

Centre Amand-Frappier Santé Biotechnologie

Étude du rôle du régulateur transcriptionnel ScmR et de la protéine HmqE chez *Burkholderia thailandensis*

Par
Gabrielle Desaulniers

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Maîtrise en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jonathan Perreault
INRS – Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Jean-Philippe Côté
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Éric Déziel
INRS – Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Éric Déziel, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci pour ta confiance, tes encouragements et de m'avoir partagé ta passion pour la microbiologie et la communication intercellulaire !

J'aimerais ensuite remercier Marie-Christine pour son soutien et ses nombreux conseils. Merci d'avoir répondu à mes 1001 questions, pour tes mots d'encouragements dans mon cahier de laboratoire et pour toutes nos belles conversations. J'aimerais également remercier Marianne pour son aide (et sa patience) avec mes analyses CL-SM.

J'aimerais remercier tous mes collègues de laboratoires que j'ai croisés dans les dernières années. Merci pour votre accueil chaleureux et votre inclusion. Merci à Thays et Charles pour votre sagesse et vos conseils. Merci à Mylène d'avoir traversé cette étape avec moi, Maude pour les cupcakes et dessert délicieux et Alex pour la biochimie. Merci les Moleux pour votre soutien, vos encouragements et tous les moments un peu moins sérieux !

Merci à ma famille de m'avoir soutenu durant ce processus. Merci de m'avoir encouragé à poursuivre mes études et de vous avoir intéressé à ma recherche malgré sa complexité. Merci Izz de m'avoir suivi et d'avoir fait de notre petit 4 et demi notre chez nous. Merci Max d'être une aussi grande source de divertissement, Lydia pour tes Vlogs, Carl pour finalement essayer de comprendre ce qu'est le *quorum sensing* et Jerry pour tes sages paroles. Merci les cinq doigts de la main.

J'aimerais aussi remercier particulièrement Noémie. Merci pour tous ces appels Zoom, à discuter de nos projets. Merci pour ton intérêt, tes conseils et ton support. Je suis fière de tout ce que nous aurons accompli ensemble, malgré la distance.

Puis pour terminer, j'aimerais remercier Jacob d'avoir passé ces dernières années à mes côtés. Merci pour ton écoute, tes encouragements et ton support.

RÉSUMÉ

ScmR est un régulateur transcriptionnel de type LysR (*LysR-Type Transcriptional Regulator*; LTTR) retrouvé chez la bactérie *Burkholderia thailandensis*. Ce régulateur affecte plusieurs fonctions, dont la production de métabolites secondaires et serait impliqué dans la régulation des communications intercellulaires (*quorum sensing*) chez cette bactérie. Cependant, les gènes directement contrôlés par ce régulateur restent inconnus. Alors que *B. thailandensis* n'est pas pathogène (du moins pour les mammifères), ScmR est également présent chez l'espèce phylogénétiquement très apparentée mais pathogène *Burkholderia pseudomallei*, une bactérie pouvant causer la mélioïdose, une maladie humaine grave. Le but de cette étude était de spécifier la fonction de ScmR en identifiant les cibles directes de ce régulateur à l'aide de la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage (ChIP-Seq) et d'identifier quel serait son ligand. Ce projet visait également à en apprendre plus sur une de ces cibles, l'opéron *hmqABCDEFG* responsable de la biosynthèse des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ), une famille de molécules suspectée d'être impliquée dans la virulence de cette bactérie et qui est également produite par le pathogène *B. pseudomallei*. Pour ce faire, j'ai réalisé et caractérisé un mutant du gène *hmqE* dont la fonction n'avait pas été étudiée précédemment.

Mots-clés : *Burkholderia thailandensis*; *quorum sensing*; ScmR; régulateur transcriptionnel de type LysR; immunoprécipitation de la chromatine liée au séquençage; opéron *hmqABCDEFG*; HmqE; 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines

ABSTRACT

ScmR is a LysR-type transcriptional regulator (LTTR) found in the bacterium *Burkholderia thailandensis*. This regulator affects several functions, including the production of secondary metabolites and is thought to be involved in the regulation of intercellular communications (quorum sensing) in this bacterium. However, the genes directly controlled by this regulator remain unknown. While *B. thailandensis* is not pathogenic (at least for mammals), ScmR is also present in the phylogenetically closely related but pathogenic species *Burkholderia pseudomallei*, a bacterium that can cause melioidosis, a serious human disease. The aim of this study is to specify the function of ScmR by identifying which are the direct targets of this regulator using the method of chromatin immunoprecipitation coupled to sequencing (ChIP-Seq) and to identify what would be its ligand. This project also aimed to learn more about one of its targets, the *hmqABCDEFG* operon responsible for the biosynthesis of 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinolines (HMAQ), a family of molecules suspected of being involved in the virulence of this bacterium and which is also produced by the pathogen *B. pseudomallei*. To do this, I realized and characterized a mutant of the *hmqE* gene whose function had not been previously studied.

Keywords : *Burkholderia thailandensis*; quorum sensing; ScmR; LysR type transcriptional regulator; chromatin immunoprecipitation sequencing; *hmqABCDEFG* operon; HmqE; 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinolines

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT.....	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
1 INTRODUCTION	1
1.1 LES BACTÉRIES DU GENRE <i>BURKHOLDERIA</i>	1
1.1.1 Groupe <i>Bptm</i>	4
1.1.2 <i>Burkholderia mallei</i>	4
1.1.3 <i>Burkholderia pseudomallei</i>	5
1.1.4 <i>Burkholderia thailandensis</i>	5
1.2 LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE CHEZ LES MICROORGANISMES (<i>QUORUM SENSING</i>)	6
1.2.1 <i>Quorum sensing</i> chez les bactéries à Gram négatif.....	6
1.2.2 <i>Quorum sensing</i> chez le groupe <i>Bptm</i>	8
1.2.3 <i>Quorum sensing</i> chez <i>Burkholderia thailandensis</i>	10
1.2.4 L'opéron <i>hmqABCDEFG</i>	13
1.2.5 Régulateurs transcriptionnels de type <i>LysR</i>	15
1.2.6 Le régulateur transcriptionnel <i>ScmR</i>	16
2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	21
2.1 HYPOTHÈSES	21
2.2 OBJECTIFS	21
2.2.1 Objectif général	21
2.2.2 Objectifs spécifiques	21
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
3.1 SOUCHES BACTÉRIENNES	23
3.2 LES PLASMIDES	25
3.3 LES OLIGONUCLÉOTIDES	27
3.4 LES CONDITIONS DE CULTURE	28
3.5 BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	29
3.6 ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE (CL/SM).....	29
3.7 AJOUT D'UNE ÉTIQUETTE DE POLY-HISTIDINE À LA PROTÉINE <i>SCMR</i>	31

3.7.1	<i>Clonage moléculaire</i>	31
3.7.2	<i>Sous-clonage de 6xHisScmR dans un vecteur d'expression</i>	36
3.8	CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION SEQUENCING (CHIP-SEQ ; IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE COUPLÉE AU SÉQUENÇAGE)	38
3.8.1	<i>Méthode CHIP-Seq</i>	38
3.8.2	<i>Méthode d'analyse du CHIP-Seq</i>	41
3.9	CONSTRUCTION DU MUTANT Δ HMQE	42
3.10	CARACTÉRISATION DU MUTANT Δ HMQE	45
3.10.1	<i>Quantification de la transcription de l'opéron hmqABCDEFG</i>	45
3.10.2	<i>Morphologie coloniale</i>	46
3.10.3	<i>Formation d'un biofilm flottant (pellicule)</i>	46
3.10.4	<i>Motilités de type swarming et swimming</i>	46
3.10.5	<i>Essais d'infection de Drosophila melanogaster</i>	47
3.10.6	<i>Production de bactoboline</i>	47
4	RÉSULTATS ET DISCUSSION	49
4.1	RECHERCHE DU LIGAND DE SCMR	49
4.1.1	<i>Criblage de mutants pour la production d'HMAQ</i>	49
4.1.2	<i>Vérification de la xanthine comme possible ligand de ScmR</i>	55
4.2	AJOUT D'UNE ÉTIQUETTE DE POLYHISTIDINE À LA PROTÉINE SCMR	58
4.3	CHIP-SEQ DE LA PROTÉINE SCMR	59
4.4	LA FONCTION DE LA PROTÉINE HMQE DE L'OPÉRON <i>HMQABCDEFG</i>	64
4.4.1	<i>Implication de HmqE dans la production d'HMAQ</i>	64
4.4.2	<i>Activation de l'opéron hmqABCDEFG</i>	65
4.4.3	<i>Observation de la morphologie des colonies sur milieu Ashdown</i>	66
4.4.4	<i>Observation de la production de pellicule en culture statique</i>	68
4.4.5	<i>Motilités de type swarming et swimming</i>	69
4.4.6	<i>Étude de l'implication de HmqE dans la virulence</i>	72
4.4.7	<i>Étude de l'implication de HmqE dans la production de bactoboline</i>	73
4.4.8	<i>Production des autoinducteurs acyl-homosérines lactones</i>	75
5	CONCLUSION	77
6	BIBLIOGRAPHIE	81
7	ANNEXE I	91
	COMPOSITION DES TAMPONS UTILISÉS POUR LE CHIP-SEQ	91
	PRÉPARATION DES ADAPTEURS D'OLIGONUCLÉOTIDES	92
	DESCRIPTION DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES UTILISÉES LORS DU PROTOCOLE DU CHIP-SEQ	93
	RÉSULTATS DU CHIP-SEQ.....	95

