux-ci, rendant difficile le traitement d'infection.

Bien entendu, les bactéries peuvent interagir entre elles et avec leur environnement. Celles-ci peuvent former des structures complexes dans lesquelles elles occupent des fonctions spécialisées, un peu comme les cellules d'un être plus complexe, pluricellulaire. La structure la plus étudiée est le biofilm. Grâce à ces interactions, les bactéries peuvent aussi se déplacer en groupe, en effectuant du *swarming* ou du *twitching* (Kearns, 2010; Jarrell & McBride 2008).

1.2 Adaptation à l'environnement

Afin de s'adapter rapidement à leur environnement changeant, les bactéries ont mis au point différentes stratégies. Ces organismes sont en mesure de réguler l'expression de leurs gènes de façon très précise. Les bactéries présentes dans un environnement changeant tels les saprophytes possèdent plusieurs voies de régulation pour leur permettre de s'adapter comparativement aux bactéries qui vivent dans un milieu bien défini et peu changeant comme les pathogènes intracellulaires (Osterberg *et al.*, 2011). Voici donc quelques-uns des moyens utilisés par les bactéries pour s'ajuster aux conditions changeantes.

1.2.1 La régulation au niveau de la transcription

La régulation de la transcription de l'ADN en ARNm est une des premières étapes à laquelle les bactéries peuvent agir. En effet, seuls les gènes nécessaires sont exprimés, afin d'économiser des ressources.

1.2.1.1 Les protéines régulatrices

Les régulateurs transcriptionnels favorisent l'activation ou la répression de la transcription. Les répresseurs peuvent agir de trois façons principales : (a) tout d'abord, ils peuvent bloquer la région promotrice en se liant à celle-ci (Browning & Busby, 2004); (b) Ils peuvent aussi replier l'ADN de façon à rendre inaccessible le promoteur, comme le fait le groupe des régulateurs H-NS (Dorman, 2004), (c) finalement, les répresseurs peuvent agir sur un activateur en se liant à ce dernier et en l'empêchant d'activer la transcription (Browning & Busby, 2004).

Les activateurs sont en mesure de promouvoir la transcription de plusieurs façons (Browning & Busby, 2004) : (a) tout d'abord, ils peuvent rendre accessible la région promotrice à l'ARN polymérase, par une liaison à l'ADN en amont du promoteur et une interaction directe avec l'ARN polymérase; (b) le régulateur peut aussi interagir avec la sous-unité sigma de l'ARN polymérase afin de promouvoir son activité. Certains régulateurs doivent agir de concert avec un autre facteur de transcription pour que l'initiation de la transcription soit possible; (c) finalement, un activateur peut aussi empêcher un répresseur d'agir, et avec l'aide d'un deuxième activateur promouvoir l'activité de l'ARN polymérase (Browning & Busby, 2004).

1.2.2 Les facteurs sigma (σ)

Pour que l'ARN polymérase soit active, elle doit posséder une sous-unité sigma (σ). Cette sous-unité est dissociable et interchangeable (Osterberg *et al.*, 2011). Celle-ci permet la reconnaissance de promoteurs spécifiques. De cette façon, les gènes importants pour certaines conditions sont exprimés seulement au besoin (Osterberg *et al.*, 2011). Les bactéries qui doivent s'adapter à un environnement très changeant possèdent plusieurs facteurs σ différents, tandis que les bactéries qui sont présentes dans un milieu stable en possèdent peu (Osterberg *et al.*, 2011).

1.2.3 Systèmes à deux composantes

Les systèmes à deux composantes permettent de réguler les gènes en fonction des changements du milieu. Typiquement, ces systèmes sont composés d'une protéine senseur et d'une protéine régulatrice (Wuichet *et al.*, 2010). Le senseur, habituellement membranaire, détecte un changement de l'environnement. Par exemple, un changement de température, la présence d'un produit nocif ou nutritif, la présence d'oxygène et bien plus. Lorsqu'un signal est reçu, le senseur transmet ce signal grâce à la phosphorylation et active le régulateur (Wuichet *et al.*, 2010). Donc, lorsqu'un changement est perçu, le senseur active la protéine régulatrice qui peut à son tour affecter la transcription de gènes importants dans l'adaptation à ce signal.

1.2.4 Les ARN non-codants

Les ARN non-codants (ARNnc) ont été plus récemment identifiés chez les bactéries. Ceux-ci peuvent agir de multiples façons dans la régulation et l'adaptation (Silva *et al.*, 2011). Certains ARNnc réagissent à des changements de température et sont impliqués dans la réponse au choc thermique (Henkin, 2008). D'autres interagissent avec le site de liaison du ribosome empêchant ainsi la traduction. Les structures secondaires de ces ARNnc sont particulièrement importantes et jouent un rôle dans la régulation de protéine régulatrice. En effet, certains ARNnc sont en mesure de titrer la quantité de protéine libre en compétitionnant avec leurs ligands (Storz *et al.*, 2011).

1.2.5 Le *quorum sensing*

Le *quorum sensing* est un moyen utilisé par les microorganismes pour communiquer entre eux et estimer la densité cellulaire de leur population. Ce système permet aux bactéries l'expression coordonnée des gènes nécessaires pour plusieurs phénomènes coopératifs comme la formation de biofilm, la sporulation, la motilité de type *swarming*, la bioluminescence ainsi que l'expression de divers facteurs de virulence (Fuqua *et al.*, 1994). Ce système, chez les bactéries à Gram négatif, comprend une synthase qui produit une molécule-signal. Ce signal diffuse dans le milieu extracellulaire et s'accumule. La molécule-signal permet l'activation d'un régulateur transcriptionnel en s'y liant. Ce dernier régule la transcription de gènes spécifiques en plus d'activer celle de la synthase. Il s'agit donc d'une boucle d'auto-induction (Fuqua *et al.*, 1994). Les gènes-cibles sont donc activés à une densité précise de la population bactérienne.

Grâce à tous ces systèmes, les bactéries sont en mesure de réagir rapidement à un changement dans leur environnement et même agir de concert.

1.3 La régulation post-transcriptionnelle CsrA/RsmA

Le régulateur CsrA est un bon exemple de système d'adaptation. En effet, la régulation de ce régulateur implique : le *quorum sensing*, des systèmes à deux composantes, différents facteurs σ et des régulateurs transcriptionnels.

1.3.1 Les cibles de CsrA

Le régulateur CsrA, *carbon storage regulator*, a été identifié pour la première fois en 1993 par Tony Romeo chez *Escherichia coli* (Romeo *et al.*, 1993). Ce régulateur joue un rôle important dans la voie d'utilisation du glucose. Plusieurs études ont portées sur les cibles de CsrA chez *E. coli*. Ce régulateur est important, entre autres, dans la formation de biofilms, l'utilisation de glucose, d'acétate et la synthèse du signal secondaire intracellulaire la di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) (Timmermans & Melderen 2009; Pannuri *et al.*, 2011; Jonas *et al.*, 2008; Romeo, 1998). De plus, un lien entre CsrA et la réponse stringente a récemment été établie (Edwards *et al.*, 2011). En effet, CsrA agit en tant que répresseur de cette réponse. Aussi, la protéine régulatrice DksA ainsi que le ppGpp sont des activateurs de la transcription des ARNnc CsrB et CsrC (Edwards *et al.*, 2011). CsrA joue donc un rôle important dans l'adaptation de la bactérie aux situations changeantes de son environnement.

1.3.2 Le mode d'action

CsrA agit en se liant à l'ARNm de ses gènes-cibles (Liu *et al.*, 1995). Ce régulateur reconnaît une séquence consensus, 5'-RUACARGGAUGU-3' (R = purine), dans laquelle les motifs ACA et GGA sont conservés (Dubey *et al.*, 2005). Ce motif est souvent retrouvé dans la séquence Shine-Dalgarno. De plus, celle-ci est fréquemment rencontrée dans une forme d'épingle à cheveux, ce qui a pour effet d'augmenter l'affinité de la protéine pour cet ARNm (Dubey *et al.*, 2005). Le motif GGA se retrouve habituellement au sommet de la boucle. Plusieurs motifs peuvent être présents dans la région promotrice de l'ARNm (Fig. 1-1).

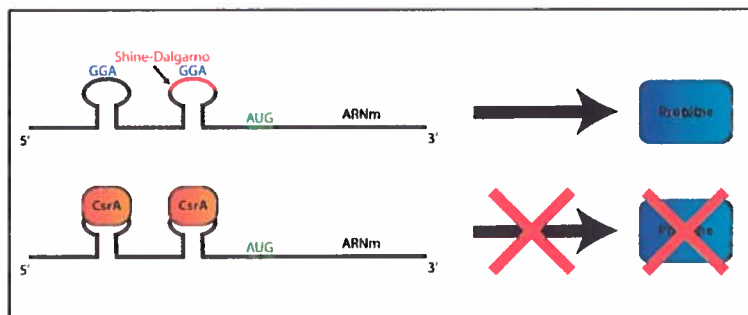


Figure 1-1. Mode d'action de CsrA

1.3.3 La régulation de CsrA

L'action de CsrA est contrôlée par des ARNnc, CsrB et CsrC (Liu *et al.*, 1997; Weilbacher *et al.*, 2003). Ces ARNnc contiennent plusieurs motifs GGA contenus dans des boucles d'épingles à cheveux (Fig. 1-2).

Ces ARNnc agissent comme des appâts : lorsque CsrA est liée à ceux-ci, il ne peut plus agir sur ces gènes-cibles. La transcription de ces ARNnc est contrôlée par un système à deux composantes, BarA/UvrY. Le senseur, BarA, est activé par une faible présence d'acide ainsi que la présence d'intermédiaires du cycle de Krebs (Chavez *et al.*, 2010). Le régulateur, UvrY, est influencé par SdiA, un régulateur du *quorum sensing* (Suzuki *et al.*, 2002). UvrY agit directement, de façon positive, sur la transcription des ARNnc *csrB* et *csrC* (Jonas & Melefort, 2009). Les ARNnc CsrB et CsrC sont affectés par la protéine CsrD qui promeut leur dégradation par la RNase E (Suzuki *et al.*, 2006).

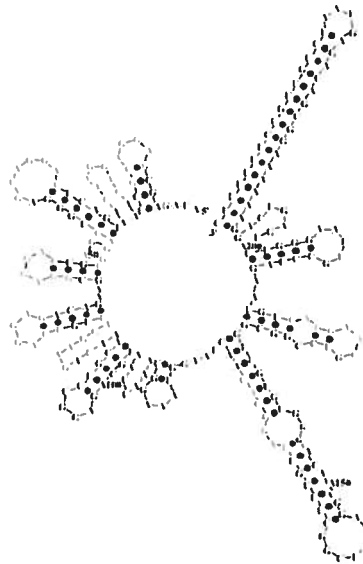


Figure 1-2. Structure secondaire de l'ARNc CsrC

Les motifs reconnus par CsrA sont en rouge. Tiré de (Weilbacher *et al.*, 2003)

Jusqu'à tout récemment, aucune étude approfondie n'avait été effectuée sur la régulation de la transcription et de la traduction de *csrA*. Les études se concentraient plutôt sur l'identification des cibles de CsrA (section 1.3.1), la régulation des ARNc et le système à deux composantes BarA/UvrY. Cependant, Yakhnin *et al.*, ont récemment démontré que *csrA* est transcrit grâce aux facteurs σ^{70} et σ^S (Yakhnin *et al.*, 2011). De plus, ce groupe a identifié cinq promoteurs qui permettent l'initiation de la transcription de *csrA* dans différentes conditions. Ils ont aussi déterminé que CsrA est en mesure de lier son ARNm et de réprimer sa propre traduction. De plus, ils ont observé une activation de la transcription de *csrA* par CsrA. Pour expliquer ceci, les auteurs proposent l'action de CsrA sur un régulateur transcriptionnel non-identifié, qui affecte la transcription de *csrA* à son tour (Yakhnin *et al.*, 2011). La figure 1-3 représente le modèle de régulation de CsrA à ce jour.

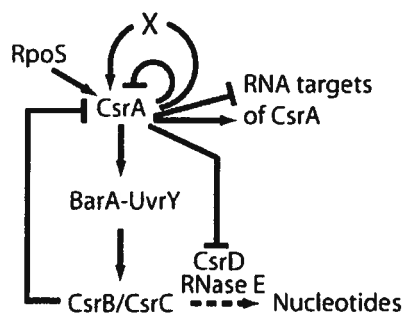


Figure 1-3. Régulation de CsrA

Tiré de (Yakhnin *et al.*, 2011)

1.3.4 Les homologues de CsrA

La recherche d'homologues chez d'autres bactéries s'est faite très tôt par bioinformatique (White *et al.*, 1996). Des homologues pour les ARNnc ainsi que le système à deux composantes sont présents chez la plupart des bactéries qui possèdent un homologue de CsrA. Le tableau 1-1 présente un résumé des systèmes CsrA étudiés jusqu'à ce jour. Cette voie de régulation est présente autant chez des bactéries pathogènes de plantes que chez des bactéries bénéfiques pour celles-ci. De plus, certains pathogènes humains comme *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophilla* et *Salmonella enterica* possèdent aussi des homologues. La classe la plus étudiée est les γ -proteobactéries, mais des homologues sont présents chez les Gram positifs tel *Bacillus subtilis*, chez les spirochètes ainsi que chez les ϵ -proteobactéries (Tableau 1-1). Cette voie contrôle une multitude de phénotype, mais les plus courants sont la motilité et la formation de biofilm. Certaines espèces possèdent plus d'un régulateur homologue à CsrA, comme par exemple, RsmA et RsmE chez *Pseudomonas fluorescens*. Le nombre d'ARNnc peut aussi varier entre un et neuf (Tableau 1-1).

Tableau 1-1. Résumé des homologues de CsrA, BarA/UvrY, CsrB/CsrC chez d'autres bactéries.

Bactérie	Homologue CsrA	Homologue BarA/UvrY	Phénotypes majeurs contrôlés par CsrA/BarA/UvrY	ARNnc contrôlé(s) par BarA/UvrY	Références
Bacilli					
<i>Bacillus subtilis</i>	CsrA	?	Motilité, flagelle	CsrB	(Yakhnin et al., 2007)
<i>Listeria monocytogenes</i>	CsrA	?	Cellobiose	?	(Lukowiak et al., 2004)
Spirochète					
<i>Borrelia burgdorferi</i>	CsrA	?	Motilité, lipoprotéine	?	(Dorsey & Tomaras, 2002)
<i>γ</i>-proteobacteria					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	?	GacS/GacA	Utilisation du citrate	RsmX, RsmY, RsmZ	(Dorsey & Tomaras 2002, Kulkarni et al., 2006)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	RsmA	GacS/GacA	Production d'alginate	RsmY1-2, RsmZ1-7	(Castañeda et al., 2000; Manzo et al., 2011)
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	RsmA	GacS/GacA	Enzyme extracellulaire : pectate lyase, polygalacturonase, cellulase, protéase, <i>hsl</i> (synthase molécule-signal)	RsmB	(Cui et al., 2001; Cui et al., 1995)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	RsmA	?/GacA	Enzyme extracellulaire : pectate lyase, polygalacturonase, cellulase, protéase	RsmB	(Cui et al., 2001; Cui et al., 1995)
<i>Escherichia coli</i>	CsrA	BarA/UvrY	Métabolisme du carbone, motilité, biofilm, virulence	CsrB, CsrC	(Wong & Akerley, 2005)
<i>Haemophilus influenza</i>	CsrA	?	Lipooligosaccharide et phosphorycholine membranaire	?	(Wong & Akerley 2005)
<i>Legionella pneumophila</i>	CsrA	LetS/LetA	Motilité, virulence, cytotoxicité	RsmY, RsmZ	(Molofsky & Swanson 2003; Hovel-Miner et al., 2009)
<i>Photobacterium luminescens</i>	CsrA	BarA/UvrY	Motilité, stress oxydatif, bioluminescence, transport du fer, sucre et peptide, dégradation insecte	CsrB	(Krin et al., 2008)
<i>Proteus mirabilis</i>	RsmA	?	Motilité, virulence	?	(Liaw et al., 2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RsmA	GacS/GacA	Motilité, HCN, biofilm, système de sécrétion type 3 et 6	RsmY, RsmZ	(Brencic & Lory, 2009; Heeb & Haas, 2001; Heurlier et al., 2004)

Bactérie	Homologue CsrA	Homologue BarA/UvrY	Phénotypes majeurs contrôlés par CsrA/BarA/UvrY	ARNnc contrôlé(s) par BarA/UvrY	Références
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	?	GacS/GacA	Phenazines, HCN, surfactant, 2,3-butanediol, protéase, biocontrol	?	(Chancey et al., 1999; Han et al., 2006; Schmidt-eisenlohr et al., 2003)
<i>Pseudomonas entomophila</i>	RsmA1-A3	GacS/GacA	Entolysine, HCN, quorum sensing, motilité	RsmY, RsmZ	(Vallet-Gely et al., 2010)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	RsmA/RsmE	GacS/GacA	DAPG, HCN, protéase, adhérence	RsmX, RsmY, RsmZ	(Blumer et al., 1999; Kay, et al., 2005; Reimann et al., 2005)
<i>Pseudomonas marginalis</i>	?	LemA/GacA	Pectinase, virulence	?	(Liao et al., 1997)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	RsmA/RsmE	GacS/GacA	Syringomycine, syringoline, HSL, alginate, protéase, virulence	RsmX, RsmY, RsmZ	(Quiñones et al., 2004; Willis & Holmstadt, 2001)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	RsmA	GacS/GacA	Coronatine, HSL, système de sécrétion, virulence	RsmX, RsmY, RsmZ	(Chatterjee et al., 2003; Kulkarni et al., 2006)
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	?	PheN (RtpA) /?	Tolaasine, protéase, virulence, motilité	?	(Grewal et al., 1995)
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	?	RepA/RepB	Pectinase, protéase, alginate, virulence	?	(Liao et al., 1994; Liao et al., 1996)
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>Typhimurium</i>	CsrA	BarA/SirA	Motilité, système de sécrétion, protéase, virulence	CsrB, CsrC	(Altier et al., 2000; Lawhon et al., 2003)
<i>Serratia marcescens</i>	RsmA	PigW/PigQ	Motilité, prodigiosine	?	(Ang et al., 2001; Coulthurst et al., 2006)
<i>Serratia plymuthica</i>	?	GrrS/GrrA	Protéase, pyrrolitrine, biocontrôle, phytase	?	(Gore & Payne, 2010)
<i>Shigella flexneri</i>	CsrA	BarA/UvrY	Métabolisme glucose, attachement et invasion	CsrB, CsrC	(Lenz & Bassler, 2007)
<i>Vibrio cholerae</i>	CsrA	VarS/VarA	Gènes régulés par HapR, quorum sensing	CsrB, CsrC, CsrD	(Lenz & Bassler 2007)
<i>Vibrio fischeri</i>	CsrA	GacS/GacA	Bioluminescence, colonisation	CsrB1, CsrB2	(Kulkarni et al., 2006; Whistler et al., 2007; Whistler & Ruby, 2003)
<i>Vibrio vulnificus</i>	CsrA	GacS/GacA	Colonisation, biofilm	CsrB1, CsrB2, CsrB3	(Gauthier et al., 2010; Jones et al., 2008)

Bactérie	Homologue CsrA	Homologue BarA/UvrY	Phénotypes majeurs contrôlés par CsrA/BarA/UvrY	ARNnc contrôlé(s) par BarA/UvrY	Références
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	RsmA	GacS/GacA	Virulence, système sécrétion type III, adhésion, amylase	?	(Blumer <i>et al.</i> , 1999; Chao <i>et al.</i> , 2008; Yang <i>et al.</i> , 2007)
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	RsmA	?/GacA	Virulence	?	(Yang <i>et al.</i> , 2007; Zhu <i>et al.</i> , 2011)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	CsrA	BarA/UvrY	Motilité, invasion cellulaire	CsrB, CsrC	(Fields & Thompson, 2008)
<i>ε-proteobacteria</i>					
<i>Campylobacter jejuni</i>	CsrA	?	Stress oxydatif, biofilm, invasion cellule hôte	?	(Fields & Thompson 2008)
<i>Helicobacter pylori</i>	CsrA	?	Motilité, survie en condition oxydative	CsrB1, CsrB2	(Barnard <i>et al.</i> , 2004; Kulkarni <i>et al.</i> , 2006)

Modifié et traduit de (Lapouge *et al.*, 2008)

1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire. Elle est en mesure de croître dans divers environnements tel le sol, l'eau et les plantes (Kominos *et al.*, 1972). *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste qui possède de multiples facteurs de virulence régulés en grande partie par le *quorum sensing*. Par exemple, *P. aeruginosa* possède des élastases, des exotoxines, un ensemble de phospholipases et de protéases en plus de la pyocyanine, des rhamnolipides et du cyanure d'hydrogène (van Delden, 2004). Tous ces facteurs peuvent affecter différents hôtes. Il a été démontré que cette bactérie est en mesure de causer des infections chez un nombre variés d'hôtes, comme les insectes, les mammifères et les plantes (Rahme *et al.*, 1995).

Chez l'homme, *P. aeruginosa* cause des infections chroniques chez les gens atteints de la fibrose kystique (Doggett *et al.*, 1964). Puisque cette bactérie est résistante à plusieurs traitements antibiotiques, une meilleure connaissance de la régulation de ses gènes de virulence pourrait aider à développer de nouvelles thérapies antipathogènes. Puisque le système RsmA (homologue de CsrA chez *E. coli*) semble réguler les gènes nécessaires pour causer des infections chroniques et aiguës (discuté à la section 1.4.4.2), cette voie pourrait être une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies.

1.4.1 Adaptation à l'environnement

Pour s'adapter à tous ces environnements, une grande partie du génome (près de 10%) de *P. aeruginosa* code pour des régulateurs transcriptionnels et des systèmes à deux composantes (Rodrigue *et al.* 2000; Gooderham & Hancock 2009). C'est un total de 118 systèmes à deux composantes qui sont prédits et de 403 régulateurs transcriptionnels (Stover *et al.*, 2000). De plus, un total de 42 ARNnc a jusqu'à ce jour été identifié (Dötsch *et al.*, 2012).

1.4.2 *Quorum sensing*

Le *quorum sensing* est très étudié chez *P. aeruginosa*. Ce système contrôle environ 6-10% des gènes du génome (Wagner *et al.* 2003; Hentzer *et al.* 2003; Schuster *et al.* 2003). Chez ce microorganisme, trois niveaux de *quorum sensing* sont présents : les systèmes *las*, *rhl* et MvfR/HAQ (Pesci *et al.*, 1997; Déziel *et al.*, 2005). La figure 1-4 présente ces trois systèmes.

Ceux-ci possèdent tous une synthase (LasI, RhlI, PqsABCD+PqsH) qui produit une molécule de signalisation spécifique.

Les systèmes *las* et *rhl* utilisent des acyl homoserines lactones (AHL), soit le N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) ou le N-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL), comme molécule-signal (Pearson *et al.*, 1995; Latifi *et al.*, 1996). La concentration de molécule-signal reflète la densité cellulaire de la population bactérienne. Lorsque celle-ci atteint un certain seuil, les régulateurs LasR et RhlR sont activés. Lorsque ceux-ci sont dimérisés et liés à leur molécule-signal correspondante, ils activent la transcription de gènes-cibles et de leur synthase spécifique (Schuster *et al.*, 2004).

Le système MvfR/HAQ est différent puisque ce dernier nécessite l'action de plusieurs gènes (*pqsA-D*, *pqsH*) afin de synthétiser les molécules-signal (Déziel *et al.*, 2004). Contrairement aux deux autres systèmes, il ne s'agit pas d'AHL, mais bien de 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ). Deux HAQ sont en mesure de lier et activer le régulateur MvfR, soit le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) et le *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) (Xiao *et al.*, 2006a).

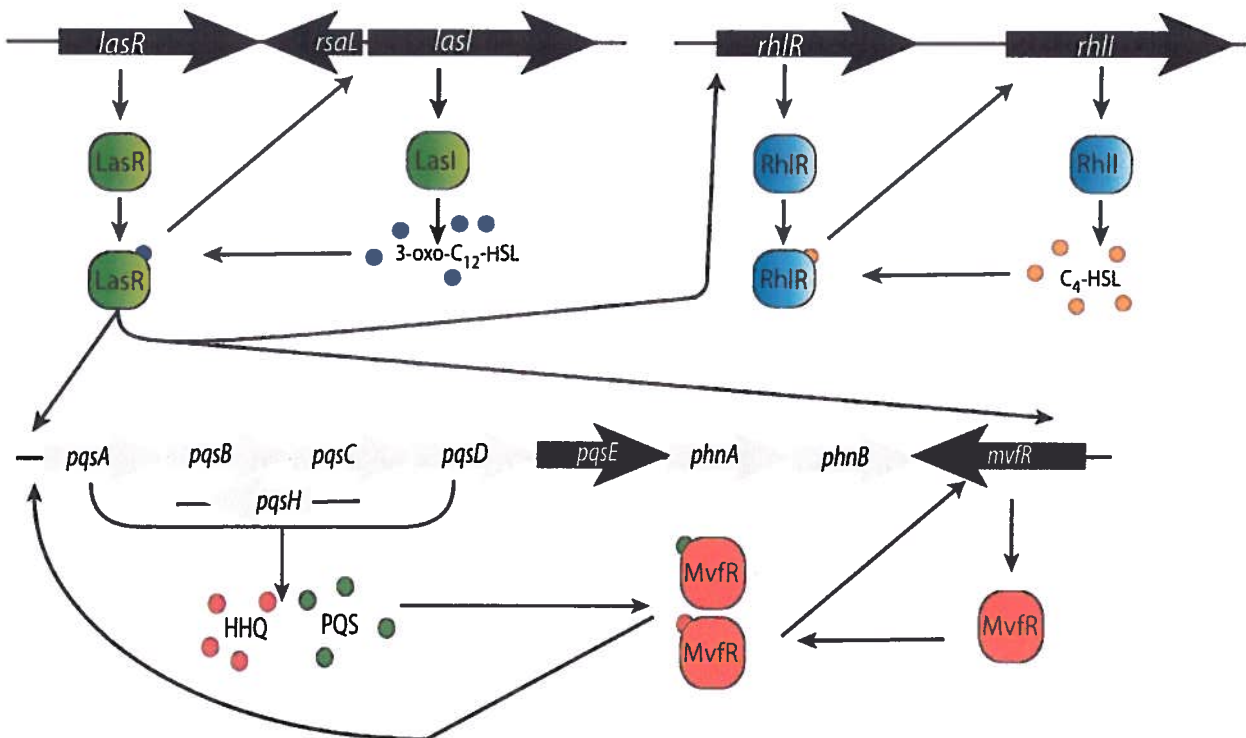


Figure 1-4. Quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*

Inspiré (Déziel *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2009; Pesci *et al.*, 1997)

Les trois systèmes sont reliés entre eux. En effet, le système *las* régule de façon positive les systèmes *rhl* et MvfR/HAQ. LasR affecte directement la transcription de *rhlR*, et *mvfR*, c'est le premier système à être activé (Gilbert *et al.*, 2009). LasR contrôle un total de 74 gènes à partir de 35 promoteurs, entre autre, le gène *lasB* codant pour l'élastase LasB (Gilbert *et al.*, 2009). Le système *rhl*, quant à lui, régule, par exemple : la production de rhamnolipide, de lectine, de HCN et de phénazines, incluant le pigment bleu pyocyanine (Ochsner *et al.*, 1994; Schuster *et al.*, 2004; Schuster *et al.*, 2007; Whiteley *et al.*, 1999). Finalement, le système MvfR/HAQ contrôle entre autres, la production de lectines, de phénazines, en plus d'influencer la formation de biofilm (Pesci *et al.*, 1999; Diggle *et al.*, 2003).

1.4.3 Régulateurs globaux

Les régulateurs globaux affectent soit la transcription, soit la traduction de gènes-cibles. Les effets peuvent être l'activation ou à l'inverse la répression. Voici un aperçu des régulateurs principaux chez *P. aeruginosa*.

DksA. Ce régulateur transcriptionnel module négativement l'expression de rhamnolipide et d'élastase B. Ces facteurs sont reliés respectivement au système de *quorum sensing rhl* et *las* (Perron *et al.*, 2005; Jude *et al.*, 2003). DksA peut lier l'ARN polymérase et ainsi modifier l'affinité de celle-ci pour certains promoteurs (Osterberg *et al.*, 2011). Lorsque le signal de stress ppGpp est présent, cela stabilise l'interaction de DksA avec l'ARN polymérase puisque le ppGpp est en mesure d'interagir directement avec celle-ci (Perron *et al.*, 2005).

GidA. Ce régulateur post-transcriptionnel favorise la traduction du régulateur RhlR (Gupta *et al.*, 2009). GidA n'affecterait pas d'autres gènes. Cependant, puisqu'il augmente la traduction d'un régulateur du *quorum sensing*, la production d'élastase, de pyocyanine et de rhamnolipide est diminuée chez un mutant *gidA*⁻ (Gupta *et al.*, 2009).

MvaT et MvaU. Ces deux régulateurs font partie de la famille des *heat-stable nucleoid-structuring* (H-NS) (Tendeng *et al.*, 2003). MvaT et MvaU sont des répresseurs qui se lient aux promoteurs riches en AT (Castang *et al.*, 2008). Ils agissent donc comme répresseur d'ADN qui a été obtenu d'une autre espèce bactérienne. Puisque la composition en GC varie d'une espèce à l'autre, ces protéines sont en mesure de reconnaître les régions qui sont différentes. De plus, pour que la répression soit efficace, ces répresseurs doivent être dimérisés (Castang & Dove 2010). Ainsi, les gènes régulés par MvaT et MvaU seront différents si le dimère est un homodimère MvaT-MvaT, MvaU-MvaU ou un hétérodimère MvaT-MvaU (Castang *et al.*, 2008;

Castang & Dove 2010). Le régulon de ces deux régulateurs a récemment été identifié : ensemble, ils réduisent l'expression de près de 350 gènes (Castang *et al.*, 2008). Les phénotypes réprimés par MvaT et MvaU comprennent, entre autres, la pyocyanine (Li *et al.*, 2009).

PA14_48830. Ce gène code pour un régulateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de phénotypes liés aux systèmes de *quorum sensing* *rhl* et MvfR/HAQ (Liang *et al.*, 2009). PA1196 (l'homologue chez *P. aeruginosa* PA01) favorise la motilité ainsi que l'expression de l'opéron *phzA1-G1*, impliqué dans la biosynthèse de pyocyanine (Liang *et al.*, 2009). Cependant, le mécanisme d'action et les cibles directes de ce régulateur ne sont pas connus.

PqsE. Bien que la fonction exacte de cette protéine reste inconnue, PqsE est essentiel à l'activité régulatrice du système MvfR/HAQ, dont la production de pyocyanine, et est impliqué dans la virulence (Diggle *et al.*, 2003; Deziel *et al.*, 2005). Un total de 237 gènes est différentiellement exprimés chez un mutant *pqsE* comparativement à la souche sauvage (Rampioni *et al.*, 2010).

Vfr. Ce régulateur transcriptionnel joue un rôle important dans la régulation du *quorum sensing*, particulièrement du régulateur LasR (Albus *et al.*, 1997). Vfr s'autorégule via trois promoteurs distincts (Fuchs *et al.*, 2010; Kanack *et al.*, 2006). De plus, pour activer la transcription de ces gènes cibles, Vfr doit être lié à l'AMP cyclique (Fuchs *et al.*, 2010). Cependant, l'AMPc n'est pas nécessaire pour réguler la transcription de LasR (Brencic & Lory, 2009).

1.4.4 Le régulateur RsmA

1.4.4.1 Généralité

RsmA est un homologue du régulateur post-transcriptionnel CsrA de *E. coli* (Tableau 1-1). RsmA est donc en mesure de lier l'ARNm de gènes-cibles. Ceux-ci, tout comme chez *E. coli*, doivent posséder des motifs GGA et sont habituellement présents dans une boucle d'épingle à cheveux. Ces motifs peuvent être présents en plusieurs endroits, mais un motif est toujours présent dans la séquence Shine-Dalgarno (Dubey *et al.* 2005). Lorsque RsmA est lié à l'ARNm, ce dernier ne peut pas se lier au ribosome et donc, la traduction de cet ARNm est inhibée. Le principe est le même que CsrA chez *E. coli* (Fig.1-1).

1.4.4.2 Les cibles de RsmA

Les gènes affectés par ce régulateur ont été caractérisés. Au départ, les phénotypes affectés chez un mutant *rsmA* ont été étudiés : RsmA a un effet sur la production d'élastase, de protéase, de lectine, d'HCN ainsi que de pyocyanine (Pessi *et al.*, 2001). De plus, deux études transcriptomiques ont été effectuées. Celles-ci comparaient la souche mutante *rsmA*⁻ à la souche sauvage. La première a été effectuée avec la souche PA01 à la fin de la phase exponentielle (DO₆₀₀ = 0,8), la seconde a été effectuée avec la souche PAK en fin de phase stationnaire (DO₆₀₀ = 6) (Burrowes *et al.*, 2006; Brencic & Lory 2009). La technique de puce à ADN a été utilisée afin d'identifier les gènes différentiellement transcrits chez un mutant *rsmA*⁻ comparativement à la souche sauvage. Ces deux études ont permis d'identifier les gènes affectés par RsmA et en tout, près de 500 gènes sont différentiellement exprimés chez un mutant *rsmA* comparativement à la souche sauvage. Entre autres, des gènes impliqués dans la motilité, la formation de biofilm, ainsi que les systèmes de sécrétion de type III (SST3) et de type VI (SST6) sont tous régulés par RsmA (Tableau 1-2). Puisque RsmA est un répresseur, Brencic et Lory proposent une action indirecte de RsmA sur des régulateurs transcriptionnels afin d'expliquer l'effet positif de RsmA sur certains gènes, comme le système de sécrétion de type III (Brencic & Stephen Lory 2009).

Tableau 1-2. Cibles de RsmA chez *P. aeruginosa*

Gènes	Fonction	Références
Effet de répression, régulation directe, infection chronique		
<i>hcnABC</i>	Synthèse du cyanure d'hydrogène (HCN)	(Brencic & Lory 2009)
<i>ppkA, ppA, tagF1, tssM1, tssK1, fhA1, tssA1B1C1, hcp1, tssG1, clpV1</i>	Sécrète toxine Tse2 par SST6	(Brencic & Lory 2009)
<i>pslA-L</i>	Polysaccharides, composant de la matrice du biofilm	(Irie <i>et al.</i> , 2010)
PA0277, PA2541, PA3732, PA4492	Protéine hypothétique	(Brencic & Lory 2009)
Effet d'activation, effet indirect, infection aiguë		
<i>exoT, PA1689, pscQ, pcr13, pcrVpopBD, exsCEBA, exsDpscEFGHIJ, exoY, exoS</i>	Injection toxines ExoS et ExoU par SST3	(Brencic & Lory 2009)
<i>pil, pilD, pilVXY1, pilMNOQ</i>	Motilité de type <i>twitching</i> et colonisation	(Brencic & Lory 2009)

Les cibles affectées par RsmA jouent un rôle dans les infections aiguës ou chronique (Tableau 1-2). Les infections aiguës sont caractérisées par l'invasion et par la cytotoxicité des bactéries, ce qui cause des lésions aux tissus. Cela peut mener à une septicémie et à la mort (Coggan & Wolfgang, 2012; Sadikot *et al.*, 2005). Chez *P. aeruginosa*, les facteurs de virulence reliés à ce type d'infection sont principalement la sécrétion de toxine grâce au système de sécrétion de type III et la sécrétion de protéases, d'hémolysine ainsi que de pyocyanine (Sadikot *et al.*, 2005). À l'inverse, l'infection chronique est caractérisée par l'absence de cytotoxicité et peu d'invasion. Lors de ce type d'infection, les bactéries forment des biofilms qui les protègent du système immunitaire ainsi que des antibiotiques (Coggan & Wolfgang, 2012). Contrairement à l'infection aiguë, ce n'est pas la septicémie qui cause la mortalité, mais bien la production de facteur inflammatoire de l'hôte. Chez *P. aeruginosa*, les gènes impliqués dans la formation de la matrice du biofilm, comme les gènes *psl* et *pel* sont importants lors des infections chroniques (Coggan & Wolfgang, 2012). De plus, les systèmes de sécrétion de type VI semblent importants lors de ce type d'infection, mais leur rôle reste encore méconnu (Mougous *et al.*, 2006)

1.4.4.3 Les ARNnc RsmZ et RsmY

Comme chez *E. coli* (section 1.3.3), deux ARNnc régulent l'activité de RsmA chez *P. aeruginosa*. RsmZ et RsmY possèdent tous deux plusieurs motifs GGA à l'extrémité de boucles d'épingle à cheveux (Heurlier *et al.*, 2004; Valverde *et al.*, 2003).

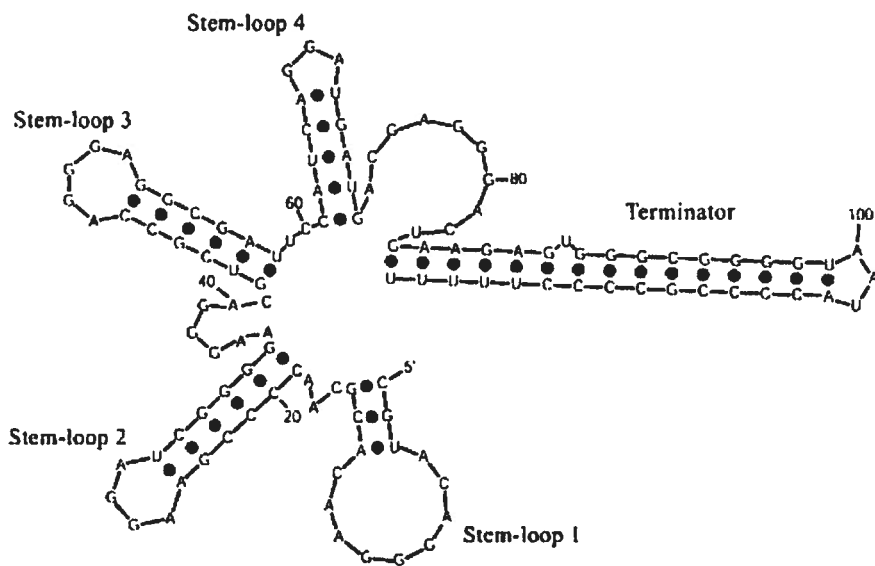


Figure 1-5. Structure secondaire de l'ARNnc RsmZ

Tiré de (Heurlier *et al.*, 2004)

RsmZ (Fig. 1-5) possède 117 nucléotides et comprend quatre boucles d'épingles à cheveux qui contiennent tous un motif GGA, reconnu par RsmA (Heurlier *et al.*, 2004). De cette façon, cet ARNnc est en mesure de séquestrer RsmA et diminuer la répression des ARNm cibles. RsmY contient 124 nucléotides (Fig. 1-6) (Heeb *et al.*, 2004). Plusieurs motifs GGA sont présents dans cet ARNnc, dont cinq dans des structures d'épingles à cheveux.

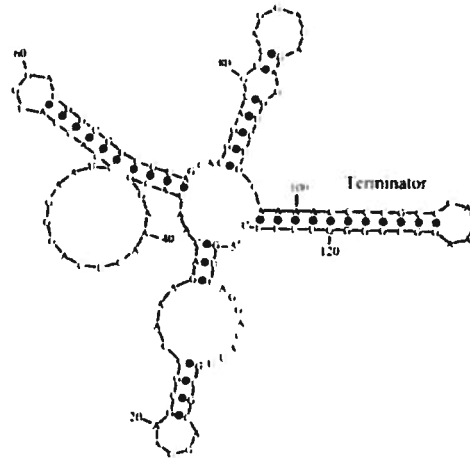


Figure 1-6. Structure secondaire de l'ARNnc RsmY chez *P. aeruginosa*

Tiré de (Heeb *et al.*, 2004)

1.4.4.4 Les systèmes à deux composantes

GacA/GacS. Ce système est homologue à BarA/UvrY chez *E. coli*. GacA est un régulateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de la virulence chez *P. aeruginosa*. En effet, un mutant *gacA* est moins virulent chez l'homme, la souris et la plante (Rahme *et al.*, 1995). GacS est le senseur qui phosphoryle GacA. Cette voie agit sur la transcription des deux ARNnc RsmZ et RsmY (Brencic *et al.*, 2009). Lorsque GacS perçoit un signal, ce dernier forme un homodimère et ensuite, phosphoryle GacA qui à son tour active la transcription de *rsmZ* et *rsmY* (Fig. 1-7).

RetS. Ce senseur est particulier puisqu'il ne possède pas de régulateur associé (Goodman *et al.*, 2004). RetS promeut la motilité et la cytotoxicité via le système de sécrétion de type III (Goodman *et al.*, 2004). RetS est en mesure de former un hétérodimère avec le senseur GacS au niveau cytoplasmique. De cette façon, GacS ne peut plus former d'homodimère et ainsi, il ne peut plus activer GacA. RetS agit donc comme un répresseur de la voie Gac/RsmA (Goodman *et al.*, 2009).

LadS. Ce senseur est lui aussi sans régulateur associé connu (Ventre *et al.*, 2006). Contrairement au senseur RetS, LadS a un effet positif sur la voie de régulation Gac/RsmA. Il promeut la formation de biofilm et réduit la cytotoxicité (Ventre *et al.*, 2006). De plus, son mécanisme d'action est inconnu. Il a récemment été démontré que ce senseur est inactivé, dû à une mutation, chez la souche *P. aeruginosa* PA14, ce qui la rend plus virulente lors des infections aiguës (Mikkelsen *et al.*, 2011).

BfiS/BfiR. Ce système est impliqué dans la formation de biofilm (Petrova & Sauer 2010). Cette voie est active lorsque les bactéries se sont attachées à une surface. Le régulateur BfiR active la transcription du gène *cafA* qui code pour l'ARNase G. Cette dernière dégrade RsmZ spécifiquement, et n'affecte pas RsmY. Ceci permet la progression dans les étapes de formation du biofilm (Petrova & Sauer 2010).

SagS/HptB. SagS fait partie de la même catégorie de senseur que RetS, et ne possède pas de régulateur (Petrova & Sauer, 2011). SagS est en mesure de phosphoryler HptB qui effectue un phosphorelai avec le régulateur PA3346 (Petrova & Sauer, 2011). HptB peut phosphoryler RetS et donc influencer le niveau de transcription des ARNnc RsmZ et RsmY (Bordi *et al.*, 2010). En condition planctonique, il a été démontré que SagS est en mesure d'inhiber l'activité de BfiS, tandis qu'en condition de biofilm, SagS active la voie BfiS/BfiR (Petrova & Sauer 2011). Cette voie agirait donc à deux niveaux sur les ARNnc, soit par HptB ou par l'ARNase G (Petrova & Sauer 2011).

1.4.4.5 La régulation de RsmA

Un schéma résumé sur la régulation de RsmA est présent à la figure 1-7. RsmA est régulé au niveau post-transcriptionnel par les ARNnc RsmY et RsmZ. Ceux-ci ne sont pas présents en quantité égale et aux mêmes moments dans la cellule. Il a été démontré que RsmY est présent en quantité plus importante que RsmZ (Petrova & Sauer, 2010, 2011). De plus, les séquences régulatrices en amont des deux ARNnc sont différentes. Bien qu'ils soient tous deux régulés positivement par GacA, RsmZ est réprimé par MvaT et MvaU, mais pas RsmY (Brencic *et al.*, 2009). De plus, RsmY est stabilisé grâce aux hexamères de Hfq qui sont en mesure de lier cet ARNnc à deux endroits distincts, ce qui le protège de la dégradation (Sonnleitner *et al.*, 2006). L'implication de cinq systèmes à deux composantes dans la régulation de RsmZ et RsmY permet de réguler finement la transcription de ces deux appâts de RsmA. Bien que ces systèmes soient relativement bien étudiés, les signaux environnementaux auxquels ils

répondent ne sont pas connus. Le stade de développement du biofilm semble toutefois important puisque les voies BfiS/BfiR et SagS/HptB réagissent différemment en fonction du stade de formation du biofilm (Petrova & Sauer, 2010, 2011).

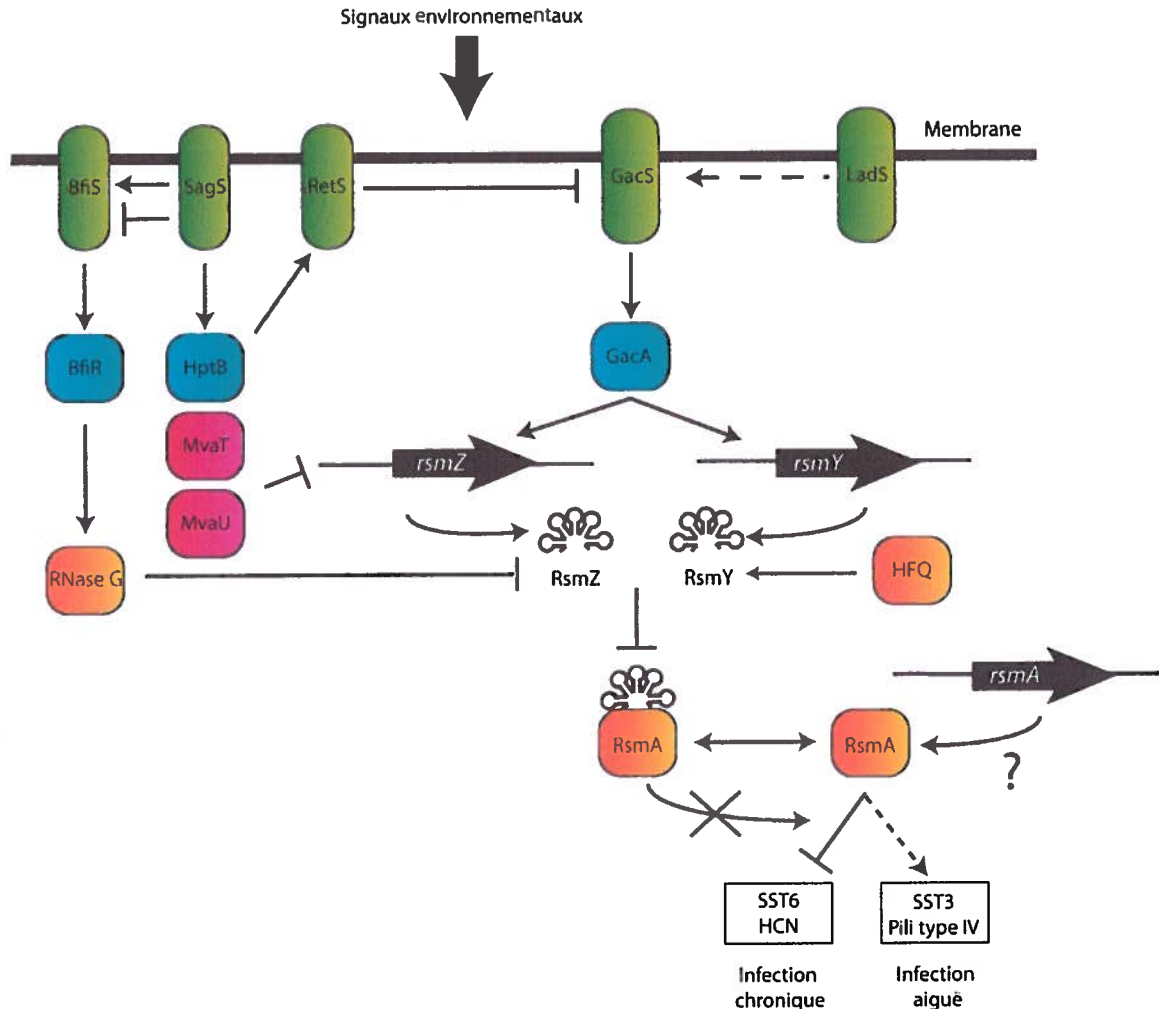


Figure 1-7. Régulation du système RsmA chez *Pseudomonas aeruginosa*

Inspiré de (Bordi *et al.*, 2010; Goodman 2010; Mikkelsen *et al.*, 2011; Petrova & Sauer 2011; Sonnleitner *et al.*, 2006; Brencic *et al.*, 2009). Les lignes pleines représentent des effets directs, les lignes pointillées des effets indirects ou des hypothèses.

Le régulateur RsmA agit comme un pivot permettant à la bactérie de passer d'une activation des gènes nécessaires à l'établissement d'une infection aiguë à ceux impliqués dans une infection chronique, et vice-versa. Ce choix se fait en amont par les systèmes à deux composantes, en particulier RetS et LadS. Ces deux senseurs ont un effet opposé sur le senseur GacS (Ventre & Filloux, 2006). RetS, en créant un hétérodimère avec GacS, réduit la quantité d'ARNc RsmY et RsmZ présents, ce qui a pour effet d'augmenter la quantité de RsmA actif et donc, favorise l'infection aiguë (Goodman *et al.*, 2009). À l'inverse, le senseur LadS promeut l'activité du

senseur GacS, ce qui augmente la quantité d'ARNnc présent et diminue la quantité de RsmA actif (Ventre *et al.*, 2006). Cela favorise la formation de biofilm et donc, l'infection chronique.

1.5 La problématique

Toutes ces voies de régulations ont pour but de contrôler le niveau de RsmA actif par l'action des ARNnc RsmY et RsmZ. Cependant aucune étude n'a porté sur la régulation même de l'expression de *rsmA* chez *P. aeruginosa*. Puisque ce régulateur joue un rôle important dans la régulation de facteurs de virulence et l'adaptation à l'environnement, une meilleure compréhension de sa régulation pourrait aider à identifier de nouvelles pistes pour des thérapies antipathogène.

1.5.1 L'hypothèse du projet

L'hypothèse du travail était que *rsmA* est régulé au niveau de sa transcription et de sa traduction par différents mécanismes. De plus, puisque plusieurs systèmes à deux composantes sont présents en amont de *rsmA*, certains facteurs environnementaux doivent avoir un effet sur l'expression de *rsmA*.

1.5.2 Les objectifs

Les objectifs du projet étaient d'identifier les régulateurs transcriptionnels et traductionnels de *rsmA*. De plus, ce projet visait à découvrir quels facteurs environnementaux sont importants dans cette régulation. Pour ce faire, la construction de rapporteurs *lacZ* transcriptionnel et traductionnel a été la première étape. Par la suite, la quantification de la transcription et de la traduction de *rsmA* dans divers mutants dans des facteurs de régulation tel que ceux impliqués dans le *quorum sensing* a permis d'identifier quelques régulateurs jouant un rôle dans la régulation de *rsmA*. Grâce aux rapporteurs, les effets de la température ainsi que la présence de différentes sources de carbone ont pu être investigués. De plus, un criblage a permis l'identification de gènes qui seraient importants dans la régulation de *rsmA*.

2 MÉTHODOLOGIE

2.1 Bactéries et plasmides

Les expériences présentées dans ce mémoire ont été effectuées avec la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, plus précisément la souche UCBPP-PA14 (PA14). Cette souche provient d'un isolat clinique prélevé d'un patient grand brûlé (Rahme *et al.*, 1995). PA14 est reconnu pour sa virulence chez les plantes, les insectes ainsi que chez l'homme (Choi *et al.*, 2002; Jander *et al.*, 2000; Plotnikova *et al.*, 2000). Toutes les souches bactériennes utilisées ainsi que les mutants provenant de la banque de mutants par transposon (Liberati *et al.*, 2006) utilisés pour les travaux présentés dans ce mémoire sont énumérés au tableau 2-1. Les plasmides utilisés pour ces travaux sont énumérés au tableau 2-2.

Tableau 2-1. Bactéries

Souches	Caractéristiques	Références
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Prototrophe	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
<i>aer</i> ⁻	<i>aer</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>algQ</i> -	<i>algQ</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>algR</i>	<i>algR</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>ANR</i>	<i>ANR</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>cbrB</i> ⁻	<i>cbrB</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>crc</i> ⁻	<i>Crc</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>dksA</i> ⁻	<i>dksA</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>gacA</i> ⁻	<i>gacA</i> ::TnphoA	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>gidA</i> ⁻	<i>gidA</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>lasR</i>	<i>lasR</i> ::Gm	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
<i>mvaT</i>	<i>mvaT</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>mvaU</i>	<i>mvaU</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>mvfR</i> ⁻	$\Delta mvfR$	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
<i>PA14_44300</i> ⁻	<i>PA14_44300</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>PA14_48570</i> ⁻	<i>PA14_48570</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>PA14_48830</i> ⁻	<i>PA14_48830</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>pqsE</i>	$\Delta pqsE$	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
<i>ptxR</i>	<i>ptxR</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>qteE</i>	<i>qteE</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>relA</i> ⁻	<i>relA</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>rhIR</i>	<i>rhIR</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)

Souches	Caractéristiques	Références
<i>rpoN</i>	<i>rpoN</i> ::Gm ^r	(Hendrickson <i>et al.</i> , 2001)
<i>rpoS</i> ^r	<i>rpoS</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>rsaL</i> ^r	<i>rsaL</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>rsmA</i> ^r	<i>rsmA</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>vfR</i>	<i>vfR</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>vqsR</i>	<i>vqsR</i> ::MaR2xT7 ^a	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>E. coli</i>		
SM10 (λpir)	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu Km λpir	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
X7213	<i>thi-1 thr-1 leuB6 fhuA21 lacY1 glnV44 asdA4 recA1 RP4 2-Tc:Mu [λpir] Km^r</i>	(Kang <i>et al.</i> , 2002)
DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

^aMaR2xT7 : transposon avec une cassette de résistance à la gentamycine (Liberati *et al.*, 2006)

Tableau 2-2. Plasmides

Plasmides	Caractéristiques	Références
pBT20	Vecteur contenant une transposase C9 <i>mariner</i> , Gm ^r	(Kulasekara <i>et al.</i> , 2005)
pGEM®-T Easy	Vecteur linéaire avec une séquence de plusieurs thymidine ainsi que le gène <i>lacZ</i> pour faciliter le clonage de fragment PCR, Cb ^r	Promega
pFLP2	Vecteur d'expression de la flippase <i>flp</i> , <i>sacB</i> , Cb ^r	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
mini CTX1	Vecteur intégratif, Ω-FRT- <i>attP</i> - MCS, <i>ori</i> , <i>int</i> , et <i>oriT</i> , Tet ^r	(Hoang <i>et al.</i> , 2000)
mini CTX- <i>lacZ</i>	Vecteur intégratif contenant le gène <i>lacZ</i> , Ω-FRT- <i>attP</i> - MCS, <i>lacZ</i> , <i>ori</i> , <i>int</i> , et <i>oriT</i> , Tet ^r	(Hoang <i>et al.</i> , 2000)
pUCPSK	Vecteur navette <i>E. coli</i> – <i>P. aeruginosa</i> , Cb ^r	(Watson <i>et al.</i> , 1996)
pMIC61 (pUCPSK- <i>lasR</i>)	<i>lasR</i> dans pUCPSK avec un promoteur <i>lac</i> dans un fragment <i>HindIII-EcoRI</i> (5'-3' <i>lasR</i>), Cb ^r	John Mattick, Institute of Molecular Bioscience, University of Queensland, Australia
pME3859	Fusion traductionnelle <i>rsmA'</i> - <i>lacZ</i> , Tet ^r	(Pessi <i>et al.</i> , 2001)
pMS1	Région de 194 pb en amont du site d'initiation de la traduction de <i>rsmA</i> ainsi que les 7 premiers codons, Cb ^r ,	Cette étude
pMS5	Fusion traductionnelle <i>rsmA'</i> - <i>lacZ</i> dans pGEM-T-easy, Cb ^r	Cette étude
pMS6	Fusion transcriptionnelle <i>rsmA'</i> - <i>lacZ</i> , dans le mini CTX- <i>lacZ</i> Tet ^r	Cette étude
pMS7	Fusion traductionnelle <i>rsmA'</i> - <i>lacZ</i> , dans le mini CTX1 Tet ^r	Cette étude

2.1.1 Construction des rapporteurs transcriptionnel et traductionnel *rsmA-lacZ*

Pour étudier la régulation aux niveaux transcriptionnel et traductionnel de *rsmA* chez *P. aeruginosa*, deux rapporteurs ont été construits. Pour ce faire, le plasmide pME3859 a été utilisé comme matrice (Pessi *et al.*, 2001). Ce plasmide contient une fusion traductionnelle entre les 194 pb en amont du gène *rsmA* en plus de ces 7 premiers codons et le gène *lacZ*, tel que représenté à la figure 2-1.

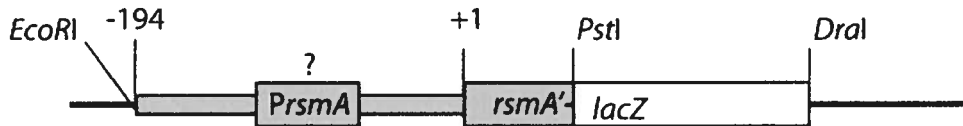


Figure 2-1. Fusion traductionnelle *rsmA'-lacZ* sur pME3859

2.1.1.1 Rapporteur transcriptionnel

Un fragment de 215 pb contenant la région promotrice de *rsmA* ainsi que les 7 premiers codons a été amplifié à l'aide des amorces *rsmAF_HindIII* et *rsmAR_HindIII* (Appendice B). Ces deux amorces contiennent un site de restriction pour l'enzyme *HindIII*. Les programmes PCR utilisés ainsi que les recettes des réactions sont disponibles dans l'appendice B. Après digestion, le fragment a été purifié sur gel et ligué dans pGEM®-T Easy (Promega), pour produire pMS1, et ce dernier a finalement été transformé dans *E. coli* DH5α par choc thermique (voir section 2.1.3.1). Une extraction plasmidique a été effectuée pour purifier le plasmide pMS1 et celui-ci fut ensuite digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*-HF (Haute-Fidélité) et ligué dans le vecteur mini CTX-*lacZ* (Fig. 2-2A) préalablement digéré par *HindIII*-HF et déphosphorylé (voir section 2.1.2) pour éviter la ligation du vecteur sur lui-même.