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE DU GENRE <i>BURKHOLDERIA</i> BASÉ SUR LES SÉQUENCES D'ARN 16S.....	3
FIGURE 1.2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU <i>QUORUM SENSING</i> D'UN SYSTÈME LUXI/LUXR.	7
FIGURE 1.3 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES TROIS SYSTÈMES DE <i>QUORUM SENSING</i> DE <i>BURKHOLDERIA THAILANDENSIS</i> ET LEURS INTERACTIONS.	12
FIGURE 1.4 : SCHÉMAS DE LA BIOSYNTHÈSE DES DIFFÉRENTS CONGÉNÈRES DE HMAQ CHEZ <i>BURKHOLDERIA THAILANDENSIS</i>	14
FIGURE 1.5 : REPRÉSENTATION DE LA LIAISON D'UN RÉGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL DE TYPE LYSR DANS LA RÉGION PROMOTRICE D'UN GÈNE.....	16
FIGURE 1.6 : REPRÉSENTATION D'UNE PARTIE DU MÉTABOLISME DES PURINES CHEZ <i>BURKHOLDERIA THAILANDENSIS</i>	17
FIGURE 1.7 : EXEMPLES D'OPÉRONS RÉGULÉS PAR LE RÉGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL SCMR.	19
FIGURE 3.1 : PRÉDICTION DE LA STRUCTURE DE LA PROTÉINE SCMR À L'AIDE DE L'APPLICATION DNASTAR.	32
FIGURE 3.2 : SCHÉMATISATION DU CLONAGE MOLÉCULAIRE POUR AJOUTER UNE ÉTIQUETTE DE POLY HISTIDINE AU GÈNE <i>SCMR</i>	33
FIGURE 3.3 : MIGRATION SDS-PAGE ET IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN DE LA PROTÉINE SCMR AVEC SON ÉTIQUETTE DE POLYHISTIDINE.	36
FIGURE 3.4 : PRODUCTION D'HMAQ-C9 :2' CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE, LE MUTANT <i>SCMR-</i> ET LE MUTANT <i>SCMR-</i> COMPLÉMENTÉ AVEC LES PLASMIDES PGD2 ET PJP3.	38
FIGURE 3.5 : MIGRATION DE NOTRE PRODUIT DE SONICATION SUR GEL D'AGAROSE 1,5 %.....	39
FIGURE 3.6 : MIGRATION DES FRAGMENTS D'ADN AMPLIFIÉS ISSUS DU CHIP SUR GEL D'AGAROSE 1,5%.	41
FIGURE 3.7 : SCHÉMA DU PLASMIDE PEX18TC- <i>PHE</i> S ::HMQETP.	42
FIGURE 3.8 : MIGRATION PCR DES COLONIES ISOLÉES POUR L'OBTENTION D'UN DOUBLE RECOMBINANT SUR GEL D'AGAROSE 1,5%.	44
FIGURE 3.9 : MIGRATION PCR DES COLONIES ISOLÉES SUR GEL D'AGAROSE 1,5% REPRÉSENTANT LA CRÉATION DU MUTANT PROPRE Δ HMQE.....	45
FIGURE 4.1 : CRIBLAGE DES MUTANTS SÉLECTIONNÉS POUR LA PRODUCTION D'HMAQ-C9 :2'.	52
FIGURE 4.2 : PRODUCTION D'HMAQ-C9 :2' CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LES MUTANTS SÉLECTIONNÉS DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.	53

FIGURE 4.3 : EXPRESSION DE L'OPÉRON <i>HMQABCDEFG</i> CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LES MUTANTS SÉLECTIONNÉS DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.....	54
FIGURE 4.4 : OBSERVATION DE LA PRODUCTION D'HYPOXANTHINE, DE XANTHINE ET D'URATE CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LE MUTANT <i>SCMR</i> - DE <i>B. THAILANDENSIS</i>	55
FIGURE 4.5 : EFFET DE L'AJOUT DE XANTHINE OU D'HYPOXANTHINE SUR LA PRODUCTION D'HMAQ-C9:2' CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE, LE MUTANT <i>SCMR</i> - ET LE MUTANT <i>SCMR</i> - COMPLÉMENTÉ.....	56
FIGURE 4.6 : EFFET DE L'AJOUT D'ALLOPURINOL SUR LA PRODUCTION D'HMAQ-C9:2' ET LA CROISSANCE BACTÉRIENNE CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LE MUTANT - <i>SCMR</i>	57
FIGURE 4.7 : PRODUCTION D'HMAQ-C9 :2' CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE, LE MUTANT <i>SCMR</i> - ET LE MUTANT <i>SCMR</i> - COMPLÉMENTÉ AVEC LES PLASMIDES PGD2, PGD4, PGD6, PGD7 ET PJP3.....	59
FIGURE 4.8 : DISTRIBUTION DES RÉGIONS CONSENSUS ISSUES DU CHIP-SEQ DE LA PROTÉINE <i>SCMR</i> SUR LE GÉNOME DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.	60
FIGURE 4.9 : REPRÉSENTATION DE L'ALIGNEMENT DES SÉQUENCES ISSUES DU CHIP-SEQ DANS LA RÉGION PROMOTRICE DU GÈNE <i>BTH_I0078</i>	62
FIGURE 4.10 : REPRÉSENTATION DE L'ALIGNEMENT DES SÉQUENCES ISSUES DU CHIP-SEQ DANS LA RÉGION PROMOTRICE DU GÈNE <i>BTH_I2686</i>	63
FIGURE 4.11 : MOTIF DE LIAISON POTENTIEL DU RÉGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL <i>SCMR</i>	63
FIGURE 4.12 : PRODUCTION D'HMAQ-C9:2' CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LES MUTANTS <i>HMQA</i> -, <i>HMQG</i> - ET Δ <i>HMQE</i> DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.....	65
FIGURE 4.13 : EXPRESSION DE L'OPÉRON <i>HMQABCDEFG</i> CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LES MUTANTS <i>HMQA</i> - ET Δ <i>HMQE</i> DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.....	66
FIGURE 4.14 : OBSERVATION DE LA MORPHOLOGIE COLONIALE CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE, LES MUTANTS <i>QUORUM SENSING</i> Δ <i>BTAR1</i> , Δ <i>BTAR2</i> ET Δ <i>BTAR3</i> , LES MUTANTS <i>HMQA</i> -, <i>HMQG</i> - ET Δ <i>HMQE</i> DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.....	68
FIGURE 4.15 : OBSERVATION DE LA FORMATION DE PELLICULE CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE, LES MUTANTS <i>HMQA</i> -, <i>HMQG</i> - ET Δ <i>HMQE</i> DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.....	69
FIGURE 4.16 : OBSERVATION DE LA MOTILITÉ DE TYPE SWARMING DES COLONIES DE LA SOUCHE SAUVAGE, DES MUTANTS <i>HMQA</i> - ET Δ <i>HMQE</i> DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.	70
FIGURE 4.17 : OBSERVATION DE LA MOTILITÉ DE TYPE SWIMMING DES COLONIES DE LA SOUCHE SAUVAGE, DES MUTANTS <i>HMQA</i> - ET Δ <i>HMQE</i> DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264.	71
FIGURE 4.18 : VIRULENCE DE LA SOUCHE SAUVAGE, DES MUTANTS <i>HMQA</i> - ET Δ <i>HMQE</i> DE <i>B. THAILANDENSIS</i> E264 ENVERS <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	73