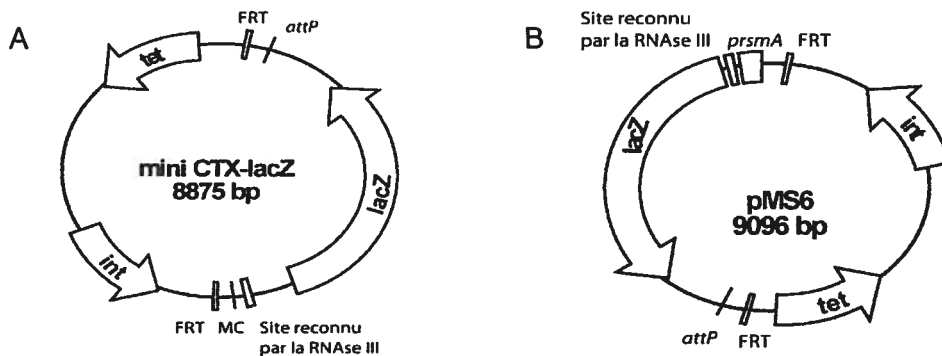


Figure 2-2. Vecteur chromosomique mini CTX-*lacZ* (A) et rapporteur transcriptionnel pMS6 *rsmA-lacZ* (B)

Le vecteur mini CTX-*lacZ* contient le gène *int* qui code pour une intégrase. Cela permet l'intégration du plasmide dans le génome bactérien au site *attB* utilisé par le phage ϕ CTX, par recombinaison avec le site *attP* du plasmide (Hoang *et al.*, 2000). De plus, le gène *lacZ* est présent sans promoteur et contient un site reconnu par la RNase III entre le site de multi-clonage et le *lacZ*. Cela permet au gène *lacZ* d'être transcrit indépendamment du promoteur inséré, assurant ainsi une fusion transcriptionnelle. Le plasmide résultant, pMS6, contient donc une fusion transcriptionnelle (*prsmA-lacZ*) entre la région promotrice de *rsmA* et le gène *lacZ* présent dans le vecteur mini CTX-*lacZ*. Ce plasmide est représenté à la figure 2-2B.

2.1.1.2 Rapporteur traductionnel

Le rapporteur traductionnel a été construit dans le vecteur mini CTX1. Ce dernier comporte les mêmes éléments que le mini CTX-*lacZ* à l'exception du gène *lacZ* et du site de reconnaissance pour l'enzyme RNase III qui sont tous deux absents (Hoang *et al.*, 2000). Le plasmide pME3859 a servi de matrice pour l'amplification de la fusion traductionnelle *rsmA-lacZ* avec les amorces *rsmAF_HindIII* et *lacZR* à l'aide de l'ADN polymérase Taq Phusion (Neb). Le programme PCR ainsi que la liste des réactifs et les amorces sont disponible à l'appendice B. Ce fragment de 3269 pb, une fois purifié sur gel, a été ligué dans le vecteur pGEM®-T Easy pour faciliter la suite du clonage donnant ainsi le plasmide pMS5. Ce vecteur contient un site de restriction pour l'enzyme *NotI* à chaque extrémité du site de multi-clonage. Cependant, puisque la digestion de pMS5 avec *NotI*-HF donnait deux fragments d'environ 3 kb, une double digestion a été utilisée pour couper le vecteur en deux et permettre la purification de l'insert. Par contre, une double digestion *SacI*-HF (pour couper le vecteur) et *NotI*-HF (pour sortir l'insert) résultait en l'apparition d'une bande non spécifique. Pour remédier à la situation, l'insert a été amplifié par PCR à partir du plasmide purifié pMS5 avec les amorces universelles SP6 et T7. Par la suite, la réaction PCR a été purifiée sur colonne et digérée avec l'enzyme de restriction *NotI*-HF et repurifiée sur colonne. Enfin, le fragment a été ligué dans le vecteur mini CTX1 digéré avec *NotI*-HF et déphosphorylé (voir section 2.1.2) pour donner le plasmide pMS7 (Fig. 2-3).

De plus, les sites FRT (Flippase Recognition Target) présents sur le vecteur mini-CTX1 permettent l'excision du gène de résistance à la tétracycline ainsi que de l'intégrase, le tout grâce à une flippase (Valente *et al.*, 2000). Le protocole utilisé est celui du groupe de Schweizer (Choi & Schweizer, 2006). Pour ce faire, le plasmide pFLP2 a été transformé dans des cellules électrocompétentes de *P. aeruginosa* PA14 (pMS7) (voir section 2.1.3.2). La sélection des colonies s'est faite en ajoutant de la carbenicilline 100 μ g/ml aux géloses. Le plasmide pFLP2

permet l'expression de la recombinase Flp qui excise la cassette de résistance en reconnaissant les sites FRT qui l'entoure. Suite à l'excision de la cassette de résistance, la souche redevient sensible à la tétracycline. Le plasmide pFLP2 a ensuite été éliminé en utilisant la sensibilité au sucrose de la souche conférée par le gène *sacB* présent sur le plasmide. Finalement, la souche de *P. aeruginosa* PA14::*rsmA'-lacZ* a été obtenue. Cette souche ne porte pas de résistance à un antibiotique et a été par la suite utilisée pour le criblage par mutagenèse aléatoire.

Les plasmides pMS6, pMS7 et pMS7F ont été transformés dans *E. coli* SM10 pour permettre le transfert du plasmide chez *P. aeruginosa* par conjugaison (voir section 2.1.4), et ainsi l'insertion en une copie dans le chromosome de PA14 au site *attB*.

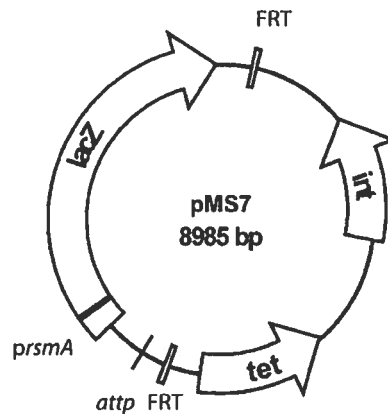


Figure 2-3. Rapporteur chromosomique traductionnel pMS7

2.1.2 Déphosphorylation des vecteurs

La déphosphorylation des vecteurs était effectuée après avoir digéré ceux-ci avec les enzymes de restrictions appropriées. Le volume de la réaction est ajusté à 50 µl avec le tampon One Phor All (OPA) et les enzymes sont inactivés en chauffant 20 min à 65°C. La phosphatase alcaline est ajoutée pour effectuer la déphosphorylation et la réaction est incubée 30 min à 37°C. Par la suite, l'inactivation de la phosphatase alcaline (BioLabs) est effectuée en chauffant la réaction 15 min à 85°C. Les vecteurs sont ensuite purifiés sur colonne d'affinité (EconoSpin). La déphosphorylation diminue les risques de ligation du vecteur sur lui-même.

2.1.3 Transformation

2.1.3.1 Transformation par choc thermique

2.1.3.1.1 Préparation des cellules compétentes au CaCl₂

La transformation par choc thermique a été utilisée pour transformer des vecteurs dans les souches *E. coli* DH5 α , SM10 et χ 7213. Les cellules compétentes étaient préparées à l'aide de cellules en début de phase exponentielle ($DO_{600} = 0,5$). Les manipulations étaient effectuées sur glace et les centrifugations à 4°C. Tout d'abord, les cellules étaient récupérées grâce à une centrifugation à 6000 X *g* durant 1 min. Le culot était resuspendu dans 500 μ l de CaCl₂ 50 mM froid (4°C). Les cellules étaient incubées sur glace pendant 10 min. Ensuite grâce à une centrifugation à 6000 X *g* durant 1 min, les cellules étaient enfin resuspendues dans 100 μ l de CaCl₂ 50 mM froid (4°C) (adapté de (Cohen *et al.*, 1972)).

2.1.3.1.2 Transformation des cellules compétentes

Une fois les cellules compétentes prêtes, l'ADN à transformer était ajouté aux cellules et mélangé doucement en tapotant le tube. Les cellules et l'ADN étaient ensuite incubés durant 45 min sur glace. Le tube était alors déposé dans un bloc chauffant à 42°C pendant 40 sec pour le choc thermique et immédiatement 2 min sur la glace. Enfin, les cellules étaient transférées dans 1 ml de TSB (voir section 2.2.1) et incubées durant 1 h à 37°C dans un tambour rotatif pour être finalement ensemencées sur un milieu sélectif (adapté de (Cohen *et al.*, 1972)).

2.1.3.2 Transformation par électroporation

2.1.3.2.1 Préparation des cellules électro-compétentes

L'électroporation a été employée pour transformer le plasmide pME3859 ainsi que le plasmide pFLP2 dans différentes souches de *P. aeruginosa*. La technique utilisée a été adaptée par Marie-Christine Groleau d'une méthode publiée par le groupe de Schweizer (Choi *et al.*, 2006). Les cellules compétentes étaient préparées à partir de pré-cultures dans le TSB. Les cellules étaient premièrement récupérées grâce à une centrifugation de 1 min à 8500 x *g* puis resuspendues dans 1 ml de sucrose 300 mM froid (4°C) et stérile. Les cellules étaient lavées une 2^e fois avec 1 ml de sucrose 300 mM, et finalement resuspendues dans un volume final de 100 μ l de sucrose 300 mM.

2.1.3.2.2 Transformation des cellules électro-compétentes

L'ADN à transformer était ajouté aux cellules compétentes et le tout transféré dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm (Bio-Rad). Grâce à l'électroporateur (Eppendorf, electroporator 2510), le mélange de cellules compétentes et d'ADN était soumis à 2500 V. Par la suite, les cellules étaient incubées dans 1 ml de TSB à 37°C dans un tambour rotatif pendant 1 h. Finalement, les cellules étaient ensemencées sur un milieu sélectif.

2.1.4 Conjugaison

Les rapporteurs intégratifs portés par pMS6, pMS7 et pMS7F ont été transférés chez *P. aeruginosa* PA14 ainsi que dans plusieurs mutants par conjugaison. La technique utilisée était la méthode sur filtre. Pour cette technique, une pré-culture d'une souche donneuse, *E. coli* SM10 (pMS6, pMS7 ou pMS7F), ainsi que d'une souche receveuse étaient toutes deux diluées dans un flacon Erlenmeyer de 125 ml stériles chacun, pour un ratio de 1 : 20 (1 ml de culture dans 19 ml de TSB).

Par la suite, les cultures sont incubées à 37°C sans agitation jusqu'à une densité optique à 600 nm (DO_{600}) entre 0,5 et 0,7. Lorsque les cultures ont atteint la bonne DO_{600} , un filtre stérile 0,2 μ m de 25 mm de diamètre (PALL) dans un portoir à filtre, ainsi qu'une seringue de 5 ml sont assemblés. Le filtre est humidifié avec 2 ml de tampon phosphate salin (PBS) contenant 0,1% de gélatine. Puis, un mélange de 4,5 ml de PBS gélatine 0,1%, 400 μ l de la souche donneuse et 100 μ l de la souche receveuse est filtré de façon stérile. Finalement, le filtre (côté avec bactérie vers le haut) est déposé sur une gélose LB et incubé à 37°C pendant 16h. Tous les composants du montage ainsi que les solutions doivent être préchauffés à 37°C. Enfin, le filtre est déposé dans un tube stérile, 500 μ l de PBS gélatine 0,1% sont ajoutés et le tube est vortexé pour bien décoller les cellules du filtre.

Lors des conjugaisons avec les rapporteurs, les bactéries ont été ensemencées sur des géloses de sélection LB agar contenant 125 μ g/ml tétracycline ainsi que 25 μ g/ml triclosan. Ces sélections ont permis la conservation des bactéries de *P. aeruginosa* contenant le rapporteur intégré et l'élimination du donneur, respectivement. À partir des colonies isolées, des pré-cultures étaient préparées. Un dosage de la β -galactosidase rapide était effectué avec trois pré-cultures (de trois colonies différentes) pour vérifier la présence du rapporteur et son efficacité (voir section 2.3). Finalement, une souche pour chaque conjugaison était congelée à -70°C dans du glycérol 15%.

2.2 Milieux de culture

2.2.1 Milieux de culture liquide

Le milieu de culture *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Difco) a été utilisé pour les pré-cultures. Lorsque nécessaire, les antibiotiques suivant ont été ajoutés : tétracycline (75 µg/ml pour *P. aeruginosa* et 25 µg/ml pour *E. coli*), carbenicilline ou ampicilline (100 µg/ml pour *E. coli*), gentamycine (100 µg/ml pour sélectionner les transposants « mariner » et 15 µg/ml pour les mutants de la banque). Le milieu de culture M63 a été utilisé pour tester l'effet de différentes sources de carbone. Ce milieu a été préparé concentré 10X et dilué 1X lors de l'usage. Pour préparer ce milieu, les composés suivant ont été pesés, dilués dans l'eau osmose inverse puis stérilisés à l'autoclave : 30 g/l KH_2PO_4 , 70 g/l K_2HPO_4 , 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 0,005 g/l FeSO_4 . La source de carbone à une concentration de 0,1% ainsi que 1 mM MgSO_4 ont été stérilisés séparément par filtration et ajoutés au milieu 1X avant l'utilisation.

2.2.2 Milieux de culture solide

Le milieu *Lysogeny Broth agar* (LB agar) (35 g/l) a été utilisé comme milieu solide de routine (Wisent). Ce milieu, supplémenté des antibiotiques adéquats, a servi lors des conjugaisons et des transformations.

2.2.3 Géloses alizarine-gal

Pour effectuer le criblage, le substrat chromogénique alizarine-β-D-galactoside (aliz-gal) a été utilisé (James *et al.*, 2000). Ce substrat de la β-galactosidase libère un pigment de coloration rose lorsqu'il est clivé par celle-ci. Les plaques carrées de 20 cm par 20 cm ont été utilisées pour couler les géloses aliz-gal. Celles-ci ont été préalablement stérilisées 15 min sous les rayons ultra-violet. Les géloses étaient composées de 200 ml de LB agar (35 g/l), aliz-gal (50 mg/l) et AlKSO_4 (500 mg/l). Tous les composants ont été pesés et dissouts dans de l'eau osmose inverse, puis stérilisés à l'autoclave. Pour sélectionner les transposants, de la gentamycine 100 µg/ml a été ajoutée aux géloses.

Les géloses ont été séchées 45 minutes au centre d'une enceinte biologique puis conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. Les géloses utilisées pour la confirmation des colonies sélectionnées

ne contenaient pas d'antibiotique pour permettre aux souches témoins de croître et étaient coulées dans des vases de Pétri standards.

2.2.4 Croissance des bactéries

Les souches utilisées lors des expériences décrites dans ce mémoire étaient conservées dans 15% de glycérol à -70°C , dans des tubes cryogéniques. Les pré-cultures étaient inoculées dans des tubes en verres contenant 3 ml de TSB, supplémenté d'antibiotique si nécessaire. Les tubes étaient incubés à 37°C dans un tambour rotatif pendant 16h.

2.3 Dosage de la β -galactosidase

Le dosage de la β -galactosidase a permis la quantification de la transcription et la traduction des rapporteurs *rsmA'-lacZ* et *rsmA-lacZ*. Dans le texte, l'expression « la traduction ou la transcription de *rsmA* » est utilisé afin d'alléger ce dernier.

Chacune des souches, à partir des pré-cultures, a été diluée dans 3 ml de TSB pour obtenir une DO_{600} de 0,05, sauf indication contraire. Les cultures étaient ensuite incubées à 37°C dans un tambour rotatif.

Le protocole utilisé était celui de Miller, tel que modifié par Zhang & Bremer (1995). Les réactifs suivants sont nécessaires : tampon Z, SDS 0,1%, chloroforme, *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranosidase (ONPG) 4 mg /ml et Na_2CO_3 1M. Le détail des solutions est disponible à l'appendice A. Les solutions étaient utilisées à température-pièce. Pour chaque point, un échantillon entre 50 μl et 500 μl était prélevé et transféré dans un microtube de 1,5 ml. La croissance, correspondant à la DO_{600} , était ensuite mesurée à l'aide du Nanodrop 1000 (Thermo-Fisher). Par la suite, le volume de chaque échantillon était complété à 1 ml avec du tampon Z, suivi de l'ajout d'une goutte de SDS 0,1% et de deux gouttes de chloroforme. Les tubes étaient vortexés pendant 10 sec pour lyser les cellules, incubés 5 min à 30°C , puis 200 μl d'ONPG étaient ajoutés. Le temps de la réaction était calculé à partir de ce moment. La réaction était finalement arrêtée en ajoutant 200 μl Na_2CO_3 1M. Les tubes étaient ensuite centrifugés 1 min pour éliminer les débris cellulaire et la concentration d'*o*-nitrophenol libéré mesurée à 420 nm à l'aide du Nanodrop. Avec les données recueillies, les unités Miller (UM) étaient calculées avec la formule suivante :

$$\text{Unité Miller} = \frac{1000 * A_{420}}{\text{temps} * \text{volume} * A_{600}}$$

Le volume correspond à celui de l'échantillon prélevé au départ, et ce, en millilitre. Lorsque l'activité de la β -galactosidase était dosée pour vérifier les différentes conjugaisons, l'expérience était effectuée à partir de pré-cultures et les densités optiques n'étaient pas calculées. L'apparition de la couleur jaune suffisait pour confirmer les résultats de conjugaison.

2.3.1 Dosage de la β -galactosidase avec le plasmide pME3859

Lorsque des dosages étaient effectués avec ce plasmide ainsi que des mutants de la banque PA14 (Liberati *et al.*, 2006), tous les mutants testés semblaient avoir un effet sur la traduction de *rsmA*. Pour contrer cet effet qui semblait lié à la présence d'un transposon ou à une légère différence entre notre souche PA14 et celle employée pour la construction de la banque de mutants non-redondante, trois mutants choisis aléatoirement dans la banque ont été utilisés pour générer une courbe-témoin de référence. Les mutants choisis furent dans les gènes : *aer*, PA14_48530, et PA14_48570. Ces gènes codent respectivement pour un senseur d'aérotaxie, une enzyme liant l'AMP et une synthase du 2-isopropylmalate (Winsor *et al.*, 2011). La courbe-témoin a été calculée en effectuant un triplicata composé d'un échantillon de chacune des souches mentionnées plus haut. Un exemple de courbe-témoin est présenté à la section 3.1.1.4.

2.3.2 Système hétérologue pour étudier l'effet de LasR sur l'expression de *rsmA*

Le système hétérologue a consisté en l'expression chez *E. coli* DH5 α du plasmide pME3859 (section 2.1.1) ainsi qu'un vecteur qui exprime LasR. Pour ce faire, la souche *E. coli* DH5 α (pME3859) a été transformée avec le vecteur vide, pUCPSK (Tableau 2-2) comme décrit dans la section 2.1.3.1. Cette souche agit comme témoin négatif. La souche *E. coli* DH5 α (pUCPSK-LasR) a été transformée avec le rapporteur pME3859.

Le dosage de la β -galactosidase s'est déroulé comme décrit à la section 2.3 à l'exception de la préparation des échantillons en début d'expérience. À partir des pré-cultures, les souches ont été diluées pour obtenir une DO₆₀₀ = 0,05 dans des tubes en verre contenant 5 ml de TSB (comparativement à 3 ml). Ensuite, chaque souche était préparée en deux séries de triplicata. À la première série, 1 mg/L C₁₂-HSL était ajouté à chacun des tubes, et à la deuxième série, 1 μ l

d'acétonitrile. La série contenant de l'acétonitrile agissait comme témoin négatif puisque le C₁₂-HSL est dilué dans ce solvant. La cinétique a été effectuée à des DO₆₀₀ d'environ 1, 1,5, 2,5, 3,5 et 4,5.

2.3.3 Vérification des transposants lors du criblage

L'activité de la β -galactosidase a été testée tel que décrit à la section 2.3. Cependant, à partir des pré-cultures, les transposants étaient préparés en culture simple plutôt que triplicata. Une cinétique complète était cependant effectuée à des DO₆₀₀ d'environ 1, 2, 3 et 4.

2.3.4 Effet de la température sur la régulation de *rsmA*

Pour étudier l'effet de la température, un incubateur horizontal munit d'un portoir à tubes fixé à un angle de 45° a été utilisé. L'agitation des cultures était de 300 rpm. Les pré-cultures étaient incubées dans un incubateur vertical munit d'un tambour rotatif à 37°C dans 3 ml de TSB pour favoriser une croissance similaire lors des expériences. Ensuite, les pré-cultures étaient diluées dans de nouveaux tubes contenant 3 ml de TSB incubés à la température voulu pour l'expérience, soit 28°C, 30°C, 37°C ou 41°C. L'activité de la β -galactosidase était ensuite mesurée en cinétique.

2.3.5 Effet de différentes source de carbone sur la régulation de *rsmA*

L'effet des différentes sources de carbone a été testé dans le milieu M63, décrit à la section 2.2.1. Les pré-cultures ont été effectuées dans 3 ml de TSB à 37°C dans un tambour rotatif. Pour l'expérience, chaque triplicata était préparé avec trois tubes contenant 5 ml de M63 + 0,1% de la source de carbone à tester. Ces tubes étaient ensuite inoculés à une DO₆₀₀ = 0,05 à partir des pré-cultures. Une foisensemencés, les tubes étaient scellés avec de la paraffine pour éviter les pertes d'eau dans le milieu. L'activité de la β -galactosidase était ensuite mesurée après 24h.

2.4 Criblage

2.4.1 Mutagenèse aléatoire

Afin de générer une banque de transposants aléatoire dans *P. aeruginosa* PA14 portant le rapporteur *rsmA'-lacZ* traductionnel de pMS7, une conjugaison a été effectuée avec la souche *E. coli* χ 7213 portant le transposon *mariner* sur le plasmide pBT20 (Tableau 2-2, et Fig. 2-4). Ce plasmide possède une origine de réplication de type R6K et ne peut donc pas se répliquer chez

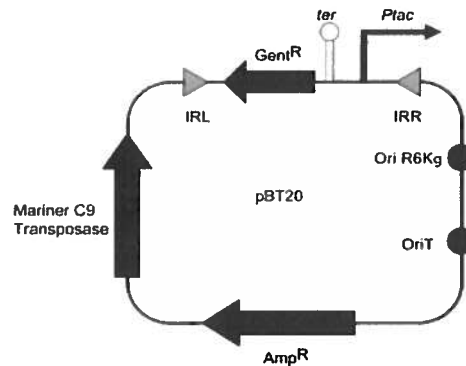


Figure 2-4. Transposon de type *mariner* (Kulasekara *et al.*, 2005)

P. aeruginosa puisque cette espèce ne possède pas l'élément λ -pir. Une fois dans *P. aeruginosa*, le transposon s'insère aléatoirement dans le génome grâce à la transposase C9 de type *mariner*, le plasmide est ensuite éliminé. Pour ce faire, deux géloses LB agar par souches ont étéensemencées avec un étalement de 200 μ l de pré-cultures. Les deux géloses pour *E. coli* χ 7213 (pBT20) ont été supplémentées d'acide diaminopimelique (DAP) (62,5 μ g/ml) pour permettre la croissance de cette souche auxotrophe, ainsi que de la gentamycine 30 μ g/ml pour le maintien du plasmide. Suite à une incubation de 16h à 37°C pour *E. coli* χ 7213 (pBT20) et 42°C pour *P. aeruginosa* PA14::*rsmA'-lacZ*, les bactéries ont été récoltées à l'aide d'un manche de Koch et mélangées ensemble (forme une pâte de bactéries) sur une gélose LB contenant du DAP mais pas d'antibiotique. Une fois incubées à 37°C pour la nuit, les bactéries ont été récoltées et resuspendues dans 5 ml de TSB. Pour tester l'efficacité de la conjugaison, des dilutions en série de 10^0 à 10^{-6} ont été effectuées et 100 μ l de chaque dilution a été étalé sur des géloses LB supplémentées de gentamycine 100 μ g/ml. Du glycérol 60% a ensuite été ajouté à la conjugaison pour produire des aliquots de 200 μ l avec 15% glycérol, lesquels ont été conservés à -70°C.

La sélection des transposants s'est effectuée sur des grandes plaques de gélose LB aliz-gal contenant 100 μ g/ml de gentamycine (voir section 2.2.3). Un millilitre d'une dilution 1:2500 d'un

aliquot de conjugaison a été étalé avec des billes de verre sur chacune des géloses. Celles-ci ont ensuite été incubées à 37°C pendant 36h puis laissées à 4°C pendant 16h. Les colonies jugées intéressantes ont été ensuite sélectionnées, et un criblage secondaire a été effectué avec celles-ci. Elles ont été repiquées sur géloses LB aliz-gal ne contenant pas d'antibiotique, toujours en présence du témoin *P. aeruginosa* PA14. L'activité de la β -galactosidase a ensuite été quantifiée chez les transposants sélectionnés dans le criblage secondaire, comme décrit à la section 2.3.3. Finalement, les transposants jugés différents de la souche sauvage ont été conservés dans 15% glycérol à -70°C.

2.4.2 Identification du site d'insertion du transposon chez les clones sélectionnés

2.4.2.1 Extraction ADN

L'ADN des transposants sélectionnés a été extrait afin de pouvoir procéder à une PCR double ronde semi-arbitraire (Section 2.4.2.2). Pour ce faire, la technique de l'extraction rapide a été utilisée. À partir des pré-cultures, 1 ml de culture a été prélevé et centrifugé 1 min à 13 000 x g. Le culot était ensuite lavé deux fois avec 200 μ l du PBS, resuspendu dans 200 μ l de PBS et incubé 10 min à 100°C. Les tubes étaient ensuite transférés sur la glace pour 10 min, puis centrifugés 10 min à 13 000 x g. Finalement, le surnageant contenant l'ADN était transféré dans un nouveau tube et conservé à -20°C.

2.4.2.2 PCR double ronde semi-arbitraire

Pour identifier le site d'insertion du transposon dans le génome, le protocole de PCR double ronde semi-arbitraire développé par Jacobs et collaborateurs a été utilisé (Jacobs *et al.*, 2003). Cette technique consiste en l'utilisation d'amorces spécifiques au transposon couplées à des amorces partiellement aléatoires. Deux PCR consécutives sont effectuées. Les détails des amorces, des réactifs ainsi que des programmes PCR sont énumérés dans l'appendice B. Les extractions d'ADN rapides des transposants ont été utilisées comme matrice pour la première ronde (tel qu'obtenu à 2.4.2.1). Lors de celle-ci, l'amorce P7-1 qui se fixe à l'extrémité 3' du transposon est couplée à trois amorces partiellement aléatoire CEKG2A, CEKG2B et CEKG2B (Liang *et al.*, 2008; Jacobs *et al.*, 2003). Ces dernières amorces contiennent une queue identique permettant l'hybridation subséquente. Plusieurs fragments ont été amplifiés

correspondant à une portion du transposon suivi du chromosome adjacent. Pour augmenter le nombre de copies spécifiques des fragments correspondant au transposon et au génome, une deuxième PCR est effectuée en utilisant l'amplification PCR de la première ronde comme matrice. L'amorce P7-2 se fixe plus près de l'extrémité de la région 3' du transposon que la P7-1 (Liang *et al.*, 2008). La deuxième amorce utilisée, CEKG4, s'hybride sur la queue des amorces partiellement dégénérées permettant ainsi l'amplification d'un fragment un peu plus court spécifique au transposon et au bout adjacent du génome (Jacobs *et al.*, 2003). Les produits PCR ont ensuite été visualisés sur un gel d'agarose 1,5% coloré au GelRed (Life Technologies) sous les rayons ultra-violets.

Pour faciliter le séquençage, les produits de PCR ont été traités avec de l'ExoSAP-IT® (USB®). Ce produit contient une exonucléase I et une phosphatase alcaline. Ces deux enzymes dégradent les nucléotides ainsi que les amorces qui n'ont pas été hybridées tout en conservant les fragments de PCR intacts. Puisque les quantités d'amorces et de nucléotides étaient très élevées pour ces PCR, la quantité d'ExoSAP-IT® et les temps d'incubation ont été modifiés. Pour le séquençage, 10 µl du produit final était traité avec 4,5 µl d'ExoSAP-IT®. Suite à l'ajout du produit, une incubation de 20 min à 37°C ainsi qu'une inactivation de 15 min à 80 °C ont été effectuées. Ce produit n'utilise pas de colonne d'affinité, ce qui permet de garder tous les produits de PCR obtenus. Ainsi, le rendement du séquençage est grandement amélioré.

2.4.2.3 Séquençage

Le séquençage a été effectué par le Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill ou par le Service de séquençage de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM).

2.4.3 Analyse statistique des dosages de la β-galactosidase

Pour comparer l'expression de *rsmA* chez les 213 mutants à la souche sauvage, un ratio a été calculé à l'aide des unités Miller et de la croissance (DO_{600}). Ce ratio permet la comparaison de toutes les souches à des temps précis. Pour ce faire, les unités Miller sont divisées par la DO_{600} pour éliminer les différences de croissance.

$$ratio T = \frac{Unités\ Miller}{Croissance}$$

La moyenne de tous les ratios de la souche sauvage a aussi été calculée. Pour chacune des expériences, il y a cinq temps d'échantillonnages, soit 3h, 4h, 5h, 6h et 7h qui correspondent

aux temps d'incubation lors de l'expérience. Un ratio unique T est disponible à chacun des temps et pour chaque souche. On obtient donc un ratio nommé T3, T4, T5, T6 et T7. Selon les expériences, on peut distinguer trois classes de mutants en raison de soucis lors de la manipulation. Tout d'abord, la plus courante correspond aux mutants qui possèdent une donnée pour les ratios T3, T4, T5 et T6, lorsque l'expérience s'est bien déroulée. Le deuxième groupe comprend les transposants qui possèdent les ratios T3, T5, T6 et T7. Finalement, le dernier groupe contient les mutants qui ont un ratio T3, T4 et T5. Trois analyses de comparaison ont été effectuées pour chacune des classes avec le logiciel SAS. Les lignes de commande utilisées sont disponibles à l'annexe C.

Tous les transposants ont été classés dans une des cinq catégories, soit : « faible », « fort », « diminution », « retard » et « WT ». Pour la classe « faible », tous les points testés devaient avoir un ratio plus petit que 0,9 lorsque comparé à la souche sauvage. Pour la classe « fort », les ratios devaient être plus grands que 1 pour tous les points. La catégorie « retard » comprend les transposants qui pour les deux premiers points avaient un ratio plus petit que 0,9 et pour le dernier plus grand ou égal à 1. La catégorie « diminution » est l'inverse du groupe « retard ». Le ratio du premier point est plus grand ou égal à 1 et les deux derniers ratios sont inférieurs à 0,9. Finalement, la classe « WT » comprend tous les mutants qui ne correspondaient pas à ces critères : ils ne sont pas jugés différents de la souche sauvage. Les ratios ainsi que le classement effectué par l'analyse sont disponibles à l'annexe C.

2.5 Détermination du début de la transcription de *rsmA*

Pour déterminer le(s) site(s) d'initiation(s) de la transcription du gène *rsmA*, une expérience de 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) a été effectuée. Le kit utilisé était le 5'RACE system for rapid amplification of cDNA ends, version 2.0 d'Invitrogen. Cette technique consiste en l'extraction de l'ARN total bactérien, en la rétro-transcription spécifique de l'ARNm du gène d'intérêt en ADNc, et en la dégradation de l'ARN restant. Grâce à l'ajout d'une queue polyC, les fragments d'ADNc sont ensuite amplifiés par PCR et clonés dans pGEM®-T Easy pour être finalement séquencés. Le principe général de cette technique est illustré à la figure 2-5 et expliqué plus en détail à la section 2.5.2.

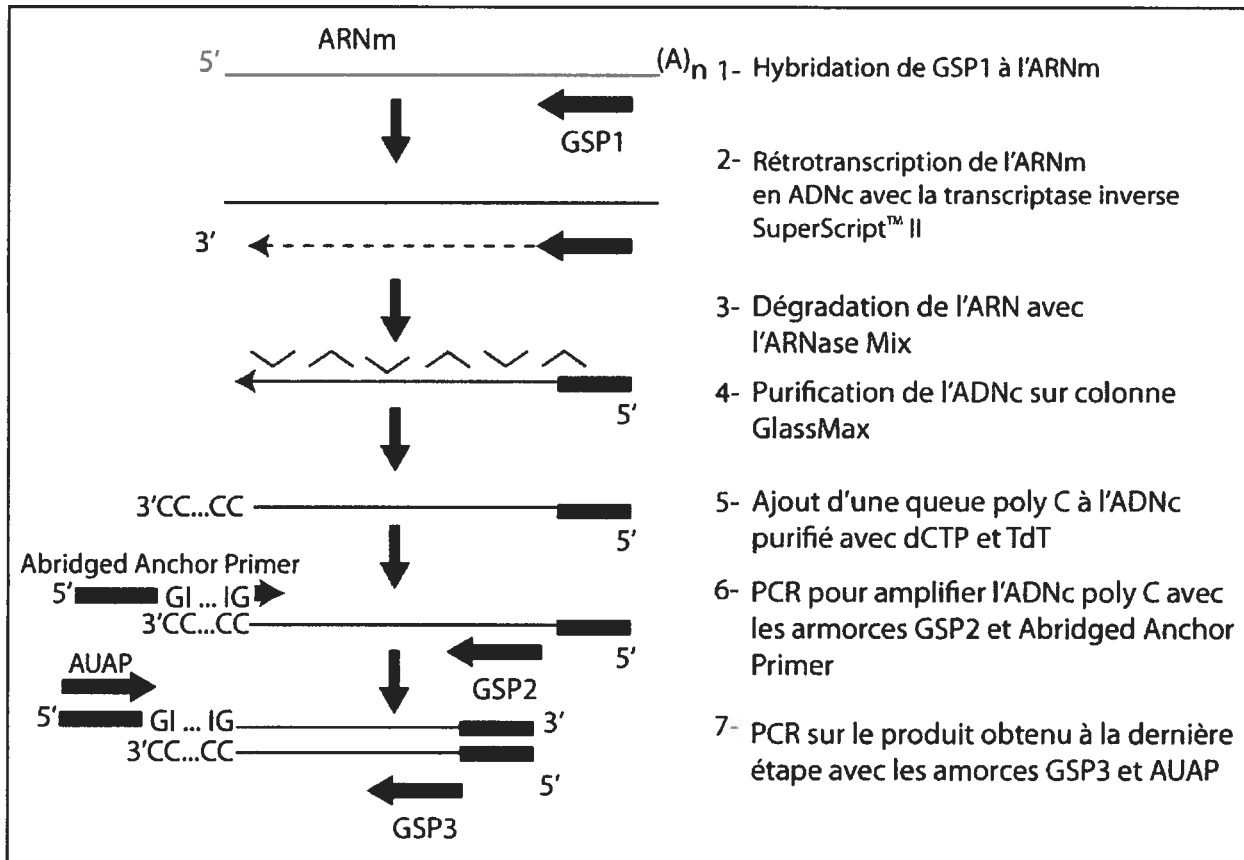


Figure 2-5. Principe du 5'RACE

Cette technique permet l'identification du site(s) d'initiation(s) de la transcription pour un gène donné. Figure adaptée du guide d'utilisation du kit 5'RACE (Invitrogene). GSP1, 2, 3 : amorce spécifique de l'ARNm d'intérêt; TdT : transférase déoxynucléotidyle terminale; dCTP : déoxycytidine triphosphate; AUAP : amorce spécifique à la partie 5' de l'amorce Abridged Anchor Primer.

2.5.1 Extraction de l'ARN

L'extraction d'ARN total a été effectuée avec le kit d'extraction *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit* de Qiagen. Les bactéries ont tout d'abord été diluées à une DO₆₀₀ de 0,05 dans 3 ml de TSB à 37°C. Les tubes ont ensuite été incubés à 37°C dans un tambour rotatif jusqu'à ce que la DO₆₀₀ soit de 2,4 (environ 4h30). L'ARNm a été préservé par l'ajout du réactif *RNA Protect* (Quiagen) aux cellules, lesquels ont ensuite été lysés enzymatiquement grâce au lysozyme et mécaniquement avec des billes de verres au FastPrep (MP Biomedicals). L'ARN a ensuite été purifié sur colonne (*RNeasy mini spin column*). Deux étapes de traitement à la DNase I ont été ajoutées pour éliminer les traces d'ADN résiduel (DNase I de Roche).

2.5.1.1 Vérification de la pureté de l'ARNm

Une PCR a été effectuée sur l'ARN total extrait pour vérifier l'absence d'ADN contaminant. Les amorces utilisées étaient *qrt_rsmAF2* et *qrt_rsmAR2*. Les détails du programme PCR ainsi que les réactifs sont disponibles à l'appendice B. Aucune amplification n'a été obtenue après 40 cycles.

2.5.2 5'RACE

Le 5'RACE a été effectué avec le kit décrit à la section 2.5. Pour obtenir l'ARNm spécifique à *rsmA*, les amorces spécifiques *GSP1_rsmA2*, *GSP2_rsmA* et *GSP3_rsmA2* ont été utilisées. Tout d'abord, la rétrotranscription spécifique de l'ARNm de *rsmA* en ADNc a été effectuée avec l'amorce *GSP1_rsmA2* et la transcriptase inverse SuperScript™ II (étapes 1 et 2, Fig. 2-5). Une purification sur colonne suivie d'un traitement avec RNase a permis l'élimination de l'ARN non spécifique (étapes 3 et 4, Fig. 2-5). Ensuite, une queue poly-C a été ajoutée grâce à une transférase déoxynucléotidyle terminale (TdT) à l'ADNc pour permettre une amplification subséquente (étape 5, Fig. 2-5). Cette amplification a été obtenue grâce à une PCR qui a été effectuée avec l'amorce *GSP2_rsmA*, spécifique à l'ADNc de *rsmA* et l'amorce AUAP spécifique à la queue poly-C (étape 6, Fig. 2-5). Finalement, une deuxième PCR a été effectuée sur le produit dilué 1:10 de la dernière PCR pour augmenter le nombre de copie de l'ADNc (étape 7, Fig. 2-5). Le résultat du 5'RACE a été vérifié sur gel d'agarose 1,5% (TBE) coloré au GelRed. La recette du TBE est disponible dans l'appendice A.

2.5.3 Clonage

L'amplification PCR finale a été traitée avec l'ExoSAP-IT®, comme décrit dans la section 2.4.2.2, puis directement clonée dans pGEM®-T Easy. Le produit de ligation a ensuite été transformé dans *E. coli* DH5α par choc thermique (voir section 2.1.3.1). Les clones furent sélectionnés sur des géloses LB contenant de la carbenicilline 100 µg/ml et du X-gal 40 µg/ml. Les géloses ont été conservées à 4°C.

2.5.4 Extraction plasmidique et séquençage

Afin d'identifier les sites d'initiation de la transcription de *rsmA*, 96 des clones obtenus ont été séquencés. Pour ce faire, le service d'extraction plasmidique suivi du séquençage en plaque offert par Génome Québec a été utilisé. Pour ce service, 96 clones, sélectionnés aléatoirement, ont été incubés dans une plaque 96 puits à fond rond contenant 200 µl de TSB supplémenté de glycérol 10% et d'ampicilline 100 µg/ml. La plaque a été incubée 12 heures à température pièce suivit de 8 heures à 37°C sans agitation. Par la suite, la plaque a été scellée et congelée à -70°C.

Les techniciens de Génome Québec ont repiqué tous les clones dans un nouveau milieu de culture contenant du LB supplémenté d'ampicilline 50 µg/ml, et incubé cette nouvelle plaque 16 heures à 37°C. Par la suite, les plasmides ont été extraient avec le kit *Agencourt CosM CPrep* et les plasmides ont été séquencés avec les amorces universelles SP6 et T7.

3 RÉSULTATS

3.1 Effet du *quorum sensing* sur la régulation de *rsmA*

L'effet du *quorum sensing* sur l'expression de *rsmA* a été étudié grâce à plusieurs mutants de *P. aeruginosa* PA14. Une série de 22 gènes a été sélectionnée afin d'approfondir les connaissances sur la régulation de *rsmA* et découvrir si un lien existe avec le *quorum sensing*. Les gènes étudiés sont présentés au tableau 3-1. Les souches utilisées pour réaliser les expériences sont présentées dans le tableau 2-1.

Tableau 3-1. Fonction des gènes sélectionnés

Gènes	Fonctions et descriptions	Lien avec le <i>quorum sensing</i>	Références
<i>algQ</i> (<i>algR2</i>)	Régulateur transcriptionnel, répresseur	Réprime la transcription de <i>lasR</i> et <i>rhlR</i>	(Ledgham, 2003)
<i>algR</i>	Régulateur transcriptionnel, répresseur	Réprime la transcription de <i>rhlI</i>	(Williams & Cámara 2009)
<i>ANR</i>	Régulateur transcriptionnel, activateur	Régulateur global, anaérobie	(Pessi & Haas, 2000)
<i>dksA</i>	Régulateur transcriptionnel, répresseur	Réprime la transcription de <i>rhlI</i>	(Jude <i>et al.</i> , 2003)
<i>gacA</i>	Régulateur transcriptionnel du système à deux composantes <i>gacA/gacS</i>	Active la transcription des ARNnc RsmZ et RsmY	(Heeb & Haas, 2001)
<i>gldA</i>	Régulateur post-transcriptionnel, répresseur	Affecte la traduction de <i>rhlR</i>	(Gupta <i>et al.</i> , 2009)
<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel, activateur	Contrôle le système <i>las</i>	(Pesci <i>et al.</i> , 1997)
<i>mvaT</i>	Régulateur transcriptionnel, répresseur famille H-NS	Réprime la transcription de <i>lasR</i> , <i>lasI</i> et <i>mvfR</i>	(Castang <i>et al.</i> , 2008)
<i>mvaU</i>	Régulateur transcriptionnel, répresseur famille H-NS	Réprime la transcription de <i>lasR</i> et <i>lasI</i>	(Castang <i>et al.</i> , 2008)
<i>mvfR</i>	Régulateur transcriptionnel, activateur	Contrôle le système <i>pqs</i>	(Déziel <i>et al.</i> , 2005)
<i>PA14_48830</i>	Régulateur transcriptionnel, activateur	Affecte les systèmes <i>rhlI</i> et <i>MvfR/HAQ</i>	(Liang <i>et al.</i> , 2009)
<i>pqsE</i>	Hydrolase dépendante du zinc	Affecte le système <i>rhl</i>	(Déziel <i>et al.</i> , 2005)
<i>ptxR</i>	Régulateur transcriptionnel	Affecte <i>lasI</i> , <i>rhlI</i> et l'opéron <i>pqsA-E</i>	(Carty <i>et al.</i> , 2006)
<i>qteE</i>	Régulateur post-transcriptionnel	Affecte la stabilité de LasR	(Siehnel <i>et al.</i> , 2010)
<i>relA</i>	Associé au ribosome, réponse stringente	Affecte les systèmes <i>las</i> et <i>rhl</i>	(Van Delden <i>et al.</i> , 2001)
<i>rhlR</i>	Régulateur transcriptionnel, activateur	Contrôle le système <i>rhl</i>	(Pesci <i>et al.</i> , 1997)

Gènes	Fonctions et descriptions	Lien avec le <i>quorum sensing</i>	Références
<i>rpoN</i>	Facteur σ alternatif	Affecte <i>rhII</i>	(Whiteley <i>et al.</i> , 2000)
<i>rpoS</i>	Facteur σ phase stationnaire	Affecte <i>rhII</i> et <i>lasI</i>	(Venturi, 2006)
<i>rsaL</i>	Régulateur transcriptionnel, répresseur	Réprime la transcription de <i>lasI</i>	(Kievit <i>et al.</i> , 1999)
<i>rsmA</i>	Régulateur post-transcriptionnel, répresseur	Régulateur global	(Heurlier <i>et al.</i> , 2004)
<i>vfr</i>	Régulateur transcriptionnel, activateur	Active la transcription de <i>lasR</i>	(Pesci <i>et al.</i> , 1997)
<i>vqsR</i>	Régulateur transcriptionnel	Affecte système <i>las</i>	(Juhás <i>et al.</i> , 2004)

3.1.1 Caractérisation au niveau traductionnel

Afin d'étudier la régulation au niveau traductionnel, l'expression de *rsmA* a été quantifiée dans des mutants des gènes présentés au tableau 3-1. Le dosage de l'activité de la β -galactosidase, tel que décrit à la section 2.3, a été effectué dans les mutants contenant le plasmide pME3859 portant un rapporteur traductionnel *rsmA'*-*lacZ*. Par la suite, les mutants qui présentaient une expression de *rsmA* nettement différente de la souche sauvage ont été étudiés à l'aide de la construction chromosomique *rsmA'*-*lacZ* (de pMS7), décrite à la section 2.1.1.2. Les résultats présentés dans cette section correspondent aux tests effectués avec le rapporteur chromosomique pMS7, sauf indication contraire. Le tableau 3-2 résume les effets observés des mutations sur la traduction de *rsmA*. Tous ces mutants ont été testés avec le plasmide pME3859. Ceux qui ne présentaient aucun effet sur la traduction de *rsmA* n'ont pas été étudiés plus en détail, et ceux qui présentaient un effet ont été étudiés avec le rapporteur chromosomique pMS7.

Tableau 3-2. Résumé des effets observés au niveau de la traduction de *rsmA*

Mutants	Effet sur la traduction de <i>rsmA</i>
Dosage avec pME3859	
<i>algQ</i> (<i>algR2</i>)	Aucun
<i>algR</i>	Aucun
<i>ANR</i>	Aucun
<i>mvaU</i>	Aucun
<i>ptxR</i>	Aucun
<i>qteE</i>	Aucun

Mutants	Effet sur la traduction de <i>rsmA</i>
<i>relA</i> ⁻	Aucun
<i>rpoN</i>	Aucun
<i>rpoS</i> ⁻	Aucun
<i>rsaL</i> ⁻	Aucun
<i>vqsR</i> ⁻	Aucun
Dosage avec pMS7	
<i>gacA</i> ⁻	Augmentation
<i>rsmA</i> ⁻	Augmentation
<i>mvaT</i>	Augmentation
<i>PA14_48830</i> ⁻	Augmentation
<i>dksA</i> ⁻	Diminution
<i>lasR</i> ⁻	Diminution
<i>rhIR</i>	Diminution*, Augmentation**
<i>gldA</i> ⁻	Diminution*, Augmentation**
<i>mvfR</i> ⁻	Retard
<i>pqsE</i>	Retard
<i>vfR</i> ⁻	Retard

*Dosage avec pME3859, **Dosage avec pMS7, résultats contradictoire

3.1.1.1 Mutants qui affectent négativement la traduction de *rsmA*

Une mutation dans les gènes *dksA* ou *lasR* entraîne une diminution de l'expression de *rsmA* (Tableau 3-2 et Fig. 3-1B). Dans un mutant *lasR*, la traduction de *rsmA* est diminuée tout au long de la croissance. LasR est un régulateur transcriptionnel qui contrôle le système de *quorum sensing las* (Albus *et al.*, 1997).

Le gène *dksA* quant à lui, code pour un répresseur transcriptionnel (Jude *et al.*, 2003). Lorsque celui-ci est interrompu, la traduction de *rsmA* est diminuée, mais seulement après avoir atteint une DO₆₀₀ de 1 (Fig. 3-1A).

L'effet des mutations dans *lasR* et *dksA* sur la transcription de *rsmA* a été vérifié et les résultats sont présents à la section 3.1.2.

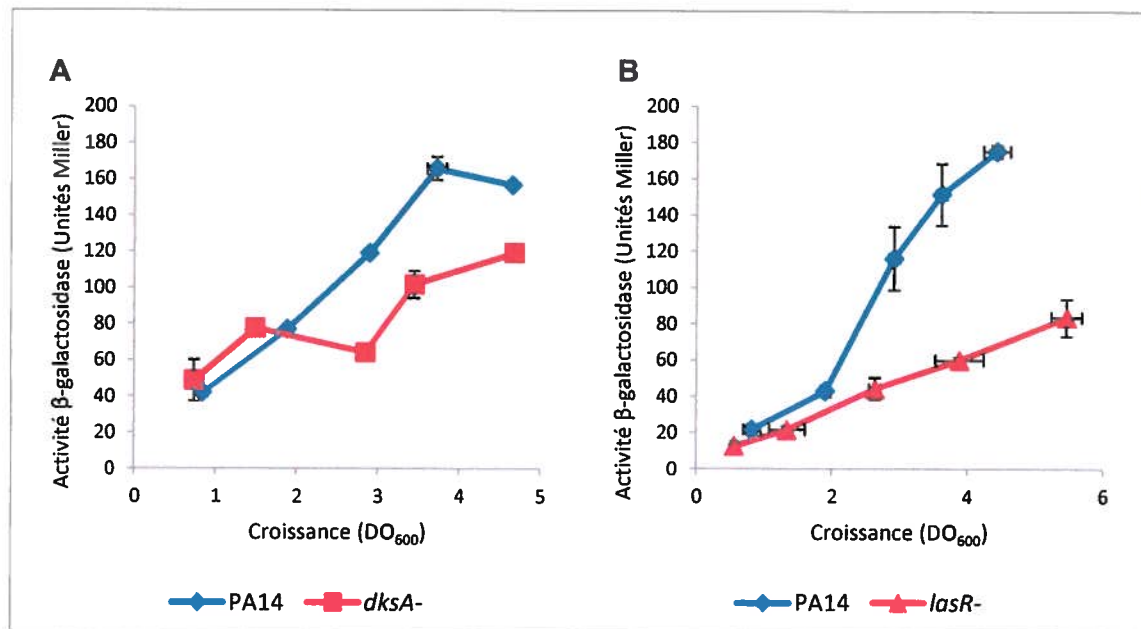


Figure 3-1. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'*-*lacZ*

(A) chez un mutant *dksA*⁻ et (B) chez un mutant *lasR*⁻.

3.1.1.2 Mutants causant un retard dans la traduction de *rsmA*

Une mutation dans les gènes *pqsE*, *mvfR* ou *vfr* retarde l'expression de *rsmA* (Fig. 3-2). Lorsque *pqsE* est inactif, la traduction de *rsmA* est retardée, mais le niveau de traduction finale est égal à celui de la souche sauvage (Fig. 3-2A). PqsE, une hydrolase dépendante du zinc, fait partie de l'opéron *pqsA-E* (Déziel *et al.*, 2005). Bien que son rôle exact ne soit pas connu, PqsE affecte des cibles des systèmes de *quorum sensing las* et *rhl* (Farrow *et al.*, 2008).

MvfR est un régulateur transcriptionnel qui affecte positivement l'opéron *pqsA-E* (Wade *et al.*, 2005). Dans un mutant *mvfR*, la traduction de *rsmA* est similaire à celle d'un mutant *pqsE*. La traduction est retardée, mais atteint le niveau de la souche sauvage à la fin de la cinétique (Fig. 3-2B).

Finalement, le gène *vfr* code pour un régulateur transcriptionnel. Vfr est important pour la transcription du régulateur *lasR* (Albus *et al.*, 1997). Lorsque *vfr* est inactivé, la traduction de *rsmA* est retardée (Fig. 3-2C). L'effet d'une mutation dans *vfr* n'est pas aussi intense que dans *lasR*.

La transcription de *rsmA* a été étudiée dans ces mutants (section 3.1.2).

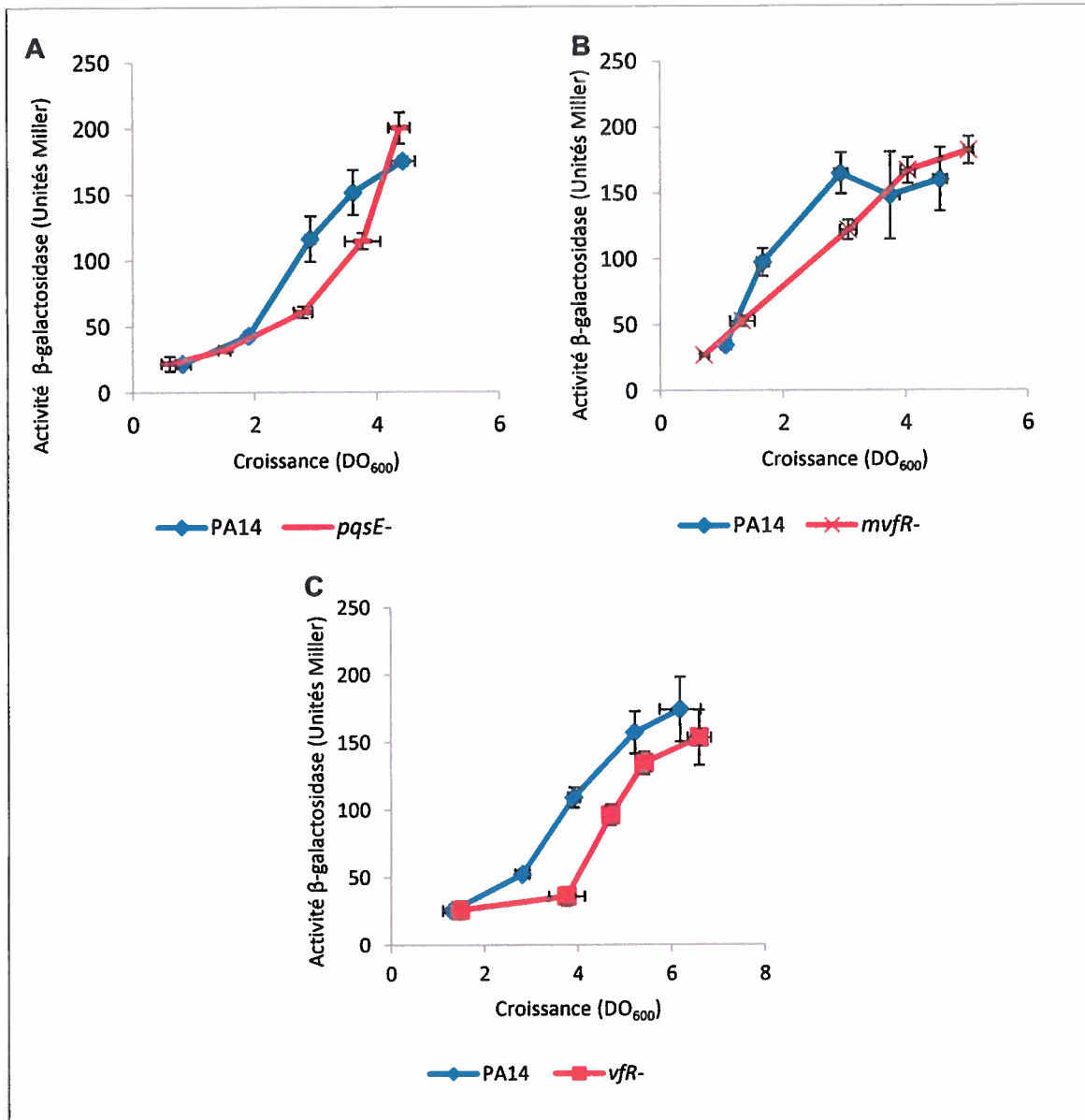


Figure 3-2. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'-lacZ*

(A) Chez un mutant *pqsE*, (B) *mvfR* et (C) *vfr*.

3.1.1.3 Mutants qui activent l'expression de *rsmA*

Une mutation dans les gènes *mvaT*, PA14_48830, *rsmA* ou *gacA* augmente le niveau de traduction de *rsmA* (Fig. 3-3). MvaT est un répresseur de la famille H-NS (Diggle *et al.*, 2002). Chez un mutant *mvaT*, la traduction de *rsmA* est augmentée de façon drastique, et ce, tout au long de la croissance (Fig. 3-3B).

Le gène PA14_48830 code pour un régulateur transcriptionnel peu étudié. Pour l'instant, on sait que ce régulateur affecte l'expression de l'opéron *phzA1B1C1D1E1F1G1* (Liang *et al.*, 2009). Lorsque ce gène est interrompu, l'expression de *rsmA* est augmentée au niveau traductionnel (Fig. 3-3A).

Puisque RsmA est un régulateur post-transcriptionnel, la quantification de l'expression de *rsmA* au niveau traductionnel a été effectuée. Dans un mutant *rsmA*, la traduction est un peu plus élevée que dans la souche sauvage tout au long de la croissance (Fig. 3-3C).

Le régulateur GacA, du système à deux composantes GacA/GacS, joue un rôle important dans la régulation des petits ARNnc RsmZ et RsmY (Brencic *et al.*, 2009). Lorsqu'inactivé, la traduction de *rsmA* est augmentée (Fig. 3-3D). Cette hausse est plus importante que chez le mutant *rsmA*, mais plus faible que chez les mutants *mvaT* et PA14_48830.

Les niveaux de transcription dans ces mutants ont été testés (section 3.1.2).

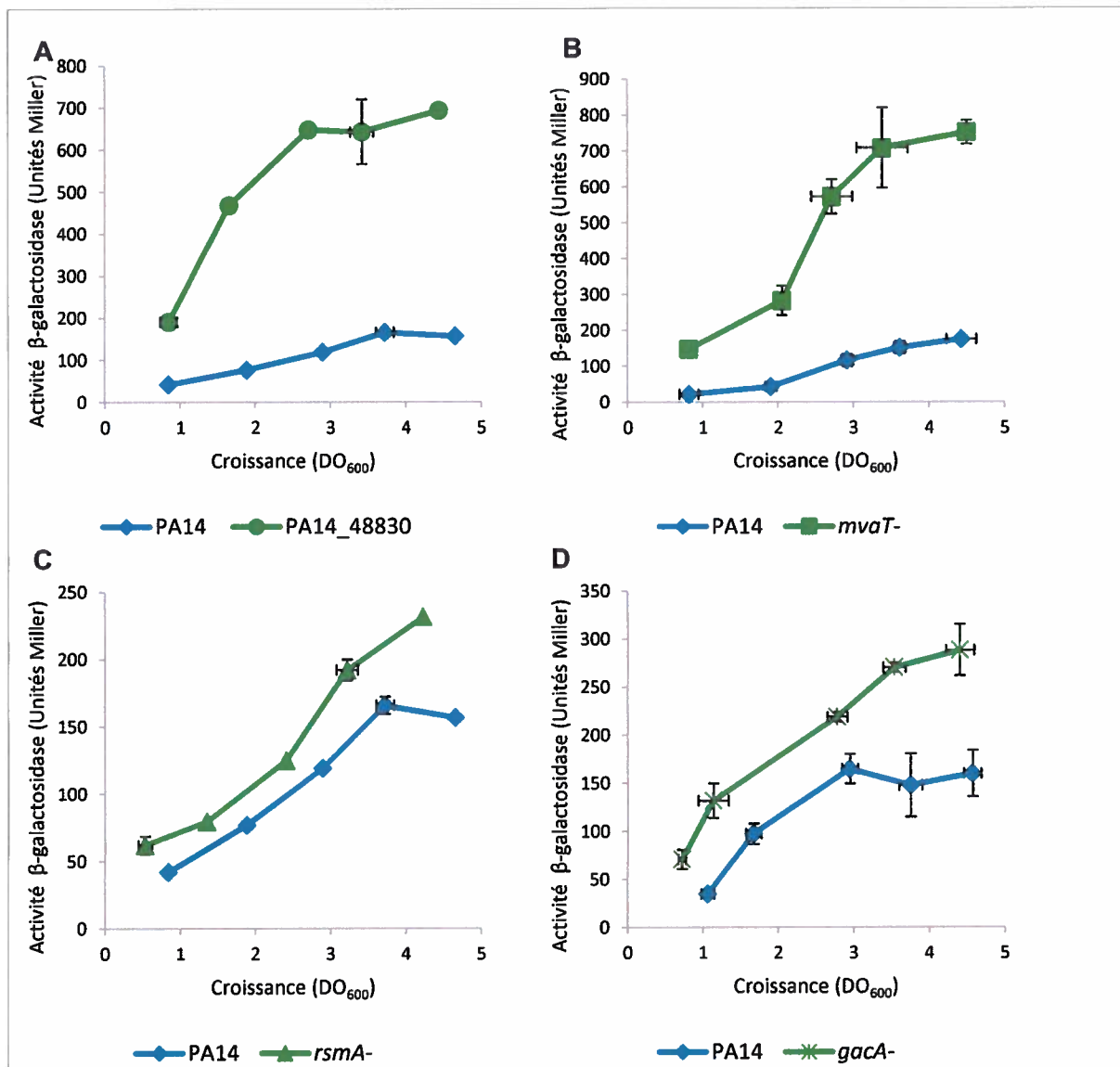


Figure 3-3. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'*-*lacZ*

(A) Chez un mutant PA14_48830⁻, (B) *mvaT*⁻, (C) *rsmA*⁻ et (D) *gacA*⁻.

3.1.1.4 Résultats différent lorsque pME3859 ou pMS7 est utilisé

Lorsque le niveau de traduction de *rsmA* est quantifié chez les mutants *rhIR* ou *gidA* avec le plasmide pME3859, les résultats ne sont pas similaires à ceux obtenus avec le rapporteur chromosomique *rsmA'*-*lacZ* (de pMS7), comparativement à tous les tests précédents. En effet, pour le mutant *gidA*, la traduction est très basse comparativement à la courbe-témoin lorsque l'expérience est effectuée avec le plasmide (Fig.3-4A; voir section 2.3.1 pour une explication de la courbe-témoin). Cependant, lorsque le même test est effectué avec la souche *gidA*⁻::*rsmA'*-*lacZ*, la traduction est très élevée (Fig.3-5A).

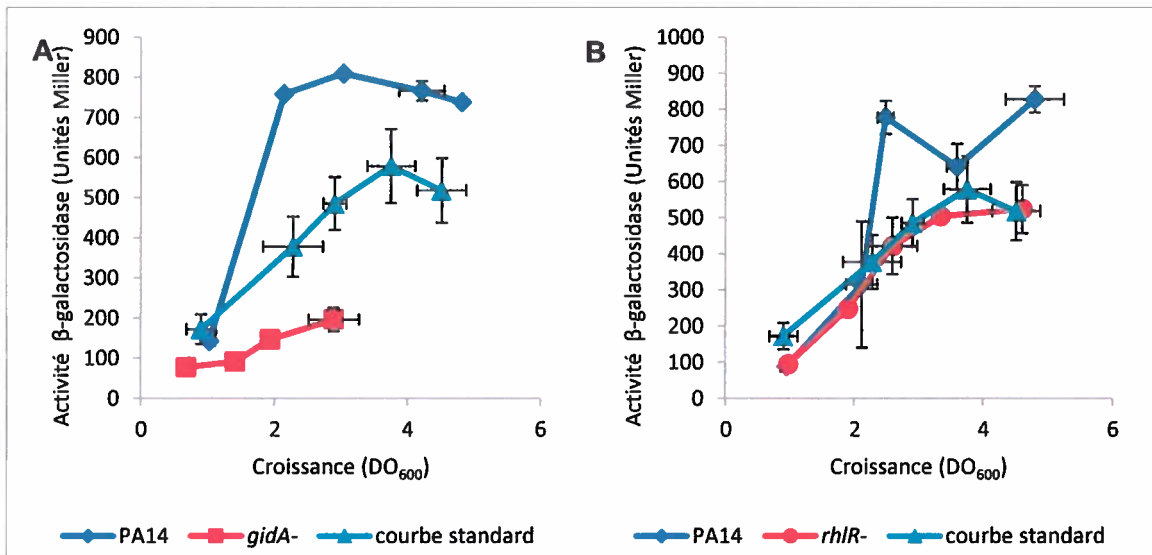


Figure 3-4. Activité du rapporteur traductionnel plasmidique *rsmA'*-*lacZ* (pME3859)

(A) chez un mutant *gidA*⁻ et (B) *rhIR*⁻.

Pour le mutant *rhIR*⁻, le niveau de traduction de *rsmA* est similaire à la courbe-témoin lorsque l'expérience est effectuée avec le plasmide (Fig. 3-4B). Cependant, lorsque l'expérience est effectuée avec le rapporteur *rsmA'*-*lacZ* (de pMS7), le niveau de traduction de *rsmA* est beaucoup plus fort que la souche sauvage (Fig. 3-5B). Dans les deux cas, les expériences ont été effectuées plusieurs fois, et ce, avec des cellules provenant de diverses conjugaisons. Les résultats étaient similaires dans tous les cas.

Les gènes *gidA* et *rhIR* code pour des protéines régulatrices. RhIR est le régulateur transcriptionnel du système de *quorum sensing rhl* tandis que GidA agit au niveau post-transcriptionnel et affecte RhIR (Gupta *et al.*, 2009; Pesci *et al.*, 1997).

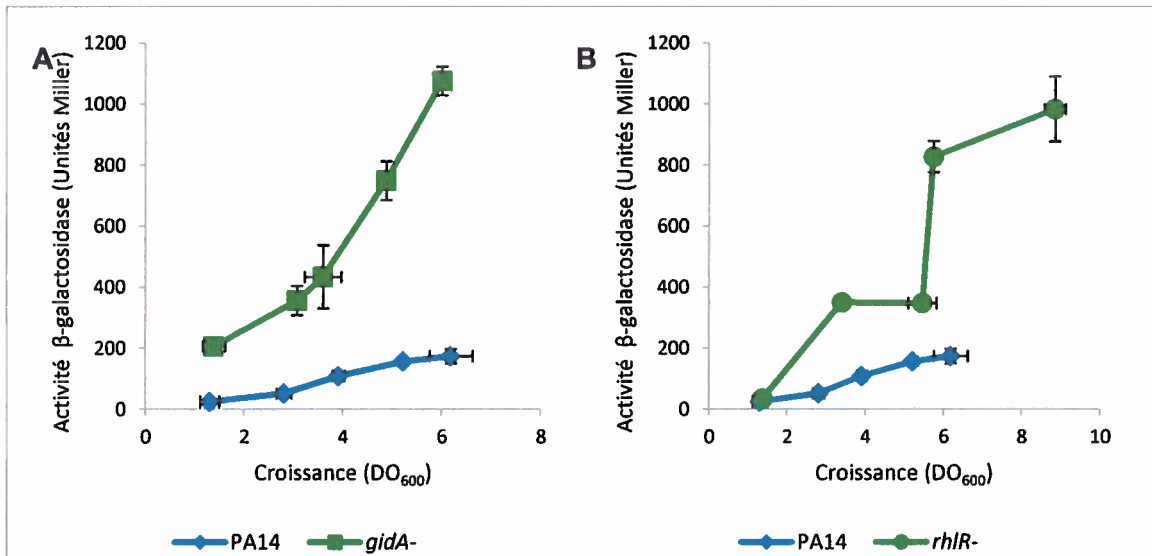


Figure 3-5. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'*-*lacZ*

(A) chez un mutant *gidA*⁻ et (B) chez un mutant *rhIR*⁻.

3.1.2 Caractérisation au niveau transcriptionnel

Suite à la caractérisation de l'effet de certaines mutations sur l'expression au niveau traductionnel de *rsmA*, les mutants qui ont obtenu un profil différent de la souche sauvage ont été sélectionnés pour poursuivre les expériences. Pour ceux-ci, la transcription de *rsmA* a été quantifiée afin de déterminer à quel niveau de régulation se situe l'effet des mutations. Un résumé des effets observés sur la transcription de *rsmA* en fonction des gènes inactivés est présenté au tableau 3-3. Les différents mutants ont tout d'abord été transformés par conjugaison pour recevoir le rapporteur chromosomique transcriptionnel pMS6 tel que décrit à la section 2.1.4.

Tableau 3-3. Résumé des effets sur la transcription de *rsmA* des mutations qui ont un effet sur la traduction de *rsmA* (voir tableau 3-2).

Gènes	Effet sur la transcription de <i>rsmA</i>
<i>mvaT</i>	Aucun
PA14_48830 ⁻	Aucun
<i>dksA</i> ⁻	Diminution
<i>gacA</i> ⁻	Diminution
<i>lasR</i>	Diminution
<i>mvfR</i>	Diminution
<i>pqsE</i>	Diminution
<i>rsmA</i> ⁻	Diminution

3.1.2.1 Mutants qui n'ont aucun effet sur la transcription de *rsmA*

Tout d'abord, les régulateurs transcriptionnels MvaT et PA14_48830, qui ont un effet important sur la traduction de *rsmA* (section 3.1.1.3), ont été sélectionnés pour quantifier l'expression de *rsmA* au niveau transcriptionnel. Chez le mutant *mvaT*, on constate que le niveau de transcription est essentiellement identique à la souche sauvage durant toute la cinétique (Fig. 3-6A). Pour ce qui est du mutant PA14_48830, il est lui aussi identique à la souche sauvage, à l'exception de la fin de la cinétique (Fig. 3-6B).

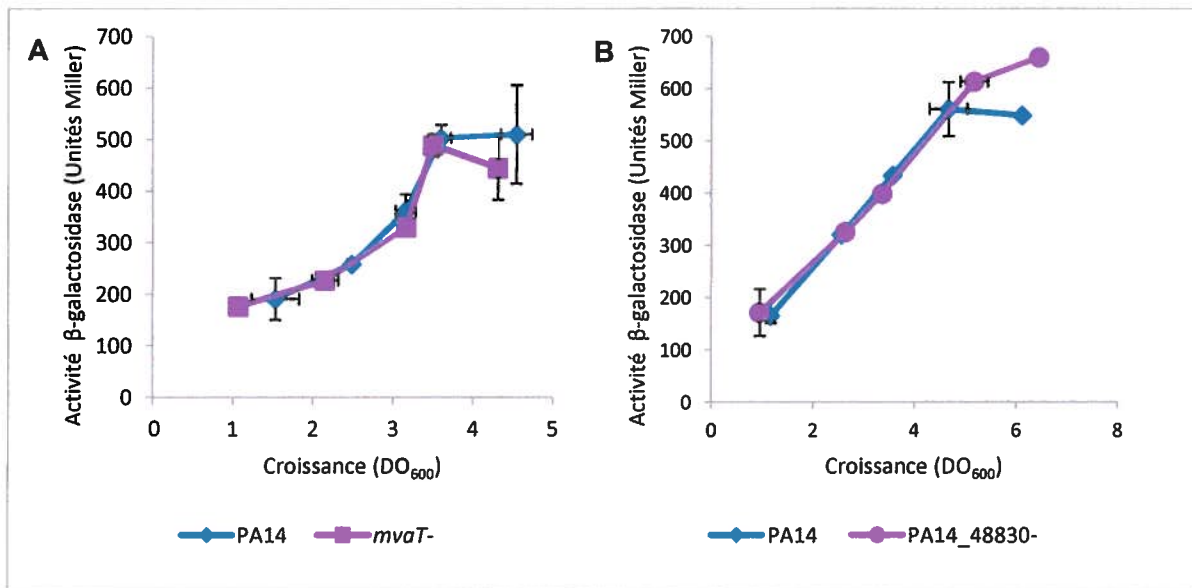


Figure 3-6. Activité du rapporteur transcriptionnel chromosomique *prsmA-lacZ*

(A) Chez un mutant *mvaT* et (B) PA14_48830

3.1.2.2 Mutants qui diminuent la transcription de *rsmA*

Chez tous les autres mutants testés, on observe une diminution de la transcription de *rsmA* comparativement au niveau de la souche sauvage. Chez le mutant *gacA*, le régulateur transcriptionnel du système à deux composants GacA/GacS, le niveau de transcription est plus faible comparativement à la souche sauvage tout au long de la cinétique (Fig. 3-7A). Lorsque le régulateur transcriptionnel DksA est inactivé, la transcription de *rsmA* est plus basse que celle de la souche sauvage tout au long de la croissance (Fig. 3-7A). RsmA affecte sa transcription de façon positive, puisque chez le mutant *rsmA*⁻ la transcription du rapporteur est diminuée (Fig. 3-7B). Le même effet est retrouvé lorsque la transcription de *rsmA* est quantifiée chez les mutants *lasR* (Fig. 3-7C). C'est dans ce mutant que la transcription est la plus faible. Ensuite, pour le régulateur du *quorum sensing* MvfR, lorsque la transcription de *rsmA* est quantifiée chez ce

mutant, une diminution de celle-ci est observée, mais ce niveau est un peu plus fort que lorsque *lasR* est inactivé (Fig. 3-7C). Finalement, lorsque *pqsE* est inactivé, la transcription de *rsmA* est diminuée (Fig. 3-7D).

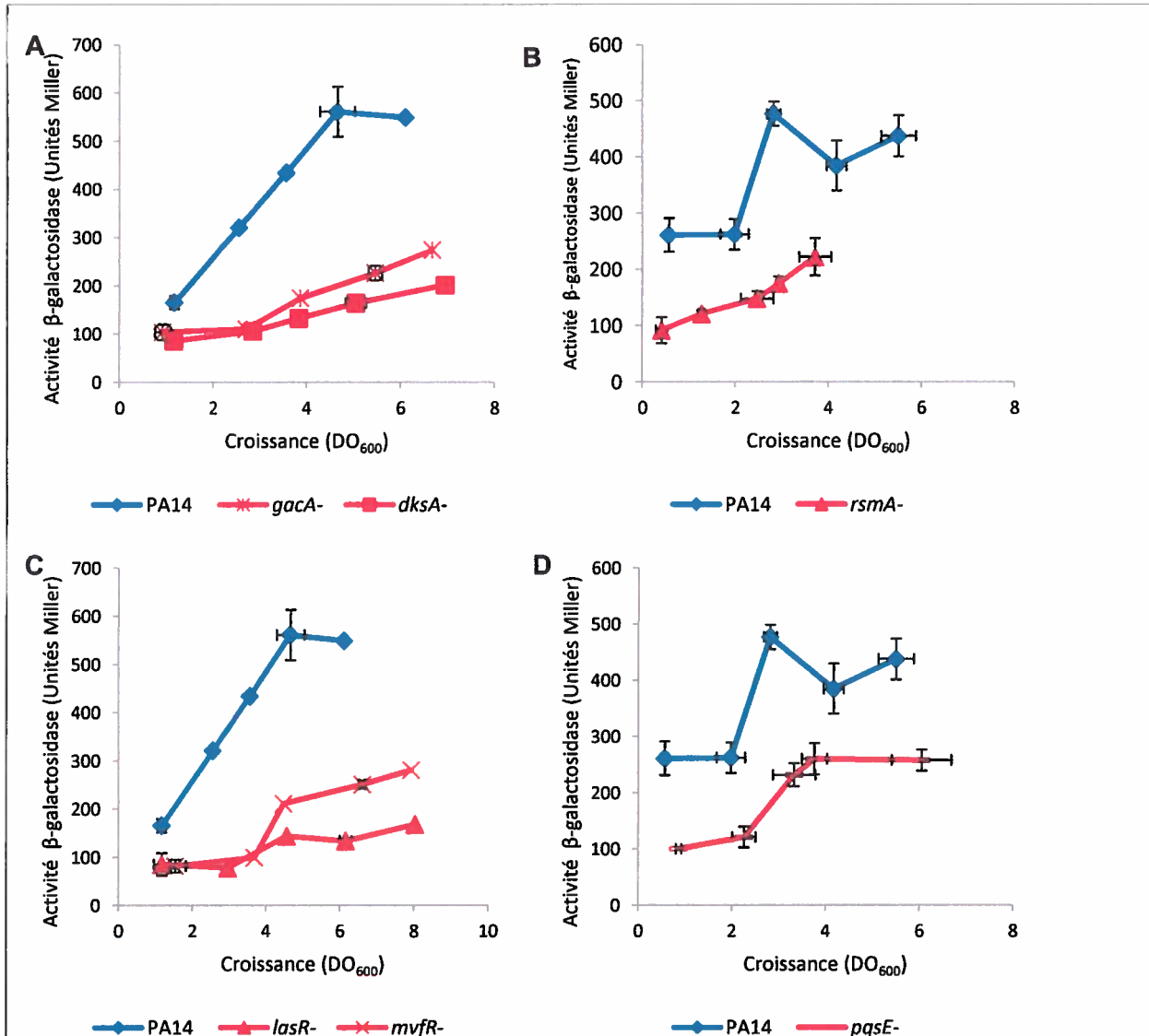


Figure 3-7. Activité du rapporteur transcriptionnel chromosomique *prsMA-lacZ*
 (A) Chez les mutants *gacA*⁻ et *dksA*⁻, (B) *rsmA*⁻, (C) *lasR*⁻ et *mvfR*⁻ et (D) *pqsE*⁻.

3.2 Lien entre *mvaT* et *rsmA*

MvaT et *MvaU* sont tous deux des régulateurs globaux qui font partie de la famille des H-NS. Chez *P. aeruginosa*, ces deux régulateurs sont paralogues et leurs régulons sont très similaires, mais pas identiques (Castang *et al.*, 2008). Lorsque la traduction de *rsmA* est quantifiée chez un

mutant *mvaT* ou *mvaU*, les résultats obtenus sont différents, seul MvaT affecte la régulation de *rsmA* (Fig. 3-8). Grâce aux travaux du groupe de Simon Dove, les gènes affectés seulement par MvaT sont connus (Castang *et al.*, 2008). De plus, Brencic et Lory ont démontré qu'uniquement MvaT affecte de façon négative la transcription de *rsmZ* (Brencic *et al.*, 2009).

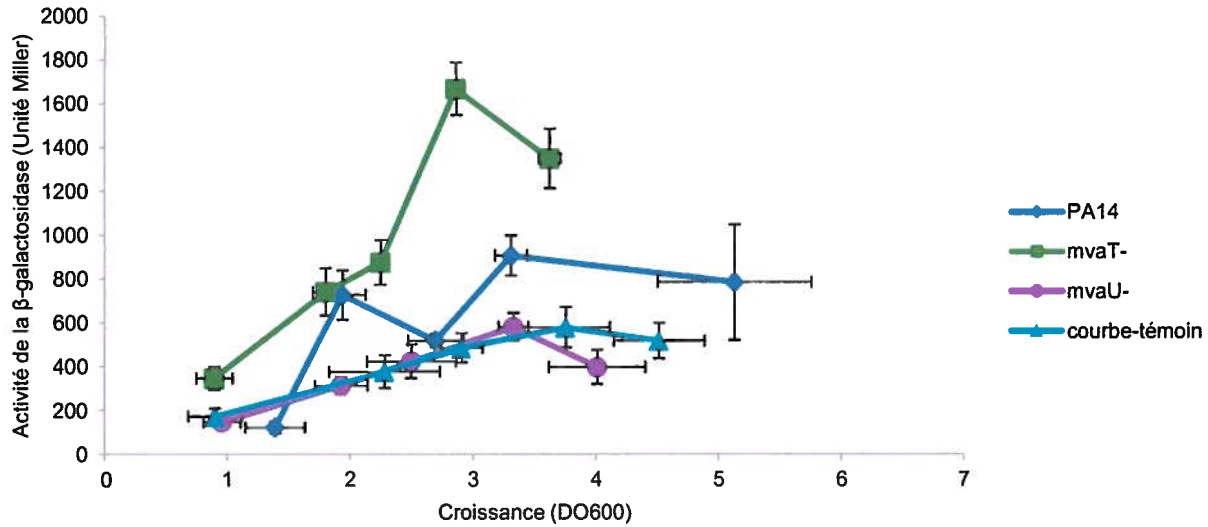


Figure 3-8. Activité du rapporteur traductionnel plasmidique *rsmA'*-*lacZ* (pME3859)

Parmi les gènes régulés par MvaT, *cbrB* est d'intérêt puisqu'il s'agit d'un régulateur dans une voie de régulation semblable à celle de *rsmA/rsmZ/rsmY* (Nishijyo *et al.*, 2001). La voie CbrB comprend un régulateur post-transcriptionnel, Crc, qui agit comme RsmA (Fig. 4-1). De plus, les phénotypes de ces mutants sont similaires (Yeung *et al.*, 2010). Nous avons émis une hypothèse selon laquelle, MvaT agirait sur la traduction de *rsmA* de façon indirecte en réprimant la transcription de *cbrB*, augmentant ainsi le niveau du régulateur Crc qui lui pourrait agir sur la traduction de *rsmA*. Pour tester cette hypothèse, la quantification du rapporteur traductionnel *rsmA'*-*lacZ* a été effectuée chez les mutants *cbrB*⁻ et *crc*⁻ (Fig. 3-9).

Lorsque le régulateur post-transcriptionnel Crc est inactivé, la traduction de *rsmA* s'en trouve augmentée (Fig. 3-9A), et ce, à un niveau plus élevé que lorsque MvaT est inactivé (Fig. 3-3B). Lorsque CbrB, un régulateur transcriptionnel qui pourrait être affecté par MvaT, est inactivé, aucun changement marquant n'est observé sur la traduction de *rsmA* (Fig. 3-9B).

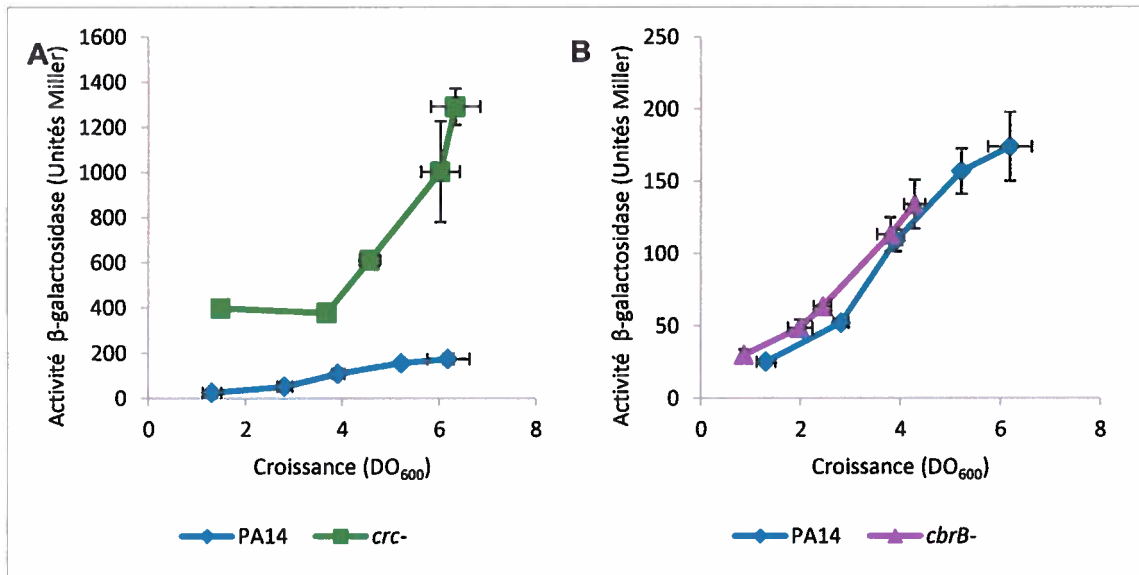


Figure 3-9. Activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'*-*lacZ*

(A) chez les mutants *crc*⁻ et (B) *cbrB*⁻.

3.3 LasR

Tel que présenté à la figure 3-7C, LasR semble activer la transcription de *rsmA*. Pour savoir si LasR est en mesure de contrôler directement la régulation de *rsmA*, une expérience a été effectuée dans un système hétérologue, telle que décrite à la section 2.3.1. Brièvement, l'expérience a consisté à exprimer *lasR* en présence de son ligand et du rapporteur traductionnel *rsmA'*-*lacZ* plasmidique (pME3859). Tout d'abord, le niveau de traduction était similaire pour tous les témoins. Cependant, lorsque LasR a été exprimé avec son ligand, le C₁₂-HSL, cela a causé un retard de croissance assez important chez *E. coli* (Fig. 3-10). Lorsqu'on compare le niveau de traduction en fin de croissance de la souche contenant le rapporteur, LasR et son ligand, on constate que celui-ci est similaire au niveau obtenu dans les témoins (Fig. 3-10).

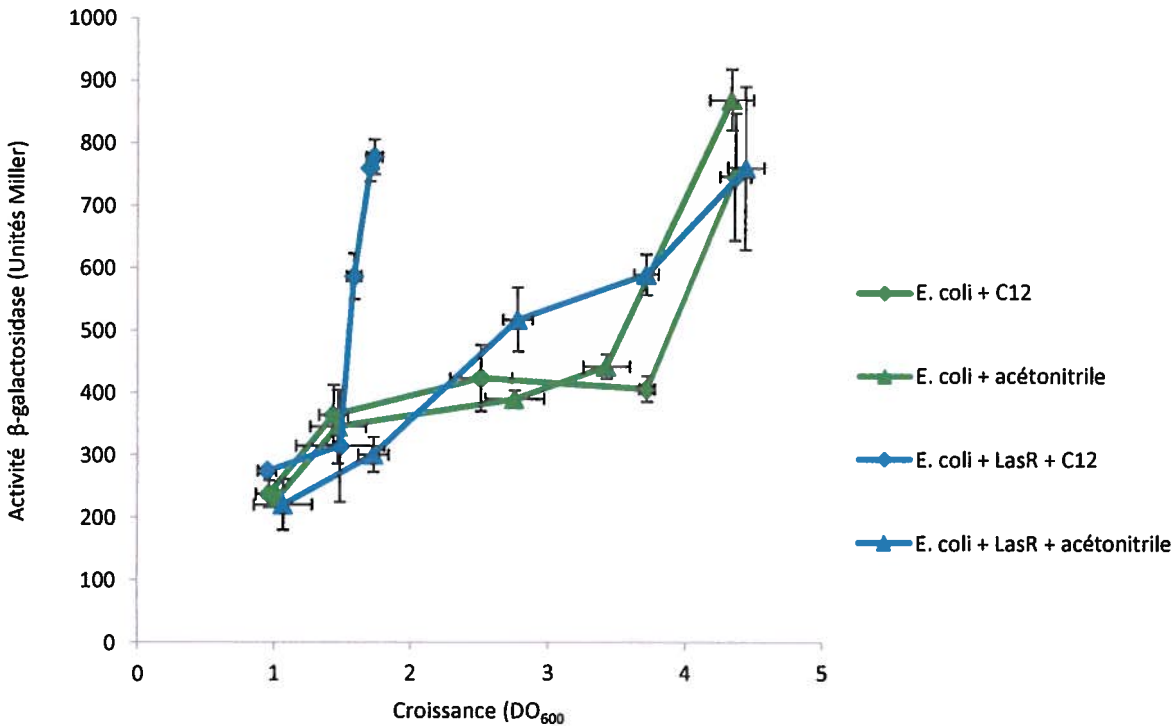


Figure 3-10. Effet de LasR sur l'activité du rapporteur traductionnel *rsmA'*-*lacZ* (pME3859) chez *E. coli* DH5 α en présence de C₁₂-HSL

3.4 Détermination du site d'initiation de la transcription par 5'Race

Le 5'RACE a pour but l'identification du ou des site(s) d'initiation de la transcription. La technique utilisée est décrite à la section 2.5. Suite aux différentes PCR, plusieurs fragments de tailles et d'intensités différentes ont été obtenus, ce qui suggère la présence de plusieurs sites d'initiation de la transcription pour *rsmA*.. La figure 3-11 représente ces différents fragments. Le fragment le plus intense est d'environ 280 pb (Fig. 3-11d). Plus difficile à voir, mais bien présent, un fragment d'intensité un peu moins forte se trouve à environ 290 pb (Fig. 3-11c). Un fragment d'intensité moyenne est présent à environ 350 pb (Fig. 3-11b) et finalement, un fragment très faible est observable à environ 400 pb (Fig. 3-11a). Ces résultats sont pertinents puisque la région intergénique entre *rsmA* et le gène en amont *lysC* ne comporte que 185 pb (Fig. 3-12A). De plus, la dernière amorce sur le gène *rsmA* amplifie 90 nucléotides avant la région intergénique. Les produits du 5'RACE ont été clonés dans pGEM®-T Easy et un ensemble de 96 clones, sélectionnés aléatoirement, a été séquencé.

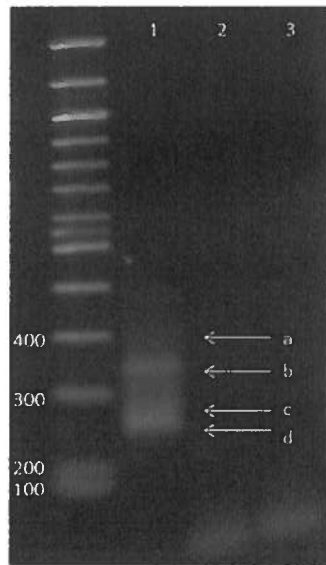


Figure 3-11. Visualisation de la dernière amplification du 5'RACE

Gel TBE 1,5%, (1) 15 µl 2ème PCR sur ADNc purifier, (2) 15 µl 2ème PCR sur filtrat purification, (3) 15 µl 2ème PCR sur échantillon sans TdT.

Un total de vingt-six longueurs de transcrits différents a été obtenu. Seulement 6 des 96 clones n'ont pas donné de résultat de séquençage concluant. De ces vingt-six longueurs, quatre transcrits sont majoritaires. La figure 3-12 schématise les résultats obtenus. Le transcrit le plus abondant est d'une longueur de 40 pb en amont du site d'initiation de la traduction et regroupe 49% des transcrits séquencés.

Ensuite, les trois autres transcrits se partagent 18% du nombre total comme suit : 4% de ceux-ci sont d'une longueur de 92 pb, 6% possèdent 85 pb et finalement, 8% contiennent 20 pb. Les transcrits qui ne sont pas présent dans un de ces quatre groupes, sont de longueurs intermédiaires entre 16 et 140 pb. Trois des clones séquencés contiennent des séquences qui ne dépassent pas le site d'initiation de la traduction.

Grâce à l'outil de prédiction de promoteur BPPROM présent sur le site de SoftBerry <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>, une analyse a été effectuée avec la région intergénique de *rsmA*, c'est-à-dire les 185 pb présentes entre *rsmA* et *lysC*. Cette analyse prédit un promoteur de type *lrp* ou *ompR* présent à -36 pb du site d'initiation de la traduction avec une boîte -10 à -51 pb et une boîte -35 à -74 pb. Ce site est représenté par un carré rouge dans la figure 3-12A.

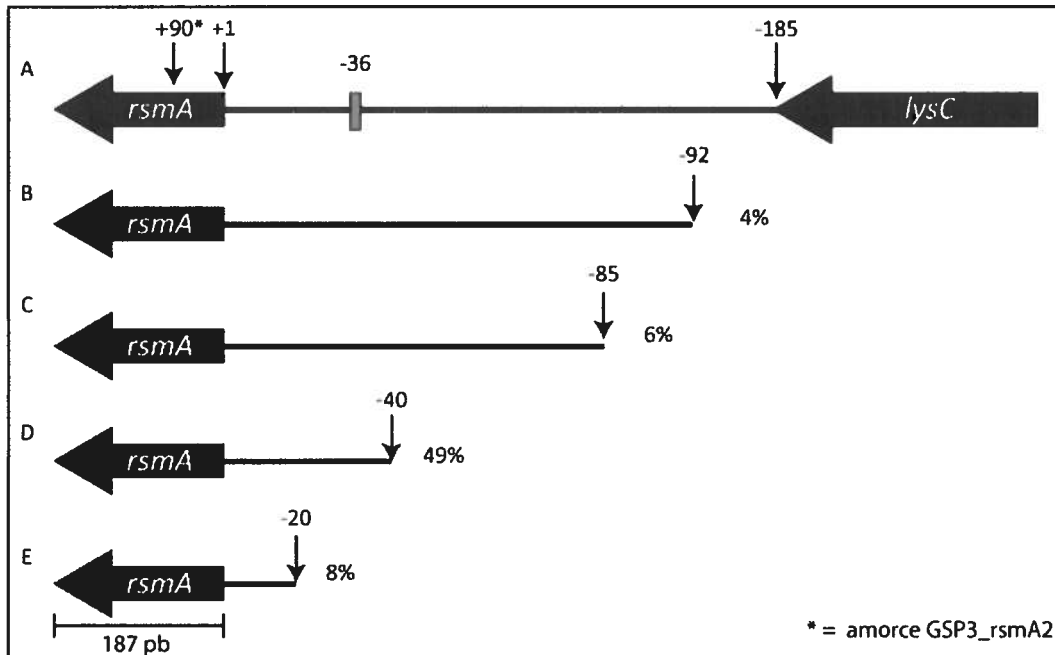


Figure 3-12. Longueur des transcrits obtenus lors du 5'RACE

(A) Contexte génomique de la région promotrice de *rsmA*, (B, C, D, E) Longueur (nucléotide) des quatre transcrits obtenus en plus grand nombre (%).

3.5 Mutagenèse aléatoire par transposition

Une mutagenèse aléatoire par transposition a été effectuée avec la souche *P. aeruginosa* PA14::*rsmA'*-*lacZ* (de pMS7F) (section 2.4.1). Cette souche contient un rapporteur chromosomique servant à quantifier la traduction de *rsmA*, sans marqueur de résistance à un antibiotique. Le rapporteur ainsi que la technique utilisée pour transférer celui-ci dans la souche sauvage sont expliqués aux sections 2.1.1.2 et 2.1.4. Le transposon employé était un dérivé *mariner* porté sur le plasmide (Fig. 2-3). Afin d'obtenir des transposants, une conjugaison entre la souche *P. aeruginosa* PA14::*rsmA'*-*lacZ* (de pMS7F) et *E. coli* χ 7213 (pBT20) a été effectuée, tel que décrit à la section 2.4.1. Les transposants contiennent donc le rapporteur *rsmA'*-*lacZ* inséré au site *attB* et un transposon inséré aléatoirement dans leur génome.

3.5.1 Criblage

Le criblage a été effectué à partir d'aliquots de transposants congelés à -70°C . Au total, environ 50 plaques de géloses aliz-gal de 20 cm X 20 cm (section 2.2.3) ont été utilisées pour ce criblage, pour un total approximatif 30 200 transposants criblés. Les transposants étaient

sélectionnés selon l'intensité de leur couleur rose. Une colonie rose foncée indiquant une traduction plus importante de la β -galactosidase reflétant ainsi une plus forte traduction de *rsmA* et une colonie rose pâle ou blanche, suggérant une expression plus faible de la β -galactosidase et donc, une traduction moindre de *rsmA*. La grosseur des colonies était aussi prise en considération, puisque les colonies plus petites pouvaient paraître plus foncées et vice-versa. La figure 3-13A présente un exemple de colonies observées sur les géloses aliz-gal. Une fois sélectionnées sur les grandes géloses, les colonies étaient repiquées sur des géloses aliz-gal de petits formats sans antibiotique. Cela permettait la comparaison directe avec des souches témoins. La figure 3-13B est un exemple de gélose utilisée dans le criblage secondaire. La présence de ces témoins permet de déterminer si, effectivement, les transposants ont un phénotype différent de la souche sauvage. Des 30 200 transposants criblés, 1060 ont été sélectionnés et repiqués sur les petites géloses aliz-gal pour confirmation, pour un total d'environ 20 géloses.

Par la suite, 213 transposants, jugés plus intéressants par une différence marquée, ont été sélectionnés et congelés à -70°C . Ensuite, l'activité de la β -galactosidase a été quantifiée en cinétique en cultures liquides pour l'ensemble de ces transposants. Le protocole qui fut employé est décrit à la section 2.3.3. Des exemples de résultats obtenus sont présentés à la section 3.5.4. Suite à l'analyse de ces résultats, 143 transposants furent sélectionnés pour l'identification du site d'insertion du transposon. De plus, une analyse statistique a été effectuée avec les résultats obtenus lors de la quantification de la β -galactosidase en liquide (section 2.4.3)

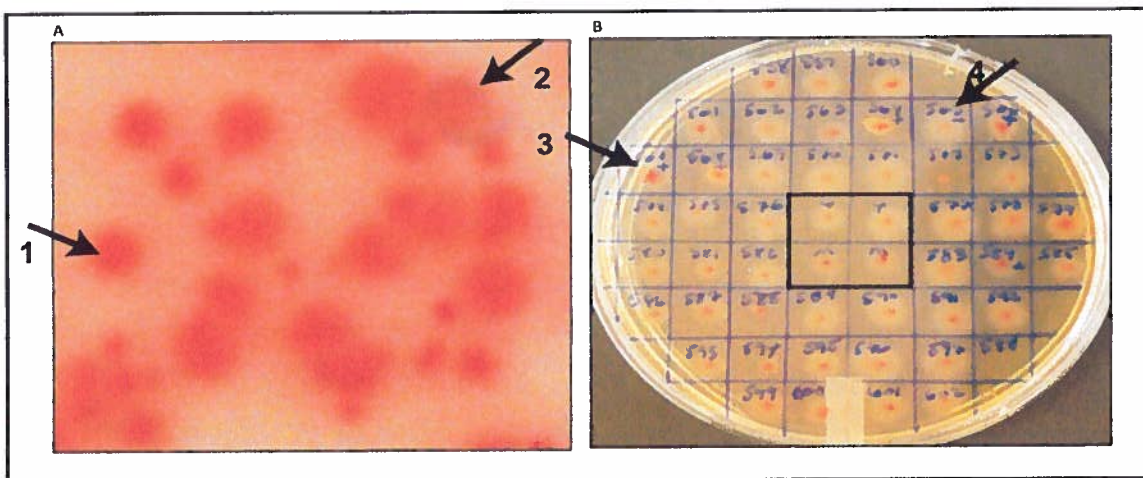


Figure 3-13. Géloses de criblage contenant de l'aliz-gal Amplification des gènes

(A) Gélose criblage primaire, (B) Gélose criblage secondaire, contenant la souche sauvage et le mutant *mvaT* dans l'encadré. (1, 3) colonie plus foncée et (2, 4) plus pâle.

Afin d'identifier le site d'insertion du transposon, et par le fait même identifier le gène interrompu qui est responsable du phénotype observé, la région adjacente au transposon doit d'abord être amplifiée. Pour ce faire, l'ADN des 143 transposants a été extrait, tel que décrit à la section 2.4.2.1. Ensuite, la région chromosomique près du transposon a été amplifiée à l'aide d'une technique de PCR semi-aléatoire, décrite à la section 2.4.2.2. La figure 3-14 présente un exemple de la visualisation des différentes régions adjacentes au transposon. Puisque la technique utilisée consiste en l'utilisation d'amorce aléatoire, plusieurs fragments de tailles différentes sont obtenus. En général, la longueur des fragments obtenus variaient entre 100 pb et 1 kb.

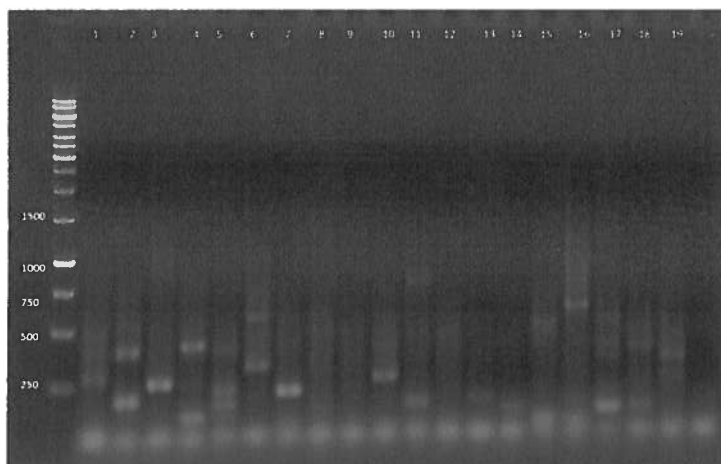


Figure 3-14. Exemple de produits PCR obtenus avec la technique de PCR double ronde
Puits #1-19 : 10 µl de produit PCR double ronde, puits (-) : 10 µl du produit de PCR témoin (sans matrice). Gel 1,5%.

3.5.2 Séquençage et analyse des produits PCR obtenus

Le séquençage a été effectué par le Service de séquençage de l'IRCM, en grande partie, comme décrit à la section 2.4.2.3. Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel Sequence Scanner (Applied Biosystem). Puisque les séquences contiennent une portion homologue au génome de *P. aeruginosa* PA14 ainsi qu'une partie homologue au transposon, les séquences obtenues peuvent être comparées au génome de *P. aeruginosa* afin d'identifier dans quel gène le transposon s'est inséré. Pour ce faire, les séquences ont été alignées en utilisant l'outil BLAST du site NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Le transposon utilisé n'est pas séquencé et donc, les séquences alignées sont nécessairement homologues au génome de *P.*

aeruginosa PA14. Un taux de succès de 97,2% a été obtenu lors du séquençage ainsi que lors de l'alignement des séquences. Les résultats obtenus étaient ensuite confirmés à l'aide de la base de données de *Pseudomonas*, sur le site <http://pseudomonas.com/> (Winsor *et al.*, 2011). De cette façon, le contexte génomique d'insertion du transposon a pu être étudié. Une visualisation graphique pour chaque transposon est disponible à l'appendice D. La base de données sur *Pseudomonas* a permis l'identification des fonctions prédites, la présence du gène interrompu dans un opéron ainsi que la distance du transposon par rapport au codon d'initiation de la traduction.

3.5.3 Caractéristiques des transposants affectés dans la traduction de *rsmA*

Les caractéristiques des transposants sont présentées en fonction de l'analyse statistique (section 2.4.3) effectuée avec les données des quantifications de l'expression du rapporteur *rsmA'-lacZ*. À cela s'ajoute les phénotypes observés sur les géloses aliz-gal ainsi que, pour les transposants séquencés, les informations obtenues sur le gène interrompu.

3.5.3.1 Vue d'ensemble

Un total de 213 transposants a été quantifié en liquide pour l'expression de *rsmA'-lacZ* au niveau traductionnel. Suite à l'analyse statistique, ceux-ci ont été classés dans cinq catégories, illustrés à la figure 3.15. Près de 40% des mutants sélectionnés ne sont pas significativement différents de la souche sauvage et sont dans la catégorie « WT ». La catégorie dans laquelle il y a le plus de mutants est celle qui regroupe les transposants pour lesquels le ratio T est plus faible tout au long de la croissance comparativement à la souche sauvage. Cette catégorie nommée « faible », comprend 32% des mutants testés. Ensuite, la catégorie « diminution », contient les transposants qui en début de croissance, étaient similaire au sauvage et qui par la suite présentaient des ratios T plus faibles. Il y a 22 % des mutants sélectionnés qui se retrouvent dans cette catégorie. Le groupe « retard » comprend les mutants pour lesquels leurs ratios T étaient plus faibles en début de croissance comparativement à la souche sauvage, et égal ou plus fort en fin de croissance. Seulement 3% appartiennent à cette catégorie. Finalement, le groupe « fort » est le plus petit des groupes et contient les mutants pour lesquels les ratios T étaient plus forts tout au long de la croissance comparativement à la souche sauvage.

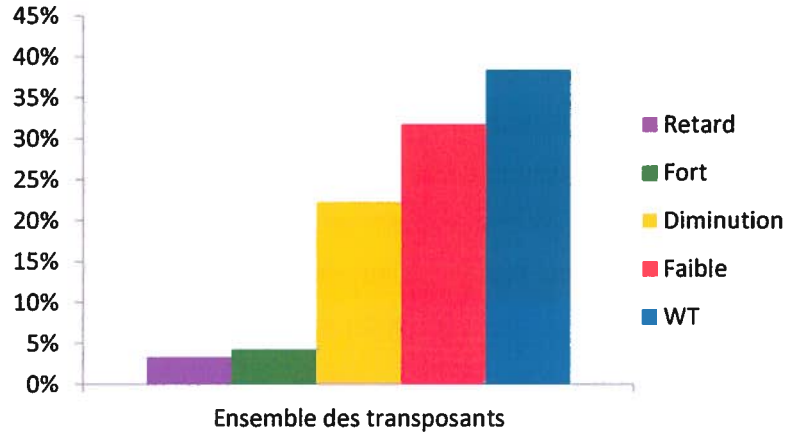


Figure 3-15. Distributions des transposants dans les différentes classes suite à l'analyse statistique

3.5.3.2 Caractéristique des transposants du groupe « fort »

Les transposants de ce groupe ont tous une activité *rsmA'-lacZ* plus forte que dans la souche sauvage lors du dosage en liquide. De plus, suite à l'analyse statistique décrite à la section 2.4.3, tous ces mutants ont un ratio plus grand que 1 à tous les points du dosage de la β -galactosidase. Les caractéristiques de ces transposants sont énumérées au tableau 3-4.

La figure 3-16 comprend des exemples de dosages de la β -galactosidase dans les transposants ayant pour effet d'augmenter la traduction de *rsmA*. Les données sont présentées en fonction du temps et représentent les ratios T (unité Miller/croissance). Le mutant #174 possède une insertion dans le gène *nuoD* et le mutant #151 dans le gène *prfA*. Ces deux gènes semblent avoir une activité de répression sur la traduction de *rsmA*.

Tableau 3-4. Caractéristiques des transposants qui font parties de la classe « fort ».

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
Mutants séquencés									
PA1606	PA14_43730	623	PA14_43730	protéine hypothétique	non	3894534	+	274	-
PA2639	PA14_29990	174	<i>nuoD</i>	Sous-unité C/D bifonctionnelle de la NADH oxydoréductase, ubiquinone	<i>nuoA-N</i>	2597740	+	205	-
PA4665	PA14_61700	151	<i>prfA</i>	Facteur de relâche de la chaîne peptidique 1	<i>hemA-prfA-PA14_61680-moeB-murI</i>	5504464	+	1046	-
PA5070	PA14_66980	285	<i>tatC</i>	Translocase sec-indépendante	<i>hisL-hisE-tatABC</i>	5979351	-	731	+
Mutants non séquencés									
114, 149, 165, 230, 296									

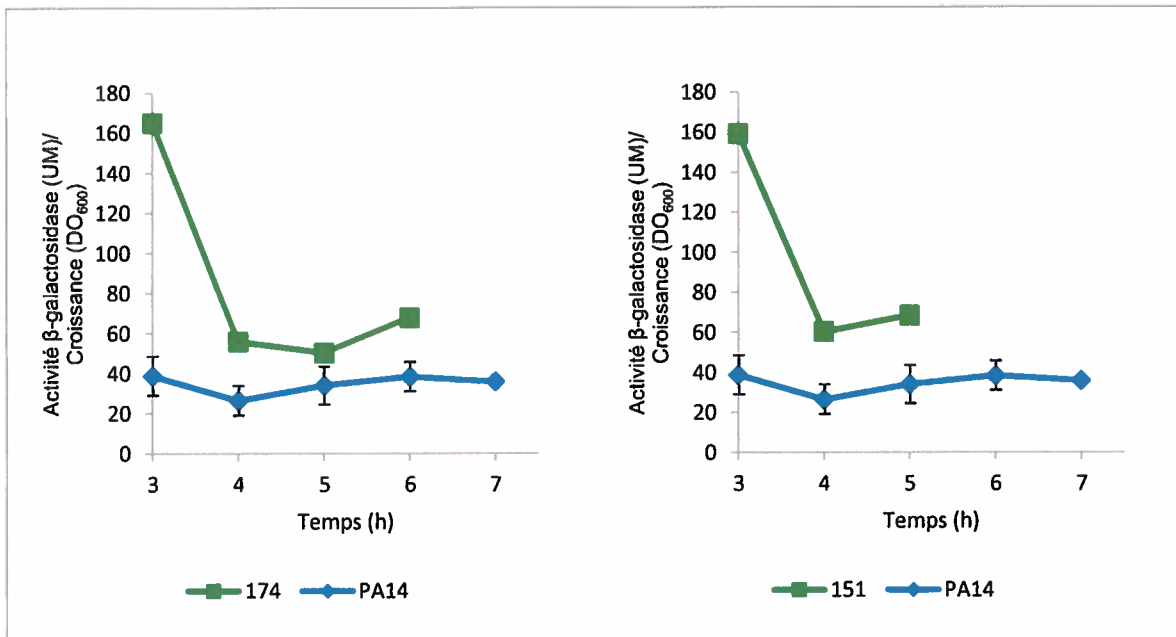


Figure 3-16. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'-lacZ* chez des transposants qui font parties de la catégorie « fort »

3.5.3.3 Caractéristique des transposants du groupe « faible »

Pour faire partie de cette catégorie, les transposants devaient avoir un ratio T plus petit que 0,9 à tous les points. Deux sous-classes sont présentes, soit les transposants avec une activité nulle et ceux possédant une faible activité.

Lors du criblage, cinq transposants ayant une couleur de colonie blanche ont été trouvés. Une telle couleur suggère une très faible ou une absence d'expression de la β -galactosidase. En effet, le transposon s'est inséré dans le gène *lacZ* du rapporteur pour chacun de ces transposants, inactivant ainsi la β -galactosidase.

La figure 3-17 contient un exemple de résultat obtenu lors du dosage de la β -galactosidase dans un des cinq mutants (# 618) possédant une insertion dans le gène *lacZ*. L'activité de la traduction est complètement absente tout au long de la cinétique. Puisque la β -galactosidase est inactivée dans ces mutants, l'ONPG ne peut donc pas être clivé. Ces transposants ne sont pas reliés à la traduction de *rsmA*, mais démontrent la redondance de la méthode de criblage.

Le deuxième groupe contient entre autres, douze transposants possédant une insertion dans un régulateur du *quorum sensing*. Les caractéristiques de ces mutants sont disponibles dans le tableau 3-5 et des exemples de dosage de la β -galactosidase sont présents à la figure 3-17. Entre autres, le régulateur transcriptionnel LasR a été interrompu

chez neuf mutants différents. De plus, les régulateurs du *quorum sensing* MvfR, Vfr et RhlR ont tous été inactivés une fois. Aussi, un gène impliqué dans la synthèse de molécules-signal, *pqsA*, est présent parmi les gènes interrompus.

Des gènes impliqués dans la biosynthèse de sidérophores, comme la pyoverdine et la pyocheline ont aussi été identifiés dans cette catégorie. Par exemple, les gènes *pvdQ*, *fpvA*, *pvdI*, *pchF*, *pchR* et *pchB* sont interrompus. Cela semble créer une diminution dans le niveau de traduction de *rsmA* comparativement à la souche sauvage.

Bien que les régulateurs du *quorum sensing* soient nombreux, les gènes les plus souvent affectés par l'insertion d'un transposon se retrouvent dans l'opéron *nuoA-N*. Cet opéron contient treize gènes qui forment la NADH réductase, une enzyme impliquée dans la respiration cellulaire. Des mutants interrompus pour les gènes *nuoG*, *nuoL* et *nuoN* ont été retrouvés onze fois dans cette catégorie.

Finalement, le locus PA14_30100 semble important pour la régulation de *rsmA* au niveau traductionnel puisqu'on retrouve deux transposants différents (#15 et 268) possédant une insertion dans ce même gène. Un exemple de dosage est disponible à la figure 3-17.

Tableau 3-5. Caractéristiques des transposants de la catégorie « faible ».

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
Mutants séquencés									
PA0337	PA14_04410	88	<i>ptsP</i>	Phosphotransférase	<i>ygdP-ptsP</i> -PA14_04420	392890	-	120	+
PA0652	PA14_08370	314	<i>vfr</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	717648	-	8	-
PA0744	PA14_54660	940	PA14_54660	Hydratase/isomérase probable de l'enoyl-CoA	PA14_5640-PA14_54660	4845919	-	351	+
PA0996	PA14_51420	531	<i>pqsA</i>	Synthèse des HAQ	<i>pqsA-E</i>	4571404	+	65	-
PA1003	PA14_51340	513	<i>mvfR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4563646	+	809	+
PA1323	PA14_47130	556	PA14_47130	Protéine hypothétique conservée	PA14_47120-PA14_47130	4198893	+	247	-
PA1430	PA14_45960	279	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4085724	+	334	-
PA1430	PA14_45960	696	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4085348	+	710	-
PA1430	PA14_45960	697	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4085821	+	237	-
PA1430	PA14_45960	704	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4085462	+	596	-
PA1430	PA14_45960	824	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4085868	+	190	-
PA1430	PA14_45960	872	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4085724	+	334	-
PA1430	PA14_45960	973	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4085728	+	330	-
PA1430	PA14_45960	563	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4085919	+	139	-
PA1430	PA14_45960	584	<i>lasR</i>	Régulateur transcriptionnel du quorum sensing	non	4086059	-	1	-
PA1538	PA14_44560	582	PA14_44560	Transport du K+	PA14_44560-PA14_44570	3967300	+	1222	+
PA2385	PA14_33820	719	<i>pvdQ</i>	Acylase	non	3007077	-	2089	+
PA2398	PA14_33680	933	<i>fpvA</i>	Récepteur de la ferripyoverdine	non	2986695	-	1911	-
PA2403	PA14_33610	351	<i>pvdI</i>	Synthèse de la pyoverdine	<i>pvdI-pvdJ-pvdD</i>	2957226	+	611	+

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
PA2621	PA14_30210	338	<i>clpS</i>	Protéase	<i>clpS-clpA</i>	2617179	+	243	+
PA2630	PA14_30100	268	PA14_30100	Protéine hypothétique	PA14_30100-PA14_30070	2606638	-	1142	-
PA2630	PA14_30100	15	PA14_30100	Protéine hypothétique	PA14_30100-PA14_30070	2606662	-	1118	-
PA2642	PA14_29940	39	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2592279	-	1905	-
PA2642	PA14_29940	74	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2592263	-	1921	-
PA2642	PA14_29940	134	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2593707	-	477	-
PA2642	PA14_29940	256	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2593704	-	480	-
PA2642	PA14_29940	883	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2592258	-	1926	-
PA2642	PA14_29940	906	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2593995	-	189	-
PA2647	PA14_29880	122	<i>nuoL</i>	Sous-unité L de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2588710	-	342	-
PA2647	PA14_29880	629	<i>nuoL</i>	Sous-unité L de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2588128	+	924	-
PA2647	PA14_29880	907	<i>nuoL</i>	Sous-unité L de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2588762	+	290	-
PA2649	PA14_29850	126	<i>nuoN</i>	Sous-unité N de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2585633	+	7	-
PA2649	PA14_29850	127	<i>nuoN</i>	Sous-unité N de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2584950	-	690	-
PA2737	PA14_28730	768	PA14_28730	Régulateur transcriptionnel	<i>pheS-pheT-ihfA-PA14_28730</i>	2474434	-	292	+
PA3141	PA14_23470	889	<i>wbpM</i>	Biosynthèse des LPS	non	2042234	+	624	+
PA3297	PA14_21400	1009	<i>hirpA</i>	Hélicase	non	1854710	-	2490	+
PA3348	PA14_20760	852	<i>cheR</i>	Protéine de chimiotaxie	non	1786608	-	193	+
PA3376	PA14_20400	941	<i>phnK</i>	Transporteur ABC	<i>phnC-phnD-phnE-phnF-phnG-phnH-phnI-phnK-phnL-phnM-phnN-phnP</i>	1755652	+	790	+

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
PA3477	PA14_19120	947	<i>rhlR</i>	Régulateur transcriptionnel du <i>quorum sensing</i>	non	1651223	+	233	+
					<i>pchE-pchF-pch-</i>				
PA4225	PA14_09280	745	<i>pchF</i>	Synthèse de la pyochéline	PA14_09300-PA14_09320	791997	+	1976	+
PA4227	PA14_09260	791	<i>pchR</i>	Régulateur transcriptionnel des gènes <i>pch</i>	non	784909	+	285	+
PA4230	PA14_09220	742	<i>pchB</i>	Synthèse de la pyochéline	<i>pchD-A</i>	781719	-	280	-
PA4307	PA14_56010	780	<i>PctB</i>	Protéine de chimiotaxie au TCE	non	5001590	+	764	+
PA4362	PA14_56730	913	PA14_56730	Protéine hypothétique conservée	non	5054123	+	285	+
					<i>rhlD</i>				
PA44544	PA14_60210	320	<i>rhlD</i>	Synthase de la pseudouridine	PA14_60200	5363845	+	437	-
					<i>mexC-mexD-oprJ</i>				
PA4599	PA14_60850	510	<i>mexC</i>	Pompe à efflux RND MexCD-OprJ		5427005	-	864	-
PA5041	PA14_66630	1024	<i>pilP</i>	Synthèse du pili de type IV	<i>pilMNOPQ</i>	5949739	-	87	-
PA5042	PA14_59270	978	<i>pilO</i>	Synthèse du pili de type IV	<i>pilMNOPQ</i>	5949854	+	592	-
					PA14_69090-PA14_69060				
PA5231	PA14_69070	988	PA14_69070	Transporteur de type ABC	PA14_69090-PA14_69060	6159572	-	2473	-
PA5232	PA14_69090	974	PA14_69090	Pompe à efflux hypothétique	PA14_69090-PA14_69060	6162090	-	1025	-
PA5443	PA14_71870	389	<i>uvrD</i>	Hélicase de type II	<i>uvrD-</i>				
ND	PA14_15520	712	<i>TrbJ</i>	Protéine de "mating pair formation"	PA14_71880	6405064	+	1056	+
					<i>trbJ-L</i>				
					devant: PA14_41260	1313492	négatif	201	positif
					et <i>tig</i>	3682205	+		

Mutation dans le transposon

199	<i>lacZ</i>	β -galactosidase
476	<i>lacZ</i>	β -galactosidase

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
		618	<i>lacZ</i>	β -galactosidase					
		679	<i>lacZ</i>	β -galactosidase					
		785	<i>lacZ</i>	β -galactosidase					
Mutants non séquencés									
65, 78, 267, 309, 438, 440, 914, 987									

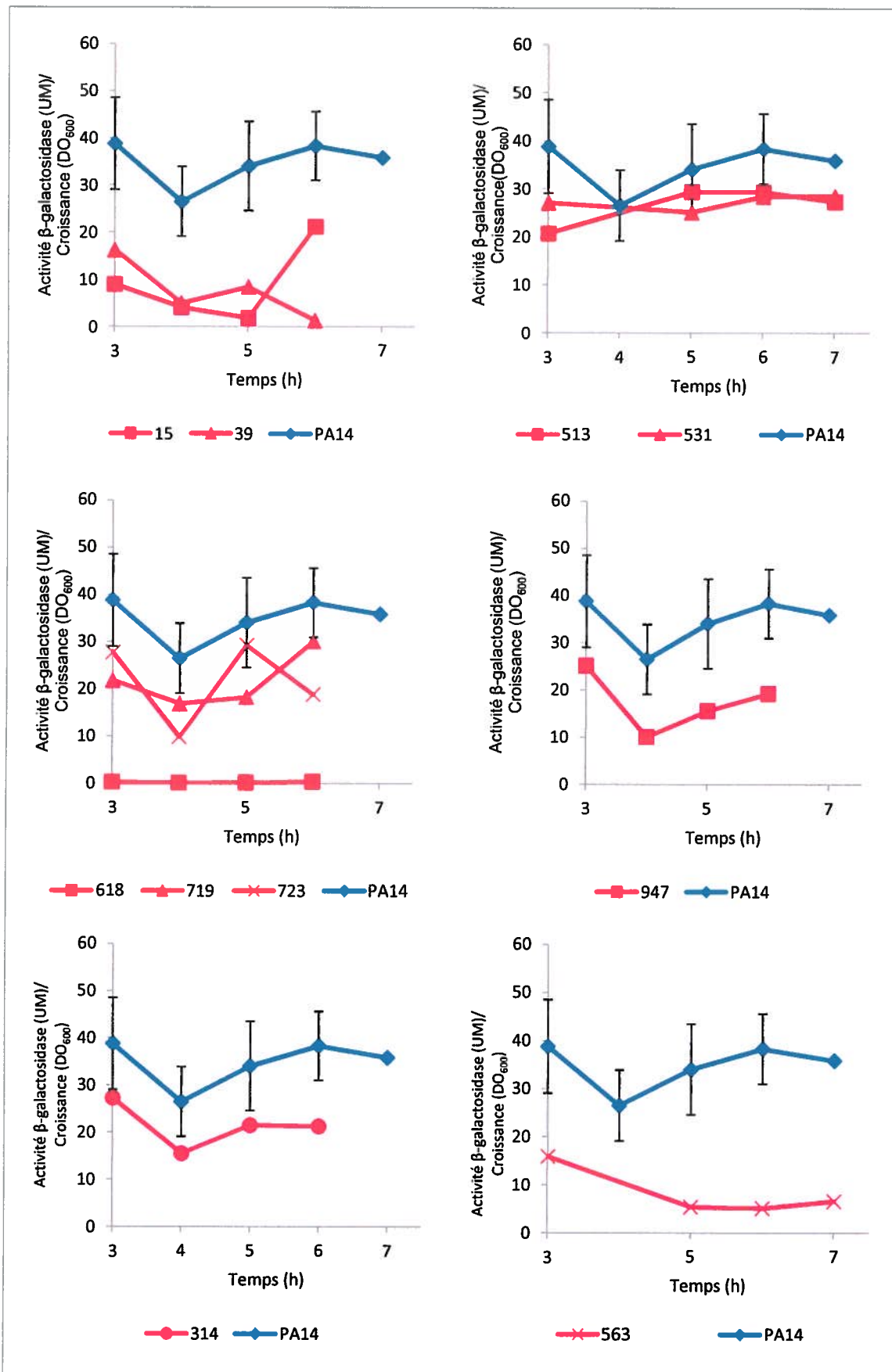


Figure 3-17. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'*-*lacZ* chez des transposants qui font parties de la catégorie « faible ».