FIGURE 4.19 : ZONE D'INHIBITION DE CROISSANCE DE *BACILUS SUBTILIS* LIÉS À LA PRODUCTION DE BACTOBOLINE CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LES MUTANTS *HMQA-*, Δ *BTAR2* ET Δ *HMQE* DE *B. THAILANDENSIS* E264..... 74

FIGURE 4.20 : BIOSYNTHÈSE DES AHL ET EXPRESSION DES DIFFÉRENTES SYNTHASES DU QS CHEZ LA SOUCHE SAUVAGE ET LES MUTANTS *HMQA-* ET Δ *HMQE* DE *B. THAILANDENSIS* E264..... 76

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 : : LISTE DES DIFFÉRENTS RÉCEPTEURS, SYNTHASES ET AHL MAJORITAIRES PRODUITS DANS LE GROUPE BPTM.....	9
TABLEAU 3.1 : SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES DURANT CETTE ÉTUDE.....	23
TABLEAU 3.2 : PLASMIDES UTILISÉS DURANT CETTE ÉTUDE.....	26
TABLEAU 3.3 : OLIGONUCLÉOTIDES UTILISÉS DANS CETTE ÉTUDE.	27
TABLEAU 3.4 : LISTE DES ANTIBIOTIQUES UTILISÉS DURANT CE PROJET CHEZ <i>B. THAILANDENSIS</i> ET <i>E. COLI</i>	29
TABLEAU 4.1 : SOUCHES UTILISÉES POUR LA DÉCOUVERTE DU LIGAND.....	49
TABLEAU 4.2 : POSSIBLE CIBLES RÉGULÉES DIRECTEMENT PAR SCMR D'APRÈS LES RÉSULTATS DU CHIP-SEQ. .	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α	Alpha
Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
μg	Microgramme
μL	Microlitre
μm	Micron
μM	Micromolaire
%	Pourcent
ABS	<i>Activation binding site</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	N-acyl-L-homosérine lactone
AI-1	Auto-inducteur 1
AI-2	Auto-inducteur 2
Ap ^R	Résistance à l'ampicilline
<i>Bcc</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
<i>Bptm</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>B. thailandensis</i> , <i>B. mallei</i>
CLHP	Chromatographe liquide à haute performance
CL/SM	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
Cm ^R	Résistance au chloramphénicol
C-terminal	Carboxy-terminal
ChIP-Seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>

DAP	Acide diaminopimélique
DO ₆₀₀	Densité optique à 600 nm
EPS	Exopolysaccharides
FRT	<i>Flippase recognition target</i>
g	Gramme
Gm ^R	Résistance à la gentamycine
H	Heure
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinolines
HHQ	4-hydroxy-2-heptylquinoline
HHQ-d4	5,6,7,8-Tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline
HMAQ	4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinolines
HSL	N-acyl-L-homosérine lactone
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Km ^R	Résistance à la kanamycine
L	Litre
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LTTR	Régulateur transcriptionnel de type LysR
mm	Milimètre
mM	Milimolaire
mL	Mililitre
nm	Nanomètre
ng	Nanogramme

N-terminal	Amino-terminal
PmB ^R	Résistance à la polymyxine B
pb	Paire de base
<i>Pbe</i>	<i>Plant-associated beneficial and environmental</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCIAA	Extraction phénol chloroforme isoamide alcool
PHA	Polyhydroxyalkanoates
<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal ; PQS	3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline
QS	<i>Quorum sensing</i>

QS-1	Premier système de <i>quorum sensing</i>
QS-2	Deuxième système de <i>quorum sensing</i>
QS-3	Troisième système de <i>quorum sensing</i>
RBS	<i>Regulatory binding site</i>
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
Tc ^R	Résistance à la tétracycline
Tp ^R	Résistance à la triméthoprim
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
URL	Unité relative de lumière
UV	Ultraviolet

1 INTRODUCTION

1.1 Les bactéries du genre *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* comprend plusieurs espèces que l'on retrouve dans une grande variété d'environnements et d'hôtes. Ce genre regroupe des bactéries à Gram négatif que l'on retrouve majoritairement dans le sol, les eaux, ainsi que la rhizosphère des plantes. Auparavant inclus dans le genre *Pseudomonas*, le genre *Burkholderia* a été établi après l'observation de plusieurs différences géniques et métaboliques (Yabuuchi *et al.*, 1992).

Le genre *Burkholderia* est reconnu pour sa grande versatilité métabolique ainsi que sa capacité à produire plusieurs métabolites impliqués dans plusieurs fonctions telles l'optimisation de la croissance des plantes, et la pathogénèse (Liu & Cheng, 2014; Vial *et al.*, 2007). De façon controversée, ce genre est également reconnu pour ses espèces pathogènes ayant pour hôte l'humain, les animaux et les plantes. On peut séparer les espèces de ce genre en plusieurs groupes distincts, selon leur phylogénie (Eberl & Vandamme, 2016) (Fig. 1.1).

Nous retrouvons premièrement les « plant-associated beneficial and environmental » (*Pbe*), qui sont des bactéries bénéfiques pour les plantes (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Ces espèces confèrent plusieurs avantages aux plantes, entre autres par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique et à induire la formation de nodules (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 2001). À la suite d'identification de marqueur moléculaires chez les espèces de ce groupe, cela a permis de le séparer dans un nouveau genre : celui de *Paraburkholderia* (Sawana *et al.*, 2014). Ce groupe se sépare des pathogènes présents dans le genre *Burkholderia*, ce qui facilite les études permettant d'utiliser ces bactéries comme biocontrôle ou pour favoriser la croissance des plantes (Kaur *et al.*, 2017). On retrouve dans ce groupe des espèces telles que *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN qui est reconnue pour sa capacité à promouvoir la croissance des plantes, ainsi que pour sa participation au biocontrôle des maladies chez les plantes (Barka *et al.*, 2000; Miotto-Vilanova *et al.*, 2016).

Nous retrouvons également le groupe « *Burkholderia cepacia* complex » (*Bcc*) qui comprend des espèces provenant de diverses niches écologiques. *Burkholderia cenocepacia* a d'abord été identifié comme un agent pathogène de l'oignon (Burkholder, 1950). Plusieurs isolats de *B. cenocepacia* ont plus tard été identifiés selon des études taxonomiques comme des espèces à part entière. Ce groupe contient par exemple *B. cenocepacia* et *Burkholderia multivorans*, des

pathogènes opportunistes qui infectent les patients immunodéprimés, que l'on retrouve parfois dans les poumons d'individus atteints de fibrose kystique (Vial *et al.*, 2011).

On retrouve également le groupe Bptm qui comprend *Burkholderia thailandensis* et les deux espèces pathogènes *Burkholderia pseudomallei* et *Burkholderia mallei* (Majerczyk *et al.*, 2014b).

Dans les dernières années les espèces *Burkholderia oklahomensis*, *Burkholderia humptydooensis* et *Burkholderia singularis* ce sont ajoutées à ce groupe (Janesomboon *et al.*, 2021).

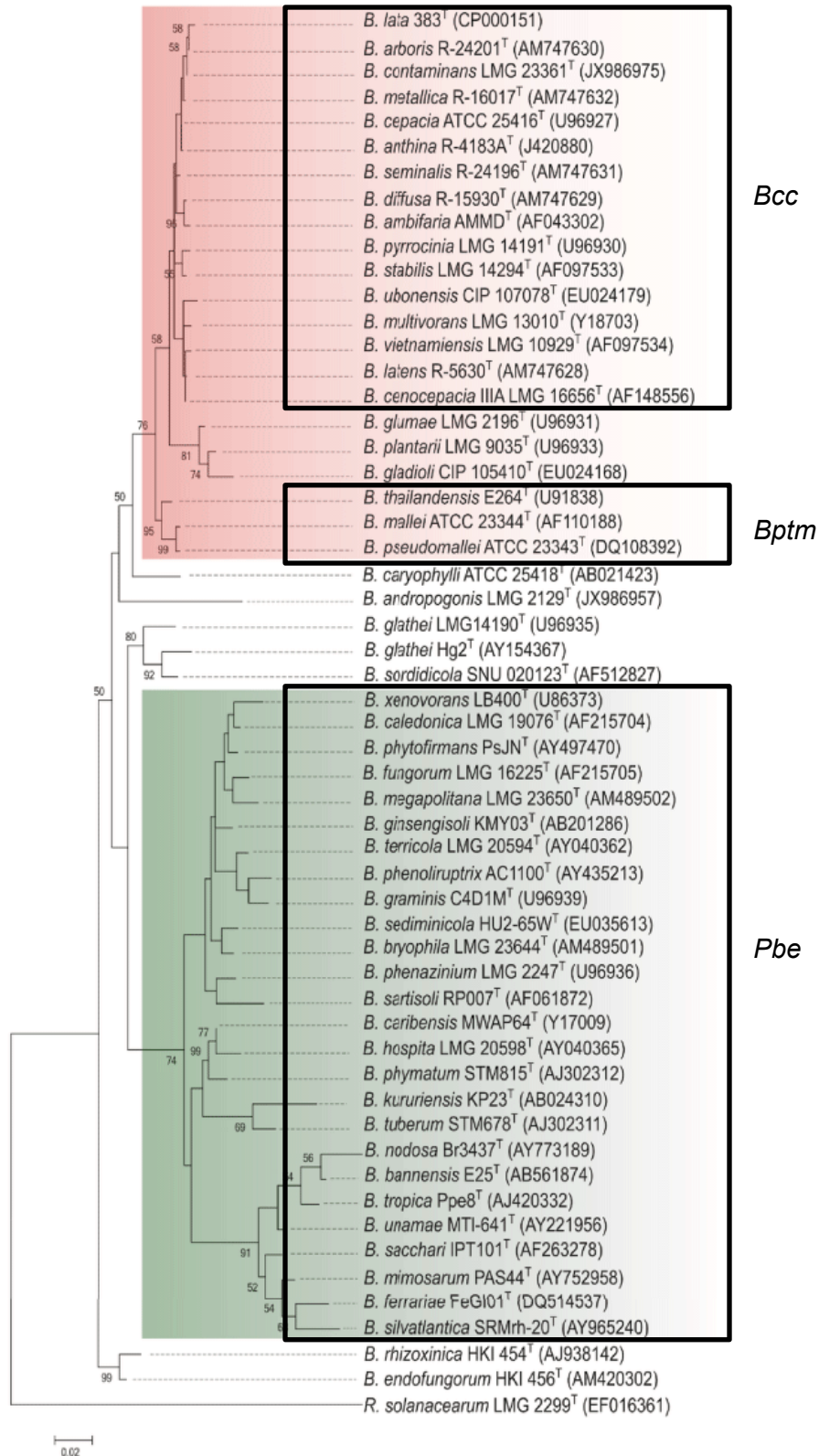


Figure 1.1 : Arbre phylogénétique du genre *Burkholderia* basé sur les séquences d'ARN 16S.
Adapté de Eberl & Vandamme, 2016.

1.1.1 Groupe Bptm

Le groupe Bptm est une sous-catégorie du genre *Burkholderia* qui comprend *B. thailandensis* et les deux espèces pathogènes *B. pseudomallei* et *B. mallei* (Majerczyk *et al.*, 2014b).

Ces bactéries contiennent deux chromosomes. Le premier contrôle les fonctions principales qui sont associées au métabolisme central et à la croissance cellulaire, comme pour la biosynthèse de macromolécules, le métabolisme des acides aminés ainsi que la mobilité (Nierman *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006). Le deuxième chromosome s'occupe majoritairement des fonctions secondaires qui sont associées à l'adaptation et à la survie dans différentes niches écologiques, comme pour la protection osmotique, l'acquisition du fer, la régulation, la production de métabolismes secondaires ou la régulation du *quorum sensing* (Nierman *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006).

Les bactéries de ce groupe ont un génome très conservé. En effet, *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* partagent environ 85% de leur génome (répartie sur leurs deux chromosomes) (Yu *et al.*, 2006). Une des grandes différences entre ces espèces est l'acquisition de divers facteurs de virulence chez *B. pseudomallei* qui lui permet d'infecter l'humain. *B. mallei*, l'agent causatif de la morve chez les équidés, quant à lui, contient un génome réduit par rapport aux deux autres espèces de son groupe. Il semble avoir conservé les gènes nécessaires pour l'infection de son hôte et délaissé les gènes lui permettant de vivre dans l'environnement (Nierman *et al.*, 2004).

B. pseudomallei et *B. thailandensis* sont des bactéries saprophytes qui se nourrissent de matière organique morte. On les retrouve donc dans les sols, plus particulièrement dans les milieux humides, telles les rizières. Elles colonisent les régions tropicales et subtropicales, surtout en Asie du Sud-est et au nord de l'Australie, mais elles ont également été retrouvées en Afrique et en Amériques (Brett *et al.*, 1997; Brett *et al.*, 1998; Wiersinga *et al.*, 2006).

1.1.2 *Burkholderia mallei*

L'espèce *B. mallei*, est reconnue pour causer la morve chez les équidés et les solipèdes (DeShazer & Waag, 2005). C'est un zoopathogène obligatoire et on l'isole donc seulement d'animaux infectés. L'espèce *B. mallei* semble avoir évolué de *B. pseudomallei* qui avait infecté un animal (Godoy *et al.*, 2003). Il semble par la suite y avoir eu érosion de son génome par une perte de gènes lui conférant un avantage dans l'environnement afin de conserver uniquement les gènes lui permettant de survivre chez son hôte (Nierman *et al.*, 2004). En effet, même si cette bactérie est similaire aux deux autres de son groupe, elle contient environ 1000 gènes de moins

que *B. pseudomallei*. Elle est toujours endémique dans diverses régions de l'Asie, de l'Afrique et au Moyen-Orient (Whitlock *et al.*, 2007). Elle est également considérée comme un agent de bioterrorisme (Rotz *et al.*, 2002). Son étude requiert donc un laboratoire ayant un niveau de biosécurité 3.

1.1.3 *Burkholderia pseudomallei*

B. pseudomallei est l'agent pathogène responsable de la mélioïdose chez l'humain (Cheng & Currie, 2005). Cette maladie se manifeste généralement sous la forme d'abcès sur différents organes, ou dans les cas aigus sous la forme de pneumonie (Leelarasamee, 2004). Il est possible de contracter une infection par l'inhalation, l'ingestion ou par des plaies ayant été en contact avec de l'eau ou des sols contaminés par *B. pseudomallei*. (Wiersinga *et al.*, 2006). Puisque *B. pseudomallei* contient plusieurs pompes à efflux, elle est multirésistante à la plupart des antibiotiques, ce qui rend son traitement difficile (Podnecky *et al.*, 2015). Dans les régions où elle est endémique, elle se retrouve parmi les causes de mortalité les plus élevées par infections bactériennes (Limmathurotsakul *et al.*, 2010). Cette bactérie est d'ailleurs reconnue comme un agent de bioterrorisme en raison de son taux de mortalité élevé (Rotz *et al.*, 2002). Son étude est donc difficile, puisqu'elle requiert un laboratoire de niveau de biosécurité 3.

1.1.4 *Burkholderia thailandensis*

L'espèce *B. thailandensis* a été proposée à la suite d'études phylogénétiques de souche de *B. pseudomallei*. L'observation de différences dans leurs séquences ribosomales 16S et leur virulence a permis l'identification de cette nouvelle espèce (Brett *et al.*, 1998). *B. thailandensis* est une bactérie non pathogène chez l'humain mais reste infectieuse chez plusieurs modèles de laboratoire, tels que les insectes (*Galleria mellonella*), les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) et les plantes (*Pereskia aculeata*), ce qui permet tout de même l'étude de sa virulence (Klaus *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2017; Molchanova & Ageeva, 2015). Puisque les bactéries du groupe Bptm possèdent un génome très conservé, on utilise habituellement *B. thailandensis* comme organisme modèle (Haraga *et al.*, 2008). En effet, puisqu'elle n'est pas pathogène pour l'humain, elle ne nécessite qu'un laboratoire de niveau de biosécurité 1, ce qui rend son étude plus facile. Sa capacité à infecter des modèles de laboratoire nous permet tout de même d'étudier sa virulence et possiblement d'augmenter notre compréhension des mécanismes d'infections des deux autres espèces du groupe Bptm. En effet, une des grandes différences entre *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* est l'acquisition de facteurs de virulences. *B. pseudomallei* aurait acquis un

système de sécrétion de type III, ce qui lui permettrait d'infecter les mammifères (Yu *et al.*, 2006), Alors que ce système n'est pas présent chez *B. thailandensis*.

1.2 La communication intercellulaire chez les microorganismes (*Quorum sensing*)

Les bactéries sont connues pour adopter différents modes de vie. On les retrouve sous forme planctonique, où elles vivent de façon libre, ou sous forme sessile, où elles vivent en communauté attachée à une surface nommée biofilm. Le *quorum sensing* (QS) permet aux individus composant une communauté bactérienne de communiquer entre eux afin de développer un mode de vie coopératif. Il permet entre autres à la communauté de créer des biofilms ou de synthétiser divers métabolites secondaires afin de leur donner un avantage. Cela permet par exemple à la communauté de favoriser sa survie, ou d'infecter un hôte. Ce mécanisme permet une modulation globale de l'expression génique en fonction de la densité de la population.