3.5.3.4 Caractéristiques des transposants du groupe « retard »

Le groupe « retard » comprend les transposants qui répondaient à deux critères suite à l'analyse statistique. Tout d'abord, les deux premiers ratios T de la quantification de l'expression de *rsmA'-lacZ* devaient être plus petits que 0,9. De plus, les transposants devaient avoir un ratio supérieur ou égal à 1 lors du dernier point. Seulement sept transposants sont classés dans cette catégorie.

Dans cette catégorie, on retrouve un transposant interrompu dans le gène *gacS*, qui code pour le senseur d'un système à deux composantes. Des gènes reliés à la biosynthèse de la pyocheline et de la pyoverdine sont aussi présent, tels *pvdD*, *pvdI* et *pchF*. Chez ces mutants, le niveau de traduction de *rsmA* est retardé en début de croissance et atteint, ou semble dépasser, le niveau de la souche sauvage en fin de croissance. Les caractéristiques des mutants appartenant à cette catégorie sont présentées dans le tableau 3-6. La figure 3-18 montre des exemples pour les mutants #288, 744, 937 et 1023, interrompus respectivement dans les gènes *gacS*, *pchF*, *pvdI* et *pvdD*.

Tableau 3-6. Caractéristique des transposants de la catégorie « retard »

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	Nom gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
Mutant séquencés									
PA0928	PA14_52260	288	<i>gacS</i>	Senseur d'un système à deux composantes	PA14_52260- <i>ldhA</i> - PA14_52280-PA14_52290	4638104	+	2299	+
PA2399	PA14_33650	1023	<i>pvdD</i>	Synthèse de la pyoverdine	<i>pvdI-pvdJ-pvdD</i>	2984134	+	5485	+
PA2402	PA14_33610	937	<i>pvdI</i>	synthèse de la pyoverdine	<i>pvdI-pvdJ-pvdD</i>	2970493	+	13878	+
PA3190	PA14_66570	303	<i>glfB</i>	Synthèse du glutamate, sous-unité alpha	<i>glfB-glfD</i>	5941142	+	2044	-
PA4225	PA14_09280	744	<i>pchF</i>	pyocheline synthétase	<i>pchE-pchF-pchG</i> - PA14_09300-PA14_09320	791997	+	1976	+
PA4969	PA14_65690	666	PA14_65690	Protéine hypothétique	non	5850077	-	813	-
Mutant non séquencés									
928									

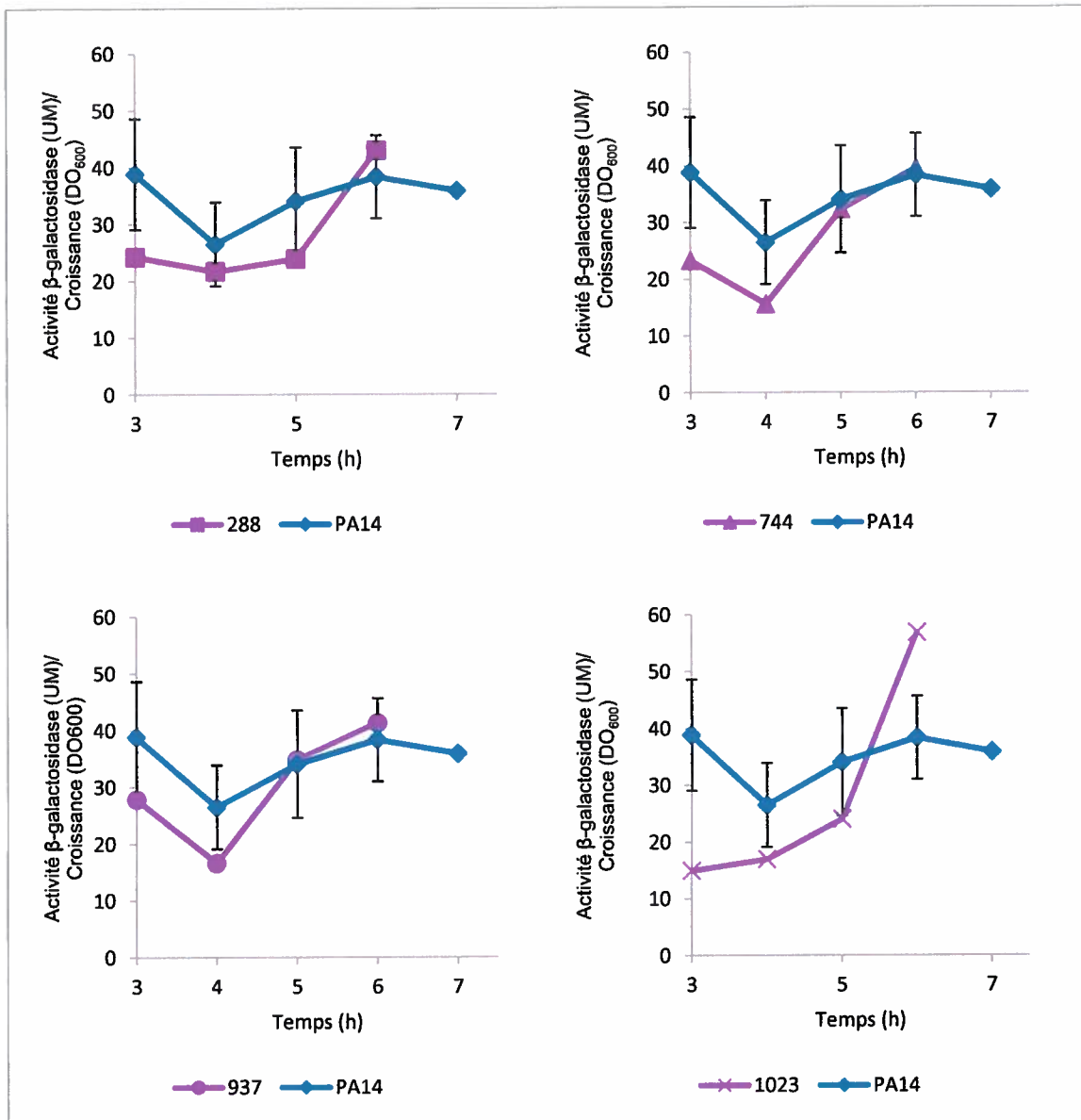


Figure 3-18. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'*-*lacZ* chez des transposants qui font parties de la catégorie « retard »

3.5.3.5 Caractéristiques des transposants du groupe « diminution »

Cette catégorie est l'inverse de la catégorie « retard ». En effet, pour qu'un mutant soit classé dans celle-ci, le ratio T du temps 1 doit être égal ou plus grand que 1, et les deux derniers ratios doivent être inférieurs à 0,9. De cette façon, les transposants qui, en début de cinétique, sont du même niveau ou un niveau plus élevé que la souche sauvage, mais qui diminuent constamment par la suite sont classés ici. Les caractéristiques de ces transposants sont présentées au tableau 3-7.

Les gènes les plus souvent interrompus dans cette catégorie se retrouvent tous dans l'opéron *nuoA-N*, soit les gènes *nuoD*, *nuoE* et *nuoG* de l'opéron *nuoA-N*. Un exemple de dosage pour le gène *nuoG* (mutant#275) est présenté à la figure 3-19.

Ensuite, on retrouve des mutants interrompus dans des gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores (pyocheline et pyoverdine). Les gènes *pvdQ*, *pvdA* et *pvdJ* pour la pyoverdine et les gènes *pchF*, *pchE* et *pchB* pour la pyocheline. Un exemple de dosage pour certains de ces gènes est disponible à la figure 3-19.

Les gènes *kynB* et *pqsH* ont été interrompu une fois, chez le mutant #203 (*kynB*) et #530 (*pqsH*). Ces gènes sont impliqués dans la biosynthèse de molécules-signal de la famille des HAQ. Dans cette catégorie, on retrouve aussi des transposants chez lesquels le transposon s'est inséré dans une région intergénique ou dans un gène codant pour l'ARNr 23S. Seulement une séquence n'a pas pu être alignée suite au séquençage.

Tableau 3-7. Caractéristiques des transposants de la catégorie « diminution ».

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	Nome gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
Mutant séquencés									
PA0084	PA14_01020	354	PA14_01020	Protéine hypothétique	PA14_00990-PA14_01020	99929	-	498	+
PA0933	PA14_52190	600	<i>rumA</i>	Méthyltransférase	<i>cysM-rumA-relA</i>	4628733	+	1208	-
PA1613	PA14_43650	857	PA14_43650	Protéine hypothétique	non	3885193	+	291	+
PA1779	PA14_41560	741	<i>nasC</i>	Déshydrogénase anaérobie	<i>nirB-nirD-PA14_41560-cobA</i>	3709229	+	326	+
PA2009	PA14_38510	1035	<i>hmgA</i>	Dioxygénase	<i>hmgA-fahA-maiA</i>	3435858	-	389	+
PA2081	PA14_37590	203	<i>kynB</i>	Synthèse de la kynurénine	<i>kynB-PA14_37610</i>	3345635	+	229	+
PA2385	PA14_33820	568	<i>pvdQ</i>	Acylase	non	3005005	-	17	+
PA2386	PA14_33810	579	<i>pvdA</i>	Synthèse de la pyoverdine	non	3004557	-	1023	+
PA2400	PA14_33630	667	<i>pvdJ</i>	Synthèse de la pyoverdine	<i>pvdI-pvdJ-pvdD</i>	2976769	+	4701	+
PA2597	PA14_30630	530	<i>pqsH</i>	Synthèse du PQS	non	2654643	-	629	+
PA2639	PA14_29990	601	<i>nuoD</i>	Sous-unité C/D bifonctionnelle de la NADH oxydoréductase, ubiquinone	<i>nuoA-N</i>	2597062	-	883	-
PA2640	PA14_29980	523	<i>nuoE</i>	Sous-unité E de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2595936	+	226	-
PA2642	PA14_29940	167	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2592282	-	1902	-
PA2642	PA14_29940	228	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2594092	+	92	-
PA2642	PA14_29940	275	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2592273	-	1911	-
PA2642	PA14_29940	504	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2593997	-	187	-

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	Nome gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
PA2642	PA14_29940	551	<i>nuoG</i>	Sous-unité G de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2592282	-	1902	-
PA2873	PA14_26930	771	PA14_26930	Protéine hypothétique, transaminase	PA14_26910- PA14_26940	2343448	-	1454	+
PA3297	PA14_21400	680	<i>hrpA</i>	Hélicase	non	1854714	-	2494	+
PA4225	PA14_09280	387	<i>pchF</i>	Synthèse de la pyochéline	<i>pchE-pchF-pchG- PA14_09300- PA14_09320</i>	792051	+	2030	+
PA4226	PA14_09270	813	<i>pchE</i>	Synthèse de la pyochéline	<i>pchE-pchF-pchG- PA14_09300- PA14_09320</i>	788498	+	2790	+
PA4230	PA14_09220	736	<i>pchB</i>	Synthèse de la pyochéline	<i>pchD-A</i>	781723	-	276	-
PA4423	PA14_57480	304	PA14_57480	Lipoprotéine hypothétique	PA14_57480- PA14_57490- <i>gmhA- PA14_57510</i>	5122751	+	1484	+
PA4497	PA14_58360	555	PA14_58360	Transporteur ABC	PA14_58350- PA14_58360	5196912	+	136	+
PA5049	PA14_66710	1001	<i>rpmE</i>	Protéine L31 de la sous-unité 50S	<i>rpmE-PA14_66700- PA14_66690</i>	5958501	-	203	-
PA5241	PA14_69220	958	<i>ppx</i>	Exopolyphosphatase	non	6173442	-	350	+
PA5369	PA14_70860	652	PA14_70860	Protéine hypothétique	non	6311534	-	568	-
PA5413	PA14_71440	346	<i>ItaA</i>	Aldolase de la l-thronine	PA14_71450- <i>ItaA</i>	6365553	+	454	-
PA5565	PA14_73370	269	<i>gidA</i>	Régulateur du <i>quorum sensing</i>	<i>gidA-gidB-soj-parB</i>	6530934	+	1519	-
	PA14_08600, 55631, 62060, 70880	231	rRNA-23S	ARN ribosomal	non	735301	+	208*	+
	PA14_08600, 55631, 62060, 70880	681	rRNA-23S	ARN ribosomal	non	735091	+	2*	+

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	Nome gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
	PA14_14570	708	PA14_14570 ARNt-Leu		non	1244824	-	2*	-
	PA14_58930	380	PA14_58930 Protéine hypothétique		PA14_58910- PA14_58990 devant: PA14_58375 et PA14_58380	5253516	+	334	+
	intergénique	663				5199759	-		
	intergénique	776			devant: PA14_35790 et PA14_35800	3184964	-		
	intergénique	599			devant: <i>pyrH</i> et <i>tsf</i>	1464886	+		
Mutant séquencés, aucune correspondance									
935									
Mutants non séquencé									
212, 234, 276, 316, 365, 395, 487, 674, 904, 945, 1038									
*Début de l'ARNr									

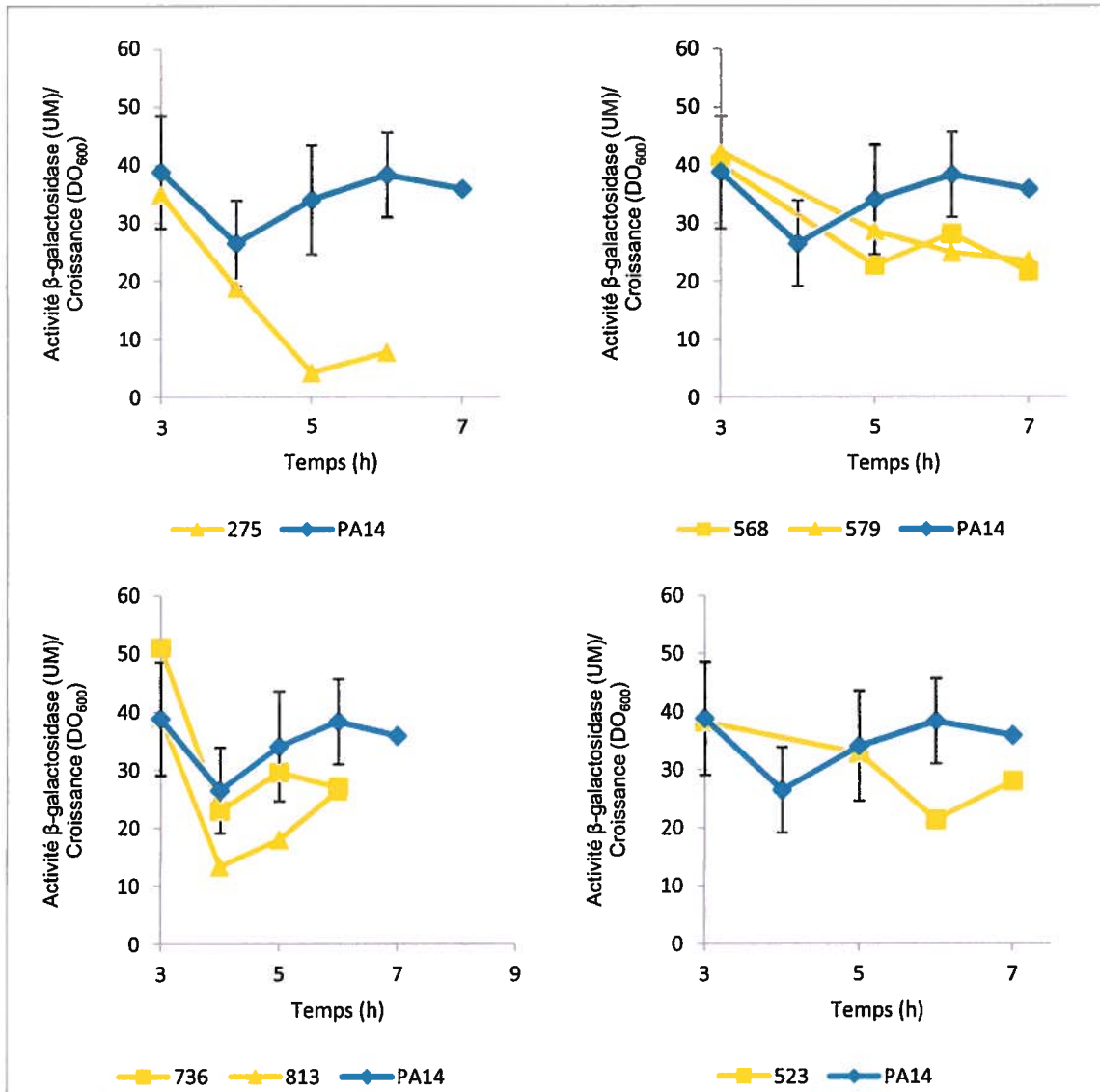


Figure 3-19. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'*-*lacZ* chez des transposants qui font partis de la catégorie « diminution »

3.5.3.6 Caractéristiques des transposants du groupe « WT »

Enfin, la dernière catégorie regroupe tous les transposants qui ne correspondaient pas aux critères de sélection des autres groupes. Ils sont donc jugés non significativement différents de la souche sauvage. Ce groupe comprend aussi les transposants qui, lors du dosage de la β -galactosidase en culture liquide, ont démontré un défaut de croissance. Le tableau 3-8 contient les caractéristiques de tous ces mutants. De plus, quelques exemples de dosage de la β -galactosidase en culture liquide

sont disponibles à la figure 3-20. Parmi les mutants séquencés, on retrouve des insertions dans les gènes *pvd*, *pch*, *nuo* et PA14_30100. Bien que le mutant #847 semble faire partie de la catégorie « faible », ce dernier a un ratio T3 supérieur à 0,9 (Appendice C).

Tableau 3-8. Caractéristiques des transposants dans la catégorie WT

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	Nome gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
Mutant séquencé									
PA0406	PA14_05300	1056	PA14_05300	Protéine qui contient un domaine TonB	<i>gshB-PA14_05300-PA14_05290-yggF</i>	462297	+	791	-
PA0767	PA14_54370	150	<i>lepA</i>	Protéine liant le GTP	<i>lepA-lepB</i>	4821015	-	1416	-
PA0984	PA14_59230	720	PA14_59230	Protéine d'immunité contre la collicine	non	5277110	-	61	-
PA1057	PA14_50700	662	PA14_50700	Antiporteur de cation	PA14_50730-PA14_50680	4502947	-	289	-
PA1080	PA14_50450	515	<i>figE</i>	Crochet flagellaire	<i>figB-E</i>	4483566	+	479	-
PA1510	PA14_44910	350	PA14_44910	Protéine hypothétique	PA14_44900-PA14_44930	4004147	-	833	+
PA1549	PA14_44440	602	PA14_44440	Transporteur d'ion métallique transmembranaire	PA14_44420-PA14_44460	3956298	+	150	+
PA1554	PA14_44370	249	PA14_44370	Sous-unité I du cytochrome C	PA14_44370-PA14_44400	3951670	+	901	+
PA1769	PA14_41680	1058	<i>ydiA</i>	Protéine hypothétique	non	3721546	+	744	+
PA2243	PA14_35590	897	<i>pslM</i>	Déshydrogénase	<i>pslM-O</i>	3162159	-	1396	-
PA2385	PA14_33820	564	<i>pvdQ</i>	Acylase	non	3006235	+	1247	+
PA2385	PA14_33820	847	<i>pvdQ</i>	Acylase	non	3005005	-	17	+
PA2399	PA14_33650	811	<i>pvdD</i>	Synthèse de la pyoverdine	<i>pvdI-pvdJ-pvdD</i>	2984344	+	5695	+
PA2424	PA14_33280	1037	<i>pvdL</i>	Synthèse de la pyoverdine	<i>pvdG-pvdL</i>	2917349	+	5250	+
PA2630	PA14_30100	163	PA14_30100	Protéine hypothétique	PA14_30100-PA14_30070	2607368	+	412	-
PA2639	PA14_29990	761	<i>nuoD</i>	Sous-unité C/D bifonctionnelle de la NADH oxydoréductase, ubiquinone	<i>nuoA-N</i>	2597154	+	791	-
PA2645	PA14_29900	179	<i>nuoJ</i>	Sous-unité J de la NADH déshydrogénase	<i>nuoA-N</i>	2589887	+	16	-
PA3170	PA14_23240	753	PA14_23240	Chlorohydrolase du N-	non	2012149	-	1182	-

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	Nome gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
			ethylammeline						
PA3534	PA14_18640	362	PA14_18640	Oxydoréductase	non	1603987	-	460	+
PA4207	PA14_09520	376	<i>mexI</i>	Pompe efflux RND	<i>opmD-medI-medH-mexG</i>	819106	+	289	-
PA4226	PA14_09270	567	<i>pchE</i>	Synthèse pyocheline	<i>pchE-pchF-pchG-PA14_09300-PA14_09320</i>	789909	+	4201	+
PA4229	PA14_09230	355	<i>pchC</i>	Synthèse pyocheline	<i>pchD-A</i>	782607	+	147	-
PA4438	PA14_57650	524	PA14_57650	ATPase	PA14_57680- <i>trpS-PA14_57650</i>	5135254	+	228	-
PA4554	PA14_60310	501	<i>pilY1</i>	Assemblage des pili	<i>pilW-pilX-pilY1</i>	5376155	+	3001	+
PA5091	PA1467240	977	<i>hufG</i>	Amidohydrolase du N-formylglutamate	PA14_67300-PA14_67260- <i>hufI-hufG</i>	6004969	+	205	-
PA5175	PA14_68380	777	<i>cysQ</i>	Nucléotidase du 3'(2'),5-bisphosphate	<i>nudE-cysQ</i>	6100699	-	421	-
PA5334	PA14_70420	305	<i>rphH</i>	Ribonucléase PH	<i>rph-PA14_70400</i>	6276508	+	507	-
PA5490	PA14_72460	2	<i>cc4</i>	Précurseur du cytochrome c4	non	6454802	+	459	-
PA5567	PA14_73400	299	<i>trmE</i>	Modificateur des ARNt	PA14_73410- <i>trmE</i>	6534244	-	757	-
	PA14_08600, 55631, 62060, 70880	1012	ARNr-23s	ARN ribosomal	non	735885	+	792	+
	PA14_15380	467	<i>repA</i>	Protéine de réplication reliée au phage	<i>repA-PA14_15400</i>	1304799	+	747	+
Aucune correspondance									
532, 361									
Mutants non séquencés									
28, 89, 90, 111, 133, 137, 138, 147, 148, 162, 180, 201, 211, 217, 219, 229, 240, 248, 259, 270, 272, 273, 291, 300, 321, 323, 331, 364, 370, 424, 439, 457, 464, 470, 550, 566, 728, 751, 754, 861, 864, 880, 882, 929, 949, 1027									

#Gène PA01	#Gène PA14	#Mutant	Nome gène	Fonction	Opéron	Position transposon	Sens transposon	Distance codon d'initiation	Brin codant
Défaut de croissance									
290, 322, 527, 539, 565, 668, 677, 802, 992									

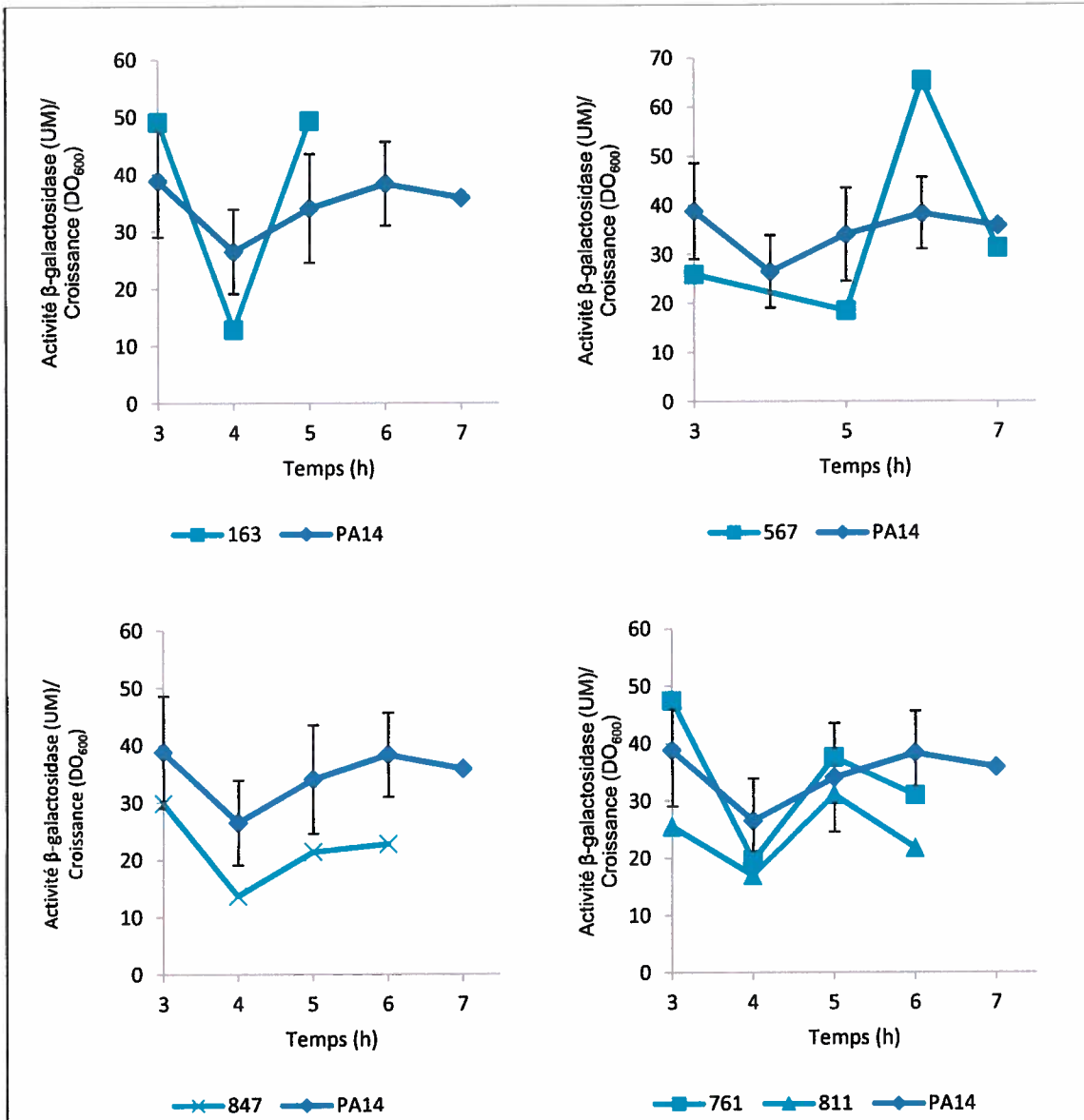


Figure 3-20. Exemple d'activité du rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'-lacZ* chez des transposants qui font partis de la catégorie « WT »

3.6 Effet des facteurs environnementaux

Puisque la régulation de *rsmA* est complexe et que bien des systèmes à deux composantes agissent dans des voies de régulation en lien avec RsmA, l'effet de certains facteurs environnementaux a été étudié. Puisque les facteurs qui sont reconnus par les systèmes à deux composantes mentionnés plus haut ne sont pas connus, l'effet de la température et l'effet de différentes sources de carbone sur la traduction de *rsmA* ont été choisis. Dans ce but, la quantification de la β -galactosidase a été effectuée, comme décrit aux sections 2.3.4 et 2.3.5.

3.6.1 Effet de la température

Le dosage de la β -galactosidase à différentes températures a été effectué dans des cultures incubées à 28°C, 30°C, 37°C et 41°C. La figure 3-21 présente un résumé du dosage de la β -galactosidase dans ces conditions. La croissance n'a pas été affectée à ces températures, et les expériences peuvent donc être facilement comparées.

Chez la souche sauvage PA14 (Fig. 3-21A), lorsque la température testée est plus basse (28°C et 30°C) que la température de la pré-culture (37°C), la période de latence est plus prononcée, ce qui n'est pas le cas lorsque la température est augmentée (41°C). Le niveau de traduction du rapporteur *rsmA'-lacZ* lors des tests à 28°C et 30°C est très similaire. À ces températures, la traduction de *rsmA* atteint un niveau médian. Lorsque la température testée est à la limite de la croissance de *P. aeruginosa*, soit 41°C, *rsmA* est traduit à un niveau beaucoup plus faible, et ce, même si la croissance est bonne. C'est à la température optimale de croissance, 37°C, que la traduction de *rsmA* est la plus élevée.

Lorsque le dosage est effectué chez un mutant *mvaT*, l'effet est plus prononcé que dans la souche sauvage (Fig. 3-21B). En effet, le niveau de traduction de *rsmA* est différent seulement à 37°C tandis que les autres températures sont assez similaires. Cependant, le niveau de traduction de *rsmA* chez ce mutant est plus élevé à toutes les températures que celui de la souche sauvage. Chez ce mutant, la phase de latence est très prononcée lorsque la température de l'expérience est plus basse que la température de la pré-culture.

Lorsque testé chez le mutant *lasR*, les résultats sont similaires à la souche sauvage, c'est-à-dire que la traduction de *rsmA* est plus élevée à 37°C, de niveau intermédiaire à 28 et 30°C et bas à 41°C (Fig. 3-21C). Chez ce mutant, une petite phase de latence est présente lorsque ce dernier est incubé à 30°C.

Il est intéressant de noter que le niveau d'aération des tubes n'affecte pas la traduction de *rsmA*, puisque l'expression n'est pas affecté à 37°C lorsque les cultures sont incubées dans un incubateur de type tombeau (faible aération) comparativement à l'incubation dans incubateur muni d'un tambour rotatif (aération maximale).

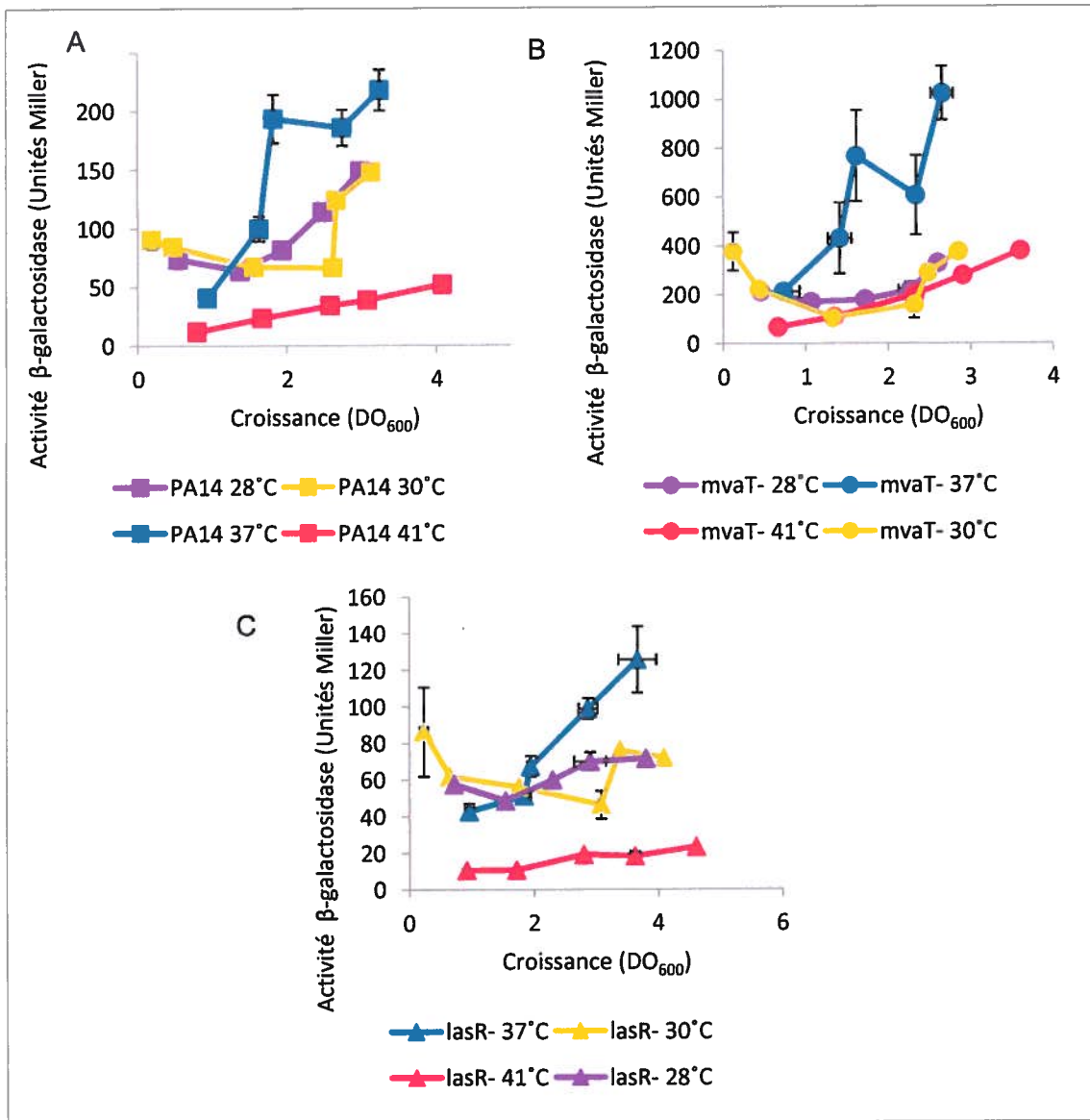


Figure 3-21. Activité du rapporteur traductionnel *rsmA*'-*lacZ* à différentes températures
(A) chez *P. aeruginosa* PA14, (B) *mvaT* et (C) *lasR*.

3.6.2 Effet de différentes sources de carbones

L'effet des différentes sources de carbone a été testé dans un milieu minéral, le M63, tel que décrit à la section 2.2.1. La technique utilisée est décrite à la section 2.3.5. Les sources de carbone testées étaient le gluconate de sodium, le glycérol, le fructose, le dextrose (D-glucose), le mannitol, l'huile de canola et le succinate de sodium. Le niveau de traduction de *rsmA* est similaire avec l'utilisation de toutes ces sources de carbones, à l'exception du fructose (Fig. 3-22). C'est avec celle-ci que la traduction de *rsmA* est la plus élevée.

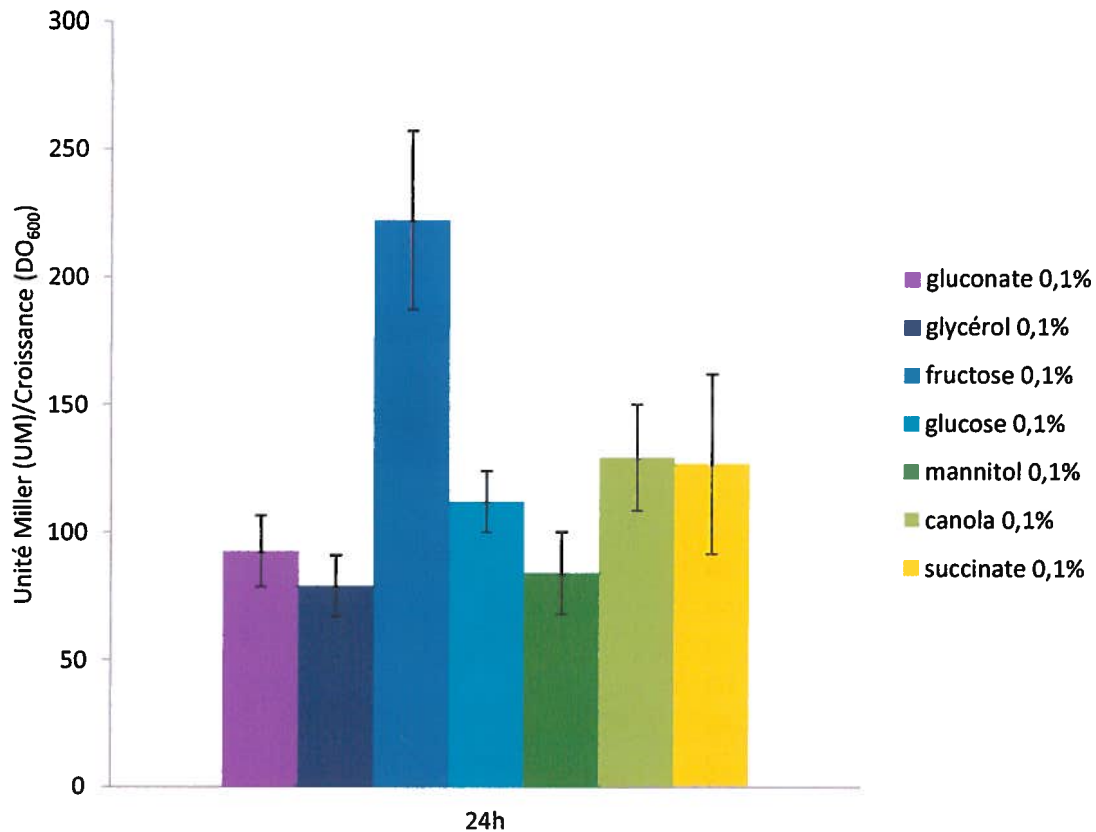


Figure 3-22. Activité du rapporteur *rsmA*'-lacZ traductionnel chromosomique dans un milieu minéral (M63) complémenté de différentes sources de carbone

4 DISCUSSION

4.1 Caractérisation de la régulation de *rsmA*

Aucune étude ne s'est intéressée à la régulation de *rsmA* jusqu'à présent chez *P. aeruginosa*. Cependant, beaucoup d'informations sont disponibles sur la voie de signalisation GacA/GacS ainsi que sur les ARNnc RsmZ et RsmY. Afin d'obtenir plus d'information sur *rsmA*, le niveau de traduction de ce dernier a été quantifié chez 22 mutants codant pour des régulateurs importants du *quorum sensing* (Tableau 3-1). De plus, afin de trouver des régulateurs qui n'auraient pas été identifiés dans la première étape, une mutagenèse aléatoire suivit d'un criblage ont été effectués. Les résultats obtenus lors de ces deux parties sont combinés ici pour faire le lien entre celles-ci. De plus, il sera question de l'analyse des sites d'initiation de la transcription pour *rsmA*, et l'implication des facteurs environnementaux dans la régulation. La discussion est séparée en plusieurs sections, dans lesquelles les gènes importants pour la régulation de *rsmA* sont discutés. Finalement, un modèle portant sur la régulation de *rsmA* est présenté.

4.1.1 Le rôle de LasR dans la régulation de *rsmA*

4.1.1.1 L'effet d'une mutation chez *lasR* sur la régulation de *rsmA*

LasR, le régulateur transcriptionnel du système de *quorum sensing las*, a été parmi les gènes sélectionnés pour déterminer si le *quorum sensing* a un effet sur l'expression de *rsmA*. Beaucoup d'études ont porté sur l'analyse du régulon de LasR, et jusqu'à ce jour, aucune n'a trouvé que ce dernier régulait de façon directe la transcription de *rsmA*. LasR régule de façon directe la transcription de 74 gènes sous le contrôle de 35 promoteurs, et affecte l'expression de plus de 300 gènes de façon indirecte (Gilbert *et al.*, 2009).

La traduction de *rsmA* chez un mutant *lasR*⁻ a tout d'abord été étudiée. Dans la figure 3-1, on observe que le niveau de traduction est beaucoup plus bas chez la souche *lasR*⁻ que chez la souche sauvage. Puisque LasR est un régulateur transcriptionnel, on ne peut pas dire si celui-ci agit directement sur *rsmA*. Pour ce faire, le niveau de transcription de *rsmA* a été quantifié chez le mutant *lasR*⁻. Dans la figure 3-7, on

constate qu'il y a une diminution au niveau de la transcription, et ce, de façon plus importante qu'au niveau de la traduction comparativement à la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que LasR agit au niveau de la transcription de *rsmA*. Cependant, on peut seulement conclure, pour l'instant, que LasR agit sur la régulation de *rsmA* au niveau transcriptionnel, soit de façon indirecte ou directe.

Lors du criblage, plusieurs transposants interrompus dans des gènes en lien avec LasR ont été retrouvés. Tout d'abord, neuf transposants ont une insertion dans le gène *lasR* lui-même (Tableau 3-5). Les neufs mutants se retrouvent dans la catégorie « faible » suite à l'analyse statistique. De plus, les résultats des quantifications de la β -galactosidase obtenus lors du criblage sont très similaires à ceux-obtenus chez le mutant *lasR* provenant de la collection de souches du laboratoire (Fig. 3-17) (Déziel *et al.*, 2004). Ces résultats confirment la technique de criblage. En terme de redondance, le gène *lasR* est celui qui a été retrouvé le deuxième plus souvent. Ceci suggère, une fois de plus, l'importance de LasR dans la régulation de *rsmA*.

Afin de voir si LasR pourrait réguler *rsmA* directement, une analyse bio-informatique a été effectuée avec les logiciels MEME (Bailey *et al.*, 2010) et MAST (Bailey & Gribskov, 1998). Une matrice est créée à partir des séquences consensus reconnues par LasR avec le logiciel MEME, et ensuite, le logiciel MAST a permis d'analyser la région intergénique de *rsmA* pour trouver une séquence reconnue par LasR. Malheureusement, aucune séquence consensus n'a été trouvée dans la région promotrice de *rsmA*, ce qui suggère une régulation indirecte.

Une autre méthode a ensuite été utilisée pour vérifier à quel niveau agit LasR. Un système hétérologue a permis de quantifier la traduction de *rsmA* en présence et en absence de LasR ainsi que de son ligand. Ce système est décrit à la section 2.3.2. Cette méthode permet d'analyser l'effet de LasR seul, sans la présence de tous les autres gènes normalement exprimés chez *P. aeruginosa* puisque la quantification de l'expression de *rsmA* se fait chez *E. coli*. Cependant, la présence de LasR ainsi que de son ligand ont perturbé grandement la croissance d'*E. coli* (Fig. 3-10). Lorsque les résultats sont analysés en fonction de la croissance, le niveau d'expression de *rsmA*'-*lacZ* atteint un niveau similaire dans tous les cas, mais à un niveau de croissance plus bas lorsque LasR est exprimé avec son ligand. Par contre, lorsque les unités Miller sont corrigées avec la croissance, le niveau de traduction de *rsmA* est beaucoup plus fort, suggérant une régulation directe.

Chez *E. coli*, les molécules-signal sont reconnues par le régulateur de type Lux SdiA. Ce dernier, lorsque surexprimé sur un plasmide, cause une surexpression de la pompe à efflux AcrAB (Yang *et al.* 2006). Celle-ci permet l'entrée de molécules de signalisation dans la cellule. La bactérie perçoit donc ce signal comme une densité de cellule élevée et passe en phase stationnaire (Yang *et al.* 2006). Puisque l'ajout de molécules-signal sans LasR ne produit pas de retard de croissance, LasR doit être présent et actif. Puisque SdiA et LasR ne lient pas les mêmes motifs d'ADN, LasR est peut-être en mesure de lier de l'ADN chez *E. coli* de façon aléatoire, créant ainsi un retard de croissance.

4.1.1.2 Effet d'une mutation chez les gènes régulés par LasR et qui régulent LasR

Pour le moment, les résultats obtenus semblent montrer que LasR affecte la transcription de *rsmA* de façon indirecte. Les cibles directes de LasR sont assez bien connues dans la littérature : LasR contrôle *rhIR*, *mvfR*, *pqsA*, *pqsH*, *kynB* et plusieurs autres (Gilbert *et al.*, 2009; Pesci *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 2006b). Les régulateur RhIR et MvfR ont été sélectionnés afin d'étudier la régulation de *rsmA*. Ces derniers contrôlent respectivement les systèmes de *quorum sensing rhI* et MvfR/HAQ (Fig. 1-4).

Le régulateur global Vfr contrôle positivement l'expression de LasR, et ce, sans besoin d'AMPc (Albus *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2010). Lorsque Vfr est inactif, la transcription de *lasR* est diminuée. L'effet de l'inactivation du gène *vfr* a donc été étudié. Finalement, l'effet d'une mutation dans *pqsE* a aussi été étudié puisqu'il fait partie de l'opéron *pqsA-E*, contrôlé positivement par LasR et MvfR.

4.1.1.2.1 RhIR

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de RhIR sont moins concluants. En effet, les résultats obtenus lors de la quantification de la β -galactosidase avec les rapporteurs traductionnels plasmidique (Fig. 3-4) et chromosomique (Fig. 3-5) ne sont pas similaires. Lorsque la traduction de *rsmA* est quantifiée avec le plasmide chez le mutant *rhIR*⁻, le niveau obtenu est très similaire à celui de la courbe-témoin, et lorsque le rapporteur chromosomique est utilisé, le niveau dépasse grandement celui de la souche sauvage. Ces résultats sont très difficiles à interpréter puisque pour tous les autres mutants testés avec le plasmide et le rapporteur chromosomique, les tendances observées étaient

comparables. De plus, plusieurs conjugaisons ont été effectuées et l'expérience a été répétée à maintes occasions. La différence majeure entre le rapporteur plasmidique et chromosomique est reliée à la quantité présente dans la cellule. En effet, le rapporteur plasmidique est en faible copie tandis que le rapporteur chromosomique se retrouve une seule fois dans la cellule. Il est possible que les différences observées soient dues au nombre de copies.

La transcription de *rsmA* n'a pas été étudiée dans le mutant *rhIR*. Cette expérience pourrait aider à clarifier la situation. Afin de vérifier l'effet d'une mutation dans *rhIR*, une quantification de l'ARNm par qRT-PCR serait nécessaire. De cette façon, il serait possible de déterminer si l'effet observé dans le mutant *lasR* est un effet indirect sur *RhIR*. Bien que l'effet d'une mutation au niveau de *rhIR* soit important au niveau de la traduction de *rsmA*, on ne peut dire si ce dernier est direct ou indirect.

Lors du criblage, le mutant #947, qui contient une insertion dans le gène *rhIR* a été identifié. Ce mutant est classé dans le même groupe que les mutants *lasR* soit, le groupe « faible ». Le niveau de traduction de *rsmA* dans ces mutants est donc plus bas tout au long de la croissance, comparativement à la souche sauvage (Fig. 3-17). Cependant, le niveau de traduction chez les mutant *lasR* (par exemple, le #563) sont plus bas (Fig. 3-17). Les résultats obtenus pour le mutant #947 sont différents des deux expériences effectuées chez le mutant *rhIR* provenant de la collection du laboratoire, ce qui complique encore plus l'analyse. Pour trancher une fois pour toute, l'évaluation de la quantité d'ARNm de *rsmA* par qRT-PCR devrait être effectuée.

4.1.1.2.2 MvfR

Lorsque le gène *mvfR* est inactivé, la traduction de *rsmA* est retardée, mais finie par atteindre le niveau de la souche sauvage (Fig. 3-2). L'effet est beaucoup moins important que l'effet d'une mutation dans *lasR*. Puisque MvfR est un régulateur transcriptionnel, la régulation de *rsmA* à ce niveau a été quantifiée (Fig. 3-7C). Dans ce cas, la transcription est beaucoup plus faible que chez la souche sauvage, mais un peu plus élevée que chez un mutant *lasR*. Ceci suggère que MvfR puisse agir au niveau de la transcription de *rsmA*, puisque son absence a un plus grand effet à ce niveau qu'à celui de la traduction. Puisque LasR active directement la transcription de MvfR, lorsque LasR est absent, la transcription de *mvfR*, activé par un régulateur inconnu, se produit, mais plus tard dans la croissance (Xiao *et al.*, 2006b). Donc, si MvfR est un régulateur

direct de *rsmA*, lorsque celui-ci est absent, le niveau de transcription de *rsmA* devrait être plus bas que celui du mutant *lasR*, ce qui n'est pas le cas. Il se pourrait que MvfR soit impliqué au niveau de la transcription de *rsmA*, mais pas de façon directe sur celui-ci. Une autre possibilité serait que MvfR et LasR soient des régulateurs de la transcription de *rsmA*. Puisque chez le mutant *lasR*⁻, le niveau de transcription est plus bas encore que chez le mutant *mvfR*⁻, il se pourrait que LasR régule *rsmA* à plusieurs niveaux. Cependant, ce résultat montre encore une fois que la régulation de *rsmA* est reliée au *quorum sensing*

Lors du criblage, le mutant #513, qui contient une insertion dans *mvfR* a été obtenu. Ce mutant a été classé dans la catégorie « faible » suite à l'analyse statistique. Ce mutant possède un ratio T plus bas que 0,9 à tous les temps testés (entre 0,63 et 0,84) (Fig. 3-17 et appendice C). Chez le mutant du laboratoire, on observe un retard au niveau de la traduction. Somme toutes, les niveaux sont assez similaires (Fig. 3-2). Cependant, cette baisse n'est pas aussi importante que chez les mutants *lasR*⁻. De plus, un seul transposant a été identifié avec une insertion dans ce gène. Les résultats obtenus confirment la technique du criblage.

Des insertions ont aussi été obtenues une fois dans le gène *pqsA* (#531), *pqsH* (#530) et *kynB* (#203). Le mutant 531 se retrouve dans la catégorie « faible » suite à l'analyse statistique, et les mutants #530 et #203 dans la catégorie « diminution ». La traduction de *rsmA* chez ces mutants est donc diminuée tout au long de la croissance (#531) ou diminue avec le temps (#203 et #530). Ces gènes sont contrôlés positivement par LasR et ils participent tous à la biosynthèse de molécules-signal reconnues par MvfR, les HAQ (Dubern & Diggle, 2008). KynB, une formamidase de la kynurenine, participe à la synthèse d'acide anthranilique, le précurseur des HAQ. PqsA est impliqué dans la biosynthèse du HHQ à partir de l'acide anthranilique, et est contrôlé positivement par LasR et MvfR. Finalement, l'enzyme *pqsH* est responsable de la formation du PQS à partir du HHQ. Le HHQ ainsi que le PQS sont les deux ligands de MvfR (Xiao *et al.*, 2006a). L'effet d'une mutation dans un gène de biosynthèse d'une des deux molécules-signal ou dans *mvfR*, est similaire. Cela confirme un rôle pour MvfR dans la régulation de *rsmA*.

4.1.1.2.3 PqsE

Lorsque PqsE est inactivé, la traduction de *rsmA* est retardée, mais atteint éventuellement le niveau de la souche sauvage, comme un mutant dans *mvfR* (Fig. 3-2). Cependant, lorsqu'on observe la transcription, celle-ci est diminuée et n'atteint pas le niveau de la souche sauvage (Fig. 3-7). Puisque la baisse de transcription n'est pas réflétée dans la traduction, il est possible que PqsE ou MvfR affecte d'autres régulateurs qui régulent la traduction de *rsmA*. De plus, puisque RsmA semble jouer un rôle important dans sa propre régulation, il est difficile d'identifier précisément à quel niveau ces régulateurs agissent.

LasR contrôle positivement *mvfR*, et donc l'opéron *pqsA-E*, lorsque LasR est absent, il y a une diminution de transcription pour *mvfR* ainsi que pour l'opéron *pqsA-E*. PqsE est essentiel pour la régulation des cibles affectées par MvfR (Déziel *et al.*, 2005; Hazan *et al.*, 2010; Rampioni *et al.*, 2010). PqsE pourrait donc agir au niveau de la transcription de *rsmA*. Par contre, aucun transposant n'a été identifié avec une insertion dans ce gène. Cela semble indiquer que cette protéine n'est pas le principal régulateur de *rsmA*. Cela peut aussi être dû aux limitations du criblage, seulement une insertion dans le gène *mvfR* a été obtenue.

4.1.1.2.4 Vfr

Lorsque *vfr* est inactivé, on observe un retard dans le niveau de traduction de *rsmA* comparativement à la souche sauvage (Fig. 3-2). Cet effet n'est pas aussi prononcé que chez un mutant *lasR*⁻, mais puisque la transcription de *lasR* est retardée dans un mutant *vfr* et non abolie, le résultat obtenu est cohérent. Lorsque LasR est suffisamment présent, la traduction de *rsmA* est presque au même niveau que la souche sauvage. Cette expérience confirme une fois de plus l'importance de LasR dans la régulation de *rsmA*.

Une insertion dans le gène *vfr* a été retrouvée une fois lors du criblage, chez le mutant #314. Ce mutant fait partie du groupe « faible » comme les autres régulateurs du *quorum sensing*. L'effet observé est semblable à celui observé chez le mutant #513 (*mvfR*), mais un peu plus fort (Fig. 3-17). Comme mentionné plus haut, l'effet retrouvé est similaire à celui obtenu avec le mutant du laboratoire, soit une diminution de la traduction, mais moins prononcée que dans le mutant *lasR*.

4.1.1.2.5 PA14_69090 et PA14_69070

Deux mutants pour les gènes PA14_69090 (PA5232, mutant #974) et PA14_69070 (PA5231, mutant #988) ont été obtenus lors du criblage. Ces deux mutants se retrouvent dans la catégorie « faible » suite à l'analyse statistique. Chez ces mutants, le niveau de traduction de *rsmA* est plus bas que chez la souche sauvage tout au long de la croissance, mais pas de façon très prononcé. Les ratios pour ces mutants sont de l'ordre de 0,75-0,89 (Appendice C).