Le QS a tout d'abord été décrit chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* (renommée *Aliivibrio fischeri*) par l'induction de la bioluminescence à l'aide de molécules produites durant la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire (Fuqua *et al.*, 1994). Ces molécules sont définies comme étant des auto-inducteurs. La quantité d'auto-inducteurs produits dans l'environnement est directement reliée à la densité de la population bactérienne. Ces molécules vont s'accumuler dans l'environnement durant la croissance bactérienne, jusqu'à atteindre une certaine concentration qui enclenchera une modulation de la transcription de certains gènes de façon coordonnée dans l'ensemble de la communauté bactérienne.

Nous retrouvons d'abord les auto-inducteurs de type 1 (AI-1) qui sont majoritairement spécifiques de l'espèce bactérienne qui les produit. Ils permettent donc une communication intercellulaire parmi les individus d'une espèce en particulier, malgré la présence d'autres espèces dans ce même environnement (Antunes & Ferreira, 2009). Cependant, certains de ces auto-inducteurs peuvent également être reconnus par d'autres bactéries qui colonisent les mêmes niches. Cela leur permet entre autres de créer des biofilms mixtes. Bien que la plupart des auto-inducteurs soient plutôt spécifiques à chaque espèce bactérienne, il existe également les auto-inducteurs de type 2 (AI-2) qui peuvent être reconnus par d'autres espèces bactériennes (Vendeville *et al.*, 2005). Ils sont utilisés pour la communication interespèce.

1.2.1 *Quorum sensing* chez les bactéries à Gram négatif

Le système de QS le plus répandu chez les bactéries à Gram négatif est le système LuxI/LuxR qui utilise des auto-inducteurs de type N-acyl-L-homosérine lactones (AHL) qui sont des auto-

inducteurs de type 1 (Fuqua *et al.*, 1994). Le principe du QS comprend tout d'abord une synthèse de type LuxI qui est responsable de la production d'un AHL en particulier. Ce dernier diffuse et s'accumule dans l'environnement durant la croissance bactérienne et est disponible pour la détection par les autres bactéries. À l'aide de leur récepteur spécifique de type LuxR, les bactéries de la même espèce seront en mesure de détecter la concentration d'auto-inducteurs présents dans l'environnement, ce qui leur permettra d'évaluer la densité de leur propre communauté. Lorsque le niveau aura atteint un *quorum*, l'auto-inducteur se liera au régulateur transcriptionnel de type LuxR de façon plus significative, ce qui permettra la modulation de la transcription de gènes spécifiques de façon coordonnée dans la population (Fig. 1.2). Les systèmes de QS forment habituellement une boucle de rétroaction positive; en effet, le gène de type *luxI* codant pour la synthèse des AHL fait partie des cibles du régulateur de type LuxR. Donc plus il y aura d'accumulation d'auto-inducteur, plus les bactéries en produiront. Les régions où se lient les régulateurs de type LuxR se nomment des boîtes *lux*. Ce sont des régions de 20 paires de bases situées dans la région promotrice des gènes qu'ils régulent (Egland & Greenberg, 1999).

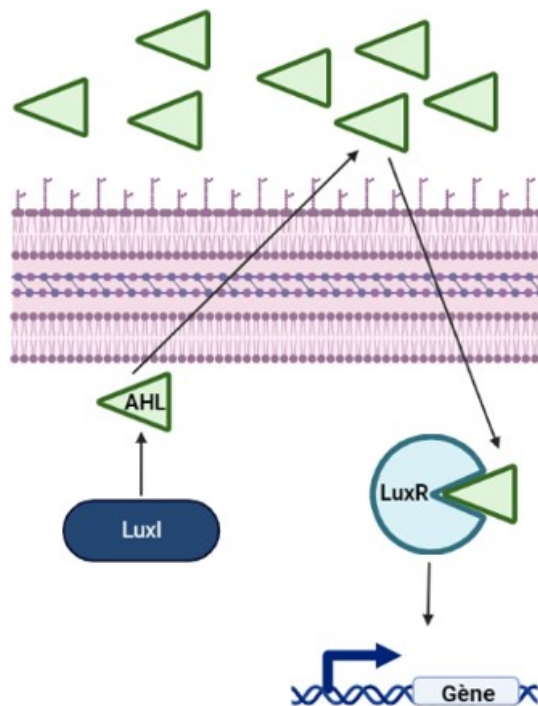


Figure 1.2 : Représentation schématique du *quorum sensing* d'un système LuxI/LuxR.

Réalisé à l'aide de Biorender.

1.2.2 Quorum sensing chez le groupe Bptm

Comme la majorité des autres bactéries à Gram négatif, le groupe Bptm utilise des systèmes de QS de type LuxI/LuxR. Ils produisent une grande variété d'auto-inducteurs de type AHL et possèdent de deux à trois systèmes de QS.

On retrouve chez *B. pseudomallei* les systèmes BpsI/BpsR, BpsII/BpsR2 et BpsIII/BpsR3 (Ulrich *et al.*, 2004a). Ces systèmes permettent la production de plusieurs AHL : *N*-decanoyl-homoserine lactone (C₁₀-HSL), *N*-octanoyl-homoserine lactone (C₈-HSL), *N*-3-hydroxy-octanoyl-homoserine lactone (3OHC₈-HSL), *N*-3-hydroxy-decanoyl-homoserine lactone (3OHC₁₀-HSL), *N*-3-oxo-tetradecanoyl-homoserine lactone (3OC₁₄-HSL), *N*-3-oxo-octanoyl-homoserine lactone (3OC₈-HSL) et le *N*-3-hydroxy-dodecanoyl-homoserine lactone (3OHC₁₂-HSL) (Lumjiaktase *et al.*, 2006; Ulrich *et al.*, 2004a; Valade *et al.*, 2004). Le système BpsI/BpsR serait important pour l'établissement d'infections chroniques, puisqu'il intervient dans la production d'exopolysaccharides (EPS), la formation de biofilms, ainsi que dans la résistance aux antibiotiques (Horton *et al.*, 2013; Mongkolrob *et al.*, 2015).

On retrouve chez *B. mallei* les systèmes BmaI1/BmaR1 et BmaI3/BmaR3 (Ulrich *et al.*, 2004b). Ces systèmes fonctionnent avec les AHL suivantes : C₈-HSL, 3OHC₈-HSL et C₁₀-HSL (Ulrich *et al.*, 2004b).

On retrouve chez *B. thailandensis* trois systèmes de type LuxI/LuxR : BtaI1/BtaR1, BtaI2/BtaR2 et BtaI3/BtaR3 (Ulrich *et al.*, 2004c). Ces systèmes fonctionnent à base de *N*-hexanoyl-homoserine lactone (C₆-HSL), C₈-HSL, C₁₀-HSL, 3OHC₈-HSL et 3OHC₁₀-HSL (Chandler *et al.*, 2009; Duerkop *et al.*, 2009; Le Guillouzer *et al.*, 2017; Le Guillouzer *et al.*, 2018; Ulrich *et al.*, 2004c).

Les premiers systèmes de QS (QS-1) de ces bactéries, soit les systèmes BpsI/BpsR, BtaI1/BtaR1 et BmaI1/BmaR1 sont très conservés chez ces trois bactéries et produisent majoritairement le C₈-HSL (Majerczyk *et al.*, 2013).

Les deuxièmes systèmes de QS (QS-2) sont quant à eux très conservés chez *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* (Majerczyk *et al.*, 2013). Cependant, le QS-2 est absent chez *B. mallei*. Cette bactérie semble l'avoir perdu au cours de son évolution. Le QS-2 semble être important pour le mode de vie saprophyte de *B. thailandensis* et *B. pseudomallei*, notamment par la régulation de la production de la bactoboline, un antibiotique qui leur donnent un avantage compétitif dans leur environnement (Duerkop *et al.*, 2009; Majerczyk *et al.*, 2014a; Majerczyk *et al.*, 2014b). L'AHL

majoritairement produite par les systèmes BpsI2/BpsR2 et BtaI2/BtaR2 est le 3OHC₁₀-HSL (Majerczyk *et al.*, 2013).

Les troisièmes systèmes de QS (QS-3) de ces bactéries, soit les systèmes BpsI3/BpsR3, BtaI3/BtaR3 et BmaI3/BmaR3 sont également très conservés et produisent de façon majoritaire le 3OHC₈-HSL (Majerczyk *et al.*, 2013). Chez *B. pseudomallei* et *B. mallei* ce système semble être important pour la virulence (Ulrich *et al.*, 2004a; Ulrich *et al.*, 2004b). Cependant, l'importance de ce système pour la virulence de *B. thailandensis* n'a pas encore été étudiée. Un résumé des différents systèmes de QS de chaque bactérie du groupe BPTM se retrouve dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : : Liste des différents récepteurs, synthases et AHL majoritaires produits dans le groupe Bptm

		<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. thailandensis</i>	<i>B. mallei</i>
QS-1	Régulateur	BpsR	BtaR1	BmaR1
	Synthase	BpsI	BtaI1	BmaI1
	AHL majoritaire	C ₈ -HSL		
QS-2	Régulateur	BpsR2	BtaR2	-
	Synthase	BpsI2	BtaR2	-
	AHL majoritaire	3OHC ₁₀ -HSL		
QS-3	Régulateur	BpsR3	BtaR3	BmaR3
	Synthase	BpsI3	BtaI3	BmaI3
	AHL majoritaire	3OHC ₈ -HSL		

Le groupe Bptm contient également quelques régulateurs transcriptionnels de type LuxR conservés qui sont «orphelins» (Majerczyk *et al.*, 2013); en effet, ils ne possèdent pas de synthase LuxI correspondante. On retrouve d'abord chez *B. pseudomallei*, *B. mallei* et *B. thailandensis* les régulateurs BpsR4, BmaR4 et BtaR4 qui sont très conservés (Majerczyk *et al.*, 2013). Chez *B. thailandensis*, BtaR4 serait important pour la régulation de la production de lipase, ainsi que pour le métabolisme et le transport de diverses sources de carbone (Ulrich *et al.*, 2004c). Ce régulateur semble également être important dans la virulence de la bactérie via la régulation de la production de malleilactone chez *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* (Biggins *et al.*, 2012; Klaus *et al.*, 2018). Cependant, la fonction de ce régulateur n'est toujours pas connue chez *B. mallei*. On retrouve également chez *B. pseudomallei*, *B. mallei* et *B. thailandensis* les régulateurs BpsR5, BmaR5 et BtaR5 (Majerczyk *et al.*, 2013). Chez *B. thailandensis*, BtaR5 est activé par la production de C₈-HSL, 3OHC₈-HSL et 3OHC₁₀-HSL chez les mutants $\Delta btaI1$, $\Delta btaI2$ et $\Delta btaI3$ (Majerczyk *et al.*, 2014a). Il semble être important dans la production de lipase et également dans le métabolisme et le transport de diverses sources de carbone (Ulrich *et al.*,

2004c). Alors que chez *B. pseudomallei* et *B. mallei* les régulateurs BpsR5 et BmaR5 semblent être important pour la virulence (Ulrich *et al.*, 2004a; Ulrich *et al.*, 2004b).

1.2.3 Quorum sensing chez *Burkholderia thailandensis*

Tel que mentionné ci-dessus, *B. thailandensis* contient trois systèmes de QS de types LuxI/LuxR. Ils sont composés d'une synthase (BtaI1, BtaI2, BtaI3) qui produit des AHL (C₈-HSL, 3OHC₁₀-HSL, et 3OHC₈-HSL, respectivement) qui, lorsqu'un quorum est atteint, vont se lier à leurs régulateurs transcriptionnels respectifs (BtaR1, BtaR2, BtaR3). Le régulateur transcriptionnel pourra par la suite aller réguler les gènes voulus, dont la synthase afin de créer une boucle de rétroaction positive (Fig. 1.3) (Le Guillouzer *et al.*, 2020).

Le principal AHL produit par BtaI1 est le C₈-HSL, mais il produit également du 3OHC₈-HSL (Chandler *et al.*, 2009; Le Guillouzer *et al.*, 2018). Le QS-1 est important pour l'agrégation et la formation de biofilm, notamment pour son implication dans la régulation de la production d'EPS (Chandler *et al.*, 2009; Tseng *et al.*, 2016). Ce système est également important pour l'activité « contact-dependent inhibition » et la motilité (Chandler *et al.*, 2009; Majerczyk *et al.*, 2014a).

Le principal AHL produit par BtaI2 est le 3OHC₁₀-HSL, mais il produit également du C₁₀-HSL et 3OHC₈-HSL (Duerkop *et al.*, 2009; Le Guillouzer *et al.*, 2018; Ulrich *et al.*, 2004c). Le QS-2 est particulièrement important pour la régulation de la production de bactoboline (Carr *et al.*, 2011; Chandler *et al.*, 2012; Duerkop *et al.*, 2009; Seyedsayamdost *et al.*, 2010).

Le principal AHL produit par BtaI3 est le 3OHC₈-HSL, mais il pourrait produire également du 3OHC₁₀-HSL (Chandler *et al.*, 2009; Le Guillouzer *et al.*, 2017).

Les systèmes QS-1 et QS-3 de cette bactérie semblent être impliqués dans la régulation de la production de métabolites secondaires, notamment les rhamnolipides (Majerczyk *et al.*, 2016; Martinez *et al.*, 2020). Cette régulation se ferait possiblement via le régulateur transcriptionnel ScmR qui sera présenté à la section 1.2.6 (Le Guillouzer *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2017).

Les trois systèmes de QS de cette bactérie sont impliqués dans la modulation de la morphologie coloniale (Chandler *et al.*, 2009). Le QS de *B. thailandensis* est également important pour la production de métabolites secondaires qui permet à la bactérie d'obtenir plusieurs avantages dans son environnement.

B. thailandensis produit également les protéines RsaM1 et RsaM2 qui permettent d'inhiber les systèmes BtaR1/BtaI1 et BtaR2/BtaI2, respectivement (Le Guillouzer *et al.*, 2018). Même s'ils sont impliqués dans la régulation des autres systèmes, ils inhibent majoritairement leurs propres

systèmes. Ils semblent utiliser différents mécanismes d'actions afin d'y arriver, mais ils y arrivent majoritairement en inhibant la production de C₈-HSL et 3OHC₁₀-HSL via la répression de la transcription de leurs synthases respectives, *bta11* et *bta12*. Leur mode de fonctionnement reste inconnu.

Les trois systèmes de QS de *B. thailandensis* sont interdépendants (Fig. 1.3). En effet, ils interagissent entre eux selon le stade de croissance de la population. Les systèmes QS-1 et QS-2 sont surtout exprimés durant la phase exponentielle, alors que le système QS-3 est principalement exprimé durant la phase stationnaire (Le Guillouzer *et al.*, 2017). De plus, la production de C₈-HSL, ainsi que la transcription de *bta11* du système QS-1 sont inhibées par BtaR2 (Le Guillouzer *et al.*, 2017; Le Guillouzer *et al.*, 2018). Alors que BtaR1 et la production de C₈-HSL active le régulateur BtaR3 du système de QS-3 (Le Guillouzer *et al.*, 2017; Majerczyk *et al.*, 2014a). Notons que les régulateurs transcriptionnels BtaR1 et BtaR3 partagent plusieurs cibles qui sont affectées autant par le C₈-HSL et le 3OHC₈-HSL (Majerczyk *et al.*, 2014a). D'autres interactions peuvent être observées à la figure 1.3, qui représente la complexité du QS chez cette bactérie.