Les gènes PA14_69090 et PA14_69070 font partie d'un même opéron et code respectivement pour une protéine hypothétique possédant un domaine lié aux pompes à efflux (COG1566) et un transporteur de type ABC. LasR contrôle la transcription de PA5232 (soit PA14_69090). Il est cependant difficile de faire un lien entre ces gènes et la régulation de *rsmA* puisque leur fonction n'est pas bien étudiée.

4.1.2 Conclusion LasR

Les résultats obtenus lors du criblage confirment l'importance de LasR dans la régulation de *rsmA*. En effet, ceux-ci semblent indiquer une régulation indirecte de LasR sur *rsmA*. De plus, MvfR et PqsE semblent jouer un rôle dans la régulation de *rsmA*. Cependant, d'autres expériences pourraient permettre de clarifier si ces régulateurs agissent de façon directe ou indirecte, comme une expérience de retard sur gel avec LasR, MvfR, PqsE et la région intergénique de *rsmA*.

4.2 Le rôle de MvaT dans la régulation de *rsmA*

Deux régulateurs globaux ont été sélectionnés pour étudier leur effet sur la régulation de *rsmA*. MvaT et MvaU sont tous deux des régulateurs H-NS et agissent comme répresseur transcriptionnel (Dame *et al.*, 2005) (Section 1.4.3). Le régulon de MvaT/MvaU comprend des régulateurs importants du *quorum sensing* comme les gènes *lasR*, *mvfR*, ainsi que l'ARNnc *rsmZ* important dans la régulation de RsmA (Castang *et al.*, 2008).

4.2.1 MvaT vs MvaU

Les régulateurs MvaT et MvaU agissent comme répresseurs lorsqu'ils sont dimérisés : soit un homodimère MvaT-MvaT ou MvaU-MvaU ou un hétérodimère MvaT-MvaU. Selon la forme de dimérisation, les gènes régulés par ces différents complexes ne sont pas les mêmes (Castang *et al.*, 2008). Le niveau de traduction de *rsmA* a été quantifié chez les mutants *mvaT* et *mvaU*. Lorsque MvaU est absent, les dimères formés peuvent être composés seulement de MvaT. Lorsque c'est le cas, aucune différence significative dans le niveau de traduction de *rsmA* n'est observée (Fig. 3-8). Cependant, lorsque MvaT est inactivé, on observe une augmentation de la traduction de *rsmA* chez ce mutant (Fig. 3-3). On peut donc dire que *rsmA* est affecté lorsque les homodimères MvaT-MvaT sont absent ou MvaT-MvaU et non MvaU-MvaU. Les expériences ont donc été poursuivies chez le mutant *mvaT*.

4.2.2 Résultats obtenus et fonction de MvaT

Puisque MvaT est un répresseur transcriptionnel, le niveau de transcription de *rsmA* chez ce mutant a été quantifié. Chez le mutant *mvaT*, la transcription de *rsmA* est identique à la souche sauvage (Fig. 3-6A). On peut donc conclure que MvaT agit de façon indirecte sur la régulation de *rsmA* et ce, au niveau traductionnel. Puisque l'effet observé est présent seulement lorsque *mvaT* est absent et non *mvaU*, une recherche des gènes régulés spécifiquement par MvaT a été effectuée. Grâce à l'étude du groupe de Simon Dove, une liste complète des gènes affectés par MvaT et MvaU est disponible (Castang *et al.*, 2008). De cette liste, 23 gènes sont régulés uniquement par MvaT (Tableau 4-1).

Tableau 4-1. Gènes surexprimés uniquement chez le mutant *mvaT* (Castang *et al.*, 2008)

#PA01	#PA14	Gène	Opéron	Fonction
PA0001	PA14_00010	<i>dnaA</i>	PA0001-PA0004	Initiateur de la réplication du chromosome
PA0138	PA14_01690		PA0136-PA0138	Perméase transporteur ABC
PA0139	PA14_01710	<i>ahpC</i>	PA0136-PA0138	Alkyl hydroperoxide réductase
PA0263	PA14_03240	<i>hcpC</i>	Non	Protéine sécrété, SST6
PA0595	PA14_07770	<i>ostA</i>	PA0593-PA0595	Protéine de tolérance au solvant organique

#PA01	#PA14	Gène	Opéron	Fonction
PA1158	PA14_49420		Non	Senseur système à deux composantes
PA1159	PA14_49410		Non	Protéine pour le choc thermique (froid)
PA2219	ND	<i>opdE</i>	Non	Protéine membranaire
PA2220	ND	<i>oprR</i>	Non	Régulateur transcriptionnel probable, famille lysR
PA2620	PA14_30230	<i>clpA</i>	PA2620-PA2621	Protéase liant l'ATP
PA2621	PA14_30210	<i>clpS</i>	PA2620-PA2621	Adaptateur pour la protéase Clp
PA2940	PA14_26010		Non	Thiolase acyl-CoA probable
PA2941	PA14_26000		PA2941-PA2942	Chélateur du magnésium probable
PA3115	PA14_23830	<i>fimV</i>	PA3113-PA3115	Protéine d'assemblage du pilus
PA3116	PA14_23810		Non	Aspartate-semialdéhyde déshydrogénase probable
PA4726	PA14_62540	<i>cbrB</i>	PA4725-PA4726	Régulateur système à deux composantes
PA4726.1		P36	Non	ARNnc
PA4726.11		<i>crcZ</i>	Non	ARNnc
PA4832	PA14_63890		Non	Déshydrogénase de courte chaîne probable
PA4833	PA14_63900		Non	Hémolysine de type III probable
PA5170	PA14_68300	<i>arcD</i>	PA5170-PA5173	Transport arginine/ornithine
PA5267	PA14_69560	<i>hcpB</i>	Non	Protéine sécrétée, SST6
PA5268	PA14_69570	<i>corA</i>	Non	Transport magnésium/cobalt

On constate que les régulateurs transcriptionnel LasR et MvfR en plus de l'ARNnc RsmZ sont absents. Cependant, RsmZ est affecté par MvaT au niveau de sa transcription et non par MvaU (Brencic *et al.*, 2009). Dans un mutant *mvaT*, RsmZ est plus transcrit. RsmA est donc moins disponible pour réprimer ces gènes-cibles. Puisque ce dernier semble affecter sa propre traduction (Fig. 3-3C), il est normal de voir une hausse de celle-ci chez le mutant *mvaT* (Section 4.3.1). Cependant, ce niveau est beaucoup plus élevé que dans un mutant *rsmA*. Ce phénomène pourrait s'expliquer si MvaT avait une autre cible qui affecte aussi la traduction de *rsmA*.

Dans la littérature, le système à deux composantes CbrA/CbrB est assez bien décrit (Nishijyo *et al.*, 2001). De plus, cette voie possède un régulateur post-transcriptionnel, Crc, qui pourrait agir directement sur la traduction de *rsmA* (Li & Lu, 2007). Le rôle du système Cbr/Crc est de contrôler les voies métaboliques requises pour l'utilisation de

certaines sources de carbone et d'azote (Yeung *et al.*, 2011). Un résumé de cette voie de régulation est présenté à la figure 4-1.

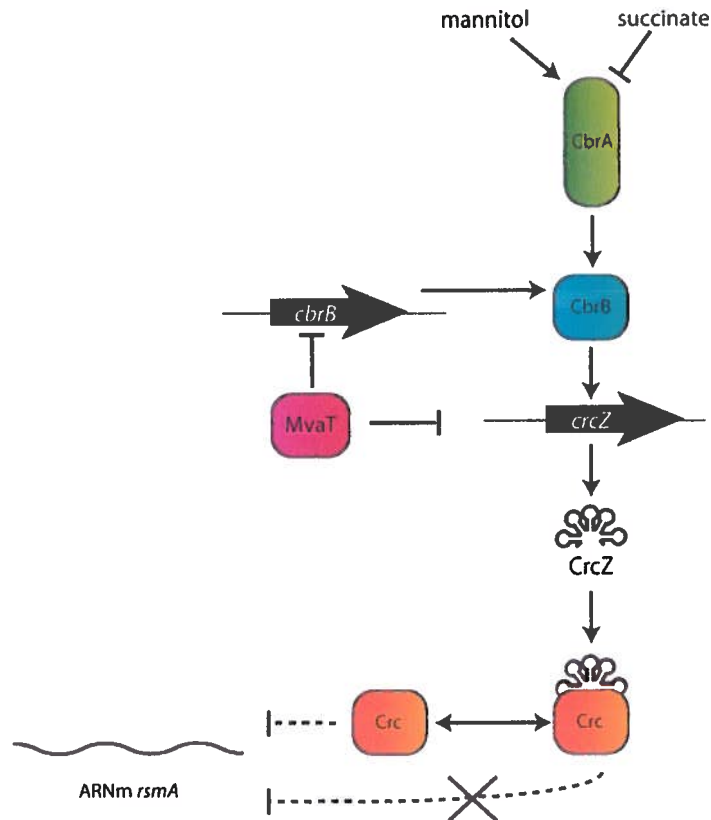


Figure 4-1. Lien entre la voie CbrA/CbrB, MvaT et RsmA

Inspiré de (Browne, *et al* 2010; Castang *et al.*, 2008; Linares *et al.*, 2010; O'Toole, *et al.* 2000; Yeung *et al.*, 2011). Les pointillés représentent une hypothèse.

4.2.3 CbrB et Crc

Le niveau de traduction de *rsmA* chez les mutants *cbrB*⁻ et *crc*⁻ a été quantifié afin de voir si cette voie a un effet sur *rsmA* (Fig. 3-9). Le résultat attendu est que *rsmA* devrait être moins traduit chez le mutant *cbrB* si Crc agit de façon directe. Lorsque *cbrB* est inactivé, la croissance est quelque peu diminuée, mais le niveau de traduction de *rsmA* est très similaire à la souche sauvage. Lorsque CbrB est absent, la transcription de l'ARNnc *crcZ* est diminuée, et le régulateur post-transcriptionnel Crc est disponible pour empêcher la traduction de ses ARNm cibles. Nous avons observé que la traduction est semblable au témoin chez le mutant *cbrB* (Fig. 3-9). Ensuite, lorsque Crc est absent, si celui-ci contrôle directement *rsmA*, la traduction de ce dernier devrait être augmentée

chez ce mutant. C'est effectivement ce qu'on observe, tel que montré à la figure 3-9. Cette hypothèse tient toujours la route puisque, lorsque MvaT est absent, il y a une augmentation de CbrB, et donc de CrcZ, ce qui a pour effet de réduire la quantité de Crc qui est disponible pour réprimer ses cibles. Si Crc contrôle directement *rsmA*, on observerait une augmentation de la traduction de ce dernier chez un mutant *mvaT*, et aucun changement au niveau de la transcription, ce qui est le cas (Fig. 3-3 et 3-6).

Le régulon de Crc a été étudié informatiquement par le groupe de John Morrissey et *rsmA* ne fait pas parti de ce régulon (Browne *et al.*, 2010). De plus, une étude protéomique visant à identifier les protéines différentiellement exprimées chez un mutant *crc*⁻, n'a pas identifié *rsmA* (Linares *et al.*, 2010). Cependant, l'analyse informatique a été basée en utilisant une séquence consensus différente de celle obtenue lors de l'analyse protéomique chez *P. aeruginosa*. Il se pourrait donc que *rsmA* soit régulé par Crc, mais que la séquence consensus reconnue soit quelque peu différente de celle utilisée lors de l'analyse informatique. En ce qui concerne l'analyse protéomique, celle-ci a été effectuée avec la souche PAO1 (Linares *et al.*, 2010). Puisque la souche PA14 possède des différences non négligeables, tant au niveau des gènes que de la régulation, il se pourrait bien que Crc régule *rsmA* chez PA14 et non chez PAO1. De plus, Linares et ces collaborateurs non pas séquencés toutes les régions différentiellement exprimés sur gel 2D. Il se pourrait que RsmA soit présentes, mais non identifié par le groupe.

Pour vérifier expérimentalement l'implication de MvaT dans la régulation de *rsmA* (Fig. 4-1), la construction d'un double mutant $\Delta mvaT/\Delta cbrB$ est nécessaire. Une construction plasmidique portant les régions en amont et en aval du gène *mvaT* a été obtenue du laboratoire de Simon Dove. Cette construction permet de déléter le gène *mvaT* sans changer le cadre de lecture, et ne laisse aucune résistance à un antibiotique. Cependant, l'échange chromosomique de l'insertion dans le gène *cbrB* chez la souche $\Delta mvaT$ n'a pas fonctionné. Il faudra procéder à la délétion de *cbrB* chez la souche $\Delta mvaT$. De cette façon, le niveau de traduction de *rsmA* pourra être quantifié chez ce double mutant grâce au rapporteur chromosomique. Si l'hypothèse est bonne, le niveau de traduction de *rsmA* devrait être plus faible. De plus, le niveau de transcription de *rsmA* devrait être comme la souche sauvage. Avant de faire de telle construction, il est possible de quantifier le niveau de transcription de *rsmA* chez les mutants *cbrB* et *crc* à l'aide du rapporteur transcriptionnel *prsmA-lacZ*.

La région intergénique de *rsmA* contient une région riche en A près du site d'initiation de la traduction. Ce site pourrait être reconnu par Crc (Linares *et al.*, 2010).

4.2.4 Lien avec criblage

Lors du criblage, aucun gène se rapprochant des voies de signalisation CbrB/CbrA/Crc n'a été trouvé. De plus, le gène *mvaT* n'a pas été retrouvé. Ceci est principalement dû à la méthode de criblage. Il était beaucoup plus facile d'observer des diminutions d'intensité de couleur que l'inverse. De plus, la majorité des clones sélectionnés étaient plus faibles que la souche sauvage au niveau de la traduction de *rsmA*.

4.2.5 Lien avec les sources de carbones

La voie de régulation CbrA/CbrB ajuste le niveau du petit ARNnc CrcZ en fonction de la source de carbone disponible. Les sources de carbone préférées de *P. aeruginosa* (comme le succinate; Fig. 4-1) ont pour effet de diminuer le niveau de CrcZ, via la voie de CbrA/CbrB (Sonnleitner *et al.*, 2011). L'inverse se produit lorsqu'une source de carbone plus difficile à assimiler par *P. aeruginosa*, comme le mannitol, est présente (Sonnleitner *et al.*, 2011). Donc, s'il y a bien un lien entre Crc et *rsmA*, le niveau de traduction de *rsmA* devrait être plus bas lorsque la source de carbone est le succinate et plus élevé lorsqu'il s'agit du mannitol. Lorsque le succinate est présent, *crcZ* est moins transcrit et donc, Crc est en plus grande quantité, ce qui lui permet de réprimer un grand nombre de ses gènes cibles. Lorsque le mannitol est utilisé, *crcZ* est plus transcrit et donc, Crc est moins disponible pour réprimer *rsmA*. Il y aurait donc augmentation de la traduction de *rsmA*. L'effet de l'utilisation de différentes sources de carbone sur la traduction de *rsmA* a été quantifié (Fig. 3-22). Cependant, les résultats obtenus sont difficiles à interpréter puisqu'il n'y a pas de différence significative entre le niveau de traduction de *rsmA* lorsque le succinate ou le mannitol est utilisé. Le niveau de traduction de *rsmA* semble plus élevé avec du succinate et plus faible avec du mannitol. Les résultats obtenus sont donc inverses à ceux attendus si l'hypothèse que Crc régule directement *rsmA* est vraie. Cette expérience devrait être effectuée de nouveau, et ce, sur plusieurs jours pour être en mesure de comparer la traduction de *rsmA* en cinétique dans ces conditions.

4.2.6 Conclusion MvaT

Il est certain que MvaT joue un rôle important dans la régulation de *rsmA* au niveau traductionnel, et ce, de façon indirecte. Une voie possible pour cette régulation passerait par le système CbrA/CbrB/CrcZ/Crc. Bien que, les résultats obtenus avec le mutant *crc* semblent indiquer une régulation directe, les résultats obtenus avec le mutant *cbrB* ne supportent pas cette hypothèse. D'autres analyses sont nécessaires afin de tirer des conclusions définitives incluant, entre autres, la quantification du niveau de traduction de *rsmA* chez le double mutant $\Delta mvaT/\Delta cbrB$. De plus, une étude plus approfondie de l'effet des sources de carbone (succinate et mannitol) est nécessaire. Finalement, une autre cible unique à MvaT pourrait être étudiée, PA14_49420. Aucune information n'est disponible sur ce senseur dans la littérature pour le moment. Il serait tout de même intéressant de quantifier le niveau de traduction de *rsmA* chez un mutant (disponible dans la banque).

4.3 RsmA

RsmA est un régulateur global, qui agit en réprimant la traduction d'ARNm cibles (Fig. 1-3 et 1-7). Le niveau de traduction de *rsmA* a donc été testé chez un mutant *rsmA*⁻ pour voir si ce dernier est en mesure de réguler sa propre traduction.

4.3.1 Traduction

Le niveau de traduction chez un mutant *rsmA*⁻ est plus élevé comparativement à la souche sauvage (Fig. 3-3). Ce résultat suggère la répression par RsmA au niveau de sa propre traduction. Chez *E. coli*, *csrA*, l'homologue de *rsmA*, est réprimé au niveau traductionnel par CsrA (Yakhnin *et al.*, 2011). En effet, le groupe de Paul Babitzke a démontré que CsrA est en mesure de lier l'ARNm *csrA* à quatre endroits différents. De plus, *csrA* est contrôlé par quatre promoteurs distincts. Les ARNm transcrit contiennent tous un ou plusieurs motif(s) GGA ou AGA. Deux sites se retrouvent dans une boucle en épingle à cheveux. Les résultats obtenus chez *P. aeruginosa* sont donc en accord avec ceux obtenus chez *E. coli* : la traduction de *rsmA* semble finement régulée grâce à une boucle de rétroaction négative créée par RsmA. Ce résultat est intéressant puisqu'une variation dans l'expression des ARNnc RsmY et RsmZ pourrait aussi affecter la

régulation au niveau traductionnel de *rsmA*. Pour vérifier expérimentalement ceci, une expérience de retard sur gel avec la protéine purifiée RsmA et l'ARNm de *rsmA* serait une bonne technique. De plus, la quantification de la traduction de *rsmA* chez les mutants *rsmZ* et *rsmY* permettrait de vérifier un autre niveau de régulation.

4.3.2 Transcription

Le niveau de transcription de *rsmA* a aussi été quantifié chez le mutant *rsmA*⁻ et un niveau diminué a été observé (Fig. 3-7). Cela suggère un effet d'activation de RsmA sur sa transcription. Puisque RsmA est un régulateur post-transcriptionnel, il ne peut agir directement à ce niveau et donc l'effet observé doit être indirect. Par contre, selon cette information, le niveau de transcription de *rsmA* chez le mutant *gacA*⁻ devrait être plus fort, et pourtant, c'est l'inverse qui est observé (Fig. 3-7). Comme RsmA semble jouer un rôle important sur sa propre régulation, il est difficile de conclure strictement avec ces résultats.

Tel que mentionné à la section 1.4.4.2, deux études transcriptomiques ont été effectuées chez *P. aeruginosa*. Cependant ces études n'ont pas fourni d'information au sujet d'un effet sur la transcription de *rsmA* car un mutant *rsmA*⁻ était utilisé. En effet, le groupe de Steve Lory a co-purifié les ARN-cibles de RsmA, mais n'a pas trouvé l'ARNm de *rsmA* puisqu'ils ont utilisé la souche PAK *rsmA*⁻ (pMMB67-RsmA-H6). Les auteurs donnent une liste de gènes qui codent pour des régulateurs transcriptinels qui sont affectés chez le mutant *rsmA*⁻ dans leur étude (Brencic & Lory, 2009). Selon eux, ces gènes pourraient être régulés par RsmA et agir ensuite sur l'expression de différents gènes. Ceci pourrait expliquer l'effet d'activation indirecte par RsmA (Brencic & Lory, 2009). Ces gènes pourraient aussi être impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *rsmA*. Ce dernier point sera discuté dans la section 4.3.3.

De plus, chez *E. coli*, une hypothèse semblable a été émise par le groupe de Paul Babitzke. Ils ont observé une diminution de la transcription de *csrA* lorsque la protéine CsrA était absente. Ils ont démontré que CsrA agit indirectement par le biais du promoteur P3 (Yakhnin *et al.*, 2011). Différentes fusions avec *lacZ* ont été utilisées pour démontrer ce point. Il serait intéressant de faire la même chose chez *P. aeruginosa*, en se basant sur les résultats obtenus lors du 5'RACE pour identifier quelle région est nécessaire pour la régulation indirecte de RsmA au niveau de la transcription.

4.3.3 Sites d'initiation de la transcription pour *rsmA*

4.3.3.1 Généralités

Afin d'identifier le ou les site(s) d'initiation de la transcription de *rsmA*, la technique du 5'RACE a été utilisée. Cette technique a permis l'identification de quatre transcrits majeurs, tels qu'illustrés aux figures 3-11 et 3-12. La présence de plusieurs transcrits suggère la régulation de *rsmA* par plus d'un régulateur transcriptionnel et traductionnel.

```
TTTGACCGTTCGGCAGGAACTTTCATTCCGGCGGGACTGGTCAATACTGGGTGAAGGATC
GCGCTCTTGATTTCTGCGGATCCGCCGCCAATTCTTTTTTGCAGCTGTTGTCTGAAAT
ATTTCGCGTGAGGAGAAAGGAATGCTGATTCTGACTCGTTCGGGTCGGAGAGACCTGAT
```

Figure 4-2. Séquence en amont de *rsmA*

Les motifs GGA et AGA sont soulignés. Le codon d'initiation de la traduction ainsi que la séquence Shine-Dalgarno sont en gras. Les nucléotides en rouges sont les premiers de chaque transcrit majeur obtenu par l'expérience de 5'RACE. Le nucléotide surligné en rouge représente le promoteur prédit par l'outil de bioinformatique BPROM.

La séquence d'ADN en amont de *rsmA* contient plusieurs séquences GGA ou AGA, qui ont le potentiel d'être reconnues par RsmA (Fig. 4-2). Chaque transcrit obtenu lors du 5'RACE contient un minimum de trois motifs jusqu'à un maximum de six motifs. Puisque les différents transcrits possèdent plus ou moins de motifs GGA, ceux-ci pourraient être régulés de façon différente par RsmA lui-même. Afin de vérifier si la présence d'autant de motifs dans les transcrits obtenus est effectivement liée à une régulation post-transcriptionnel par RsmA, la mutation de nucléotides présents dans ces motifs grâce à la technique QuickChange serait efficace. Par la suite, le dosage de la traduction de *rsmA* permettrait de vérifier l'importance de ces motifs.

Le transcrit le plus abondant (49%) débute à -40 nucléotide du site d'initiation de la traduction. Ce transcrit possède quatre nucléotides de plus que le site d'initiation de la transcription prédit par BPROM (-36). Le promoteur prédit est de type *lrp* ou *ompR*. Une recherche a été effectuée à l'aide de la base de données de *Pseudomonas*. Tous les gènes codant pour un domaine *lrp* ou *ompR* ont été identifiés (Tableaux 4-2 et 4-3). Dans l'étude transcriptomique chez PAK *rsmA*⁻, un des régulateurs qui pourrait être

régulé par RsmA, PA1799 (*parR*, PA14_41260) possède un domaine ompR. De plus, lors du criblage, un transposant possédant une insertion dans la région intergénique en amont de ce gène a été identifié. Ce mutant, #723, appartient à la catégorie « faible » suite à l'analyse statistique. Il serait intéressant de vérifier la transcription de *rsmA* chez ce mutant. Si la transcription est diminuée comme chez le mutant *rsmA*, il serait possible que ce soit le régulateur mystère qui active la transcription de *rsmA*.

Les autres transcrits sont moins abondants, et aucun promoteur n'a été prédit dans ces régions. La régulation de *rsmA* semble impliquer plusieurs régulateurs qui agissent à différents moments dans la croissance, ou dans différentes conditions. Il serait pertinent de construire des rapporteurs transcriptionnels de même longueur que les quatre transcrits majoritaire obtenu. De cette manière, l'implication d'un ou de plusieurs promoteurs pourrait être analysée en fonction de la phase de croissance. De plus, la construction de rapporteurs traductionnels avec ces mêmes fragments aiderait à déterminer quelle région de l'ARN est liée par RsmA de façon à affecter sa traduction.

Tableau 4-2. Gènes codant pour des protéines prédites ou connues pour posséder un domaine de type lrp (COG1522) (Winsor et al., 2011)

#PA14	Gène
PA14_06680	<i>nirH</i>
PA14_06690	<i>nirG</i>
PA14_06700	<i>nirL</i>
PA14_06710	
PA14_38300	
PA14_37580	<i>kynR</i>
PA14_35540	<i>bkdR</i> (<i>lien crc</i>)
PA14_30770	
PA14_12570	
PA14_58510	
PA14_63240	
PA14_70080	<i>lrp</i>

Tableau 4-3. Gènes codant pour des protéines prédites ou connues pour posséder un domaine de type ompR (COG0745) (Winsor et al., 2011)

#PA14	Gène	#PA14	Gène
PA14_02260		PA14_41260	<i>parR</i> *
PA14_05320	<i>pilG</i>	PA14_43340	<i>kdpE</i>
PA14_05330	<i>pilH</i>	PA14_45880	

#PA14	Gène	#PA14	Gène
PA14_06060	<i>creB</i>	PA14_49180	<i>phoP</i>
PA14_11680		PA14_49440	
PA14_22760	<i>cpxR</i>	PA14_52250	
PA14_22940	<i>gltR</i>	PA14_54510	
PA14_24350		PA14_56950	
PA14_27810		PA14_63150	<i>pmrA</i>
PA14_24350		PA14_64570	<i>irlR</i>
PA14_27810		PA14_65880	
PA14_29730		PA14_68700	<i>ompR</i>
PA14_31960		PA14_70750	<i>phoB</i>
PA14_32580			

*Gène retrouvé dans le criblage et dans l'étude transcriptomique effectuée chez la souche PAK (Brencic & Lory, 2009)

4.3.3.2 Les sites d'initiation chez *E. coli* pour *csrA*

Chez *E. coli*, une étude plus approfondie de la régulation de *csrA* a été effectuée (Yakhnin *et al.*, 2011). Cette étude a permis de démontrer que *csrA* est transcrit à partir de cinq promoteurs différents. L'intensité de la transcription dépend de la phase de croissance et de la contribution des différents promoteurs. De plus, la transcription de *csrA* dépend des facteurs σ^{70} et σ^S . Finalement, les auteurs ont démontré que CsrA a un effet d'activation via un régulateur inconnu au niveau de sa transcription et inhibe sa traduction (Yakhnin *et al.*, 2011). Les résultats obtenus chez *P. aeruginosa* et *E. coli* sont similaires et confirment les résultats obtenus lors des dosages de la β -galactosidase avec les rapporteurs.

4.3.3.3 Comparaison avec l'étude du transcriptome chez *P. aeruginosa* PA14

Le groupe de Susanne Häussler a utilisé la technique du séquençage à haut débit de l'ARN total chez la souche *P. aeruginosa* PA14. Cette étude visait à découvrir les gènes différentiellement exprimés dans les biofilms comparativement aux cultures liquides, et ce, à deux temps différents par conditions (Dötsch *et al.*, 2012). Cette étude a permis d'identifier plusieurs sites d'initiation de la transcription. Parmi ces sites, ils en ont identifiés trois pour *rsmA*, soit -40, -86 et -141 (Dötsch *et al.*, 2012). De plus, puisqu'ils ont fait l'expérience dans différentes conditions, ils ont identifié que les promoteurs -40 et -141 étaient utilisés en condition liquide aux temps 4h et 12h. Le promoteur à -86 quant à lui est utilisé en condition liquide au temps 12h et en biofilm après 48h.

L'expérience de 5'RACE effectuée pour ce mémoire a été faite en condition liquide après 4h30 d'incubation. Les résultats obtenus par le groupe de Susanne Häussler confirment les résultats du 5'RACE puisque les trois fragments ont été obtenus. Pour le fragment -40, c'est celui qui était le plus abondant dans les transcrits du 5'RACE et cela s'explique puisque les conditions utilisées étaient similaires : culture liquide en phase exponentielle. De plus, ce promoteur est seulement utilisé en condition liquide (Dötsch *et al.*, 2012).

Le promoteur -86 a aussi été trouvé dans l'expérience du 5'RACE. Cependant, ce fragment a été retrouvé seulement trois fois. Des transcrits de longueur similaire, soit de -85, ont été retrouvés cinq fois. Il se peut que ces fragments correspondent au promoteur -86, mais que la rétrotranscription était incomplète. Il n'est pas surprenant que ces fragments soient peu nombreux puisque le groupe de Häussler a démontré que ce promoteur était utilisé en condition liquide après 12h de croissance et en biofilm après 48h (Dötsch *et al.*, 2012). Cela explique donc la quantité réduite de ce transcrit dans notre expérience de 5'RACE.

Finalement, le transcrit -141 identifié par le groupe de Häussler a aussi été retrouvé dans le 5'RACE, mais seulement une fois. Bien qu'il ait été démontré que ce promoteur soit utilisé seulement en condition liquide et durant toute la croissance (4h et 12h), les auteurs ne précisent pas si la quantité de transcrits est plus importante au temps 4h ou 12h (Dötsch *et al.*, 2012). Il se peut aussi qu'il soit utilisé, mais de façon moins importante, dans les conditions testées.

4.3.3.4 Conclusions de l'identification des sites d'initiation de la transcription

Les résultats obtenus lors de cette expérience sont en accord avec ce qui est connu pour l'instant dans la littérature, tant au niveau de l'homologue CsrA que RsmA lui-même chez PAK, PAO1 et PA14. Il est maintenant clair que *rsmA* est transcrit de façon différente dépendamment des conditions de culture, en plus de la phase de croissance des bactéries. Il serait approprié d'identifier quel régulateur agit avec quel promoteur. De plus, les résultats obtenus supportent l'hypothèse que RsmA agisse comme répresseur de sa traduction. Aussi, des évidences, tant chez *E. coli* que chez *P. aeruginosa* suggèrent que RsmA affecte un régulateur transcriptionnel qui à son tour vient moduler la transcription de *rsmA*. Ce régulateur pourrait bien être ParR, et il serait logique que ce dernier agisse sur le promoteur présent à -40. Pour vérifier le tout, il serait intéressant de quantifier la transcription de *rsmA* chez le mutant *parR*. De plus, une expérience de retard sur gel avec des fragments correspondant aux différentes régions obtenus lors du 5'RACE permettrait de démontrer à quel endroit RsmA peut lier l'ARNm.

4.3.4 Criblage (GacA)

Lors du criblage, un transposant (#288) contenant une insertion dans le senseur GacS a été trouvé. Ce mutant est classé dans la catégorie « retard » suite à l'analyse statistique. Le senseur GacS active la transcription du régulateur GacA, et ce faisant, la transcription des deux ARNnc RsmZ et RsmY. Si le senseur est absent, il y aura moins de transcription des deux ARNnc, et donc, la protéine RsmA sera plus présente dans la cellule pour réprimer la traduction de ses cibles. Puisque RsmA semble réprimer sa traduction, il est logique de voir une diminution de la traduction chez le mutant *gacS*. De plus, l'effet observé pourrait être dû à la répression du régulateur transcriptionnel de *rsmA* par RsmA.

4.3.5 Conclusion

RsmA semble impliqué activement dans sa propre régulation, tant au niveau traductionnel que transcriptionnel. En effet, la présence de plusieurs motifs dans les transcrits obtenus lors du 5'RACE ainsi que la hausse du niveau d'activité du rapporteur

traductionnel *rsmA*'-lacZ chez le mutant *rsmA*⁻ sont des résultats suggérant la répression de RsmA sur son ARNm. De plus, les résultats obtenus lors de la quantification de la transcription avec *prsmA-lacZ* suggèrent l'implication d'un régulateur transcriptionnel contrôlé par RsmA. Finalement, les résultats obtenus sont en accord avec ce qui est présenté dans la littérature jusqu'à maintenant, et ce, autant chez *E. coli* que *P. aeruginosa*. Un modèle intégratif de régulation de *rsmA* est présenté à la section 4.7.

4.4 Régulateurs qui affectent le système *rhl*

4.4.1 L'effet d'une mutation dans PA14_48830 sur *rsmA*

Lorsque le niveau de traduction de *rsmA* est quantifié chez le mutant PA14_48830⁻, il y a une augmentation assez prononcée de ce niveau comparativement à la souche sauvage (Fig. 3-3). Ce gène semble particulièrement important pour la traduction de *rsmA*. Cependant, ce gène code pour un régulateur transcriptionnel. Lorsque le niveau de transcription est quantifié chez ce même mutant, il y a seulement une petite différence avec la souche sauvage en fin de croissance. L'effet de PA14_48830 est donc indirect puisque cette protéine ne doit pas agir au niveau traductionnel.

Le groupe de Kangmin Duan a démontré l'effet de ce régulateur chez PA01 sur les systèmes *rhl* et MvfR/HAQ, mais pas de façon directe. L'effet observé sur le système HAQ serait un effet indirect passant d'abord par le système *rhl* (Liang *et al.*, 2009). En effet, RhlR est un répresseur de l'opéron *pqsABCDE* (Xiao *et al.*, 2006b). On peut donc dire que la traduction de *rsmA* est affectée par PA14_48830, et que cet effet peut passer par le système *rhl*. Cependant, pour conclure, les résultats obtenus chez le mutant *rhlR* et PA14_48830 doivent être semblables. Pour l'instant, il n'est pas possible de tirer une conclusion puisque les résultats obtenus chez le mutant *rhlR* sont ambigus et nécessitent plus de test.

4.4.2 L'effet d'une mutation dans *DksA* sur *rsmA*

Lorsque le gène *dksA* est inactivé, la traduction de *rsmA* est diminuée (Fig. 3-1). Puisque *DksA* est un régulateur transcriptionnel, pour que l'effet observé soit direct, la transcription de *rsmA* doit être affectée. Effectivement, c'est ce qui y est observé (Fig. 3-7). Le niveau de transcription est plus bas encore, comparativement à la souche

sauvage, que le niveau de traduction. Encore une fois, un lien entre le système *rhl* et un autre régulateur est visible (Jude *et al.*, 2003). Cependant, puisque les résultats obtenus avec le mutant *rhlR* ne sont pas concluants, il est difficile de tirer une conclusion claire.

4.4.3 L'effet d'une mutation dans *GidA* sur *rsmA*

Le niveau de traduction de *rsmA* a été quantifié chez le mutant *gidA*⁻. Cependant, les résultats sont difficilement interprétables. En effet, si l'expérience est effectuée avec le rapporteur plasmidique ou le rapporteur chromosomique, les résultats obtenus sont complètement différents. Avec le plasmide, le niveau de traduction de *rsmA* est beaucoup plus faible tandis qu'avec le rapporteur chromosomique, le niveau de traduction est plus élevé comparativement à la souche sauvage (Fig. 3-4 et 3-5). Les causes concernant ces résultats sont mentionnées plus haut comme pour les résultats obtenus chez le mutant *rhlR*. Puisque *GidA* est un régulateur post-transcriptionnel, se dernier pourrait agir directement sur la traduction de *rsmA*. De plus, puisque les cibles et le mécanisme d'action de *GidA* ne sont pas bien décrits, son effet sur la régulation de *rsmA* pourrait être indirect via le système *rhl* ou un autre régulateur.

Lors du criblage, un mutant possédant une insertion dans le gène *gidA* (#269) a été trouvé. Ce dernier se retrouve dans la catégorie « diminution » suite à l'analyse statistique. De plus, la tendance lors de cette expérience correspond à celle observée lors de l'expérience avec le rapporteur plasmidique (Fig. 3-4). Ceci renforce l'hypothèse qu'une mutation dans *gidA* influence la traduction de *rsmA*. Le niveau de transcription n'a pas été testé chez ce mutant et pourrait aider à confirmer cette hypothèse.

4.4.4 Conclusion sur l'implication du système *rhl*

Le système *rhl* semble influencer la régulation de *rsmA*, tant au niveau traductionnel avec le régulateur PA14_48830 que transcriptionnel avec les régulateurs *DksA* et *GidA*. L'utilisation de la RT-PCR chez ces mutants en plus de *rhlR*⁻ est nécessaire afin de quantifier le niveau de transcrits de *rsmA* de façon claire, comme discuté à la section 4.1.1.2.1.

4.5 Le criblage, résultats nouveaux

4.5.1 La méthode

Le criblage sur gélose aliz-gal suite à une mutagenèse aléatoire a été un franc succès, mais présente néanmoins quelques lacunes. Tout d'abord, cette méthode a permis de façon assez rapide le criblage de plusieurs colonies différentes (environ 30 200). Le rapporteur traductionnel chromosomique *rsmA'-lacZ* donnait des résultats assez fidèles quant à la couleur des colonies sur géloses aliz-gal. En effet, puisque le criblage a été effectué après plusieurs expériences chez des mutants du *quorum sensing*, les mutants qui avaient un effet important sur la traduction comme *mvaT* et *lasR* avaient un phénotype correspondant sur ces géloses. De plus, une certaine redondance chez les gènes interrompus a été atteinte. Par exemple, le gène *lasR* a été sélectionné neuf fois, et les gènes de l'opéron *nuo* dix-huit fois. Cela démontre la pertinence du criblage puisque des gènes identifiés plus tôt comme étant importants pour la régulation de *rsmA* ont été identifiés à nouveau lors du criblage. Aussi, cinq transposants possèdent une insertion dans le gène *lacZ* présent du rapporteur chromosomique. Ces mutants étaient de couleur blanche sur gélose aliz-gal et ne possédaient aucune activité lors de la quantification de la β -galactosidase en liquide. Ceci confirme une fois de plus la méthode puisque le gène *lacZ* n'est présent qu'une seule fois, et ce, dans le rapporteur chromosomique. Lorsque ce dernier est inactivé, la β -galactosidase ne peut être produite et l'aliz-gal ou l'ONPG ne peuvent être scindés, ce qui explique la couleur blanche des colonies ainsi que l'absence d'activité en culture liquide.

Cependant, il était difficile de différencier visuellement les différentes teintes de rose sur les géloses. En effet, toutes les colonies possédaient une teinte différente, et non une couleur blanche ou rose très foncé (par exemple, voir Fig. 3-13). De plus, les niveaux de croissance sur géloses étaient parfois différents entre les transposants. Cela influençait aussi l'intensité de la couleur des colonies. La solution choisie fut d'observer les colonies à plusieurs moments durant la croissance. De ce fait, beaucoup de colonies ont été sélectionnées sur géloses pour effectuer la quantification en milieu liquide (n=213).

Puisque ces expériences demandent beaucoup de temps, chaque transposant a donc été testé sans réplicat, mais en cinétique sur plusieurs heures. Cette façon de faire a permis d'identifier des mutants chez lesquels *rsmA* était traduit de façon différente à un

moment précis durant la croissance. Par contre, cela a aussi posé problème : il s'est avéré difficile de départager les transposants jugés différents de la souche sauvage. Pour faciliter la tâche, une analyse statistique a été effectuée, tel que décrite à la section 2.4.3.

Cette analyse est arbitraire, puisqu'il s'agit d'une comparaison d'un ratio T effectué une seule fois au ratio T de la souche sauvage effectué en moyenne 24 fois (section 2.4.3). Ces résultats ne permettent pas de conclure hors de tout doute sur l'importance des transposants dans la régulation de *rsmA*, mais cela permet de limiter grandement les expériences futures à quelques mutants jugés plus intéressants.

Finalement, bien que la moitié des transposants sélectionnés pour effectuer les dosages de la β -galactosidase en liquide fut plus foncée sur géloses, seulement neuf d'entre eux ont été classés dans la catégorie « fort » suite à l'analyse statistique. Cela peut s'expliquer par le fait que les colonies étaient choisies en moyenne après plus de 24h d'incubation tandis que l'analyse en liquide s'effectue sur une période d'incubation de 6h. De plus, il est fort probable que les conditions de croissance en milieu solide ou liquide influencent la régulation de *rsmA*. En effet, les colonies sur géloses ressemblent plus à un biofilm, tandis que les bactéries cultivées en liquide sont planctoniques. Cette différence est non négligeable et peut être la cause des différences obtenues lors du dosage de la β -galactosidase en liquide.

4.5.2 La respiration cellulaire

4.5.2.1 Expression de *rsmA*

Les gènes retrouvés le plus abondamment lors du criblage font partie de l'opéron *nuoA-N*. Au total, 21 transposants possèdent une interruption dans un de ces gènes. Cet opéron contient 13 sous-unités qui forment la NADH oxydoréductase. Cette enzyme participe activement à la respiration cellulaire en catalysant la réduction de quinone grâce au NADH et participe activement au gradient de proton (Walker, 1992). Chez *E. coli*, l'inactivation d'un seul gène de ce complexe élimine l'activité membranaire de ce dernier (Erhardt *et al.*, 2011). Donc, pour tous les mutants *nuo*, si l'expression de *rsmA* est affectée, cela devrait être de façon similaire. Cependant, suite à l'analyse statistique,

ces mutants sont répartis dans quatre groupes, comme présenté dans le tableau résumé (Tableau 4-4).

Tableau 4-4. Ensemble des transposants pour les gènes *nuo* ainsi que leur ratio T

#Mutant	Ratio T3	Ratio T4	Ratio T5	Ratio T6	Gène
<i>Groupe « fort »</i>					
174	4,99437	2,11175	1,47636	1,76908	<i>nuoD</i>
<i>Groupe « faible »</i>					
39	0,4915	0,18616	0,24611	0,03378	<i>nuoG</i>
74	0,39004	0,28263	0,03369	0,39419	<i>nuoG</i>
134	0,47399	0,45327	0,4457	0,36704	<i>nuoG</i>
256	0,57051	0,60741	0,2577	0,22501	<i>nuoG</i>
883	0,58287	0,48647	0,23924	0,3403	<i>nuoG</i>
906	0,53785	0,53297	0,52432	0,34336	<i>nuoG</i>
122	0,55885	0,41686	0,36629	0,4469	<i>nuoL</i>
629	0,41117	0,30494	0,28348	0,32089	<i>nuoL</i>
907	0,37109	0,502	0,23757	0,33503	<i>nuoL</i>
126	0,76789	0,60449	0,52496	0,48971	<i>nuoN</i>
127	0,62267	0,53074	0,37281	0,52903	<i>nuoN</i>
<i>Groupe « diminution »</i>					
523	1,1559	.	0,96298	0,5568	<i>nuoE</i>
551	1,18411	.	0,36891	0,39422	<i>nuoG</i>
601	1,11155	1,16121	0,55404	0,70443	<i>nuoD</i>
167	1,10987	1,02603	0,78026	0,60563	<i>nuoG</i>
275	1,05562	0,70736	0,12257	0,20044	<i>nuoG</i>
504	1,05332	0,38865	0,35855	0,25435	<i>nuoG</i>
<i>Groupe « WT »</i>					
761	1,43778	0,74262	1,10473	0,80793	<i>nuoD</i>
228	0,91063	0,64082	0,44432	.	<i>nuoG</i>
179	0,94569	0,80182	0,77108	0,5261	<i>nuoJ</i>

La majorité des mutants se retrouve dans la catégorie « faible » et « diminution ». Pour la plupart des mutants de la catégorie « diminution », les ratios obtenus au premier et deuxième temps sont les seuls plus élevés que 1. Ces résultats peuvent être dus au fait que ces expériences ne reposent que sur une seule quantification, et ce, en un seul exemplaire. La variation due à la croissance dans chacune des expériences peut aussi s'expliquer par le fait que ces mutants soient dans la catégorie « diminution » et non

« faible ». Toutefois, la tendance est, pour la majorité des mutants, que *rsmA* soit moins traduit comparativement à la souche sauvage. Pour ce qui est des transposants classés dans la catégorie « WT », les mutants #288 et 179 sont très près des critères de la catégorie « faible ». En effet, leur premier ratio est un peu plus élevé que 0,9 (0,91 et 0,95). Ces variations peuvent elles aussi être causées par le manque de réplicata. Finalement, un seul mutant se retrouve dans la catégorie « fort ». Puisque cela ne s'est produit qu'une seule fois sur 21, il est fort probable que cela soit attribuable à une erreur lors de la quantification de la β -galactosidase, ou une croissance différente des autres essais. Pour vérifier le tout, un dosage du niveau d'expression de *rsmA* dans quelques mutants de la banque, et ce, avec un nombre de réplicata plus élevé, permettra de s'assurer de la validité de ces résultats.

4.5.2.2 Les gènes *nuo* chez *Pseudomonas*

Deux études ont été effectuées chez *P. aeruginosa* dans laquelle le rôle de l'opéron *nuo* est discuté. Le groupe de Daniel Hassett a démontré, grâce à l'utilisation de micropuces à ADN que l'opéron *nuo* est essentiel à la croissance lorsque *P. aeruginosa* croît en condition anaérobie et en présence de NO_3^- (Platt *et al.*, 2008). Marco Palma, a quant à lui, démontré la réduction des transcrits de cinq gènes de l'opéron *nuo* lorsque du H_2O_2 est présent (Palma *et al.*, 2004). Cet opéron semble donc affecter par le stress oxydatif.

Chez *P. fluorescens*, deux études ont démontré que l'opéron *nuo* est nécessaire pour la colonisation efficace des racines de plants de tomates (Camacho *et al.*, 2002; Dekkers *et al.*, 1998). La souche utilisée dans ces deux études, WCS365, est employée comme agent de biocontrôle, en outre contre certains champignons. Dans l'étude du groupe de Bloemberg, les chercheurs ont aussi fait des tests de colonisation de racines de plantes avec un mutant *ndh*, mais ce dernier n'avait aucun problème de colonisation (Camacho *et al.*, 2002). Le gène *ndh* code pour une NADH déshydrogénase, mais contrairement au complexe *nuo*, cette protéine ne participe pas à la formation du gradient de proton (Matsushita *et al.*, 1987). Comme le groupe de Bloemberg le mentionne, la force proton motrice joue un rôle important dans bien des fonctions cellulaires qui nécessitent de l'énergie comme le transport actif, la motilité, la transmission de signal et l'insertion de protéines dans la membrane (Camacho *et al.*, 2002).

4.5.2.3 Conclusion sur la respiration cellulaire

Puisque plusieurs systèmes à deux composantes sont présents dans des voies de régulation en lien avec *rsmA*, il se pourrait que l'absence des gènes *nuo* affecte ces systèmes puisqu'il nécessite l'utilisation d'énergie. En effet, les gènes *nuo* participent à la production d'énergie et une baisse de celle-ci pourrait défavoriser les systèmes à deux composantes. Si le signal n'atteint pas *rsmA*, cela pourrait réduire le niveau de traduction de ce dernier. Il serait intéressant de quantifier le niveau de transcription de *rsmA* dans quelques mutants *nuo* afin d'identifier si l'absence du complexe NADH I affecte *rsmA* au niveau de la transcription ou de la traduction. Il serait aussi intéressant de quantifier la transcription et la traduction de *rsmA* dans des conditions de pH variés. De cette façon, il serait possible d'identifier si la différence d'expression de *rsmA* chez les mutants *nuo* est due à un changement dans le gradient membranaire de proton ou non. La quantification chez un mutant *ndh* pourrait aussi aider à déterminer si le gradient de proton est important puisque ce complexe n'est pas impliqué dans cette fonction.

4.5.3 L'acquisition du fer

4.5.3.1 Expression de *rsmA*

Lors du criblage, un total de 20 transposants séquencés se sont avérés interrompus dans un gène impliqué dans la production de sidérophores, soit la pyocheline ou la pyoverdine. Le tableau 4-5 présente un résumé de ces mutants séparés en classe d'après l'analyse statistique. On constate qu'il n'y a pas vraiment de corrélation entre le gène interrompu et l'effet sur l'expression de *rsmA*. De plus, il n'y a pas de lien entre les gènes impliqués dans la biosynthèse de la pyocheline (*pch*) ou de la pyoverdine (*pvd*). Les mutants sont répartis dans quatre des cinq catégories. Contrairement, par exemple, aux mutants qui possèdent une insertion dans le gène *lasR* (section 4.1.1.1) qui sont tous présents dans la même catégorie, et aux mutants *nuo* qui sont majoritairement dans deux catégories similaires, il semble y avoir une plus grande variabilité entre les mutants *pvd* et *pch*. Pour vérifier l'importance de ces gènes, une quantification avec un réplicata plus grand et une répétition de l'expérience chez des mutants de la banque est nécessaire. Cependant, il est tout de même intéressant de constater le nombre élevé de mutation dans ces deux ensembles de gènes.

Tableau 4-5. Ensemble des mutants avec une insertion dans un gène en lien avec les sidérophores.

#mutant	Ratio T3	Ratio T4	Ratio T5	Ratio T6	Ratio T7	Gène
<i>Classe « WT »</i>						
355	0,93092	0,53829	0,42918	0,8483	.	<i>pchC</i>
567	0,78514	.	0,54523	1,7066	0,87306	<i>pchE</i>
811	0,77292	0,64155	0,91283	0,56734	.	<i>pvdD</i>
1037	1,38924	0,57079	0,77298	1,1185	.	<i>pvdL</i>
564	0,92725	.	0,88224	0,68217	0,63238	<i>pvdQ</i>
847	0,90392	0,51674	0,62881	0,59379	.	<i>pvdQ</i>
<i>Classe « diminution »</i>						
736	1,54433	0,86489	0,86828	0,70375	.	<i>pchB</i>
813	1,17727	0,5028	0,52776	0,68873	.	<i>pchE</i>
387	1,46512	0,91527	0,70164	0,3528	.	<i>pchF</i>
667	1,14614	0,41061	0,70953	0,88661	.	<i>pvdJ</i>
579	1,27884	.	0,83952	0,649	0,6542	<i>pvdA</i>
568	1,21218	.	0,66553	0,73357	0,60297	<i>pvdQ</i>
<i>Classe « faible »</i>						
742	0,81242	0,46694	0,79055	0,81281	.	<i>pchB</i>
745	0,82994	0,6523	0,83271	0,66746	.	<i>pchF</i>
791	0,80646	0,67849	0,62355	0,35912	.	<i>PchR</i>
351	0,71233	0,60225	0,61394	0,88564	.	<i>pvdI</i>
719	0,65976	0,63663	0,53546	0,78445	.	<i>pvdQ</i>
<i>Classe « retard »</i>						
744	0,70512	0,58915	0,94876	1,03151	.	<i>pchF</i>
1023	0,45227	0,64041	0,70549	1,48295	.	<i>pvdD</i>
937	0,84272	0,62734	1,02237	1,07694	.	<i>pvdI</i>

4.5.3.2 La relation entre le fer et *rsmA*

Le milieu utilisé lors du criblage est un milieu riche qui contient du fer. Les sidérophores sont produits lorsque le fer est limitant. Les variations observées chez les mutants codants pour les sidérophores sont peut-être dues à cela. Tout dépendamment de la vitesse de croissance, le fer est consommé plus ou moins vite dans le milieu. Lors de la croissance sur gélose, le fer est consommé plus localement qu'en condition liquide. Ceci peut être un facteur qui explique les grandes variations et le peu de différences avec la souche sauvage lors de la quantification de *rsmA* en milieu liquide. Afin d'étudier l'effet du fer et d'identifier si ces gènes sont réellement importants pour la régulation de *rsmA*,

la quantification de *rsmA* doit être effectuée dans un milieu pauvre en fer. Il serait aussi intéressant de faire cette quantification en milieu riche, mais tard en phase stationnaire.

Lors des études du transcriptomes chez un mutant *rsmA* comparativement à la souche sauvage, deux groupes ont obtenu des résultats différents en ce qui concerne l'effet d'une mutation dans le gène *rsmA* sur la transcription de gènes reliés à l'acquisition du fer (Brencic & Lory, 2009; Burrowes *et al.*, 2006). Le groupe de Lory a comparé les résultats obtenus lors de ces deux analyses (Brencic & Lory, 2009) : les gènes *pchA*, *B*, *C*, *D*, *E* et *pvdS*, *I* sont affectés par une mutation dans *rsmA*, mais de façon différente. En effet, en début de phase exponentielle, ces gènes semblent plus transcrits, tandis qu'en phase stationnaire, ceux-ci le sont moins que dans la souche sauvage (Brencic & Lory, 2009). Il semble donc y avoir un lien entre la régulation des sidérophores et *rsmA*. De plus, cette régulation est dépendante de la phase de croissance.

4.5.3.2.1 PvdQ

Le gène le plus souvent inactivé est *pvdQ*, qui comporte quatre mutants. Ce dernier est intéressant puisqu'il possède deux rôles. Il agit comme acylase du ligand de LasR C₁₂-HSL et il participe à la production de pyoverdine (Sio *et al.*, 2006). Puisque LasR semble avoir un rôle dans la régulation de *rsmA*, il est intéressant de retrouver dans le criblage une enzyme qui inactive la molécule-signal reconnue par ce dernier. Si PvdQ agit effectivement sur la régulation de *rsmA*, il est probable que cet effet soit indirect via LasR. Lorsque *pvdQ* est absent, le C₁₂-HSL n'est pas dégradé, et serait donc en concentration plus importante. Cependant, l'effet sur l'expression de *rsmA* au niveau traductionnel dans ces mutants apparaît moins évident. La quantification du niveau de traduction de *rsmA* devra être effectuée chez un mutant *pvdQ* en triplicata. De plus, une quantification du C₁₂-HSL en parallèle chez la souche sauvage, le mutant *lasR* et le mutant *pvdQ* permettrait de voir si les phénotypes observés sont liés à une variation de concentration de molécule-signal.

Le groupe de Quax a étudié le rôle de PvdQ lorsque le fer est limité (Nadal *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que les phénotypes observés chez un mutant *pvdQ* et *rsmA* sont similaires. Chez les deux mutants, la motilité de type *swarming* est complètement inhibée (Heurlier *et al.*, 2004; Nadal *et al.*, 2010). De plus, les deux mutants forment des biofilms moins complexes comparativement à la souche sauvage (Burrowes *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). Cependant, lorsque les phénotypes des mutants *pvdQ* et *rsmA* sont

observés en milieu riche, ils ne sont pas identiques. En effet, le groupe de Song a observé plus de biofilm avec un mutant *pvdQ* (Wang *et al.*, 2011). Clairement, il sera important de vérifier le rôle des gènes impliqués avec le fer en conditions limitantes en fer pour bien voir leur effet.

4.5.3.3 Conclusion sur l'effet du fer sur la régulation de *rsmA*

Somme toute, le fer semble un facteur environnemental qui affecte la régulation de *rsmA*. Il serait pertinent de poursuivre les travaux sur cette voie. Pour ce faire, une quantification de la traduction/transcription de *rsmA* dans un milieu contenant différentes concentrations de fer serait souhaitable. De plus, une quantification dans les mêmes conditions que le criblage, mais avec un nombre de réplicats plus élevé pourrait aider à départir les gènes intéressants de ceux qui le sont moins. De plus, puisque plusieurs mutations ont été obtenues dans le gène *pvdQ*, cela renforce le lien possible entre *rsmA* et LasR.

4.5.4 Un nouveau régulateur?

Lors du criblage, trois mutants ont été trouvés avec une mutation dans le gène PA14_30100. Ce gène code pour une protéine hypothétique et contient un domaine cupin2 (COG2850). Ce domaine est souvent associé au régulateur transcriptionnel (Khuri *et al.*, 2001). À l'exception de ce domaine, aucune information n'est disponible jusqu'à ce jour sur la fonction de ce gène.

Les mutants #15 et 268 ont été classés dans la catégorie « faible » suite à l'analyse statistique, et le mutant #163 dans la catégorie « WT ». Cependant, l'analyse statistique pour ce dernier n'est basée que sur deux ratios. Pour les deux mutants de la catégorie « faible », le niveau de traduction de *rsmA* est très bas, et ce, tout au long de l'expérience comparativement à la souche sauvage (Fig. 3-17, appendice C).

Il serait intéressant de quantifier l'expression de la traduction de *rsmA* chez ce mutant avec un nombre de réplicats plus élevé. Si les résultats confirment ceux obtenus lors du criblage, une quantification du niveau de transcription chez ce même mutant permettrait d'identifier à quel niveau ce dernier pourrait agir dans la régulation de *rsmA*. Il semble donc un bon candidat pour la régulation directe de *rsmA* au niveau transcriptionnel.

4.5.5 Autres gènes retrouvés plus d'une fois

4.5.5.1 L'opéron PA14_69090 à PA14_69060

Les gènes PA14_69070 et PA14_69090 font partie d'un même opéron et ont été retrouvés une fois chacun lors du criblage. Peu d'information est disponible au sujet de leur fonction. Celle-ci est prédite et reliée aux transporteurs ABC ainsi qu'aux pompes à efflux. Les deux mutants qui portent une insertion dans ces gènes (#988 et #974) font tous deux parties de la catégorie « faible » suite à l'analyse statistique. Il se peut que ces derniers jouent un rôle dans le transport d'une molécule reliée à la régulation de *rsmA*. Une vérification du niveau de traduction de *rsmA* avec plus de triplicata serait intéressante, en plus d'une quantification au niveau transcriptionnel afin d'évaluer la pertinence de cette mutation dans la régulation de *rsmA*.

4.5.5.2 L'opéron *pilM-pilQ*

Les gènes *pilO* et *pilP* ont tous deux été identifiés dans le criblage chez les mutants #978 et #1024, respectivement. Ces gènes codent pour des protéines qui participent à l'assemblage du pilus de type IV. Ils font tous deux partie de la catégorie « faible ». Ces gènes, régulés indirectement par RsmA, affectent la régulation au niveau traductionnel de ce dernier. En effet, RsmA agirait indirectement sur la régulation de cet opéron en affectant un régulateur transcriptionnel (Brencic & Lory, 2009). Puisque ces gènes sont impliqués dans la motilité de type *twitching* il est probable qu'un système à deux composantes agisse sur la régulation de *rsmA* puis ce dernier affecte la traduction d'un régulateur transcriptionnel qui agit sur l'expression de l'opéron *pil*. Il est peu probable que ces deux gènes affectent directement la régulation de *rsmA*.