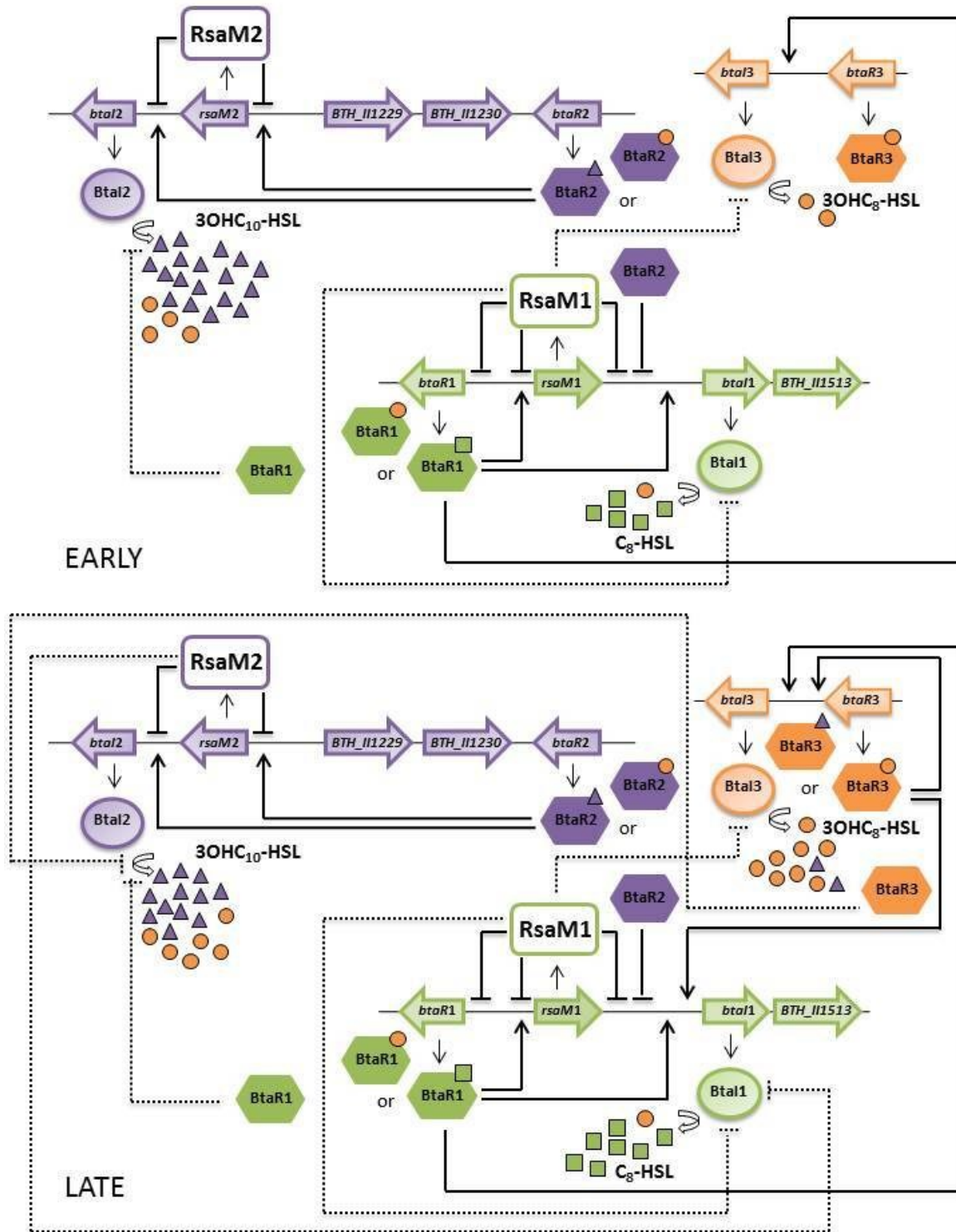


Figure 1.3 : Représentation schématique des trois systèmes de quorum sensing de *Burkholderia thailandensis* et leurs interactions.

Tiré de Le Guillouzer *et al.*, 2018.

1.2.4 L'opéron *hmqABCDEFGF*

L'opéron *hmqABCDEFGF* de *B. thailandensis* est responsable de la production de 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ), des métabolites qui s'accumulent au cours de sa croissance (Vial *et al.*, 2008). Les principaux HMAQ produits par la souche E264 sont les HMAQ-C9:2' et les HMAQNO-C9:2' (Vial *et al.*, 2008). On retrouve cet opéron également chez *B. pseudomallei*, ainsi que chez quelques espèces du groupe *Bcc* (Vial *et al.*, 2008).

On retrouve un opéron similaire chez *Pseudomonas aeruginosa*, nommé *pqsABCDE*, qui est responsable de la production des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ), tel que le 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline (*Pseudomonas* Quinolone Signal : PQS) et le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) (Déziel *et al.*, 2004). Chez *P. aeruginosa*, les HAQ sont impliqués dans la virulence et la communication intercellulaire (Diggle *et al.*, 2006a). En effet, le HHQ et le PQS agissent comme activateurs/auto-inducteurs du régulateur transcriptionnel MvfR (aussi nommé PqsR). Ce dernier participe à la régulation de la transcription de plus de 100 gènes selon la densité cellulaire, incluant sa principale cible *pqsABCDE* et forme donc un système de QS chez *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006a; Xiao *et al.*, 2006b). De plus, la protéine PqsE de l'opéron semble être directement impliquée dans le QS de la bactérie et la virulence. Plus précisément PqsE semble promouvoir l'activité du régulateur de type LuxR nommé RhIR, vraisemblablement par un rôle de chaperonne (Borgert *et al.*, 2022; Groleau *et al.*, 2020; Letizia *et al.*, 2022).

Chez *B. thailandensis*, les HMAQ semblent également être impliqués dans la virulence et pourraient aussi être impliqués dans la communication interspèce (Klaus *et al.*, 2020). Certains HMAQ inhibent la croissance de bactéries à Gram positif, ce qui apporterait un avantage à l'espèce dans un environnement compétitif (Mou *et al.*, 2021). Par exemple, les HMAQ-N-Oxyde dérivés des HMAQ ont une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis* encore plus grande que celle des HMAQ conventionnels (Klaus *et al.*, 2020). Les HMAQ sont également impliqués dans divers processus chez différentes espèces du genre *Burkholderia*, tels que la biosynthèse de protéases extracellulaires, la formation de biofilms, la morphologie coloniale, ainsi que l'activité antifongique (Butt *et al.*, 2016; Diggle *et al.*, 2006b; Vial *et al.*, 2008).

Tout comme pour la biosynthèse des HAQ, l'opéron *hmqABCDEFGF* utilise l'acide anthranilique comme précurseur pour la synthèse des HMAQ (Vial *et al.*, 2008). Les enzymes HmqADE sont par la suite nécessaires pour l'activation de l'acide anthranilique en ester CoA à l'aide de CoA. Les produits de HmqG et HmqF sont quant à eux nécessaires afin d'ajouter le groupement méthyle supplémentaire, puis pour l'insaturation respectivement (Fig. 1.4) (Agarwal *et al.*, 2012). Ces deux protéines qui n'ont pas d'homologue chez *P. aeruginosa* permettent la production d'HAQ méthylé

et insaturé que l'on retrouve dans le genre *Burkholderia*. La protéine HmqL, dont le gène se retrouve en dehors de l'opéron, est importante dans la biosynthèse des HMAQ-N-Oxyde (Vial *et al.*, 2008). Elle utilise les HMAQ comme précurseur afin de produire les dérivés HMAQ-NO.