4.5.6 Conclusion générale sur le criblage

Le criblage a permis de confirmer certains résultats concernant le rôle du *quorum sensing* dans la régulation de *rsmA*. En effet, des transposants ont été identifiés avec des insertions dans les gènes *lasR*, *mvfR*, *vfr*, *rhIR*, *gidA*, *pqsA* et *kynB*. De plus, les résultats des quantifications en milieu liquide pour ces mutants concordaient avec ceux obtenus en testant les mutants du laboratoire. Cette méthode a aussi permis de

découvrir de nouveaux horizons concernant la régulation de *rsmA*, surtout au niveau des facteurs environnementaux. En effet, le fer et la respiration cellulaire semblent des éléments importants pour la régulation de *rsmA*. Finalement, le criblage a permis d'identifier deux régulateurs transcriptionnels potentiels pour la régulation de *rsmA*, soit les gènes PA14_30100 et *parR*.

4.6 Les facteurs environnementaux

4.6.1 La température

L'effet de différentes températures d'incubation a été testé sur la régulation au niveau traductionnel de *rsmA*. Les résultats obtenus (Fig. 3-21) démontrent que *rsmA* est affecté par la température. En effet, la traduction atteint un niveau plus élevé à 37°C, intermédiaire à 28 et 30°C et finalement plus bas à 41°C. Des résultats similaires ont aussi été obtenus chez le mutant *lasR* (Fig. 3-21).

Il est intéressant de noter que la traduction de *rsmA* est affectée de façon différente par la température chez le mutant *mvaT*. Chez ce dernier, le niveau de traduction de *rsmA* est similaire pour les températures 28, 30 et 41°C tandis qu'à 37°C ce niveau est beaucoup plus important (Fig. 3-21). L'effet indirect de MvaT sur la traduction de *rsmA* pourrait donc être due en partie à la température d'incubation. En effet, aux températures de 28, 30 et 41°C, les niveaux de traduction de *rsmA* sont plus élevées chez le mutant *mvaT*, mais à un niveau moins important qu'à 37°C, comparativement à la souche sauvage. Jusqu'à ce jour, il n'existe pas de lien entre la température et le régulateur global MvaT. Cette piste est toutefois intéressante. Il se pourrait que *mvaT* soit contrôlé par un système à deux composantes qui réagit à la température, et selon son état, affecte *rsmA* ensuite.

De plus, aucune preuve quant à l'effet de la température sur la voie CbrA/CbrB/Crc n'est disponible. Cependant, pour tester cela il suffit de quantifier le niveau de transcription chez les mutants *cbrB* et *crc* aux mêmes températures que *mvaT*. Si les résultats sont similaires, l'effet de la température sur *rsmA* pourrait passer par cette voie.

Dans la littérature, l'effet de la température sur diverses fonctions des bactéries a été étudié plus abondamment chez les agents de biocontrôle, comme *Pseudomonas fluorescens* CHAO. Le groupe de Dieter Haas a identifié un senseur qui réagit

différemment selon la température (Humair *et al.*, 2009). Ils ont identifié le régulateur RetS comme point d'entrée à la modulation de la voie GacS/GacA/Rsm à la température. En effet, RetS est plus actif lorsque les bactéries sont incubées à une température de 35°C, ce qui est élevé pour cet agent de biocontrôle de plante. Lorsque RetS est activé, GacS est réprimé. GacA est donc moins présent, ainsi que les ARNnc RsmY, RsmZ et RsmX, ce qui permet à RsmA/E de réprimer ces gènes-cibles plus efficacement. Puisqu'à haute température la bactérie n'a pas besoin de ses facteurs de biocontrôle, qui sont régulés par RsmA/RsmE, celle-ci économise de l'énergie en ne les produisant pas (Humair *et al.*, 2009).

P. aeruginosa est en mesure de croître à des températures plus élevées (max. 41°C) que *P. fluorescens* CHA0 (max. 37°C). Un effet strictement au niveau de RetS, qui agit comme répresseur de la voie GacS/GacA aurait pour effet de diminuer la traduction de *rsmA* puisque ce dernier serait en plus grande quantité et libre de réprimer sa traduction. C'est possiblement le phénomène que nous avons observé. Lorsque la température est élevée (41°C), la traduction de *rsmA* est à son niveau le plus bas, comme chez *P. fluorescens*. Toutefois, ces deux espèces jouent des rôles différents : *P. fluorescens* est un agent de biocontrôle tandis que *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste. Il est donc possible que le lien entre RetS et la température chez *P. fluorescens* ne soit pas le même chez *P. aeruginosa*. Il serait tout de même intéressant de voir si un lien entre RetS, MvaT et la température existe chez *P. aeruginosa*. Pour ce faire, la quantification de *rsmA* chez un mutant *retS* incubé à différentes températures permettrait d'identifier si la température a toujours un effet lorsque le senseur RetS est absent. De plus, pour vérifier si les observations faites chez *P. fluorescens* CHA0 sont les mêmes chez *P. aeruginosa*, la quantification du niveau de transcription des ARNnc RsmZ et RsmY serait pertinente.

4.6.2 L'utilisation de différentes sources de carbone

Afin d'identifier un facteur environnemental qui influence l'expression de *rsmA*, l'effet de l'utilisation de différentes sources de carbone a été étudié. Pour ce faire, l'expression de *rsmA* a été quantifiée dans un milieu minimal. Certains résultats obtenus sont en lien avec le système à deux composantes CbrA/CbrB et sont discutées à la section 4.2.5.

Les niveaux de traduction de *rsmA* lors de la croissance sur différentes sources de carbone (Fig. 3-22) ne sont pas très différents d'une source à l'autre. Seul le fructose a donné des résultats distincts, alors que la traduction de *rsmA* était significativement plus élevée après 24h d'incubation.

Le fructose est présent dans l'environnement naturel des *Pseudomonas*. Par exemple, ce dernier se retrouve dans l'exsudat racinaire des plants de tomates (Kamilova *et al.*, 2006). Dans cet environnement, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 colonise les racines et protège la plante contre certains champignons en produisant un antifongique. Bien que le fructose soit présent, les bactéries ne sont pas attirées par ce composé, mais elles peuvent l'utiliser comme source de carbone (de Weert *et al.*, 2002).

De plus, le fructose serait relié au système GacA/GacS. En effet, chez *Pseudomonas* sp. DSS73, retrouvé dans la rhizosphère de la betterave à sucre, et *Pseudomonas brassicacearum*, retrouvé dans la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana* et de *Brassica napus*, le système GacA/GacS reconnaît l'exsudat racinaire (Koch *et al.* 2002; Lalaouna *et al.* 2012). La concentration élevée de molécules présentes dans l'exsudat racinaire (le fructose pour la betterave à sucre) semble liée à la production d'antifongique et de biofilm, deux caractéristiques importantes pour le biocontrôle et contrôlées par RsmA (Koch *et al.* 2002; Lalaouna *et al.* 2012). Prenons par exemple la formation de biofilm : lorsque les ARNnc RsmZ et RsmY sont présents, RsmA est moins disponible pour réprimer ces gènes cibles et la formation de biofilm est observée. Pour ce faire, la voie GacA/GacS doit être activée par la présence d'exsudat racinaire. À l'inverse, les bactéries ne forment pas de biofilm lorsque RsmA est actif.

Les phénotypes observés chez les espèces de *Pseudomonas* protectrices de plantes sont similaires à ceux observés chez le pathogène opportuniste. En effet, chez *P. aeruginosa*, lorsque GacA ou GacS est inactivé, la souche est moins pathogène chez les plantes et chez les souris (Rahme *et al.*, 1995). Lorsque GacA est inactif, la transcription des ARNnc RsmZ et RsmY est réduite, et RsmA peut alors agir librement en réprimant les systèmes de sécrétion de type VI et la formation de biofilm, il y a donc une diminution des infections chroniques.

De plus, la voie GacA/GacS semble réagir à d'autres composés produits par les plantes, comme certains composés phénoliques et l'acide rosmarinique (Walker *et al.*, 2004; Yamazaki *et al.*, 2012). Pour résister à ces composés, *P. aeruginosa* doit être sous forme de biofilm, et ce, avant que la concentration des composés ne soit trop grande

(Walker *et al.*, 2004). Cette voie semble donc permettre l'adaptation à l'environnement grâce à la présence de sources de carbone provenant des plantes.

Puisque RsmA est contrôlé au niveau post-traductionnel par les ARNnc RsmZ et RsmY, eux-mêmes contrôlés par GacA, il est logique de voir un niveau de traduction différent dans des conditions qui miment la rhizosphère de plantes. Puisque RsmA semble affecter sa traduction et sa transcription (section 4.3), si ce dernier est en quantité moindre puisqu'il est lié aux ARNnc plus abondants en conditions environnementales, cela promeut l'activation des gènes nécessaires à l'infection chronique et ainsi la formation d'un biofilm qui protégera les bactéries contre les composés néfastes dans l'exsudat racinaire de la plante. Les espèces pathogènes et protectrices de *Pseudomonas* semblent utiliser une régulation similaire face à un changement d'environnement. Cependant, ce qui les différencie semble être les gènes cibles régulés par RsmA. Chez les espèces comme *P. fluorescens*, les antifongiques qui aident à protéger la plante font partie de ces gènes, tandis que chez *P. aeruginosa*, RsmA contrôle des gènes comme les systèmes de sécrétion de type III et VI qui agissent comme facteurs de virulence.

Somme toute, les sources de carbone spécifiques à un milieu environnemental comme le fructose semble permettre à la bactérie d'identifier le milieu dans lequel elle se trouve et d'activer la transcription des gènes nécessaires pour s'adapter à ce milieu.

4.6.3 Conclusion sur les facteurs environnementaux

P. aeruginosa semble utiliser la voie de régulation RetS et GacA/GacS pour s'adapter aux différentes conditions environnementales dans lesquelles elle se retrouve. La température ainsi que les différentes sources de carbone sont de bons indicateurs de l'endroit où se retrouve la bactérie. L'adaptation rapide se fait grâce à la transcription des ARNnc RsmZ et RsmY qui, à leur tour, affecteront la régulation de *rsmA*. Il serait pertinent de poursuivre l'étude de ces facteurs puisque *P. aeruginosa* doit aussi s'adapter à l'environnement « humain » lors d'infections.

4.7 Proposition d'un modèle portant sur la régulation de *rsmA*

Grâce aux observations effectuées tout au long de ce projet, une vision plus précise sur la régulation de *rsmA* est maintenant possible. La figure 4-3 présente un modèle qui prend en considération les observations effectuées lors de ce projet et les découvertes de la littérature.

Tout d'abord, quelques facteurs environnementaux sont maintenant identifiés grâce au criblage et aux différentes expériences sur la température et les sources de carbone. En effet, il semble y avoir un lien étroit entre la température et le senseur RetS (section 4.6.1). De plus, le fructose semble agir au niveau de GacS (section 4.6.2). Suite au criblage, il semble y avoir un lien entre le gradient de proton (les gènes *nuo*) et le fer avec la traduction de *rsmA*. Cependant, plus d'expériences sont nécessaires afin de vérifier le mécanisme d'action de ces deux facteurs.

Le *quorum sensing* semble jouer un rôle clé dans la régulation de *rsmA*, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel. En effet, les régulateurs LasR, MvfR, Vfr, DksA et PqsE affectent de façon positive la transcription de *rsmA*. Au niveau traductionnel, le répresseur MvaT semble particulièrement important. Ce dernier réprime la transcription de l'ARNnc RsmZ et pourrait agir via la voie CbrA/CbrB, impliqué dans la régulation suite à la présence de certaines sources de carbone. Le dosage du niveau de traduction de *rsmA* chez un mutant *rsmZ* est nécessaire afin de voir si MvaT agit strictement à ce niveau ou à ce niveau et via une autre voie. Le régulateur transcriptionnel PA14_48830 semble lui aussi impliqué au niveau de la traduction de *rsmA*. La cible directe de ce dernier n'a toutefois pas été identifiée.

Dans ce schéma, comparativement à celui présenté à la figure 1-7, le senseur LadS est absent. En effet, il a été démontré que ce dernier est non fonctionnel chez la souche *P. aeruginosa* PA14 (Mikkelsen *et al.*, 2011). Puisque les travaux effectués pour ce mémoire ont été effectués avec cette souche, ce senseur a été retiré du modèle.

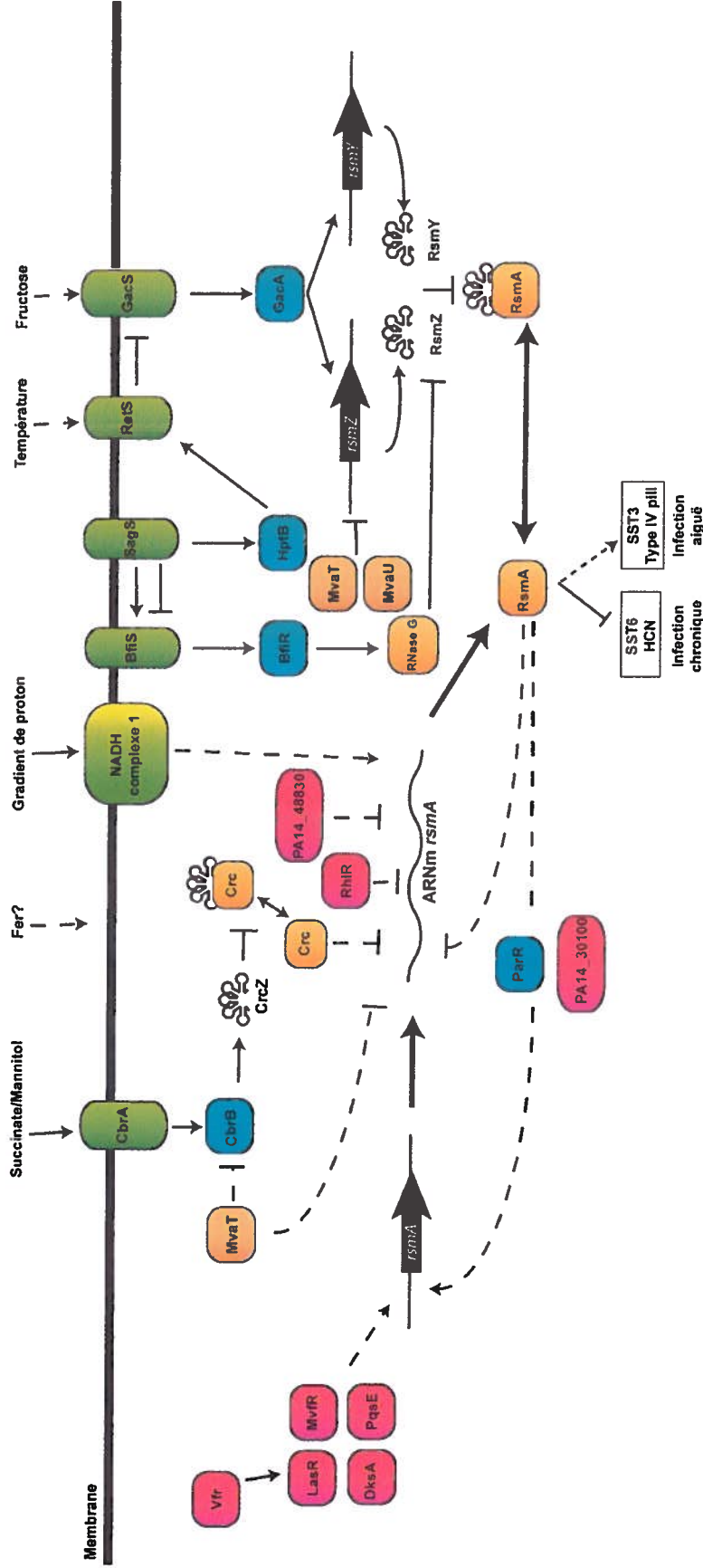


Figure 4-3. Régulation de *rsmA* chez *P. aeruginosa* PA14 suite aux observations lors de ce mémoire et en lien avec la littérature

Les senseurs de systèmes à deux composants sont en vert et les régulateurs transcriptionnels du *quorum sensing*, et régulateurs d'autres processus sont en rose. En orange, ce sont des régulateurs post-transcriptionnel et en brun un répresseur transcriptionnel. Les traits pointillés représentent des hypothèses qui découlent des observations effectuées dans ce mémoire. Les flèches représentent une activation (directs ou indirecte), les barres une répression. Inspiré de (Castang *et al.*, 2008; Mikkelsen *et al.*, 2011; Petrova & Sauer 2011; Yeung *et al.*, 2011; Brencic & Lory 2009).

Finally, RsmA plays an important role in the regulation of its transcription and translation. In fact, the results obtained suggest a negative feedback loop of RsmA at the level of its translation. Moreover, the latter seems to positively affect its transcription by affecting a transcriptional regulator. Two interesting candidates have been identified, either the regulator ParR and PA14_30100. The transcription start sites have also been identified, and they are consistent with the results obtained in the study of the transcriptome of *P. aeruginosa* and in *E. coli* (Dötsch *et al.*, 2012; Yakhnin *et al.*, 2011). These latter results confirm the differential regulation of *rsmA* according to the growth phase and the culture medium.

4.8 Conclusion

The regulation of *rsmA* is complex and occurs at several levels. Even though the post-translational regulation by the RNAs RsmZ and RsmY has been well characterized in the literature, thanks to this research project, it is now clear that RsmA is regulated at the levels of its transcription and translation. Moreover, the majority of published studies focus on the importance of RsmA in an infection context. The work presented in this thesis indicates that this protein plays an important role in the rapid adaptation of the bacterium to its environment in general, whether in the human body or in the soil.

BIBLIOGRAPHIE

- Albus, A. M. M., Pesci, E. C. C., Runyen-janecky, L. J. J., West, S. E., & Iglewski, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 179(12), 3928.
- Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A. I., Burnham, K. D., & Maurer, R. (2000). Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Molecular microbiology*, 35(3), 635-46.
- Ang, S., Horng, Y. T., Shu, J. C., Soo, P. C., Liu, J. H., Yi, W. C., Lai, H. C., Luh, K. T., Ho, S. W. & Swift, S. (2001). The role of RsmA in the regulation of swarming motility in *Serratia marcescens*. *Journal of biomedical science*, 8(2), 160-9.
- Bailey, T. L., Bodén, M., Whittington, T., & Machanick, P. (2010). The value of position-specific priors in motif discovery using MEME. *BMC bioinformatics*, 11, 179. doi:10.1186/1471-2105-11-179
- Bailey, T., & Gribskov, M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics*, 14, 48-54.
- Barnard, F. M., Loughlin, M. F., Fainberg, H. P., Messenger, M. P., Ussery, D. W., Williams, P., & Jenks, P. J. (2004). Global regulation of virulence and the stress response by CsrA in the highly adapted human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Molecular microbiology*, 51(1), 15–32.
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., & Haas, D. (1999). Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 14073-8.
- Bordi, C., Lamy, M.-C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Molecular microbiology*, 76(6), 1427-43.
- Brencic, A., & Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Molecular microbiology*, 72(3), 612-32.
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., & Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular microbiology*, 73(3), 434 -445 .
- Browne, P., Barret, M., O’Gara, F., & Morrissey, J. P. (2010). Computational prediction of the Crc regulon identifies genus-wide and species-specific targets of catabolite repression control in *Pseudomonas* bacteria. *BMC microbiology*, 10(300).

- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature reviews. Microbiology*, 2(1), 57-65.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., & Gara, F. O. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology*, 152(2), 405-418.
- Camacho Carvajal, M. M., Wijffjes, A. H. M., Mulders, I. H. M., Lugtenberg, B. J. J., & Bloemberg, G. V. (2002). Characterization of NADH dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 and their role in competitive root colonization. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(7), 662-71.
- Carty, N. L., Layland, N., Colmer-Hamood, J. a, Calfee, M. W., Pesci, E. C., & Hamood, A. N. (2006). PtxR modulates the expression of QS-controlled virulence factors in the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Molecular microbiology*, 61(3), 782-94.
- Castang, S., McManus, H. R., Turner, K. H., & Dove, S. L. (2008). H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18947-52.
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., & Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*, 182(9), 2624-8.
- Chancey, S. T., Wood, D. W., & Pierson, L. S. (1999). Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and environmental microbiology*, 65(6), 2294-9.
- Chao, N., Wei, K., Chen, Q., & Meng, Q. (2008). The rsmA-like gene rsmAXcc of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is involved in the control of various cellular processes, including pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(4), 411-23.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J. R., & Chatterjee, A. K. (2003). GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 16(12), 1106-17.
- Chavez, R.G., Alvarez, A.F., Romeo, T. et Georgellis, D. (2010). The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *Journal of bacteriology*, 192(7), 2009-12.
- Choi, J. Y., Sifri, C. D., Goumnerov, B. C., Rahme, L. G., Ausubel, F. M., & Calderwood, S. B. (2002). Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *Journal of bacteriology*, 184(4), 952.
- Choi, K. H., & Schweizer, H. P. (2006). mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols*, 1(1), 153-161.

- Choi, K.-H., Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of microbiological methods*, 64(3), 391-7.
- Coggan, K. Y., & Wolfgang, M. C. (2012). Global Regulatory Pathways and Cross-talk Control *Pseudomonas aeruginosa* Environmental Lifestyle and Virulence Phenotype. *Current issues in molecular biology*, 14(2), 47-70.
- Cohen, S., Chang, A., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110-4.
- Coulthurst, S. J., Williamson, N. R., Harris, A. K. P., Spring, D. R., & Salmond, G. P. C. (2006). Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 7), 1899-911.
- Cui, Y., Chatterjee, A., & Chatterjee, A. K. (2001). Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory rsmB RNA, extracellular enzymes, and harpinEcc. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(4), 516-26.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K., & Chatterjee, A. K. (1995). Identification of a global repressor gene, rsmA, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *Journal of bacteriology*, 177(17), 5108.
- Dame, R. T., Luijsterburg, M. S., Krin, E., Bertin, P. N., Wagner, R., & Wuite, G. J. (2005). DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *Journal of bacteriology*, 187(5), 1845.
- de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 181(7), 2175-84.
- Dekimpe, V., & Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 3), 712-23.
- Dekkers, L. C., Van Der Bij, A. J., Mulders, I. H., Phoelich, C. C., Wentwoord, R. A., Glandorf, D. C., Wijffelman, C. A., & Lugtenberg, B. J. (1998). Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Molecular plant-microbe interactions*, 11(8), 763-71.

- de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H. M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., De Mot, R. & Lugtengerg, B. J. J.(2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 15(11), 1173-80.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lepine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., Xiao, G., & Rahme, L. G. (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. *Molecular microbiology*, 55(4), 998-1014.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G., & Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1339-44.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., 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. *Molecular Microbiology*, 50(1), 29-43.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P., & Cámara, M. (2002). Advancing the Quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the Regulation of N-Acylhomoserine Lactone Production and Virulence Gene Expression. *Journal of bacteriology*, 184(10), 2576-2586.
- Doggett, R. G., Harrison, G. M., & Wallis, E. S. (1964). Comparison of some properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in persons with and without cystic fibrosis. *Journal of Bacteriology*, 87(2), 427.
- Dorman, C. J. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature reviews. Microbiology*, 2(5), 391-400.
- Dorsey, C., & Tomaras, A. (2002). Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system. *Applied and environmental*, 68(12), 6353-6360.
- Dötsch, A., Eckweiler, D., Schniederjans, M., Zimmermann, A., Jensen, V., Scharfe, M., Geffers, R., & Häussler, S. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptome in Planktonic Cultures and Static Biofilms Using RNA Sequencing. (S. Semsey, Ed.) *PLoS ONE*, 7(2), e31092.
- Dubern, J.-F. J., & Diggle, S. P. (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular BioSystems*, 4(9), 882.

- Dubey, A. K., Baker, C. S., Romeo, T., & Babitzke, P. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA–RNA interaction. *Rna*, *11*(10), 1579–1587.
- Edwards, A., Patterson-Fortin, L.M., Vakulskas, C.A., Mercante, J.W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M.I., Fields, J.A., Thompson, S.A., Georgellis, D., Cashel, M., Babitske, P. et Romeo, T. (2011). Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Molecular microbiology*, *80*(6), 1561-80.
- Erhardt, H., Stefan, Steimle, Muders, V., Pohl, T., Walter, J., & Friedrich, T. (2011). Disruption of individual nuo-genes leads to the formation of partially assembled NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*. *1817*(6), 863-71
- Farrow III, J. M., Sund, Z. M., Ellison, M. L., Wade, D. S., Coleman, J. P., Pesci, E. C (2008). PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the rhl quorum-sensing system. *Journal of bacteriology*, *190*(21), 7043.
- Fields, J. A. & Thompson, S. A. (2008). *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. *Journal of bacteriology*, *190*(9), 3411-6.
- Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Jones, A. K., Fulcher, N. B., Urbanowski, M. L., Yahr, T. L., & Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *Journal of bacteriology*, *192*(14), 3553-64.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, *176*(2), 269.
- Gauthier, J. D., Jones, M. K., Thiaville, P., Joseph, J. L., Swain, R. a, Krediet, C. J., Gulig, P. a, et al. (2010). Role of GacA in virulence of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology (Reading, England)*, *156*(Pt 12), 3722-33. doi:10.1099/mic.0.043422-0
- Gilbert, K. B., Kim, T. H., Gupta, R., Greenberg, E. P., & Schuster, M. (2009). Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Molecular microbiology*, *73*(6), 1072 -1085.
- Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. W. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology reviews*, *33*(2), 279-94.
- Goodman, A. L. (2010). Sit and stay a while: how BfiSR controls irreversible attachment in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology*, *192*(20), 5273-5274.
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., & Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental cell*, *7*(5), 745-54.

- Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes & development*, 23(2), 249-59.
- Gore, A. L., & Payne, S. M. (2010). CsrA and Cra influence *Shigella flexneri* pathogenesis. *Infection and immunity*, 78(11), 4674-82.
- Grewal, S. I., Han, B., & Johnstone, K. (1995). Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Journal of bacteriology*, 177(16), 4658-68.
- Gupta, R., Gobble, T. R., & Schuster, M. (2009). GidA posttranscriptionally regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 191(18), 5785-92.
- Han, S. H., Lee, S. J., Moon, J. H., Park, K. H., Yang, K. Y., Cho, B. H., Kim, K. Y., Kim, Y. W., Lee, M. C., Anderson, A. J. & Kim, Y. C. (2006). GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 924-30.
- Hazan, R., He, J., Xiao, G., Dekimpe, V., Apidianakis, Y., Lesic, B., Astrakas, C., Déziel, E., Lépine, F. & Rahme, L. G. (2010). Homeostatic interplay between bacterial cell-cell signaling and iron in virulence. *PloS Pathogene*, 6(3), e1000810.
- Heeb, S., & Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1351-63.
- Hendrickson, E. L., Plotnikova, J., Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2001). Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7126-34.
- Henkin, T. M. (2008). Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. *Genes & development*, 22(24), 3383-90.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N. & Givskow, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal*, 22(15), 3803-15.
- Heroven, A. K., Böhme, K., Rohde, M., & Dersch, P. (2008). A Csr-type regulatory system, including small non-coding RNAs, regulates the global virulence regulator RovA of *Yersinia pseudotuberculosis* through RovM. *Molecular microbiology*, 68(5), 1179-95.

- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Camara, M., Williams, P. & Haas, D. (2004). Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA / RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 186(10), 2936-2945.
- Hoang, T T, Kutchma, A. J., Becher, A., & Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid*, 43(1), 59-72.
- Hoang, Tung T, Karkhoff-schweizer, R. R., Kutchma, A. J., & Schweizer, H. P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 212(1), 77-86.
- Hovel-Miner, G., Pampou, S., Faucher, S. P., Clarke, M., Morozova, I., Morozov, P., Russo, J. J., Shuman, H. A. & Kalachikow, S. (2009). SigmaS controls multiple pathways associated with intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Journal of bacteriology*, 191(8), 2461-73.
- Humair, B., González, N., Mossialos, D., Reimann, C., & Haas, D. (2009). Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *The ISME journal*, 3(8), 955-65.
- Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A. N., Wozniak, D. J., Romeo, T., & Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Polysaccharide Psl is Regulated Transcriptionally by RpoS and Post-transcriptionally by RsmA. *Molecular microbiology*, 78(September), 158-172.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. V. & Manoil, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14339-44.
- James, A L., Perry, J. D., Chilvers, K., Robson, I. S., Armstrong, L., & Orr, K. E. (2000). Alizarin-beta-D-galactoside: a new substrate for the detection of bacterial beta-galactosidase. *Letters in applied microbiology*, 30(4), 336-40.
- Jander, G., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of bacteriology*, 182(13), 3843-5.
- Jarrell, K. F., & McBride, M. J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature reviews. Microbiology*, 6(6), 466-76.
- Jonas, K, Edwards, A. N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U. & Melefors, Ö. (2008). The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular microbiology*, 70(1), 236-257.

- Jonas, Kristina, & Melefors, O. (2009). The *Escherichia coli* CsrB and CsrC small RNAs are strongly induced during growth in nutrient-poor medium. *FEMS microbiology letters*, 297(1), 80-6.
- Jones, M. K., Warner, E. B., & Oliver, J. D. (2008). CsrA inhibits the formation of biofilms by *Vibrio vulnificus*. *Applied and environmental microbiology*, 74(22), 7064-6. doi:10.1128/AEM.01810-08
- Jude, F., Kohler, T., Branny, P., Perron, K., Mayer, M. P., Comte, R., & Van Delden, C. (2003). Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 185(12), 3558.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B., Jordan, D., Lauber, J., Salunkhe, P., Limpert, A. S., von Götz, F., Steinmetz, I., Eberl, L. & Tümmler, B. (2004). Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 150(4), 831-841.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(10), 1121-6.
- Kanack, K. J., Runyen-Janecky, L. J., Ferrell, E. P., Suh, S.-J., & West, S. E. H. (2006). Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 12), 3485-96.
- Kang, H. Y., Dozois, C. M., Tinge, S. A., Lee, T. H., & Iii, R. C. (2002). Transduction-Mediated Transfer of Unmarked Deletion and Point Mutations through Use of Counterselectable Suicide Vectors. *Journal of bacteriology*, 184(1), 307-312.
- Kay, E., Dubuis, C., & Haas, D. (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 17136-41.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 634-44.
- Khuri, S., Bakker, F. T., & Dunwell, J. M. (2001). Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Molecular biology and evolution*, 18(4), 593-605.
- Koch, B., Nielsen, T. H., Sørensen, D., Bo, J., Christophersen, C., Molin, S., Sørensen, J., et al. (2002). Lipopeptide Production in *Pseudomonas* sp . Strain DSS73 Is Regulated by Components of Sugar Beet Seed Exudate via the Gac Two-Component Regulatory System. *Applied and environmental microbiology*. 68(9), 4509-16

- Kominos, S. D., Copeland, C. E., Grosiak, B., & Postic, B. (1972). Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Applied microbiology*, 24(4), 567-70.
- Krin, E., Derzelle, S., Bedard, K., Adib-Conquy, M., Turlin, E., Lenormand, P., Hullo, M.-F., et al. (2008). Regulatory role of UvrY in adaptation of *Photobacterium luminescens* growth inside the insect. *Environmental microbiology*, 10(5), 1118-34.
- Kulasekara, H. D., Ventre, I., Kulasekara, B. R., Lazdunski, A., Filloux, A., & Lory, S. (2005). A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Molecular microbiology*, 55(2), 368-80.
- Kulkarni, P. R., Cui, X., Williams, J. W., Stevens, A. M., & Kulkarni, R. V. (2006). Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic acids research*, 34(11), 3361-9.
- Lalaouna, D., Fochesato, S., Sanchez, L., Schmitt-Kopplin, P., Haas, D., Heulin, T., & Achouak, W. (2012). Phenotypic switching involves GacS/GacA-dependent Rsm small RNAs in *Pseudomonas brassicacearum*. *Applied and environmental microbiology*, 78(6), 1658-65.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H.-T., & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular microbiology*, 67(2), 241-53.
- 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. *Molecular microbiology*, 21(6), 1137-46.
- Lawhon, S. D., Frye, J. G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., & Altier, C. (2003). Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1633-1645.
- Ledgham, F. (2003). Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR2 (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing. *Research in Microbiology*, 154(3), 207-213.
- Lenz, D. H., & Bassler, B. L. (2007). The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Molecular microbiology*, 63(3), 859-71.
- Li, C., Wally, H., Miller, S. J., & Lu, C.-D. (2009). The Multifaceted Proteins MvaT and MvaU, Members of the H-NS Family, Control Arginine Metabolism, Pyocyanin Synthesis, and Prophage Activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 191(20), 6211-6218.
- Li, W., & Lu, C.-D. (2007). Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 189(15), 5413-20.

- Liang, H., Li, L., Dong, Z., Surette, M. G., & Duan, K. (2008). The YebC Family Protein PA0964 Negatively Regulates the *Pseudomonas aeruginosa* Quinolone Signal System and Pyocyanin Production. *Journal of Bacteriology*, 190(18), 6217-6227.
- Liang, H., Li, L., Kong, W., Shen, L., & Duan, K. (2009). Identification of a novel regulator of the quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 293(2), 196-204.
- Liao, C. H., McCallus, D. E., & Fett, W. F. (1994). Molecular characterization of two gene loci required for production of the key pathogenicity factor pectate lyase in *Pseudomonas viridiflava*. *Molecular plant-microbe interactions*, 7(3), 391-400.
- Liao, C. H., McCallus, D. E., Fett, W. F., & Kang, Y. (1997). Identification of gene loci controlling pectate lyase production and soft-rot pathogenicity in *Pseudomonas marginalis*. *Canadian journal of microbiology*, 43(5), 425-31.
- Liao, C. H., McCallus, D. E., Wells, J. M., Tzean, S. S., & Kang, G. Y. (1996). The *repB* gene required for production of extracellular enzymes and fluorescent siderophores in *Pseudomonas viridiflava* is an analog of the *gacA* gene of *Pseudomonas syringae*. *Canadian journal of microbiology*, 42(2), 177-82.
- Liaw, S.-J., Lai, H.-C., Ho, S.-W., Luh, K.-T., & Wang, W.-B. (2003). Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *Journal of Medical Microbiology*, 52(1), 19-28.
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. & Ausubel, F. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2833-8.
- Linares, J. F., Moreno, R., Fajardo, A., Martínez-Solano, L., Escalante, R., Rojo, F., & Martínez, J. L. (2010). The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology*, 12, 3196-3212.
- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., Oakford, L., Yüksel, U., Giedroc, D. P. & Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 272(28), 17502-10.
- Liu, M. Y., Yang, H., & Romeo, T. (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *Journal of bacteriology*, 177(10), 2663-72.
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L., Fuentes, L. E., Nunez, C., Segura, D., Espin, G. & Castaneda, M. (2011). Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 21(3-4), 147-59.

- Matsushita, K., Ohnishi, T., & Kaback, H. R. (1987). NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry*, 26(24), 7732-7.
- Mikkelsen, H., McMullan, R., & Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS one*, 6(12), e29113.
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., & Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology*, 13(7), 1666-81
- Milenbachs Lukowiak, A., Mueller, K. J., Freitag, N. E., & Youngman, P. (2004). Dereglulation of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression by two distinct and semi-independent pathways. *Microbiology*, 150(2), 321.
- Molofsky, A., & Swanson, M. S. (2003). *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Molecular microbiology*, 50(2), 445-461.
- Mougous, J., Cuff, M., Raunser, S., Shen, A., & Zhou, M. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 312(5779), 1526-1530.
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Papaioannou, E., Wahjudi, M., Krzeslak, J., Coenye, T., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2010). Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 1), 49-59.
- Nishijyo, T., Haas, D., & Itoh, Y. (2001). The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 40(4), 917-31.
- Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A., & Reiser, J. (1994). Isolation and Characterization of a Regulatory Gene Affecting Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in. *Journal of bacteriology*, 176(7), 2044-2054.
- OMS (2011). Global tuberculosis control. WHO Library Cataloguing-in-Publication.
- Osterberg, S., Del Peso-Santos, T., & Shingler, V. (2011). Regulation of Alternative Sigma Factor Use. *Annual review of microbiology*, 37-55.
- O'Toole, G. a, Gibbs, K. a, Hager, P. W., Phibbs, P. V., & Kolter, R. (2000). The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 182(2), 425-31.
- Ovadis, Marianna, Liu, X., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I., & Chernin, L. (2004). The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies. *Journal of bacteriology*, 186(15), 4986-4993.

- Palma, M., Deluca, D., Worgall, S., Luis, E. N., & Quadri, L. E. N. (2004). Transcriptome Analysis of the Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Hydrogen Peroxide Transcriptome Analysis of the Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Hydrogen Peroxide. *Journal of bacteriology*, 186(1), 248-252.
- Pannuri, A., Yakhnin, H., Vakulskas, C. a, Edwards, A. N., Babitzke, P., & Romeo, T. (2011). Translational Repression of NhaR, a Novel Pathway for Multi-tier Regulation of Biofilm Circuitry by CsrA. *Journal of bacteriology*, 194(1), 79-89
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1490-4.
- Perron, K., Comte, R., & van Delden, C. (2005). DksA represses ribosomal gene transcription in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with RNA polymerase on ribosomal promoters. *Molecular microbiology*, 56(4), 1087-102.
- Pesci, E C, Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, a S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11229-34.
- Pesci, E C, Pearson, J. P., Seed, P. C., & Iglewski, B. H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 179(10), 3127-32.
- 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 RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(24), 6940.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T. G., Camara, M. C. A., Haas, D., & Williams, P. (2001). The Global Posttranscriptional Regulator RsmA Modulates Production of Virulence Determinants and N-Acylhomoserine Lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 183(22), 6676-6683.
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2010). The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development directly through CafA by its control over the small RNA rsmZ. *Journal of bacteriology*, 192(20), 5275-5288.
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2011). SagS contributes to the motile-sessile switch and acts in concert with BfiSR to enable *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Journal of bacteriology*. 193(23), 6614-28.
- Pettit, R. K. (2011). Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 13(1), 1-11.

- Platt, M. D., Schurr, M. J., Sauer, K., Vazquez, G., Kukavica-Ibrulj, I., Potvin, E., Levesque, R. C., Fedynak, A., Brinkman, F. S. L., Schurr, J., Hwang, S.-H., Lau, G. W., Limbach, P. A., Rowe, J. J., Lieberman, M. A., Barraud, N., Webb, J., Kjelleberg, S., Hunt, D. F. & Hasset, D. J. (2008). Proteomic, microarray, and signature-tagged mutagenesis analyses of anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, likely representing chronic, late-stage cystic fibrosis airway conditions. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2739-58.
- Plotnikova, J. M., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2000). Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 124(4), 1766-74.
- Quiñones, B., Pujol, C. J., & Lindow, S. E. (2004). Regulation of AHL production and its contribution to epiphytic fitness in *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(5), 521-31.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G., & Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5219), 1899-902.
- Ramos, L. (2004). *Pseudomonas: virulence and gene regulation*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 553p.
- Rampioni, G., Pustelny, C., Fletcher, M. P., Wright, V. J., Bruce, M., Rumbaugh, K. P., 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. *Environmental microbiology*. 12(6), 1659-73
- Reimann, C., Valverde, C., Kay, E., & Haas, D. (2005). Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology*, 187(1), 276–285.
- Rodrigue, a, Quentin, Y., Lazdunski, a, Méjean, V., & Foglino, M. (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in microbiology*, 8(11), 498-504.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular microbiology*, 29(6), 1321-30.
- Romeo, T, Gong, M., Liu, M. Y., & Brun-Zinkernagel, A M. (1993). Identification and molecular characterization of csrA, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *Journal of bacteriology*, 175(15), 4744-55.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(11), 1209-23.

- Sanjuan, E., Esteve-Gassent, M. D., Maruskova, M., & Seshu, J. (2009). Overexpression of CsrA (BB0184) alters the morphology and antigen profiles of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*, 77(11), 5149-62.
- Schmidt-Eisenlohr, H., & Gast, A. (2003). Inactivation of *gacS* does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. *Applied and environmental*, 69(3), 1817-1826.
- Schuster, M, Urbanowski, M. L., & Greenberg, E. P. (2004). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15833-9.
- Schuster, Martin, Lostroh, C. P., Ogi, T., & Greenberg, E. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of bacteriology*, 185(7), 2066.
- Schuster, Martin, & Greenberg, E. P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC genomics*, 8(287).
- Seed, P. C., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *Journal of bacteriology*, 177(3), 654-9.
- Shedova, E., Lipasova, V., Velikodvorskaya, G., Ovadis, M., Chernin, L., & Khmel, I. (2008). Phytase activity and its regulation in a rhizospheric strain of *Serratia plymuthica*. *Folia microbiologica*, 53(2), 110-4.
- Siehnel, R., Traxler, B., An, D. D., Parsek, M. R., Schaefer, A. L., & Singh, P. K. (2010). A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 1-6.
- Silva, I. J., Saramago, M., Dressaire, C., Domingues, S., Viegas, S. C., & Arraiano, C. M. (2011). Importance and key events of prokaryotic RNA decay: the ultimate fate of an RNA molecule. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2(6), 818-36.
- Simon, R., Prierer, U., & Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *BioTechnology*, 1(9), 784-791.
- Sio, C., Otten, L., Cool, R., & Diggle, S. (2006). Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and*, 74(3), 1673-1682.
- Sonnleitner, E., & Haas, D. (2011). Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Applied microbiology and biotechnology*. 91(1), 63-79

- Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-domenigg, T., Greenberg, E. P., & Bläsi, U. (2006). Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 59(5), 1542-1558.
- Storz, G., Vogel, J., & Wassarman, K. M. (2011). Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. *Molecular Cell*, 43(6), 880-891.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, a L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-64.
- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S. R., & Romeo, T. (2006). Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes & development*, 20(18), 2605. C
- Suzuki, K., Wang, X., & Weilbacher, T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *Journal of*, 184(18), 5130.
- Tendeng, C., Soutourina, O. a, Danchin, A., & Bertin, P. N. (2003). MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 11), 3047-50.
- Timmermans, J., & Van Melderren, L. (2009). Conditional essentiality of the csrA gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 191(5), 1722-4.
- Valente, E., Assis, M. C., Alvim, I. M., Pereira, G. M., & Plotkowski, M. C. (2000). Integration-Proficient *Pseudomonas aeruginosa* Vectors for Isolation of Single-Copy Chromosomal lacZ and lux Gene Fusions. *Microbial pathogenesis*, 29(6), 345-56.
- Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., Péchy-Tarr, M., Cosson, P., Keel, C., Caroff, M. & Lemaitre, B. (2010). Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Applied and environmental microbiology*, 76(3), 910-21.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., & Haas, D. (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1361-1379. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03774.x
- van Delden, C., Comte, R., & Bally, M. (2001). Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5376.
- Ventre, I., & Filloux, A. (2006). Des senseurs pour contrôler le style de vie bactérien : le choix entre infection chronique ou aiguë. *M/S: médecine sciences*, 22(10), 811-814.

- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S. & Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), 171-6.
- Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS microbiology reviews*, 30(2), 274-91.
- Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, E. A., Engstrom, E., Coleman, J. P., & Pesci, E. C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 187(13), 4372.
- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I., & Iglewski, B. H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *Journal of bacteriology*, 185(7), 2080.
- Walker, J. E. (1992). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly reviews of biophysics*, 25(3), 253-324.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Déziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R. & Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant physiology*, 134(1), 320–331.
- Wang, L., Zhang, C., Gong, F., Li, H., Xie, X., Xia, C., Chen, J., Song, Y., Shen, A. & Song, J. (2011). Influence of *Pseudomonas aeruginosa* *pvdQ* Gene on Altering Antibiotic Susceptibility Under Swarming Conditions. *Current microbiology*, 63(4), 377-86.
- Watson, A A, Alm, R. A, & Mattick, J. S. (1996). Construction of improved vectors for protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 172(1), 163-4.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P. & Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 48(3), 657-70.
- Whistler, Cheryl A, Koropatnick, T. A, Pollack, A., Mcfall-Ngai, M. J., & Ruby, E. G. (2007). The GacA global regulator of *Vibrio fischeri* is required for normal host tissue responses that limit subsequent bacterial colonization. *Cellular microbiology*, 9(3), 766-78.
- Whistler, CA. (2003). GacA regulates symbiotic colonization traits of *Vibrio fischeri* and facilitates a beneficial association with an animal host. *Journal of bacteriology*, 185(24), 7202-7212.
- White, D., Hart, M. E., & Romeo, T. (1996). Phylogenetic distribution of the global regulatory gene *csrA* among eubacteria. *Gene*, 182(1-2), 221-223.

- Whiteley, M., Lee, K. M., & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13904-9.
- Whiteley, M., Parsek, M. R. R., & Greenberg, E. P. (2000). Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4356.
- Williams, Paul, & Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 182-191.
- Willis, D., & Holmstadt, J. (2001). Genetic evidence that loss of virulence associated with *gacS* or *gacA* mutations in *Pseudomonas syringae* B728a does not result from effects on alginate production. *Applied and environmental*, 67(3), 1400-1403.
- Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. W., Binkman, F. S. L. (2011). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D596-600.
- Wong, S. M., & Akerley, B. J. (2005). Environmental and genetic regulation of the phosphorylcholine epitope of *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide. *Molecular microbiology*, 55(3), 724-38.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic acids research*, 17(9), 3471-3478.
- Wuichet, K., Cantwell, B. J., & Zhulin, I. B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current opinion in microbiology*, 13(2), 219-25.
- Xiao, G., Déziel, E., He, J., Lépine, F., Lesic, B., Castonguay, M.-H. H., Milot, S., Tampakaki, A. P., Stachel, S. E. & Rahme, L. G. (2006a). MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Molecular microbiology*, 62(6), 1689-99.
- Xiao, G., He, J., & Rahme, L. G. (2006b). Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 6), 1679-86.
- Yakhnin, H., Yakhnin, A. V., Baker, C. S., Sineva, E., Berezin, I., Romeo, T., & Babitzke, P. (2011). Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by E σ (70) and E σ (S) , and indirect transcriptional activation by CsrA. *Molecular microbiology*, 1-16.

- Yamazaki, A., Li, J., Zeng, Q., Khokhani, D., Hutchins, W. C., Yost, A. C., Biddle, E., Toone, E. J., Chen, X. & Yang, C.-H. (2012). Derivatives of plant phenolic compound affect the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* via a GacS-GacA two-component signal transduction system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(1), 36-43.
- Yang, S., Lopez, C. R., & Zechiedrich, E. L. (2006). Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2386-91.
- Yang, W.-feng, Chen, L., Liu, H.-xia, Hu, B.-shi, & Liu, F.-quan. (2007). [Cloning, sequencing and functional study of *gacA* gene from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*]. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, 47(2), 208-12.
- Yeung, A. T. Y., Bains, M., & Hancock, R. E. W. (2011). The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 193(4), 918-31.
- Zhang, X., & Bremer, H. (1995). Control of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter strength by ppGpp. *Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11181.
- Zhu, P. L., Zhao, S., Tang, J. L., & Feng, J. X. (2011). The *rsmA*-like gene *rsmA_{Xoo}* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* regulates bacterial virulence and production of diffusible signal factor. *Molecular plant pathology*, 12(3), 227-237.
- Zhuang, X., Han, Z., Bai, Z., Zhuang, G., & Shim, H. (2010). Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 158(5), 1119-26.

APPENDICE A : SOLUTIONS

Tampon Z, pH=7

Produit	Quantité (1 L)	Molarité (M)
Na ₂ HPO ₄	8,52 g	0,06
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	5,5 g	0,04
KCl	0,75 g	0,01
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,246 g	0,001
B-mercaptoéthanol	2,7 ml	0,05

Le tampon Z est conservé à 4°C.

Tampon phosphate salin pour l'ONPG, pH=7

Produit	Quantité (1 L)	Molarité (M)
Na ₂ HPO ₄	8,52 g	0,06
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	5,5 g	0,04

Le tampon phosphate est conservé à 4°C.

ONPG

Produit	Quantité (50 ml)	Molarité (M)
Tampon phosphate salin	50 ml	1
ONPG	0,2 g	0,067

L'ONPG est conservé à -20°C.

Na₂CO₃

Produit	Quantité (1 L)	Molarité (M)
Na ₂ CO ₃	105,99 g	1

Le Na₂CO₃ est conservé à température pièce.

TBE, pH=8

Produit	Quantité (500ml) 10X	Molarité (M)
Tris	56 g	0,46
Acide borique	27,5 g	0,44
EDTA 0,5M	20 ml	0,0125

APPENDICE B : RÉACTIFS POUR PCR, PROGRAMMES ET AMORCES

Réactifs PCR pour l'amplification de la séquence promotrice et les 7 premiers codons de *rsmA*

Réactif	Volume (µL)
H ₂ O	16,5
Tampon PCR 10X	2,5
DMSO	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
Amorce rsmAF_hindIII	0,5
Amorce rsmAR_hindIII	0,5
Polymérase Taq (0,5 U/µL)	1
Matrice (ADN 100ng)	1

Programme PCR pour l'amplification de la séquence promotrice et les 7 premiers codons de *rsmA*

Nombre de cycle	Température	Temps (min)
1X	95 °C	5 :00
30X	95 °C	0 :30
	52 °C	0 :30
	72 °C	0 :55
1X	72 °C	7 :00
∞	4 °C	∞

Amorces pour la construction des rapporteurs

Nom	Séquence	Tm	Longueur
rsmAF_hindIII	GCTCAAGCTTGTGAGTGACGCTGACAGG	60	28
rsmAR_hindIII	GCTCAAGCTTCCGACGCGTCAGAATCAG	56	28
lacZR	TTATTTTTGACACCAGACCAAC	60	22

Réaction PCR double ronde

1ère ronde

Réactif	Volume (μL) 1 Réaction
Tampon PCR (10X)	1
dNTPs (10mM)	0,2
Amorce P7-1 (10 pmol/ μL)	0,5
Amorce CEKG 2A (10 pmol/ μL)	2
Amorce CEKG 2B (10 pmol/ μL)	1
Amorce CEKG 2C (10 pmol/ μL)	1
H ₂ O (Milli-Q stérile)	2,3
Polymérase TAQ (0,5 U/ μL)	1
ADN	1
Total	10

2ème ronde

Réactif	Volume (μL) 1 Réaction
PCR Buffer (10X)	5
dNTPs (10mM)	1
amorceP7-2 (10pmol/ μL)	2,5
Amorce CEKG4 (10pmol/ μL)	20
H ₂ O (Milli-Q stérile)	9,5
Polymérase Taq (0,5 U/ μL)	2
Produit PCR ronde 1	10
Total	50

Programme PCR

1ère ronde

Nombre de cycle	Température	Temps (min)
1X	95 °C	2 :00
6X	95 °C	0 :30
	30 °C	0 :30
	72 °C	1 :30
30X	95 °C	0 :30
	45 °C	0 :30
	72 °C	2 :00
1X	72 °C	5 :00
∞	4 °C	∞

2ème ronde

Nombre de cycle	Température	Temps (min)
1X	95 °C	1 :00
30X	95 °C	0 :30
	52 °C	0 :30
	72 °C	2 :00
1X	72 °C	5 :00
∞	4 °C	∞

Amorces pour les PCR double ronde

Nom	Séquence	Tm	Longueur
P7-1	CTAACAATTCGTTCAAGCCG	72 °C	20
P7-2	GGATGCGTCTAAAAGCCTGC	72 °C	20
CEKGA	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNAGAG	67 °C	35
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC	73 °C	35
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT	67 °C	35
CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	62 °C	20

Traitement à l'ExoSAP-IT

Réactifs	Volume (µl)
Réaction PCR 2 ^{ème} ronde	10
ExoSAP-IT	4,5

Réaction PCR pour la vérification de l'absence d'ADN dans les extractions d'ARN

Réactifs	Volume (µL)
H ₂ O	16,5
Buffer PCR 10X	2,5
DMSO	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
qrt_rsmAF2	0,5
qrt_rsmAR2	0,5
Polymérase TAQ (0,5 U/µL)	1
Matrice (extraction ARN)	10 (dilution 3 µl ARN dans 27 µL H ₂ O DEPC)

Programme PCR pour la vérification de l'absence ADN dans les extractions d'ARN

Nombre de cycles	Température	Temps (min)
1X	95 °C	5 :00
40X	95 °C	0 :30
	57 °C	0 :30
	72 °C	0 :30
1X	72 °C	7 :00
∞	4 °C	∞

Amorces pour le 5'RACE

Nom	Séquence	Tm	Longueur
GSP1_rsmA2	TAATGGTTTGGCTCTTGATC	53	20
GSP2_rsmA	TTTCTGGATGCGCTGGTAAA	60	20
GSP3_rsmA2	CACCTGGTTCCTTTGACAC	60	20

Programme PCR pour l'amplification de l'ADNc de rsmA pour le 5'RACE

Nombre de cycle	Température	Temps (min)
1X	94 °C	2 :00
40X	94 °C	0 :30
	55 °C	0 :30
	72 °C	1 :00
1X	72 °C	7 :00
∞	4 °C	∞

APPENDICE C : ANALYSE STATISTIQUE AVEC SAS® ANALYTICS

Data Mariane;

```
input Souche T3 T4 T5 T6 T7;  
TRT3=T3/33.0447574680713;  
TRT4=T4/26.4911517533412;  
TRT5=T5/34.0496859246594;  
TRT6=T6/38.3434196755066;  
TRT7=T7/ 35.8922697829537;
```

```
/*"première condition si le temps 6 est absent" */  
if (T6=.) then do;  
if (TRT3>=1 and TRT4>=1 and TRT5>=1) then indice="fort5";  
    else if (TRT3<0.9 and TRT4<0.9 and TRT5<0.9) then indice="faib5";  
  
        else if (TRT3<0.9 and TRT4<0.9 and TRT5>=1) then indice="reta5";  
  
            else if (TRT3>=1 and TRT4<0.9 and TRT5<0.9) then  
indice="dimi5";  
                end;  
/*"deuxième condition si le temps 4 contient une valeur" */  
  
if (T7=.) then do;  
if (TRT3>=1 and TRT5 >=1 and TRT6>=1 and TRT4>=1) then indice="fort6";  
    else if (TRT3<0.9 and TRT4 <0.9 and TRT5<0.9 and TRT6<0.9) then  
indice="faib6";  
        else if (TRT3<0.9 and TRT4<0.9 and TRT6>=1) then indice="reta6";  
            else if (TRT3>=1 and TRT5<0.9 and TRT6 <0.9) then  
indice="dimi6";  
                end;  
  
/*"troisième condition: si le temps 4 = absent et t7 présent" */  
  
if (T4=.) then do;  
if (TRT3>=1 and TRT5 >=1 and TRT6>=1 and TRT7>=1) then indice="fort7";  
    else if (TRT3<0.9 and TRT7 <0.9 and TRT5<0.9 and TRT6<0.9) then  
indice="faib7";  
        else if (TRT3<0.9 and TRT5<0.9 and TRT7>=1) then indice="reta7";  
  
            else if (TRT3>=1 and TRT6<0.9 and TRT7<0.9) then  
indice="dimi7";  
                end;
```

#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
288	24,267	21,677	23,914	43,05	.	0,7344	0,81828	0,7023	1,1228	.	3,37774	reta6	gacS
303	14,974	23,493	27,301	39,032	.	0,4531	0,88684	0,8018	1,018	.	3,15971	reta6	gltB
937	27,848	16,619	34,811	41,294	.	0,8427	0,62734	1,0224	1,0769	.	3,56937	reta6	PA14_33610
666	29,537	12,925	15,074	41,54	.	0,8938	0,48789	0,4427	1,0834	.	2,90778	reta6	PA14_65690
744	23,3	15,607	32,305	39,552	.	0,7051	0,58915	0,9488	1,0315	.	3,27454	reta6	pchF
1023	14,945	16,965	24,022	56,861	.	0,4523	0,64041	0,7055	1,483	.	3,28112	reta6	pvdD
928	20,213	16,257	40,727	38,581	.	0,6117	0,61369	1,1961	1,0062	.	3,42766	reta6	
174	165,04	55,943	50,27	67,833	.	4,9944	2,11175	1,4764	1,7691	.	10,35156	fort6	nuoD
623	86,596	33,244	35,959	50,275	.	2,6206	1,25491	1,0561	1,3112	.	6,24271	fort6	PA14_43730
296	33,659	26,869	38,549	41,516	.	1,0186	1,01425	1,1322	1,0828	.	4,24775	fort6	rien
285	56,236	52,83	43,049	40,501	.	1,7018	1,99426	1,2643	1,0563	.	6,01664	fort6	tatC
114	37,341	47,557	56,267	44,724	.	1,13	1,79519	1,6525	1,1664	.	5,74414	fort6	
151	159,3	60,262	68,505	.	.	4,8207	2,27479	2,0119	.	.	9,1074	fort5	prfA
149	55,265	29,227	36,768	.	.	1,6724	1,10328	1,0798	.	.	3,85554	fort5	
165	94,675	29,127	37,207	.	.	2,865	1,09951	1,0927	.	.	5,05726	fort5	
230	34,37	29,181	46,851	.	.	1,0401	1,10153	1,376	.	.	3,51761	fort5	
563	15,859	.	5,376	5,104	6,5825	0,4799	.	0,1579	0,1331	0,1834	0,95433	faib7	LasR
584	23,429	.	4,6633	7,983	11,412	0,709	.	0,137	0,2082	0,318	1,37213	faib7	LasR
510	22,208	.	25,216	26,537	24,81	0,672	.	0,7406	0,6921	0,6912	2,79591	faib7	mexC
513	20,662	.	29,326	29,311	27,316	0,6253	.	0,8613	0,7644	0,7611	3,01203	faib7	mvfR
582	16,222	.	19,107	17,833	16,326	0,4909	.	0,5611	0,4651	0,4549	1,97201	faib7	PA14_44560
556	18,061	.	27,588	22,239	25,757	0,5466	.	0,8102	0,58	0,7176	2,65442	faib7	PA14_47130
531	27,012	.	25,095	28,389	28,485	0,8175	.	0,737	0,7404	0,7936	3,08847	faib7	pqsA
852	26,37	12,337	21,226	22,579	.	0,798	0,46571	0,6234	0,5889	.	2,47598	faib6	cheR
338	25,67	16,276	28,274	20,799	.	0,7768	0,61441	0,8304	0,5424	.	2,76404	faib6	clipS
933	21,764	20,923	22,098	25,602	.	0,6586	0,78981	0,649	0,6677	.	2,7651	faib6	fpvA

#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
1009	21,02	19,465	19,536	28,259	.	0,6361	0,73476	0,5738	0,737	.	2,68162	faib6	hrpA
723	27,737	9,7959	29,253	18,801	.	0,8394	0,36978	0,8591	0,4903	.	2,55858	faib6	intergenic
199	1,25	0,1138	0,0707	0,0723	.	0,0378	0,0043	0,0021	0,0019	.	0,04609	faib6	lacZ
476	0,51	0,1406	0,235	0,2279	.	0,0154	0,00531	0,0069	0,0059	.	0,03358	faib6	lacZ
618	0,254	0,0618	0,1109	0,3332	.	0,0077	0,00233	0,0033	0,0087	.	0,02195	faib6	lacZ
679	1,794	0,1465	1,14	0,2671	.	0,0543	0,00553	0,0335	0,007	.	0,10026	faib6	lacZ
785	0,589	0,1793	0,2269	0,4354	.	0,0178	0,00677	0,0067	0,0114	.	0,04263	faib6	lacZ
279	15,994	8,5843	6,5424	10,531	.	0,484	0,32404	0,1921	0,2746	.	1,27482	faib6	lasR
696	18,105	8,4801	.	7,3539	.	0,5479	0,32011	.	0,1918	.	1,05981	faib6	LasR
697	19,389	7,6948	5,497	6,7793	.	0,5867	0,29047	0,1614	0,1768	.	1,21545	faib6	LasR
704	29,531	7,5867	10,838	8,1747	.	0,8937	0,28639	0,3183	0,2132	.	1,71155	faib6	LasR
824	15,428	8,0354	8,4449	5,9315	.	0,4669	0,30332	0,248	0,1547	.	1,17293	faib6	LasR
872	15,076	8,8911	10,484	13,271	.	0,4562	0,33562	0,3079	0,3461	.	1,44586	faib6	LasR
973	13,535	4,0742	10,308	11,087	.	0,4096	0,15379	0,3028	0,2891	.	1,15526	faib6	LasR
39	16,242	4,9315	8,3799	1,2952	.	0,4915	0,18616	0,2461	0,0338	.	0,95755	faib6	nuoG
74	12,889	7,4871	1,1472	15,115	.	0,39	0,28263	0,0337	0,3942	.	1,10055	faib6	nuoG
134	15,663	12,008	15,176	14,074	.	0,474	0,45327	0,4457	0,367	.	1,74	faib6	nuoG
256	18,853	16,091	8,7747	8,6278	.	0,5705	0,60741	0,2577	0,225	.	1,66063	faib6	nuoG
883	19,261	12,887	8,146	13,048	.	0,5829	0,48647	0,2392	0,3403	.	1,64888	faib6	nuoG
906	17,773	14,119	17,853	13,166	.	0,5379	0,53297	0,5243	0,3434	.	1,9385	faib6	nuoG
122	18,467	11,043	12,472	17,136	.	0,5589	0,41686	0,3663	0,4469	.	1,7889	faib6	nuoL
629	13,587	8,0782	9,6526	12,304	.	0,4112	0,30494	0,2835	0,3209	.	1,32048	faib6	nuoL
907	12,262	13,299	8,0891	12,846	.	0,3711	0,502	0,2376	0,335	.	1,44569	faib6	nuoL
126	25,375	16,014	17,875	18,777	.	0,7679	0,60449	0,525	0,4897	.	2,38705	faib6	nuoN
127	20,576	14,06	12,694	20,285	.	0,6227	0,53074	0,3728	0,529	.	2,05525	faib6	nuoN
768	24,827	16,023	17,972	25,13	.	0,7513	0,60486	0,5278	0,6554	.	2,5394	faib6	PA14_28730

#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
15	8,909	4,0211	1,783	21,222	.	0,2696	0,15179	0,0524	0,5535	.	1,02724	faib6	PA14_30100
268	21,631	11,204	11,437	27,363	.	0,6546	0,42295	0,3359	0,7136	.	2,12705	faib6	PA14_30100
351	23,539	15,954	20,905	33,958	.	0,7123	0,60225	0,6139	0,8856	.	2,81416	faib6	PA14_33610
940	16,722	11,206	18,759	19,891	.	0,506	0,423	0,5509	0,5188	.	1,99874	faib6	PA14_54660
913	17,088	8,098	10,093	7,0152	.	0,5171	0,30569	0,2964	0,183	.	1,30219	faib6	PA14_56730
988	24,758	20,056	19,321	29,115	.	0,7492	0,7571	0,5674	0,7593	.	2,83307	faib6	PA14_69070
974	27,632	19,651	29,582	32,483	.	0,8362	0,74178	0,8688	0,8472	.	3,29391	faib6	PA14_69090
987	21,663	19,257	26,376	26,414	.	0,6556	0,72692	0,7746	0,6889	.	2,84601	faib6	pas séquence
742	26,846	12,37	26,918	31,166	.	0,8124	0,46694	0,7906	0,8128	.	2,88272	faib6	pchB
745	27,425	17,28	28,353	25,593	.	0,8299	0,6523	0,8327	0,6675	.	2,98241	faib6	pchF
791	26,649	17,974	21,232	13,77	.	0,8065	0,67849	0,6236	0,3591	.	2,46762	faib6	PchR
780	3,197	0,251	0,4796	0,3448	.	0,0968	0,00947	0,0141	0,009	.	0,1293	faib6	PctB
941	9,506	15,423	24,395	28,602	.	0,2877	0,58221	0,7165	0,7459	.	2,33226	faib6	phnK
978	26,117	23,817	25,937	31,003	.	0,7904	0,89905	0,7618	0,8086	.	3,25972	faib6	piIO
1024	29,583	23,193	20,004	31,3	.	0,8952	0,8755	0,5875	0,8163	.	3,17454	faib6	piIP
88	17,37	12,293	7,9354	25,013	.	0,5257	0,46404	0,2331	0,6523	.	1,87507	faib6	ptsP
719	21,802	16,865	18,232	30,078	.	0,6598	0,63663	0,5355	0,7845	.	2,6163	faib6	pvdQ
947	25,104	10,021	15,562	19,167	.	0,7597	0,37826	0,457	0,4999	.	2,09483	faib6	rhIR
320	20,978	15,997	22,667	30,002	.	0,6348	0,60386	0,6657	0,7825	.	2,68685	faib6	rtuD
712	20,246	7,4057	9,2409	9,2496	.	0,6127	0,27956	0,2714	0,2412	.	1,40488	faib6	TrbJ
389	21,726	16,085	15,643	13,387	.	0,6575	0,60718	0,4594	0,3491	.	2,07321	faib6	uvrD
314	27,249	15,509	21,487	21,231	.	0,8246	0,58544	0,631	0,5537	.	2,59481	faib6	vfr
889	24,673	20,212	25,083	24,2	.	0,7467	0,76298	0,7367	0,6311	.	2,87744	faib6	wbpM
65	21,182	21,897	9,3481	31,017	.	0,641	0,82657	0,2745	0,8089	.	2,55103	faib6	
78	8,062	3,6836	15,803	8,9634	.	0,244	0,13905	0,4641	0,2338	.	1,0809	faib6	

#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
267	19,733	23,567	22,622	26,17	.	0,5972	0,88962	0,6644	0,6825	.	2,83366	faib6	
309	20,681	20,945	22,067	20,231	.	0,6258	0,79065	0,6481	0,5276	.	2,59219	faib6	
438	25,754	20,707	28,749	34,207	.	0,7794	0,78166	0,8443	0,8921	.	3,29748	faib6	
440	19,672	17,559	27,232	30,168	.	0,5953	0,66281	0,7998	0,7868	.	2,84468	faib6	
914	22,365	16,926	29,668	25,597	.	0,6768	0,63891	0,8713	0,6676	.	2,85459	faib6	
599	55,718	.	28,948	25,396	12,752	1,6861	.	0,8502	0,6623	0,3553	3,55394	dimi7	intergenic
523	38,196	.	32,789	21,35	28,002	1,1559	.	0,963	0,5568	0,7802	3,45584	dimi7	nuoE
551	39,129	.	12,561	15,116	12,456	1,1841	.	0,3689	0,3942	0,3471	2,29429	dimi7	nuoG
555	33,206	.	25,131	30,191	22,955	1,0049	.	0,7381	0,7874	0,6396	3,16989	dimi7	PA14_58360
579	42,259	.	28,586	24,885	23,481	1,2788	.	0,8395	0,649	0,6542	3,42156	dimi7	pvdA
568	40,056	.	22,661	28,128	21,642	1,2122	.	0,6655	0,7336	0,603	3,21425	dimi7	pvdQ
530	20,409	10,895	22,7797	19,658	.	1,0271	0,58421	0,8142	0,6524	.	3,0779	dimi6	pqsh
269	58,619	26,766	8,8136	10,668	.	1,7739	1,01038	0,2588	0,2782	.	3,32138	dimi6	gidA
1035	39,828	21,755	24,759	31,33	.	1,2053	0,8212	0,7272	0,8171	.	3,5707	dimi6	hmgA
680	34,294	13,376	23,062	22,887	.	1,0378	0,50493	0,6773	0,5969	.	2,8169	dimi6	hrpA
663	37,411	18,294	18,87	26,317	.	1,1321	0,69056	0,5542	0,6863	.	3,06323	dimi6	intergenic
776	34,079	15,267	27,971	23,209	.	1,0313	0,5763	0,8215	0,6053	.	3,03436	dimi6	intergenic
203	88,127	31,047	26,088	34,471	.	2,6669	1,17197	0,7662	0,899	.	5,50404	dimi6	kynB
346	49,911	16,249	20,984	30,546	.	1,5104	0,61339	0,6163	0,7966	.	3,53672	dimi6	ltaA
741	35,196	14,764	28,038	29,279	.	1,0651	0,55732	0,8235	0,7636	.	3,20947	dimi6	nasC
601	36,731	30,762	18,865	27,01	.	1,1116	1,16121	0,554	0,7044	.	3,53123	dimi6	nuoD
167	36,676	27,181	26,568	23,222	.	1,1099	1,02603	0,7803	0,6056	.	3,52179	dimi6	nuoG
275	34,883	18,739	4,1736	7,6855	.	1,0556	0,70736	0,1226	0,2004	.	2,08599	dimi6	nuoG
504	34,807	10,296	12,209	9,7527	.	1,0533	0,38865	0,3586	0,2544	.	2,05487	dimi6	nuoG
354	39,985	17,573	27,942	32,15	.	1,21	0,66334	0,8206	0,8385	.	3,53246	dimi6	PA14_01020
708	39,978	4,7305	27,481	18,941	.	1,2098	0,17857	0,8071	0,494	.	2,68945	dimi6	PA14_14570

#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
771	39,908	13,694	21,942	26,415	.	1,2077	0,51694	0,6444	0,6889	.	3,05791	dimi6	PA14_26930
857	36,651	15,498	27,235	29,544	.	1,1091	0,58504	0,7999	0,7705	.	3,26455	dimi6	PA14_43650
304	48,074	14,084	28,248	12,727	.	1,4548	0,53164	0,8296	0,3319	.	3,14798	dimi6	PA14_57480
380	33,175	17,338	21,912	33,934	.	1,004	0,65449	0,6435	0,885	.	3,18698	dimi6	PA14_58930
652	45,953	22,444	28,966	22,746	.	1,3906	0,84722	0,8507	0,5932	.	3,68177	dimi6	PA14_70860
935	34,016	14,174	28,296	25,602	.	1,0294	0,53503	0,831	0,6677	.	3,06313	dimi6	pas blast
674	61,413	19,329	30,408	24,375	.	1,8585	0,72963	0,893	0,6357	.	4,11687	dimi6	pas séquence
1038	39,124	22,113	28,872	33,6	.	1,184	0,83473	0,8479	0,8763	.	3,74292	dimi6	pas séquence
395	37,98	19,845	21,97	14,076	.	1,1494	0,74913	0,6452	0,3671	.	2,91082	dimi6	pas séquence; pas match
487	34,972	43,732	23,975	19,168	.	1,0583	1,6508	0,7041	0,4999	.	3,91313	dimi6	pas séquence; pas match
736	51,032	22,912	29,565	26,984	.	1,5443	0,86489	0,8683	0,7038	.	3,98125	dimi6	pchB
813	38,903	13,32	17,97	26,408	.	1,1773	0,5028	0,5278	0,6887	.	2,89656	dimi6	pchE
387	48,414	24,247	23,891	13,528	.	1,4651	0,91527	0,7016	0,3528	.	3,43483	dimi6	pchF
958	37,827	12,686	15,865	29,775	.	1,1447	0,47888	0,4659	0,7765	.	2,86604	dimi6	ppx
667	37,874	10,878	24,159	33,996	.	1,1461	0,41061	0,7095	0,8866	.	3,15289	dimi6	pvdJ
1001	44,261	13,54	19,831	19,493	.	1,3394	0,51111	0,5824	0,5084	.	2,94132	dimi6	rpmE
231	52,571	28,808	26,532	13,91	.	1,5909	1,08747	0,7792	0,3628	.	3,82037	dimi6	rRNA-23s
681	85,47	22,291	23,587	18,234	.	2,5865	0,84145	0,6927	0,4755	.	4,59619	dimi6	rRNA-23s
600	63,849	36,127	25,412	33,795	.	1,9322	1,36373	0,7463	0,8814	.	4,92362	dimi6	rumA
212	65,184	11,073	13,649	25,299	.	1,9726	0,41798	0,4009	0,6598	.	3,45127	dimi6	
228	41,328	7,788	11,339	13,947	.	1,2507	0,29398	0,333	0,3637	.	2,24139	dimi6	

#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
234	33,746	31,396	29,297	31,15	.	1,0212	1,18516	0,8604	0,8124	.	3,8792	dimi6	
276	53,833	23,049	22,104	26,775	.	1,6291	0,87004	0,6492	0,6983	.	3,84662	dimi6	
316	46,007	18,154	18,769	33,573	.	1,3923	0,6853	0,5512	0,8756	.	3,50438	dimi6	
365	37,543	20,693	25,309	25,971	.	1,1361	0,78112	0,7433	0,6773	.	3,33785	dimi6	
904	114,12	13,428	19,836	21,185	.	3,4534	0,50687	0,5826	0,5525	.	5,09538	dimi6	
945	39,014	14,225	28,119	30,853	.	1,1806	0,53698	0,8258	0,8047	.	3,34807	dimi6	
2	62,232	48,999	24	48,484	.	1,8833	1,84964	0,7049	1,2645	.	5,70224	WT	cc4
777	44,15	12,421	32,759	39,571	.	1,3361	0,46887	0,9621	1,032	.	3,79905	WT	cysQ
515	18,16	.	31,034	21,798	21,907	0,5496	.	0,9114	0,5685	0,6104	2,63986	WT	flgE
977	18,511	26,371	27,695	29,115	.	0,5602	0,99545	0,8134	0,7593	.	3,12832	WT	hutG
376	25,783	26,622	21,847	15,67	.	0,7802	1,00493	0,6416	0,4087	.	2,83547	WT	mexI
761	47,511	19,673	37,616	30,979	.	1,4378	0,74262	1,1047	0,8079	.	4,09306	WT	nuoD
228	30,092	16,976	15,129	.	.	0,9106	0,64082	0,4443	.	.	1,99577	WT	nuoG
179	31,25	21,241	26,255	20,173	.	0,9457	0,80182	0,7711	0,5261	.	3,04469	WT	nuoJ
1056	32,09	24,409	26,322	32,802	.	0,9711	0,92141	0,7731	0,8555	.	3,52104	WT	PA14_05300
362	36,281	33,982	40,559	29,371	.	1,0979	1,28276	1,1912	0,766	.	4,33784	WT	PA14_18640
753	32,124	17,56	24,482	27,902	.	0,9721	0,66287	0,719	0,7277	.	3,08168	WT	PA14_23240
163	49,147	12,908	49,361	.	.	1,4873	0,48725	1,4497	.	.	3,42418	WT	PA14_30100
249	61,136	45,956	30,865	82,123	.	1,8501	1,73476	0,9065	2,1418	.	6,63309	WT	PA14_44370
602	68,397	45,292	30,992	56,961	.	2,0698	1,7097	0,9102	1,4856	.	6,17527	WT	PA14_44440
350	20,467	21,629	26,643	35,327	.	0,6194	0,81644	0,7825	0,9213	.	3,13961	WT	PA14_44910
662	32,633	26,455	26,305	20,728	.	0,9875	0,99864	0,7725	0,5406	.	3,2993	WT	PA14_50700
524	25,404	.	33,094	30,783	12,51	0,7688	.	0,9719	0,8028	0,3486	2,8921	WT	PA14_57650
720	45,269	14,763	24,975	35,76	.	1,3699	0,55729	0,7335	0,9326	.	3,59334	WT	PA14_59230
532	43,184	.	20,317	35,284	31,076	1,3069	.	0,5967	0,9202	0,8658	3,68956	WT	pas match blast

#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
361	64,388	14,946	18,695	34,607		1,9485	0,5642	0,5491	0,9026		3,96431	WT	pas séquence
355	30,762	14,26	14,613	32,527		0,9309	0,53829	0,4292	0,8483		2,74669	WT	pchC
567	25,945		18,565	65,437	31,336	0,7851		0,5452	1,7066	0,8731	3,91003	WT	pchE
501	22,05	25,238	17,823			0,6673	0,9527	0,5235			2,14344	WT	pilY1
897	32,613	20,676	23,377	23,692		0,9869	0,78049	0,6866	0,6179		3,07188	WT	psIM
811	25,541	16,995	31,082	21,754		0,7729	0,64155	0,9128	0,5673		2,89464	WT	pvdD
1037	45,907	15,121	26,32	42,887		1,3892	0,57079	0,773	1,1185		3,85151	WT	pvdL
564	30,641		30,04	26,157	22,698	0,9273		0,8822	0,6822	0,6324	3,12404	WT	pvdQ
847	29,87	13,689	21,411	22,768		0,9039	0,51674	0,6288	0,5938		2,64326	WT	pvdQ
467	10,965	32,989	28,598	21,335		0,3318	1,24527	0,8399	0,5564		2,97339	WT	repA
291	37,558	16,801	42,793	33,005		1,1366	0,63422	1,2568	0,8608		3,88835	WT	rien
300	79,12	23,123	28,024	34,702		2,3943	0,87286	0,823	0,905		4,99527	WT	rien
305	31,743	19,414	22,881	38,689		0,9606	0,73283	0,672	1,009		3,37443	WT	rph
1012	52,847	94,956	28,444	41,115		1,5993	3,58443	0,8354	1,0723		7,09136	WT	rRNA-23s
299	14,004	35,033	12,787	30,899		0,4238	1,32245	0,3755	0,8059		2,92761	WT	trmE
1058	112,63	21,196	17,431	37,738		3,4085	0,80012	0,5119	0,9842		5,70474	WT	ydjA
1.PA14	33,045	26,491	34,05	38,343	35,892	1	1	1	1	1	5	WT	PA14 wt
28	6,605	6,1655	32,544	11,609		0,1999	0,23274	0,9558	0,3028		1,69116	WT	
89	16,489	10,132	34,107	23,844		0,499	0,38247	1,0017	0,6219		2,505	WT	
90	59,527	32,618	17,635	34,825		1,8014	1,23127	0,5179	0,9082		4,4588	WT	
111	33,01	57,396	21,713	59,428		0,999	2,16661	0,6377	1,5499		5,35312	WT	
133	33,361	20,138	34,154	37,945		1,0096	0,76019	1,0031	0,9896		3,76245	WT	
137	24,133	24,988	37,096	31,297		0,7303	0,94326	1,0895	0,8162		3,57927	WT	
138	46,933	21,758	25,092	47,756		1,4203	0,82135	0,7369	1,2455		4,22406	WT	
147	44,413	24,904	37,515	44,526		1,344	0,94008	1,1018	1,1613		4,54711	WT	

#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
148	38,043	25,755	31,535	.	.	1,1513	0,97222	0,9261	.	.	3,04961	WT	
162	60,262	31,497	32,574	.	.	1,8236	1,18895	0,9567	.	.	3,96924	WT	
180	57,088	39,856	32,015	37,518	.	1,7276	1,50448	0,9402	0,9785	.	5,15076	WT	
201	170,92	44,213	31,633	.	.	5,1723	1,66898	0,929	.	.	7,77032	WT	
211	27,18	27,493	50,413	.	.	0,8225	1,03781	1,4806	.	.	3,3409	WT	
217	35,01	23,223	43,415	.	.	1,0595	0,87663	1,2751	.	.	3,21115	WT	
219	23,65	22,026	33,908	.	.	0,7157	0,83145	0,9959	.	.	2,54298	WT	
229	28,873	30,155	35,767	.	.	0,8738	1,13829	1,0505	.	.	3,06249	WT	
240	32,029	27,918	38,773	28,186	.	0,9693	1,05387	1,1387	0,7351	.	3,89696	WT	
248	51,232	28,693	33,174	25,466	.	1,5504	1,0831	0,9743	0,6642	.	4,27191	WT	
259	27,363	31,703	25,202	25,55	.	0,8281	1,19672	0,7401	0,6663	.	3,43124	WT	
270	30,251	27,659	44,356	26,25	.	0,9155	1,04407	1,3027	0,6846	.	3,9468	WT	
272	30,323	22,156	24,743	26,435	.	0,9176	0,83634	0,7267	0,6894	.	3,17008	WT	
273	29,273	39,745	24,431	22,921	.	0,8859	1,50031	0,7175	0,5978	.	3,70144	WT	
321	12,842	42,833	49,403	18,127	.	0,3886	1,61689	1,4509	0,4727	.	3,92916	WT	
323	51,939	19,194	28,099	39,593	.	1,5718	0,72456	0,8252	1,0326	.	4,15417	WT	
331	33,323	15,254	30,092	37,533	.	1,0084	0,57582	0,8838	0,9789	.	3,4469	WT	
364	40,588	25,697	39,893	26,824	.	1,2283	0,97002	1,1716	0,6996	.	4,0695	WT	
370	25,798	21,899	31,478	28,055	.	0,7807	0,82665	0,9245	0,7317	.	3,2635	WT	
424	35,816	33,529	36,731	15,041	.	1,0839	1,26565	1,0788	0,3923	.	3,82055	WT	
439	24,093	19,283	32,349	34,943	.	0,7291	0,72792	0,9501	0,9113	.	3,31836	WT	
457	30,627	18,744	24,001	25,086	.	0,9268	0,70755	0,7049	0,6543	.	2,99352	WT	
464	17,915	20,144	31,315	29,042	.	0,5422	0,7604	0,9197	0,7574	.	2,97966	WT	
470	38,224	35,82	31,218	19,415	.	1,1567	1,35215	0,9169	0,5064	.	3,93209	WT	
550	24,734	.	35,55	26,321	33,644	0,7485	.	1,0441	0,6865	0,9374	3,41639	WT	
566	85,455	.	22,821	27,959	46,692	2,586	.	0,6702	0,7292	1,3009	5,2863	WT	

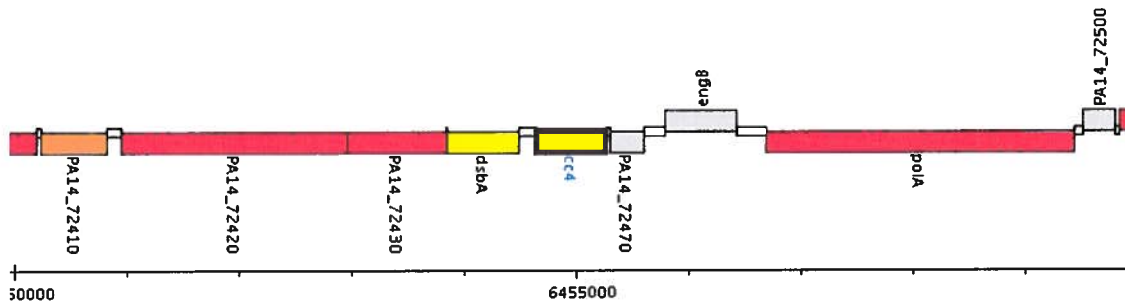
#mutant	T3	T4	T5	T6	T7	TRT3	TRT4	TRT5	TRT6	TRT7	TTRT	indice	Gène
728	51,979	16,491	37,981	13,772	.	1,573	0,62251	1,1155	0,3592	.	3,67013	WT	
751	45,311	23,969	34,562	27,953	.	1,3712	0,90478	1,015	0,729	.	4,02005	WT	
754	33,743	16,045	31,303	21,336	.	1,0211	0,60569	0,9193	0,5565	.	3,10259	WT	
861	44,426	18,666	32,594	24,054	.	1,3444	0,70461	0,9572	0,6273	.	3,6336	WT	
864	26,731	25,801	29,079	39,232	.	0,8089	0,97394	0,854	1,0232	.	3,66005	WT	
880	21,11	19,522	38,544	31,516	.	0,6388	0,73694	1,132	0,8219	.	3,3297	WT	
882	39,092	25,306	28,014	37,914	.	1,183	0,95525	0,8227	0,9888	.	3,94981	WT	
929	28,671	20,375	24,724	37,711	.	0,8676	0,76911	0,7261	0,9835	.	3,34638	WT	
949	42,133	15,819	32,765	33,709	.	1,275	0,59713	0,9623	0,8791	.	3,71356	WT	
1027	48,689	17,452	28,782	43,358	.	1,4734	0,65877	0,8453	1,1308	.	4,10824	WT	
150	39,825	20,378	55,759	.	.	1,2052	0,76924	1,6376	.	.	3,612	WT	lepA

T = ratio T : unité Miller/croissance (DO₆₀₀) à 3h, 4h, 5h, 6h, 7h; TRT = ratio T mutant/ratio T WT; TTRT = somme des TRT, indice = catégorie

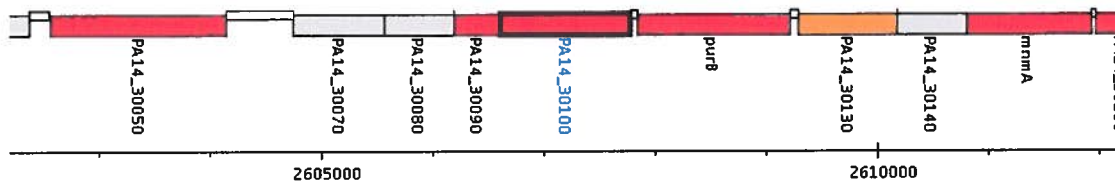
APPENDICE D : CONTEXTE GÉNOMIQUE DE L'INSERTION DES TRANSPOSONS

Contexte d'insertion des transposons. Les données ont été prises sur le site www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2011). Les gènes inactivés sont indiqués par un cadre en trait épais.

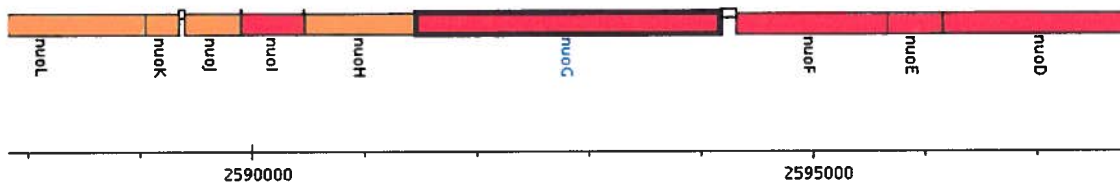
Mutant#2



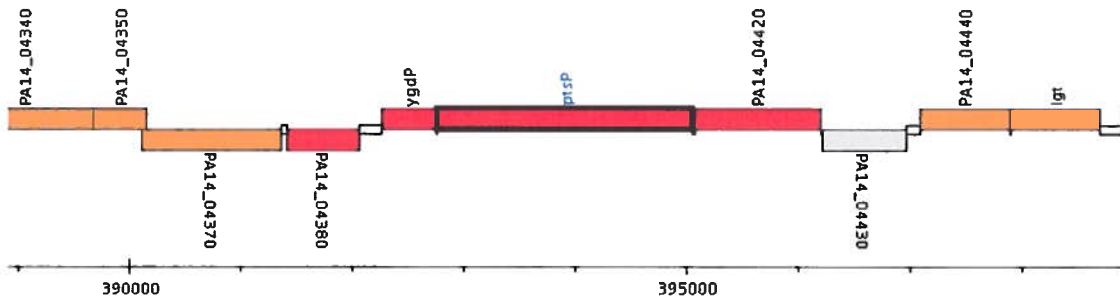
Mutant#15, 163, 268



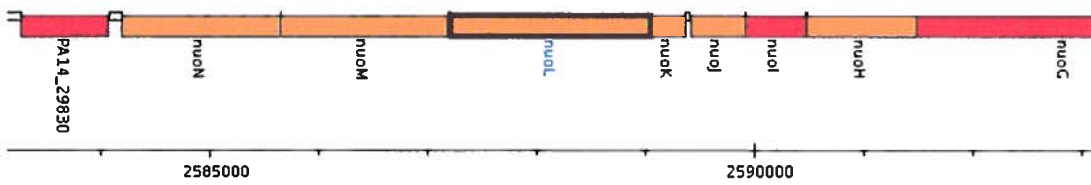
Mutant#39, 74, 134, 167, 228, 256, 275, 504, 551, 883, 906



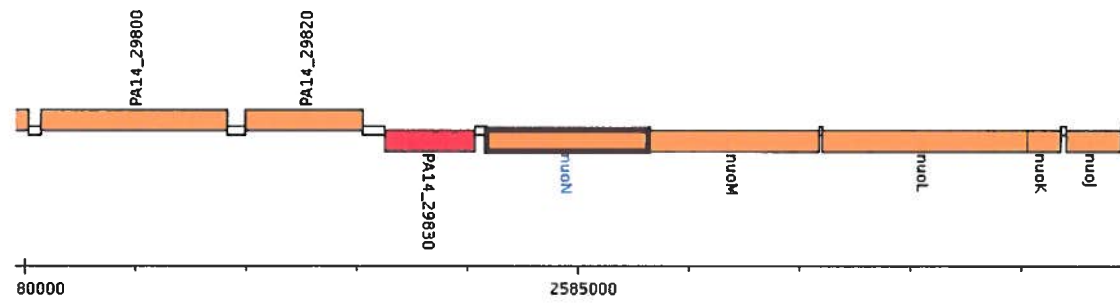
Mutant#88



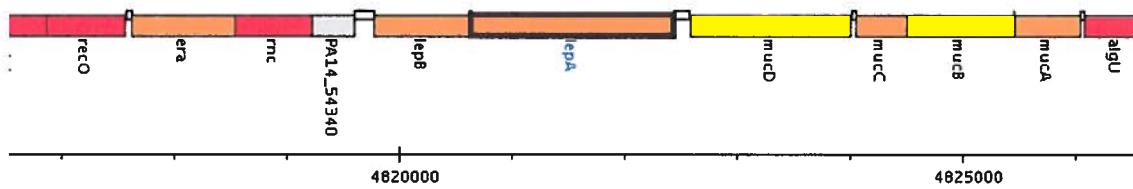
Mutant#122, 629 et 907



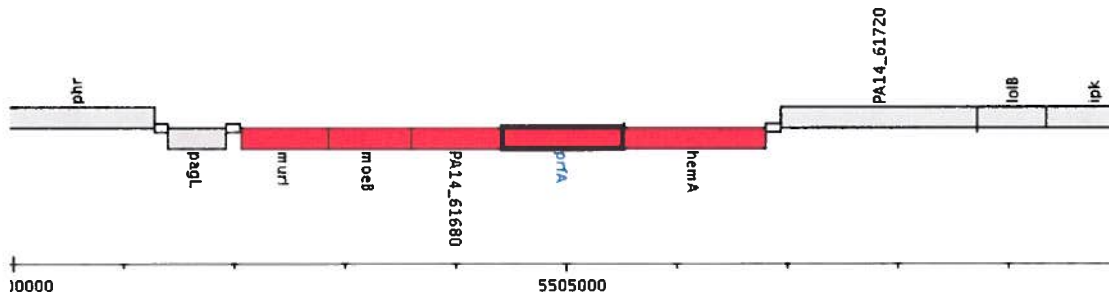
Mutant#126 et 127



Mutant#150



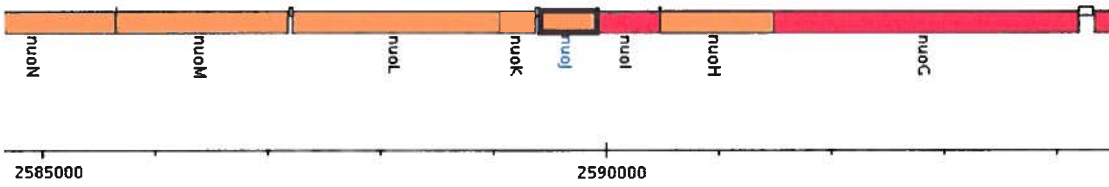
Mutant#151



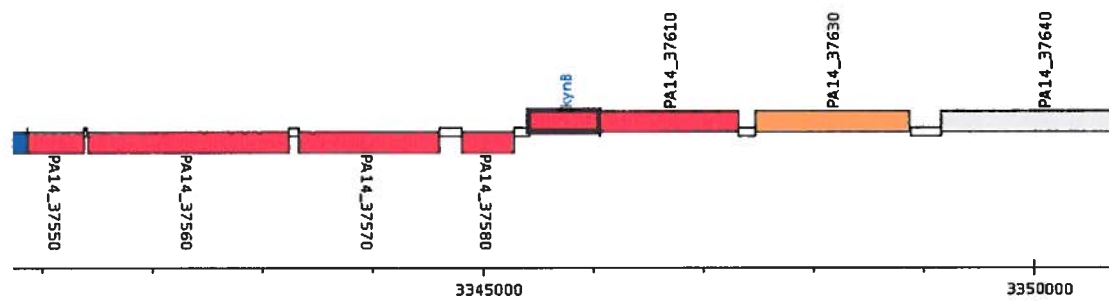
Mutant#174, 601 et 761



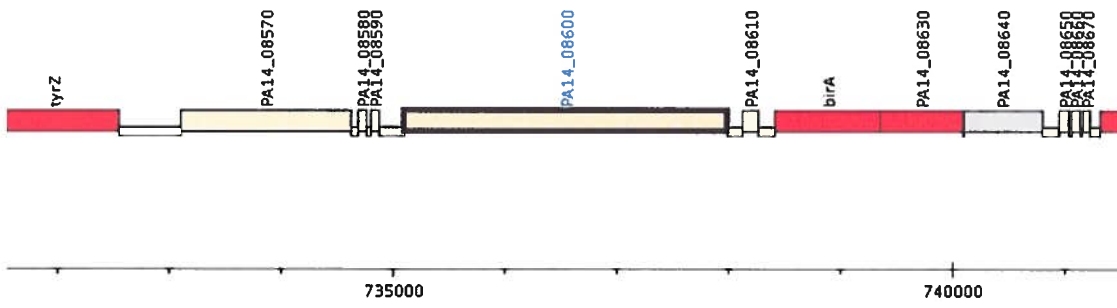
Mutant#179



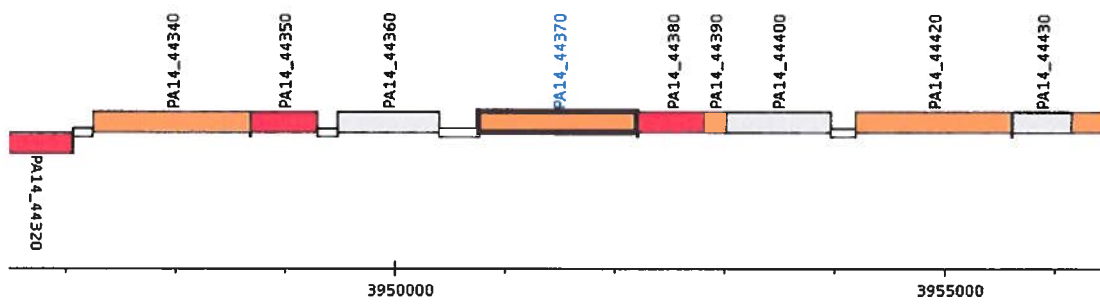
Mutant#203



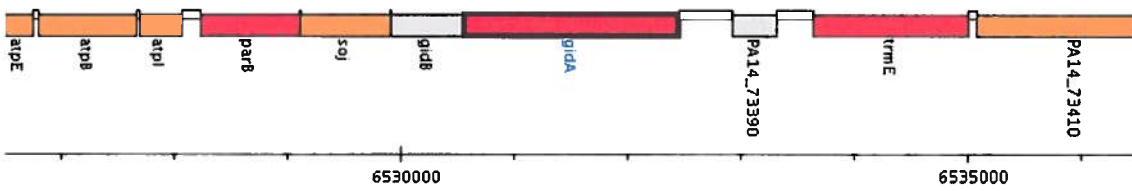
Mutant#231, 681 et 1012



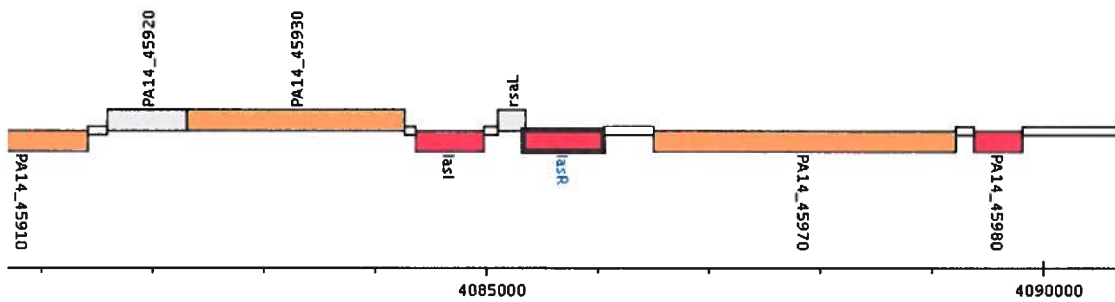
Mutant#249



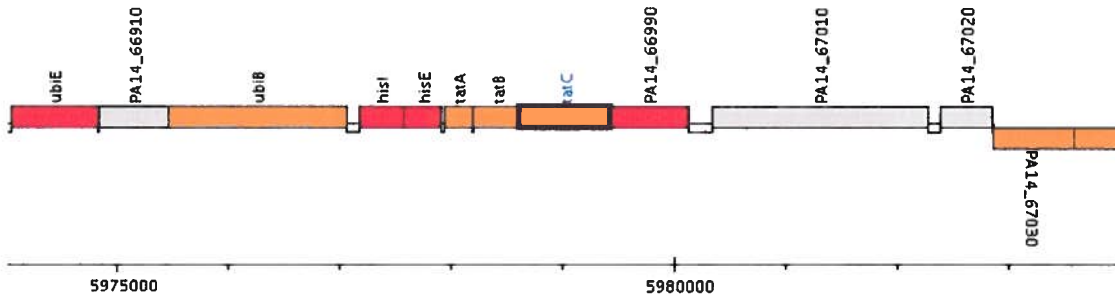
Mutant#269



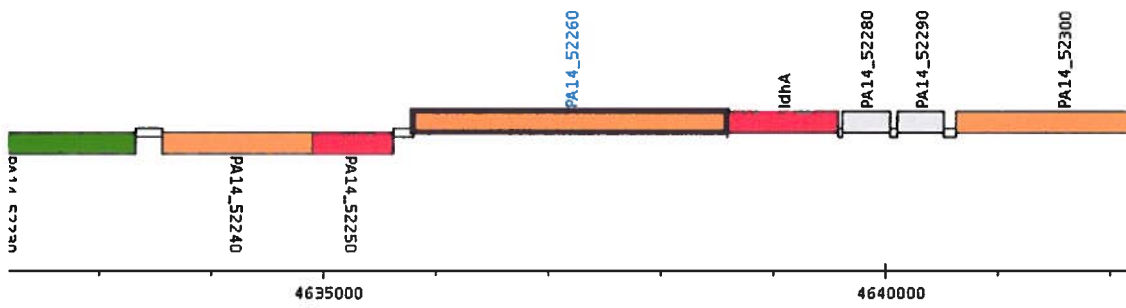
Mutant#279, 563, 584, 696, 697, 704, 824, 872 et 973



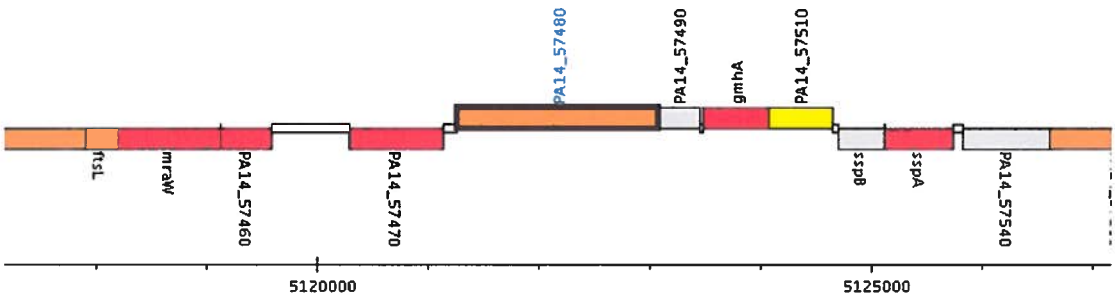
Mutant#285



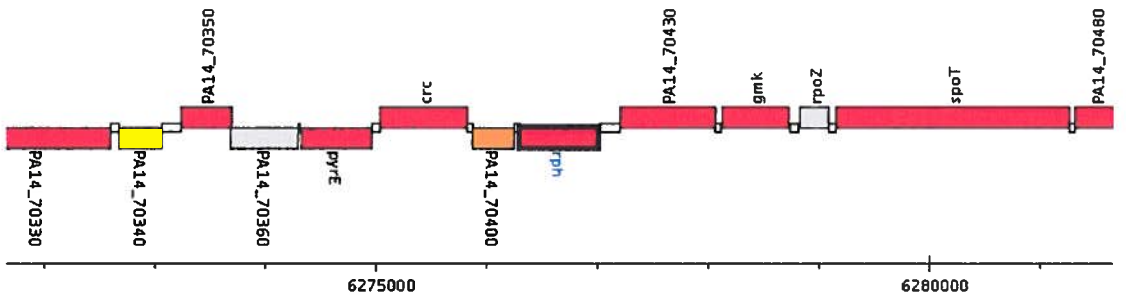
Mutant#288



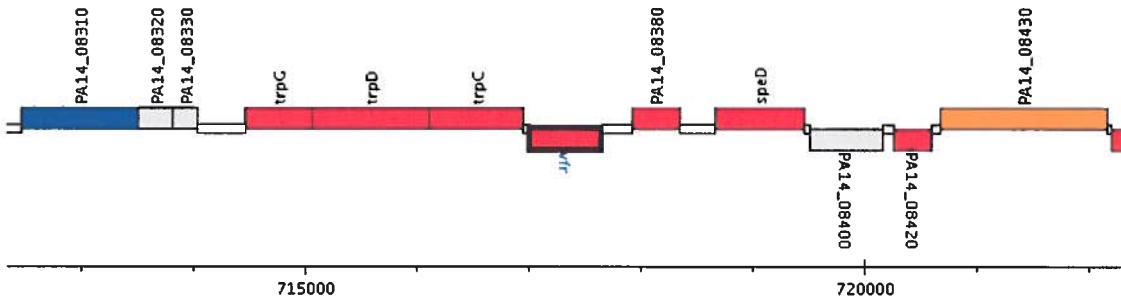
Mutant#304



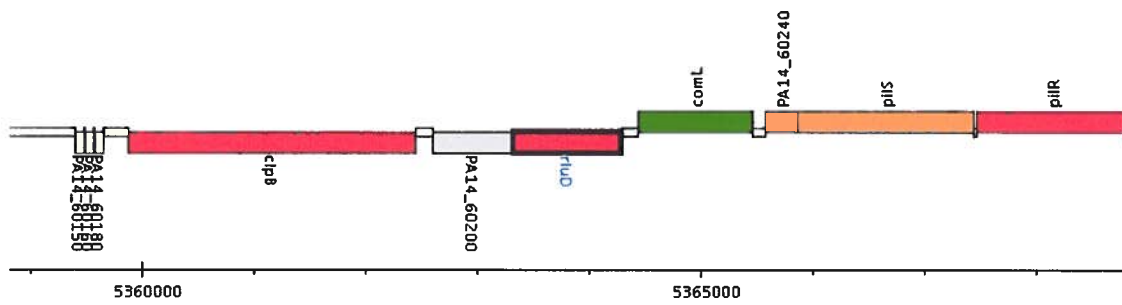
Mutant#305



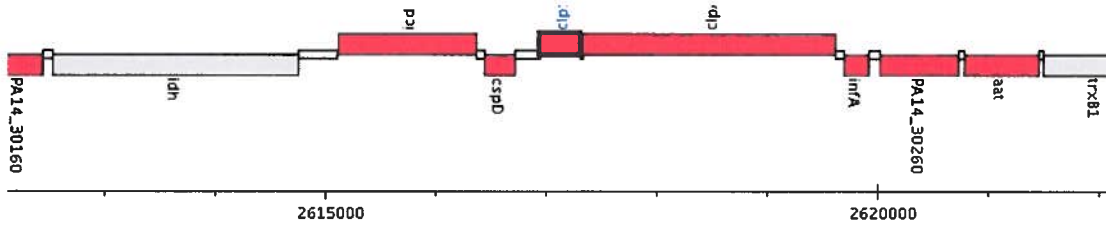
Mutant#314



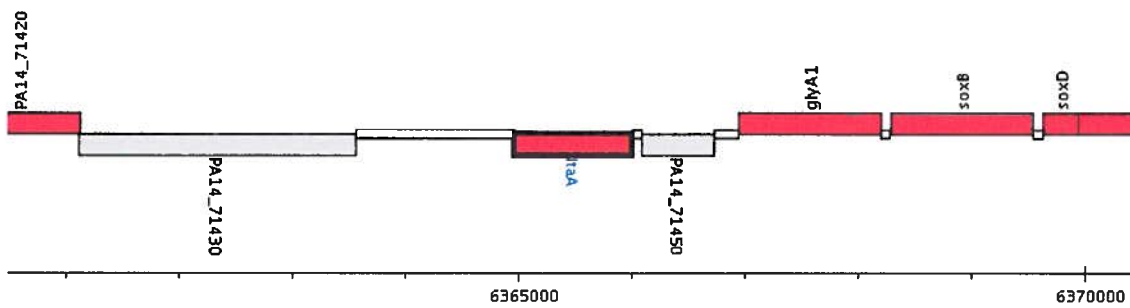
Mutant#320



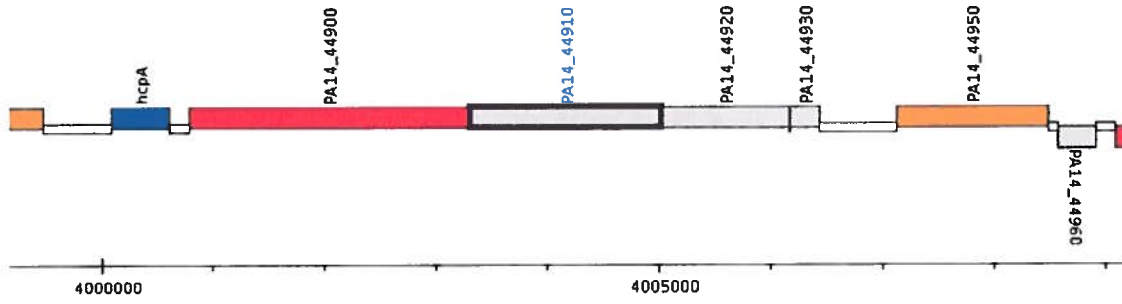
Mutant#338



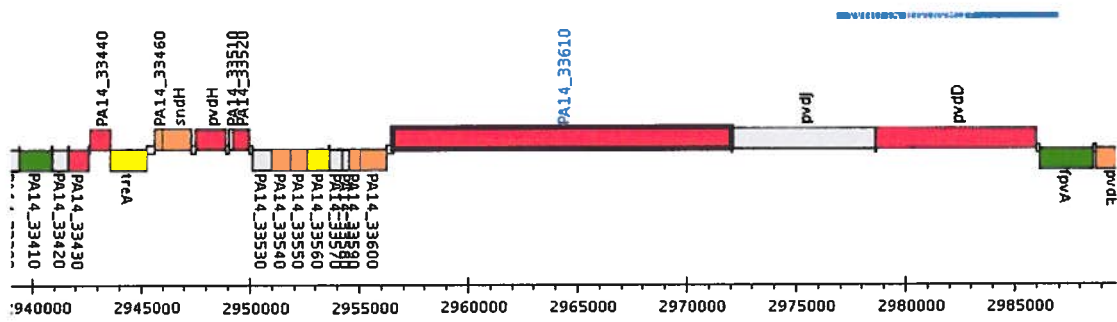
Mutant#346



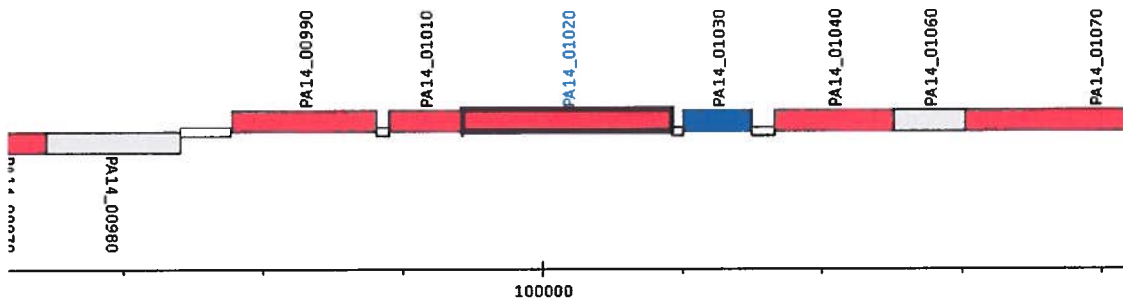
Mutant#350



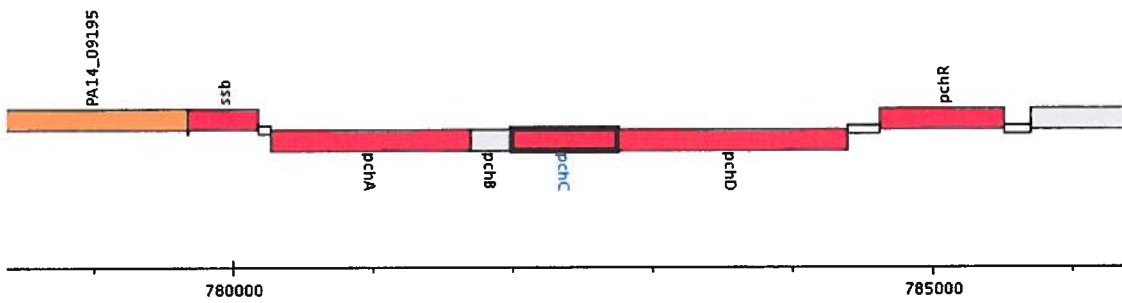
Mutant#351 et 937



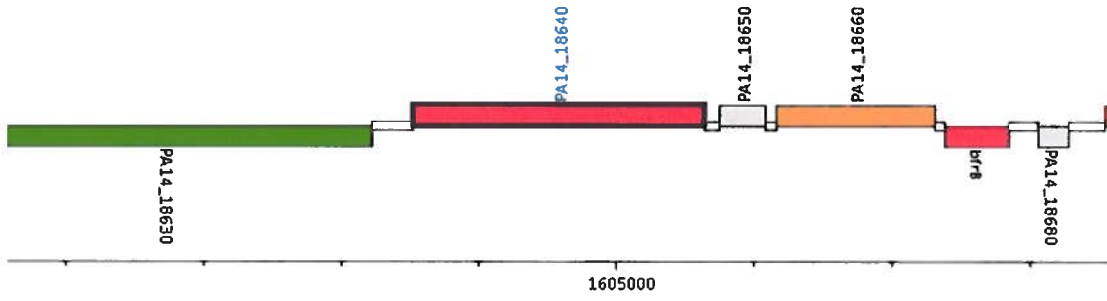
Mutant#354



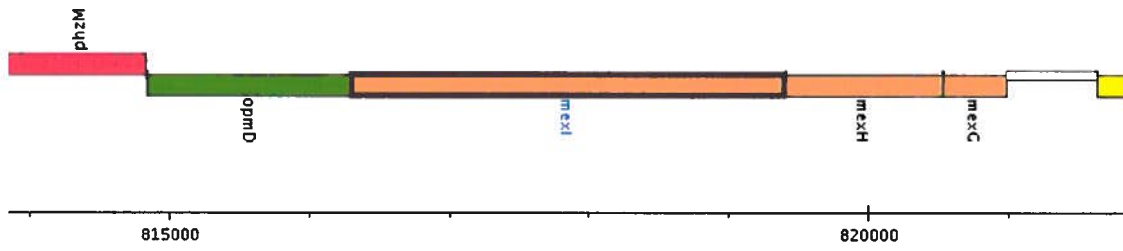
Mutant#355



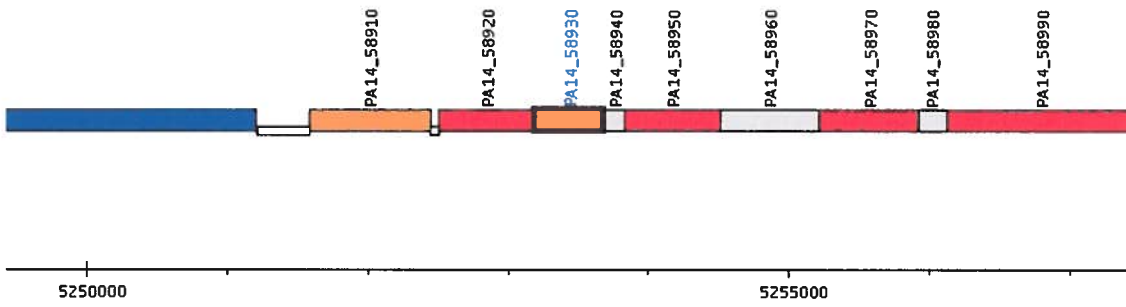
Mutant#362



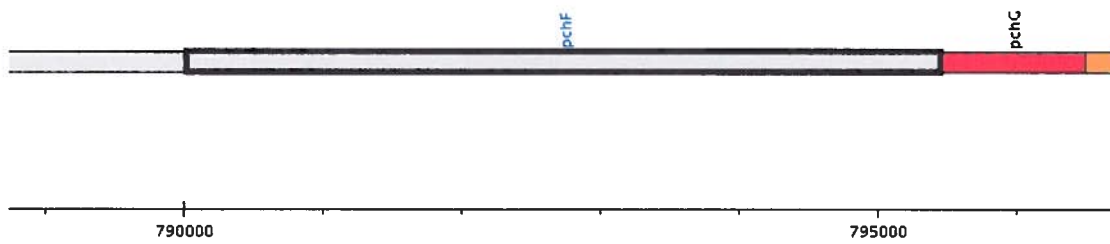
Mutant#376



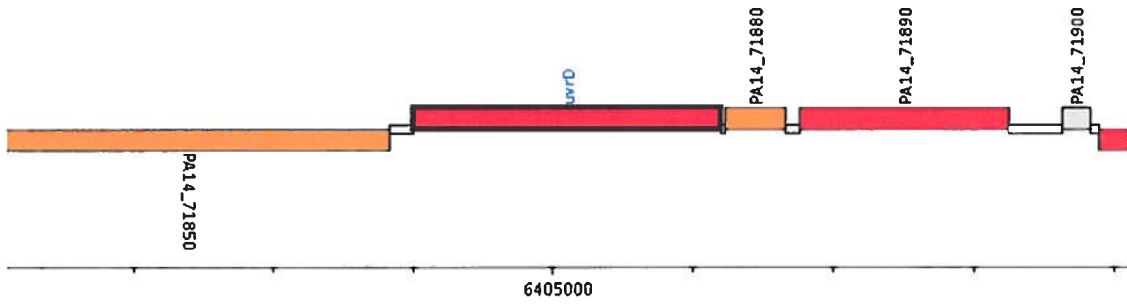
Mutant#380



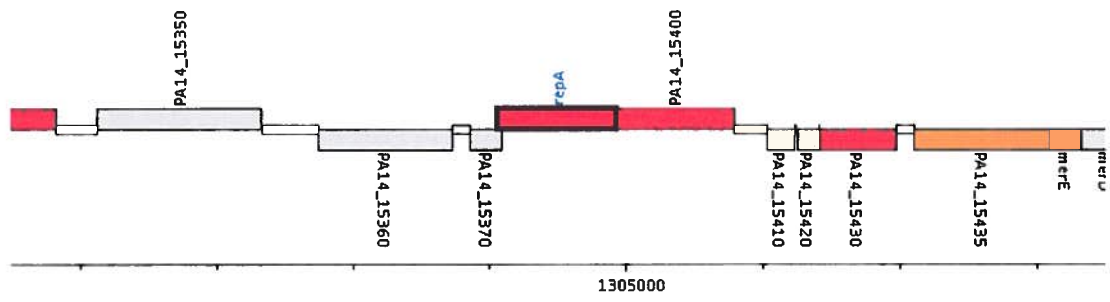
Mutant#387, 744 et 745



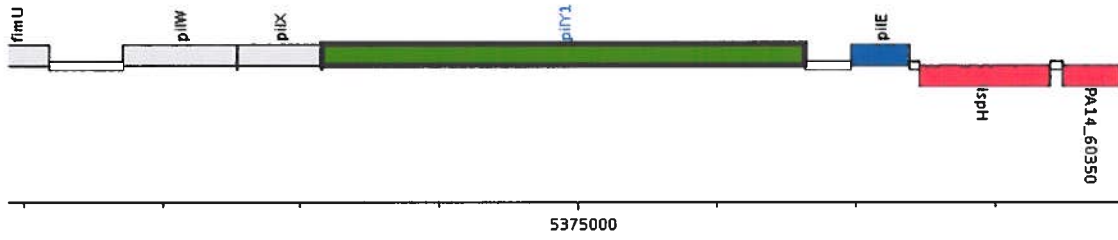
Mutant#389



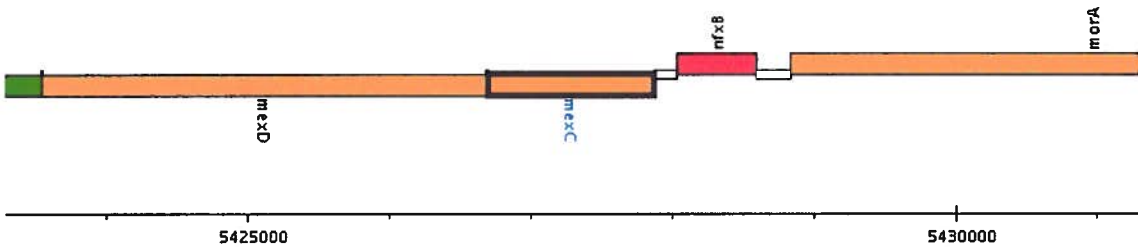
Mutant#467



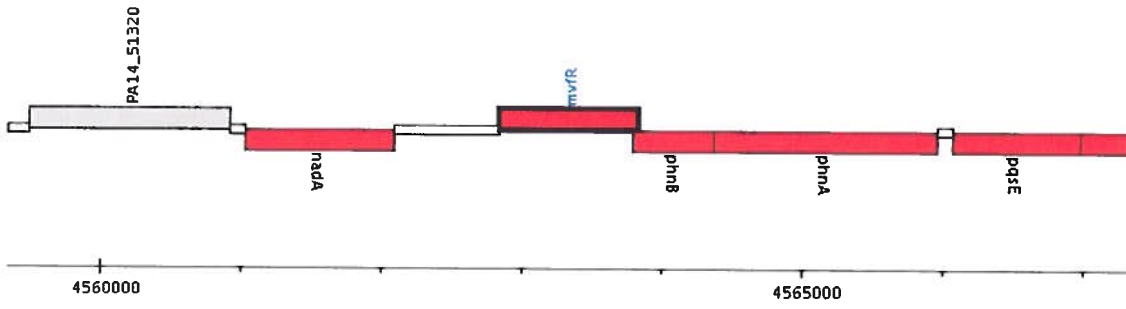
Mutant#501



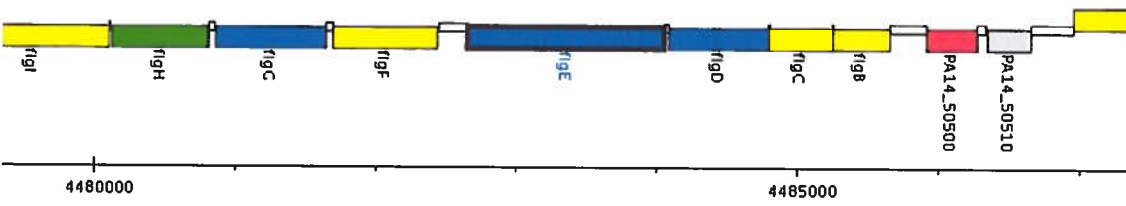
Mutant#510



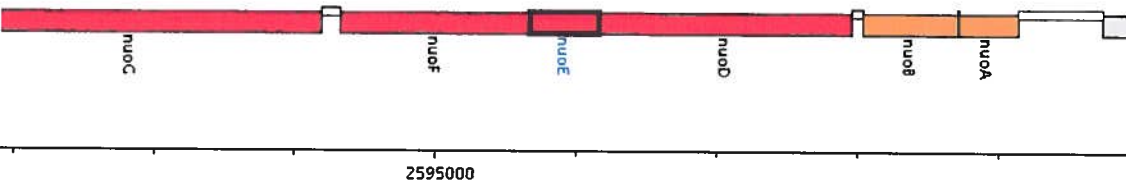
Mutant#513



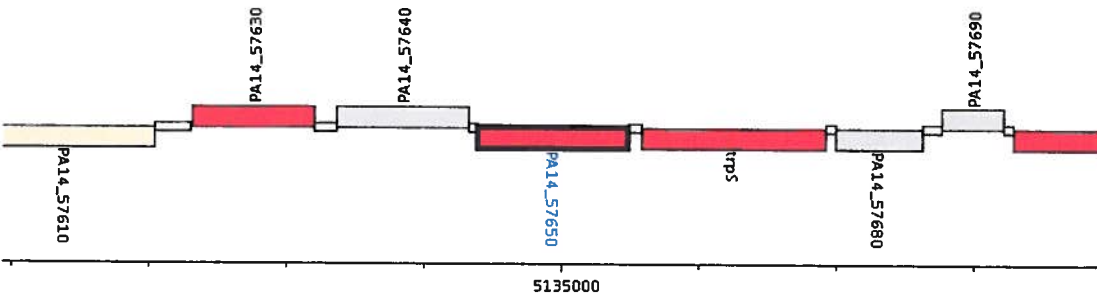
Mutant#515



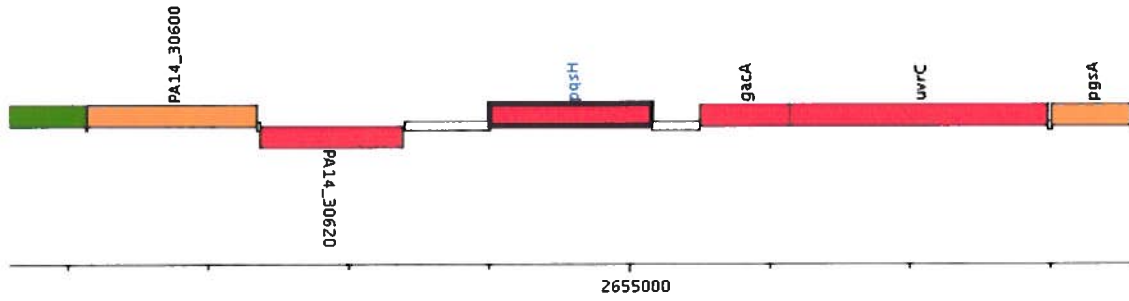
Mutant#523



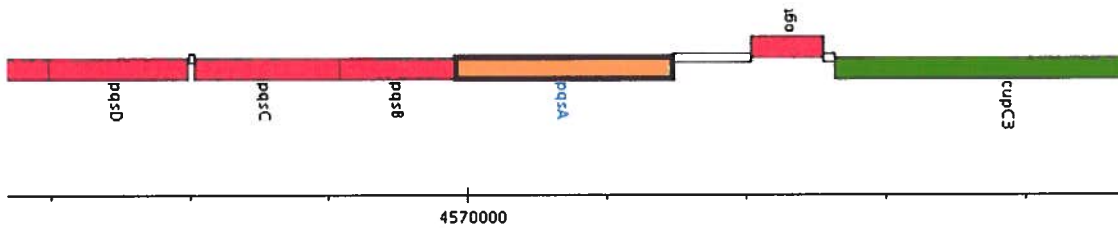
Mutant#524



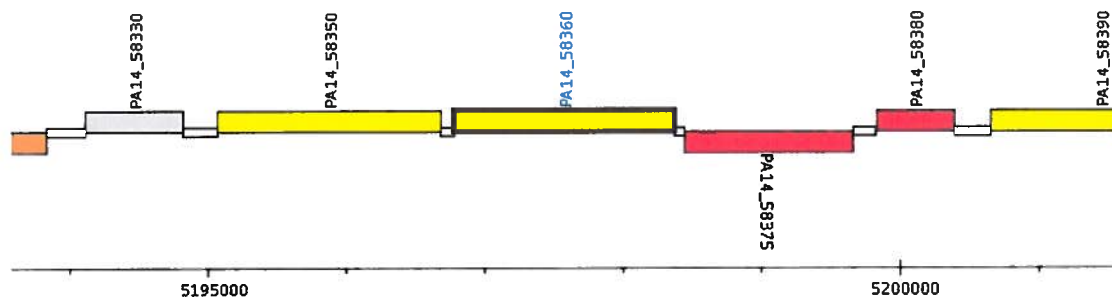
Mutant#530



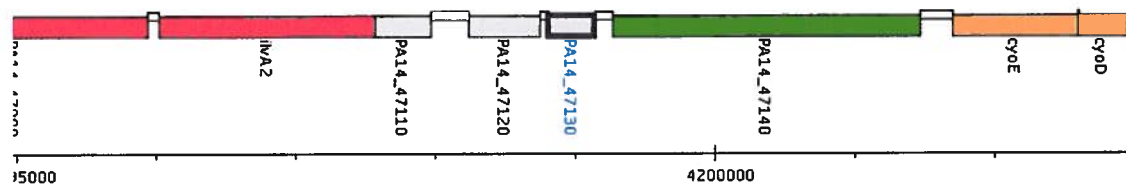
Mutant#531



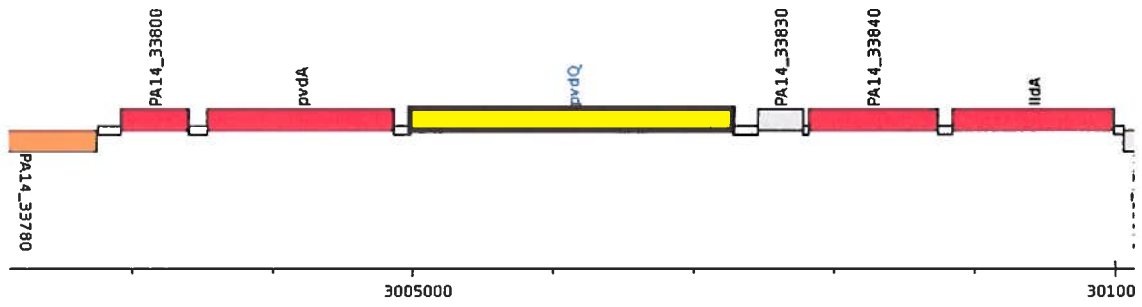
Mutant#555



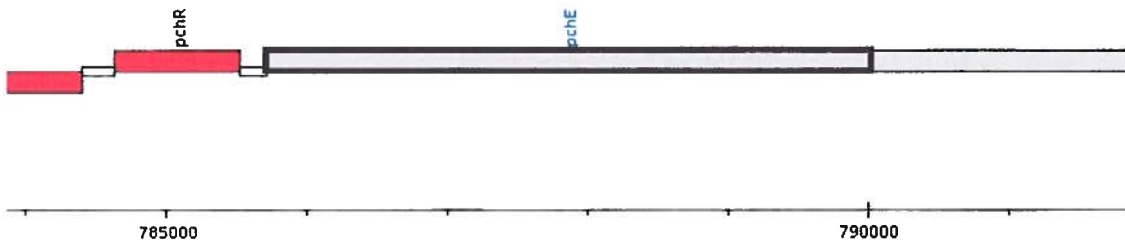
Mutant#556



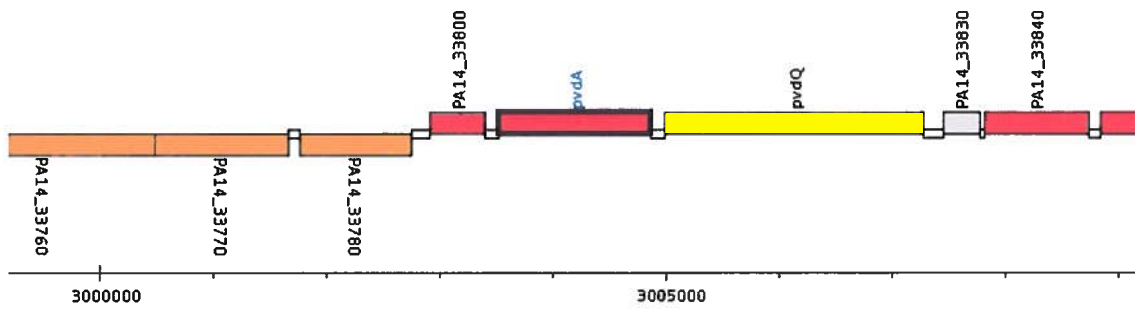
Mutant#564, 568, 719 et 847



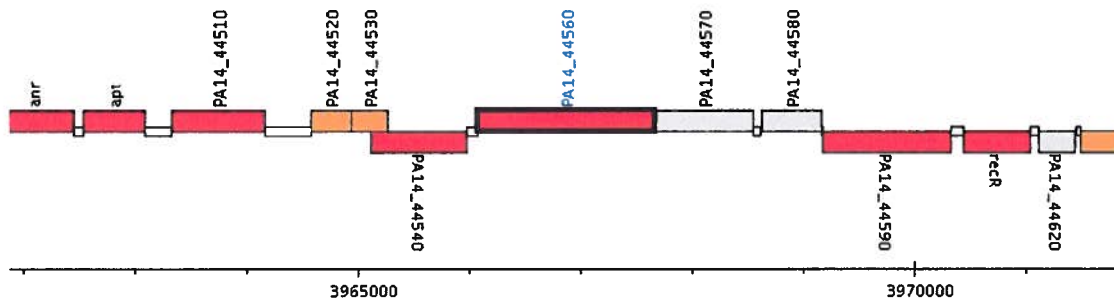
Mutant#567 et 813



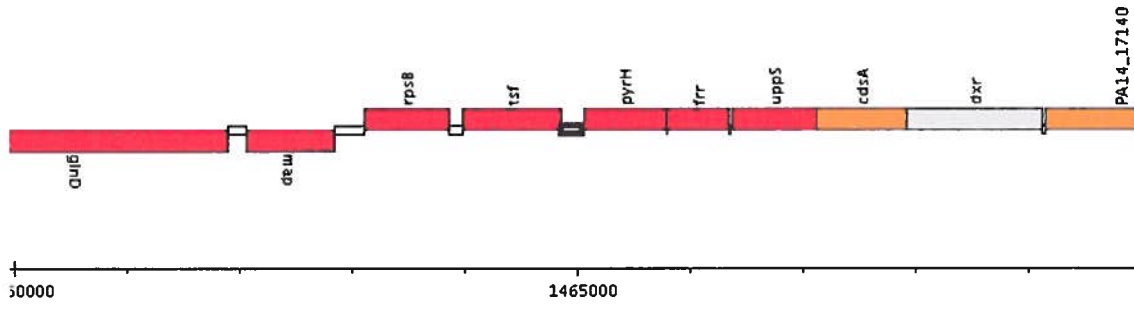
Mutant#579



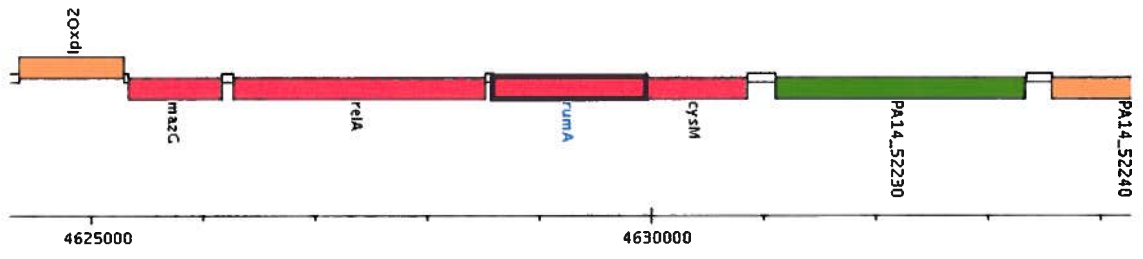
Mutant#582



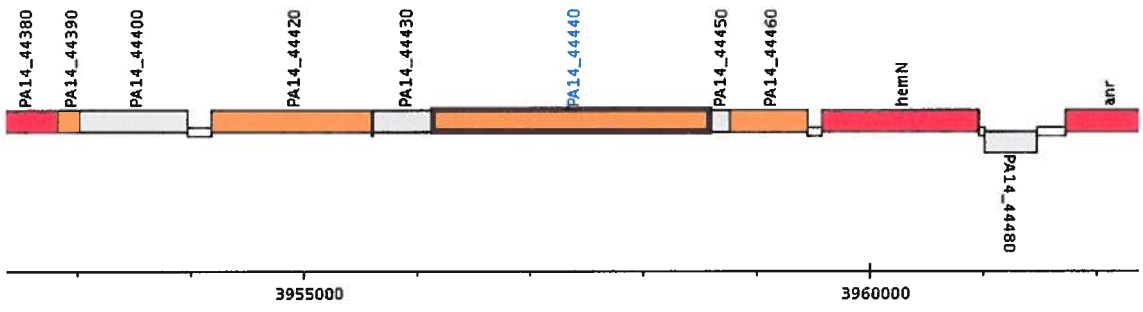
Mutant#599



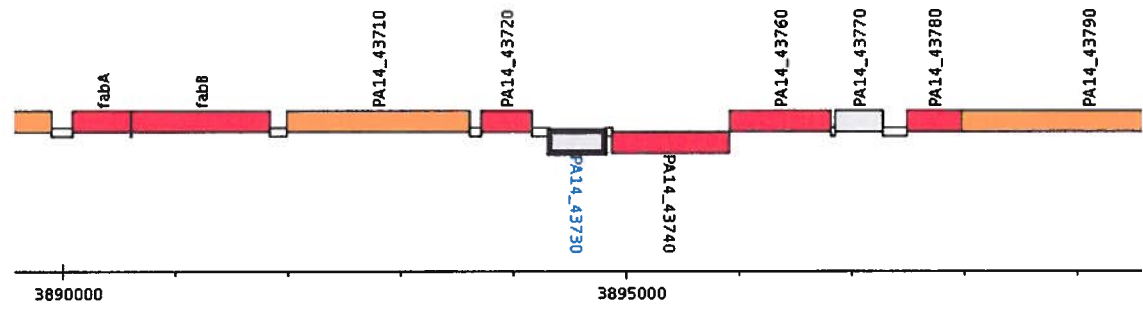
Mutant#600



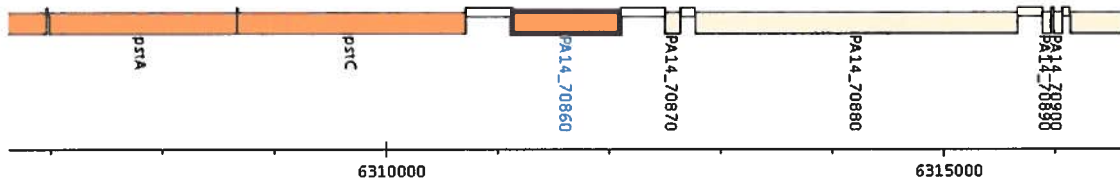
Mutant#602



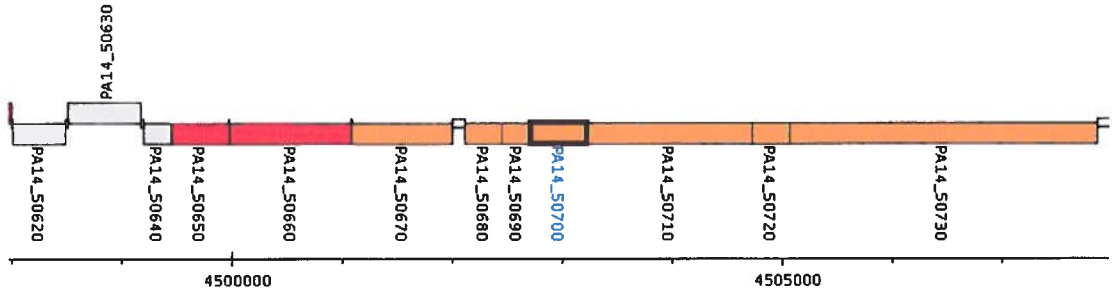
Mutant#623



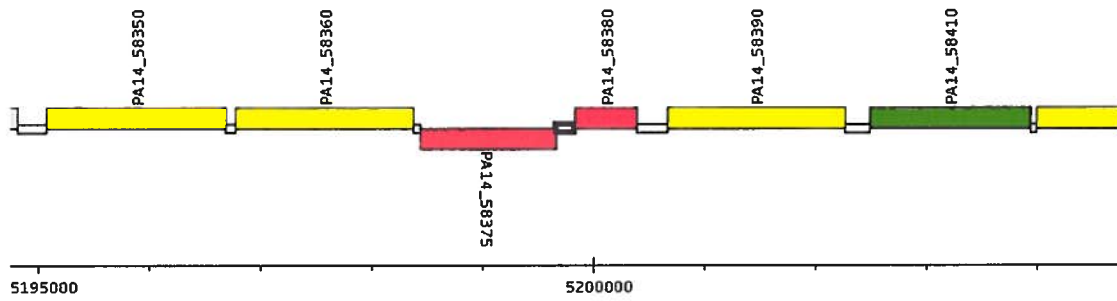
Mutant#652



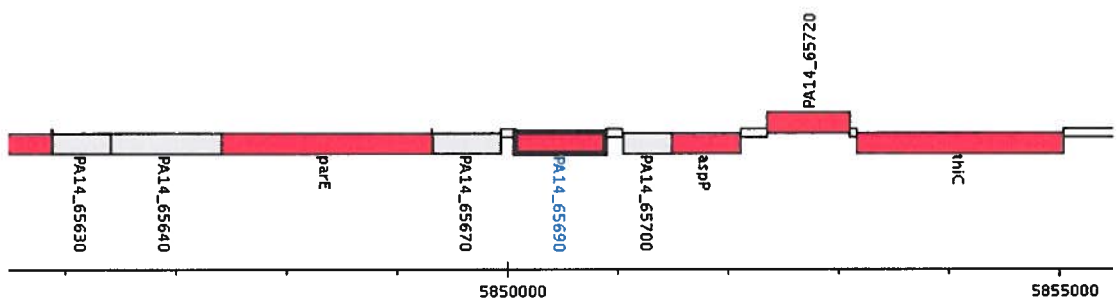
Mutant#662



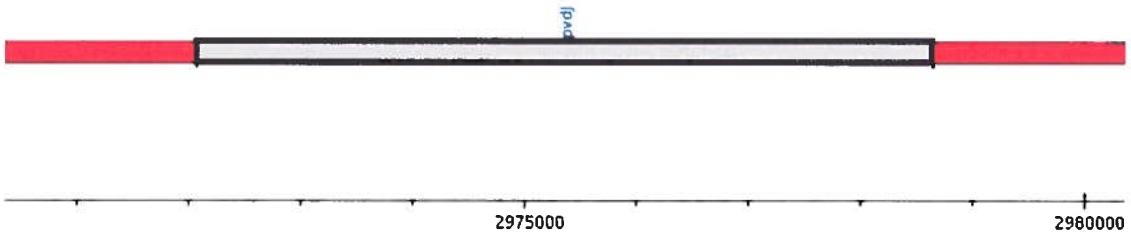
Mutant#663



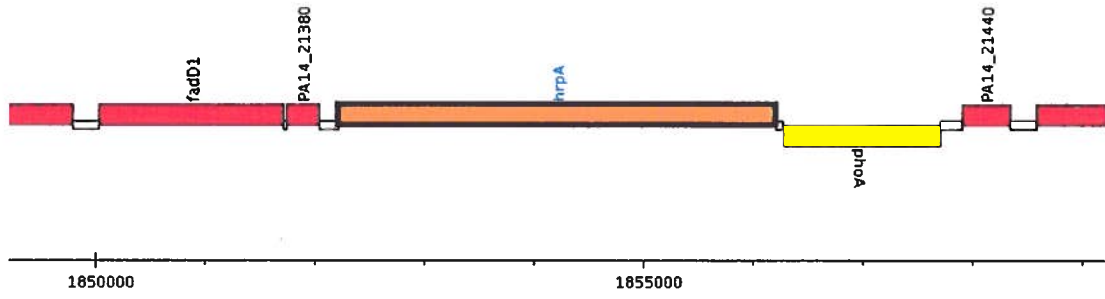
Mutant#666



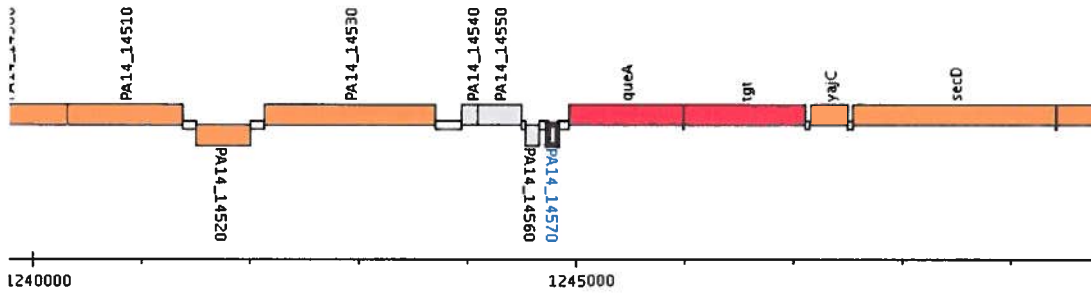
Mutant#667



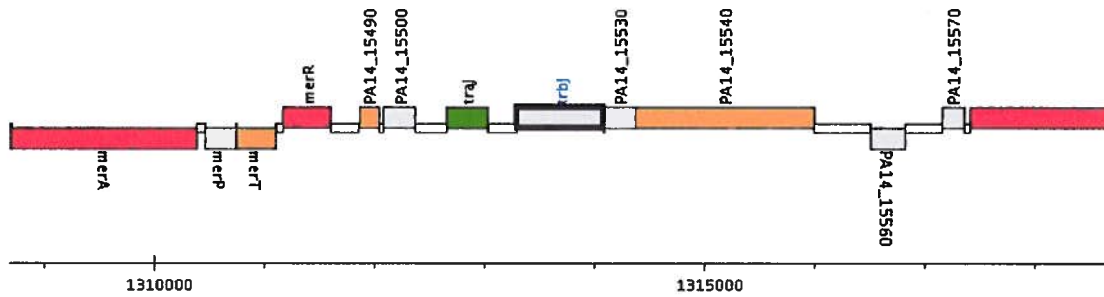
Mutant#680 et 1009



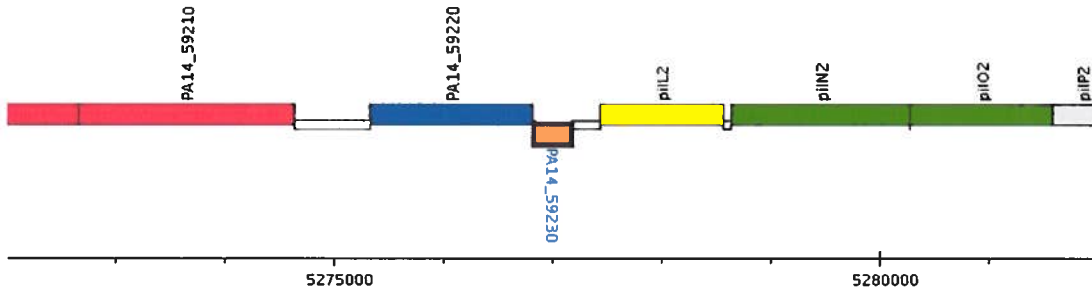
Mutant#708



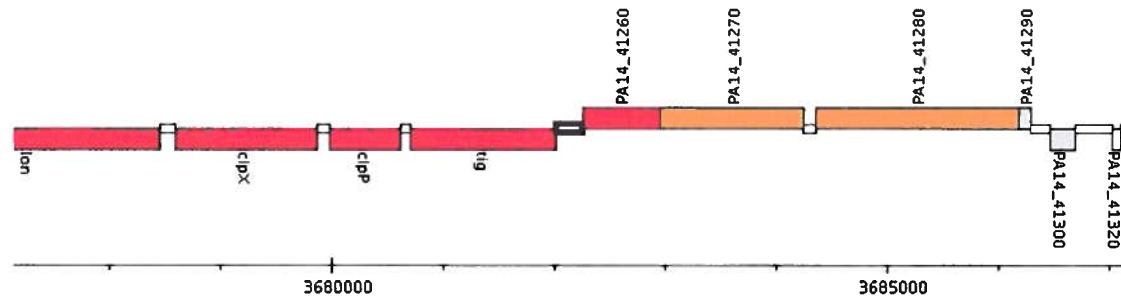
Mutant#712



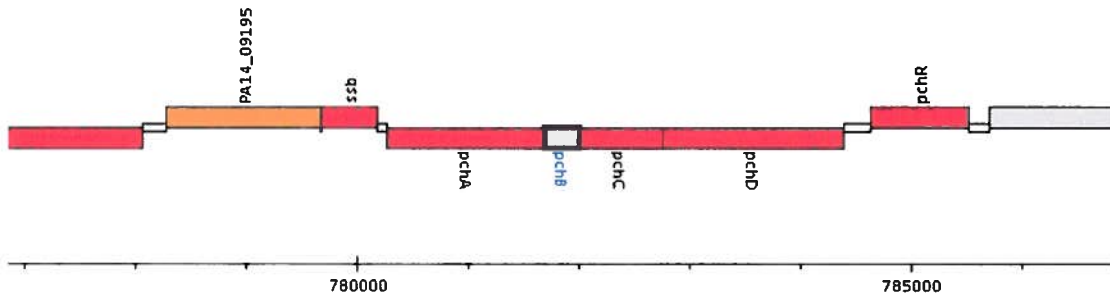
Mutant#720



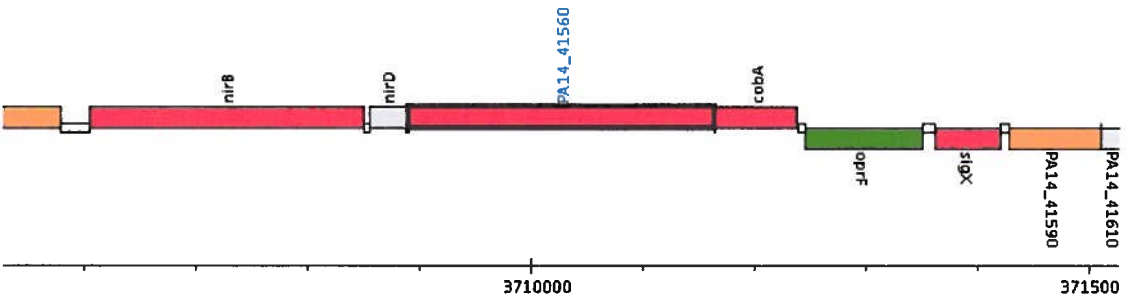
Mutant#723



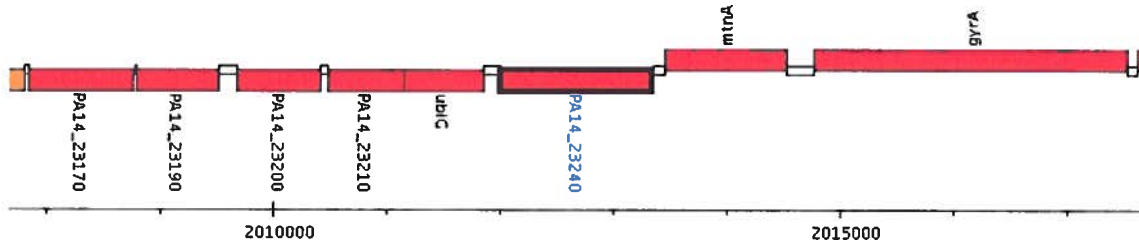
Mutant#736 et 742



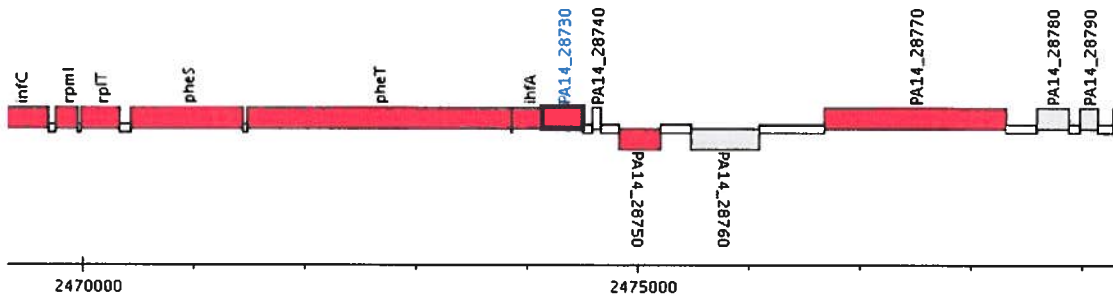
Mutant#741



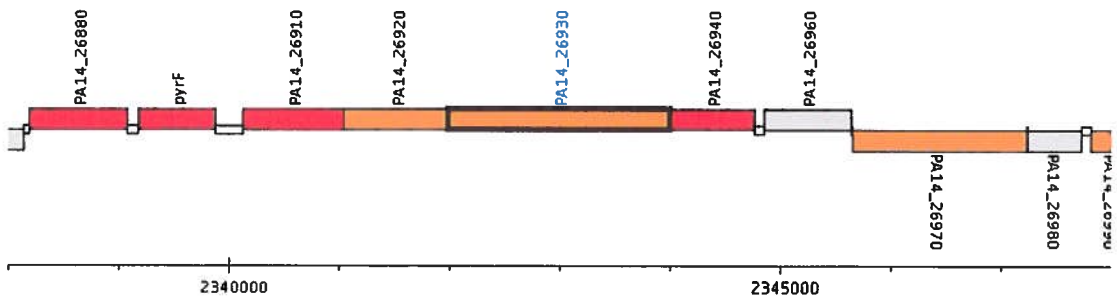
Mutant#753



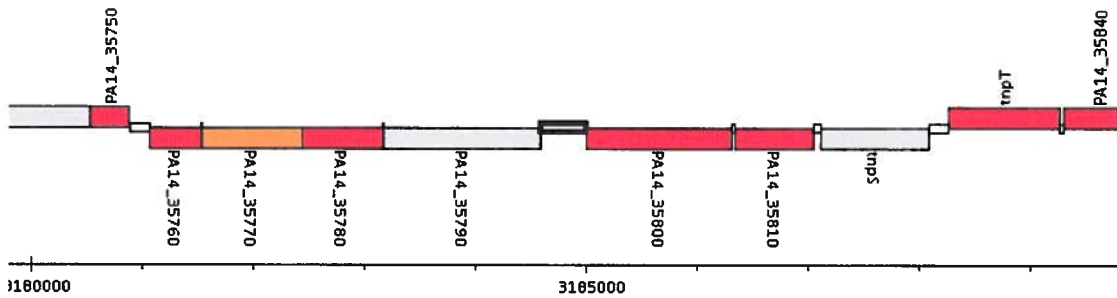
Mutant#768



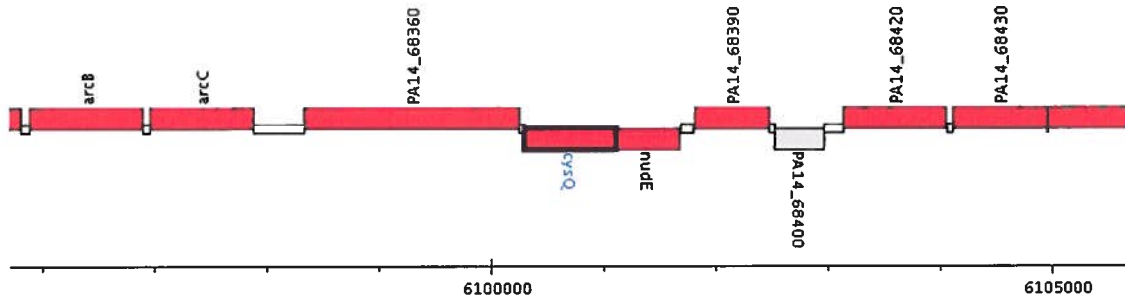
Mutant#771



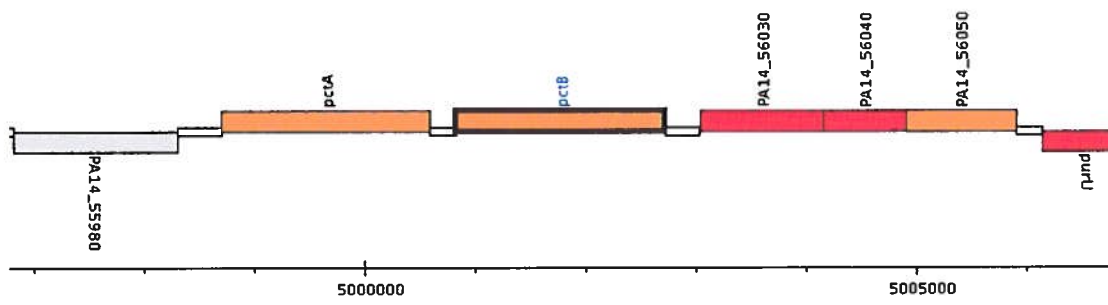
Mutant#776



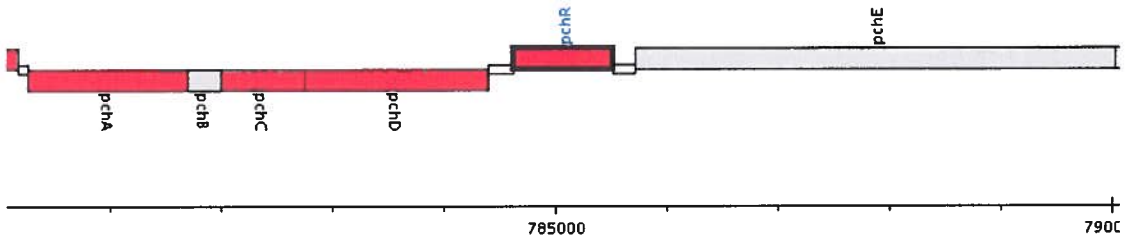
Mutant#777



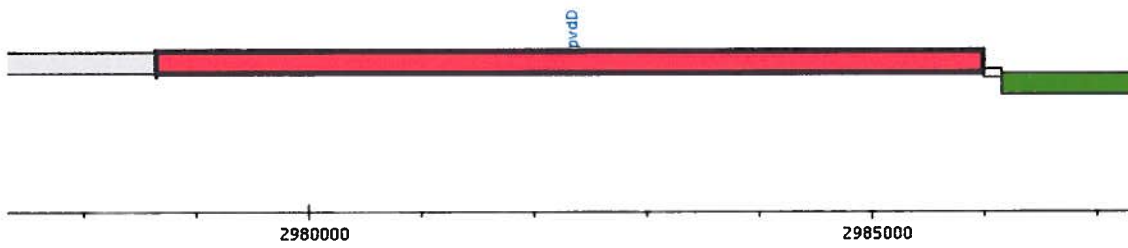
Mutant#780



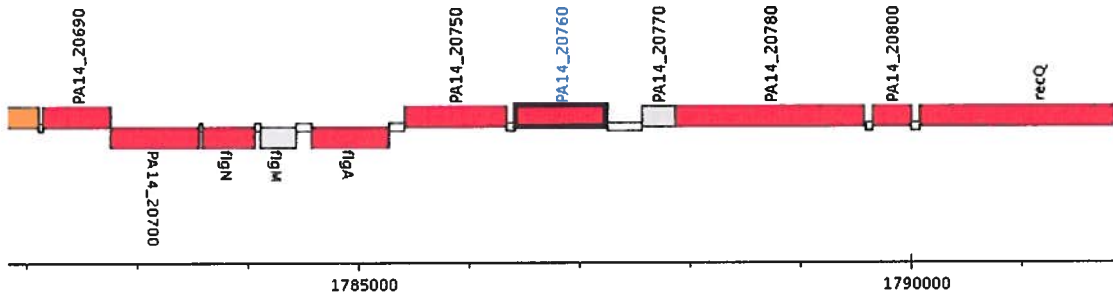
Mutant#791



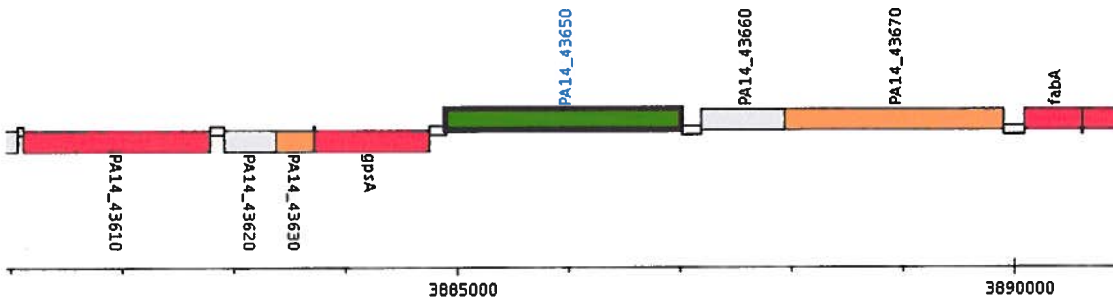
Mutant#811 et 1023



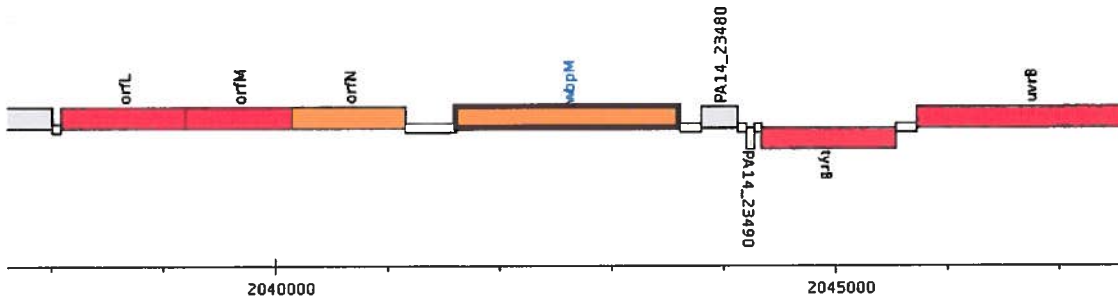
Mutant#852



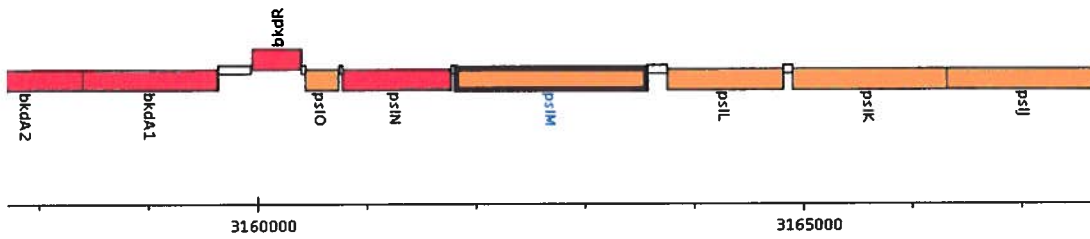
Mutant#857



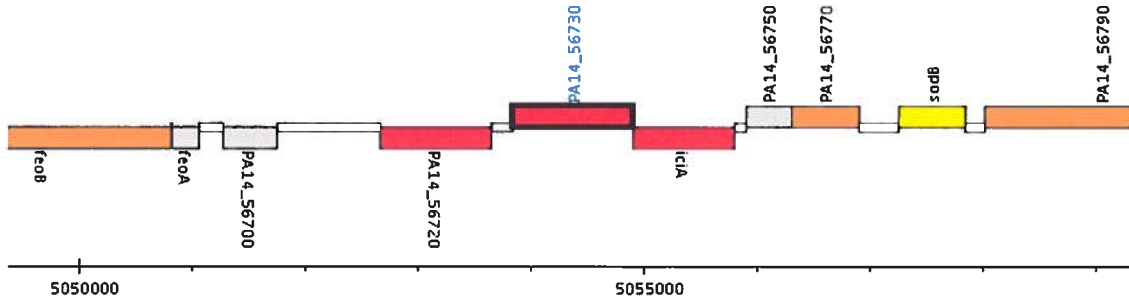
Mutant#889



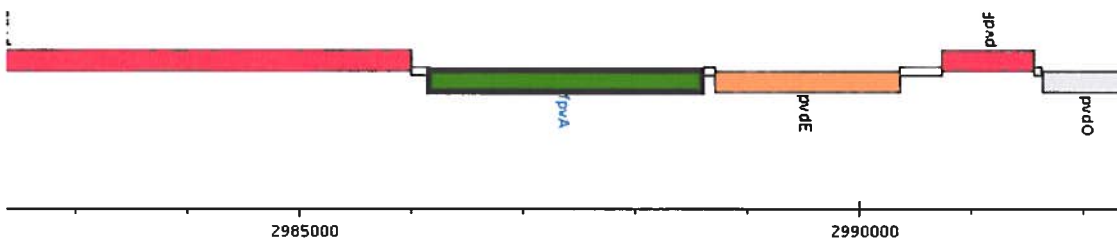
Mutant#897



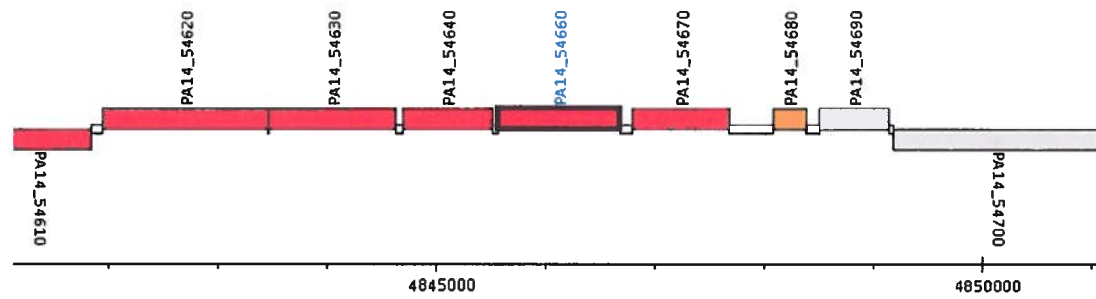
Mutant#913



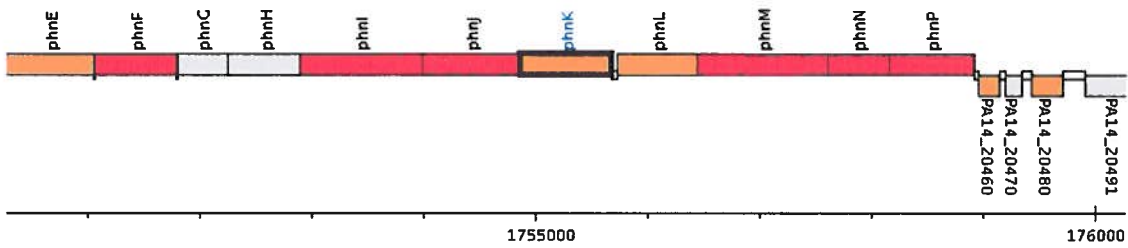
Mutant#933



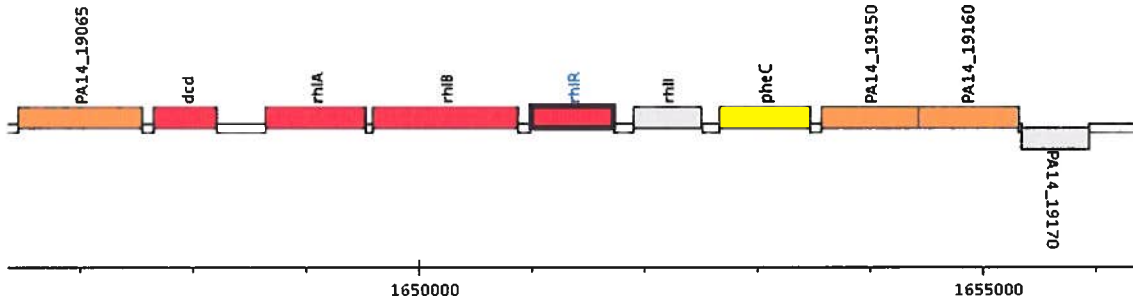
Mutant#940



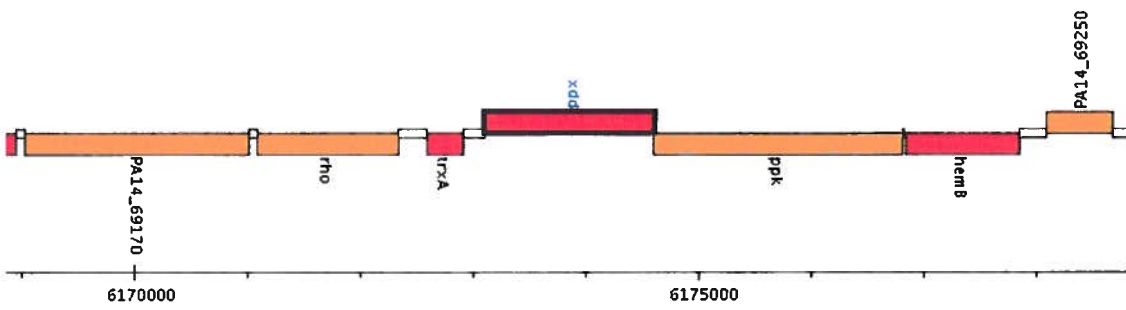
Mutant#941



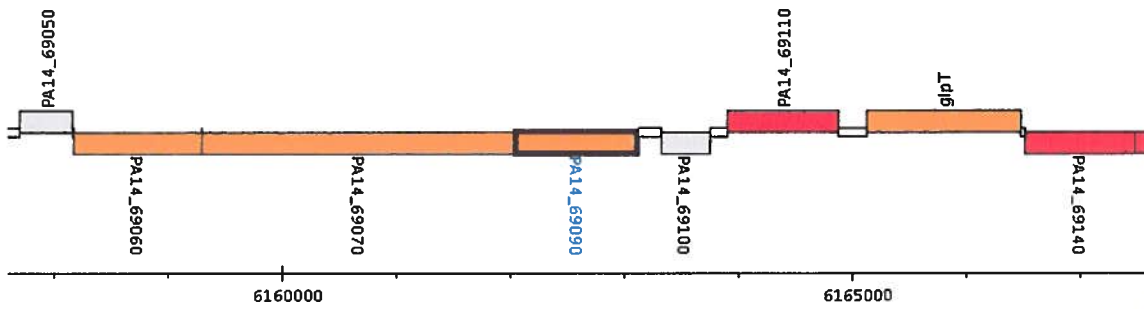
Mutant#947



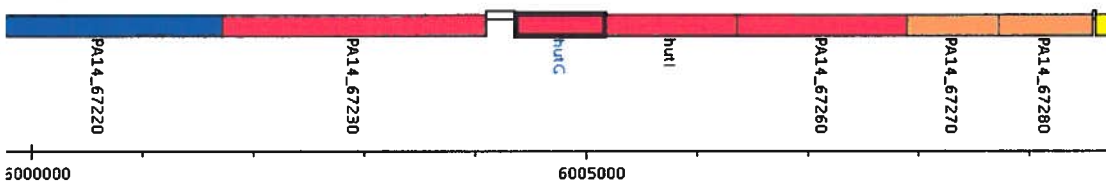
Mutant#958



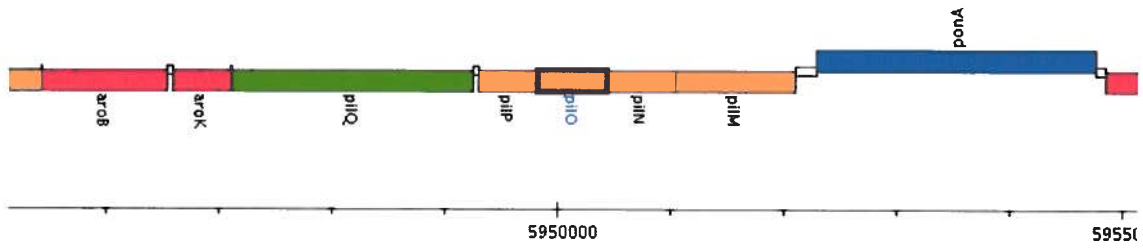
Mutant#974



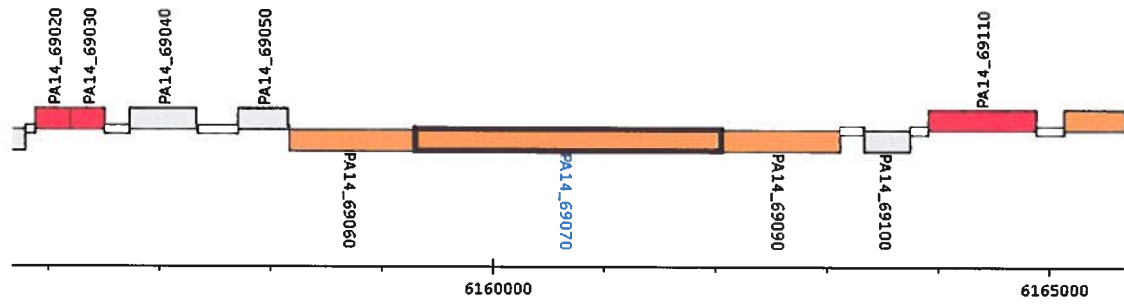
Mutant#977



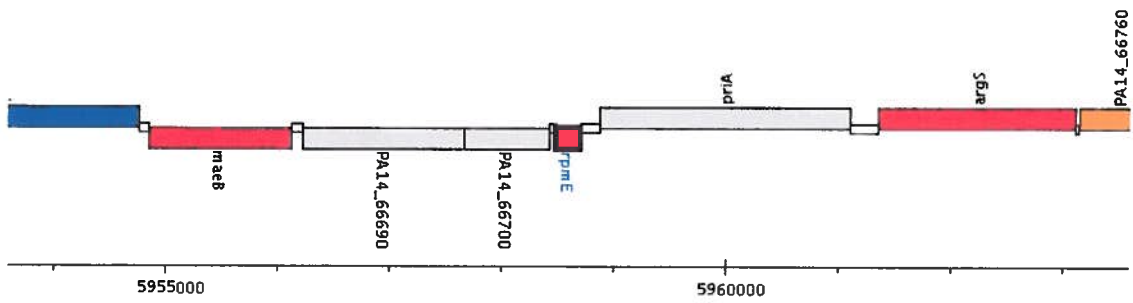
Mutant#978



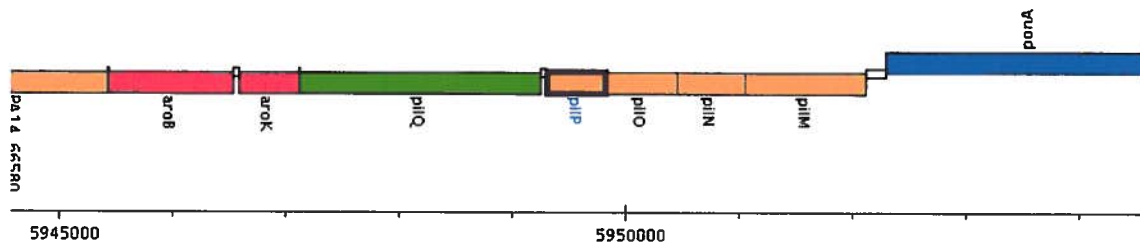
Mutant#988



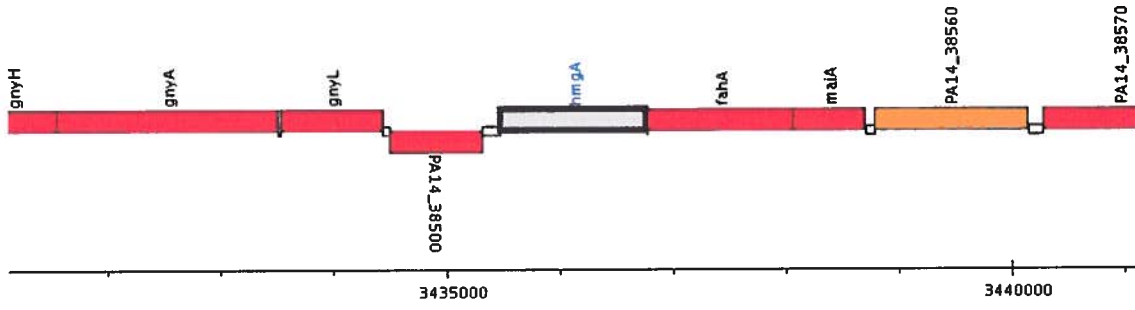
Mutant#1001



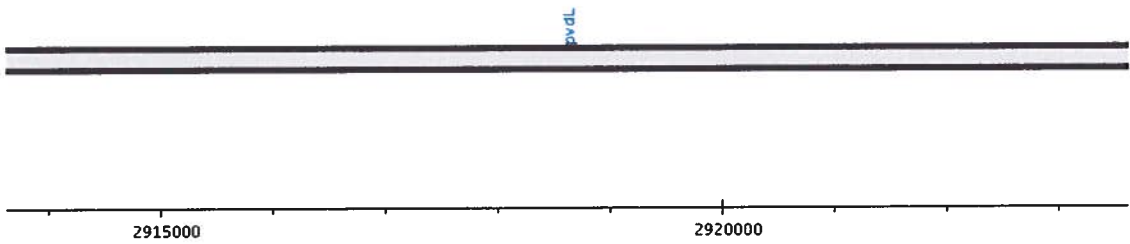
Mutant#1024



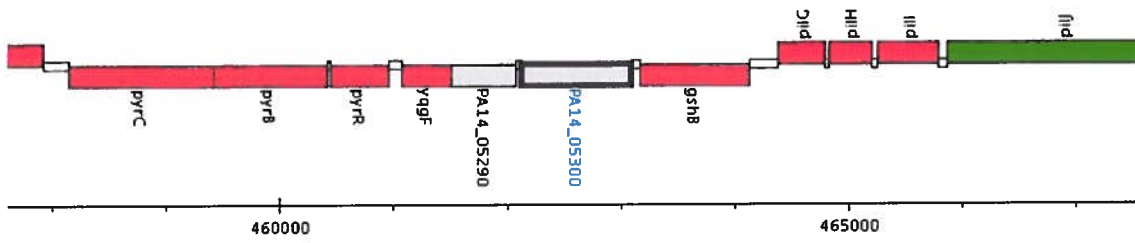
Mutant#1035



Mutant#1037



Mutant#1056



Mutant#1058