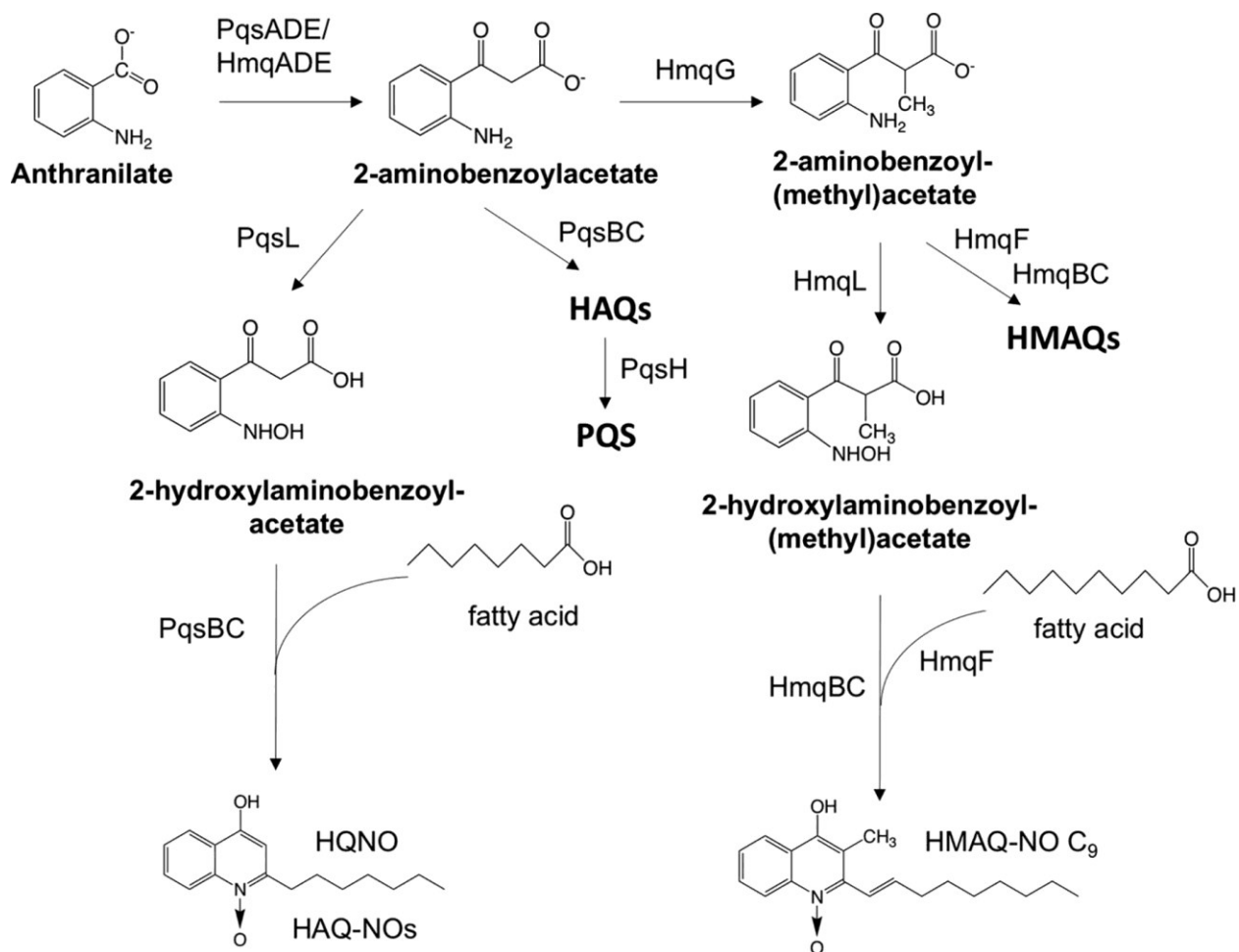


Figure 1.4 : Schémas de la biosynthèse des différents congénères de HMAQ chez *Burkholderia thailandensis*.

Tiré de Klaus *et al.*, 2020.

Même si l'opéron *hmqABCDEFG* est bien décrit dans la littérature, la fonction de la protéine HmqE est toujours inconnue. À cause de la grande similarité entre PqsE de *P. aeruginosa* et HmqE de *B. thailandensis*, ces deux protéines pourraient avoir des fonctions similaires (Diggle *et al.*, 2006b). Selon sa séquence protéique, HmqE pourrait appartenir à la famille des metallo- β -lactamase, tout comme la protéine PqsE (Yu *et al.*, 2009). Cependant bien que la protéine PqsE fasse partie de ce groupe, elle contient un site actif de thioestérase, qui lui permet de convertir

les précurseurs des HAQ (Drees & Fetzner, 2015). Vial et al. (2008) ont réalisé un mutant *hmqA*- par délétion et ont observé une abolition de la production des différents HMAQ habituellement produit par *B. thailandensis*. Par la suite, en étudiant l'opéron *hmqABCDEFG* de *B. thailandensis*, Le Guillouzer et al. (2018) ont remarqué que certains phénotypes, tel que la morphologie coloniale, observés chez un mutant *hmqA*- ne produisant plus d'HMAQ ne pouvaient pas être complétés par l'ajout d'HMAQ. Selon l'hypothèse qu'une mutation dans le premier gène de l'opéron empêche la transcription des gènes suivant, il a été proposé que ces phénotypes pourraient être plutôt liés à la perte de la fonction d'HmqE. La réalisation d'un mutant $\Delta hmqE$ non polaire chez *B. thailandensis* pourrait permettre d'en apprendre plus sur sa fonction.

1.2.5 Régulateurs transcriptionnels de type LysR

Les régulateurs transcriptionnels de type LysR (LTTR) sont des régulateurs globaux qui influencent l'expression de divers gènes de façon directe ou indirecte (Henikoff *et al.*, 1988). Ils sont très répandus et conservés chez les eucaryotes et les bactéries (Maddocks & Oyston, 2008).

Une des caractéristiques permettant d'identifier les LTTR est le domaine hélice-coude-hélice utilisé pour lier l'ADN dans la région promotrice des gènes qu'ils régulent. Cette séquence est très conservée entre les différents LTTR. Chez les LTTR agissant comme des activateurs ce domaine se retrouve dans la région C-terminal, alors que pour les répresseurs, elle se retrouve en N-terminal (Pérez-Rueda & Collado-Vides, 2000). Pour les régulateurs agissant à la fois comme répresseur et activateur, il est possible de la retrouver à une distance de 20 à 90 paires de bases du N-terminal (Maddocks & Oyston, 2008). On retrouve habituellement en C-terminal un domaine moins conservé servant à lier un co-facteur qui permet au régulateur transcriptionnel de moduler son activité. Ces ligands/co-facteurs sont souvent nécessaires afin de réguler de façon négative le régulateur. En effet la régulation des LTTR forme habituellement une boucle de rétroaction négative (Celis, 1999; van Keulen *et al.*, 2003).

Les LTTR sont reconnus pour se lier à deux sites dans la région promotrice des gènes qu'ils régulent. Ils se lient premièrement au « regulatory binding site » (RBS) qui est composé d'une séquence palindromique T-N₁₁-A (Parsek *et al.*, 1994). Ils se lient également au « activation binding site » (ABS) qui est également composé d'une séquence T-N₁₁-A, mais qui ne nécessite pas un palindrome (Maddocks & Oyston, 2008). La liaison du LTTR à ces sites est dépendante de l'affinité pour son ligand. Le LTTR seul aura de l'affinité pour le site RBS, alors qu'un LTTR en complexe avec son ligand aura plus d'affinité pour le site ABS. La forme active des LTTR nécessite habituellement la formation d'un tétramère (Muraoka *et al.*, 2003). Un premier dimère

se lie au site RBS, puis un deuxième au site ABS, ce qui forme un tétramère. Par la suite, le co-facteur vient se lier au complexe afin d'activer la transcription du gène cible (Maddocks & Oyston, 2008).

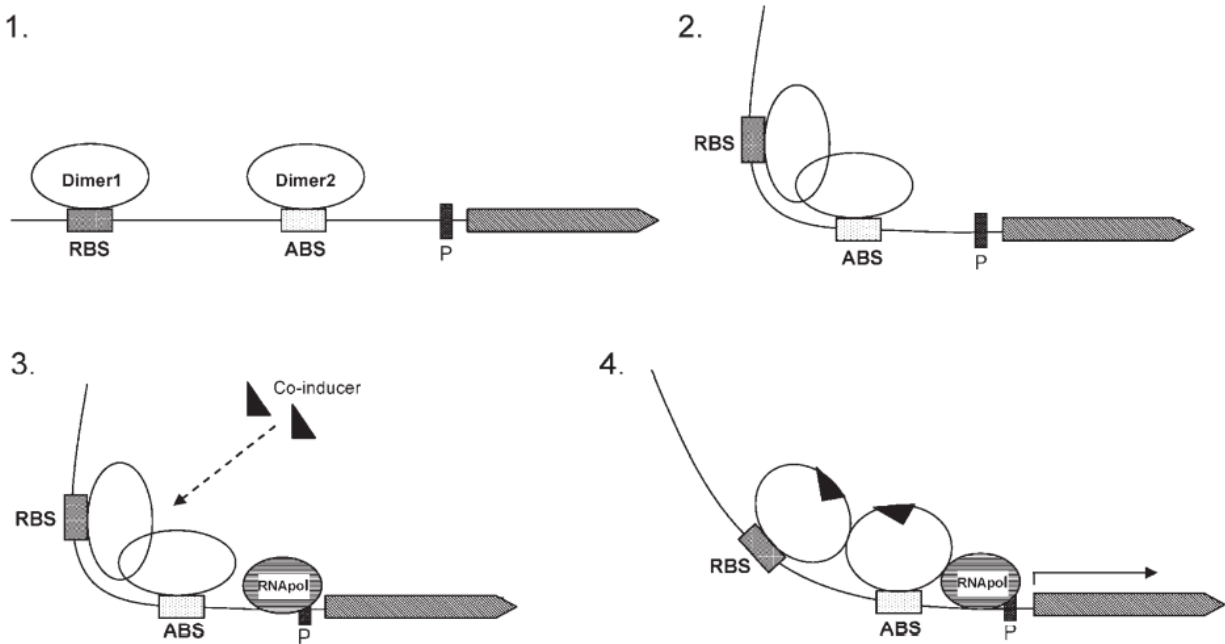


Figure 1.5 : Représentation de la liaison d'un régulateur transcriptionnel de type LysR dans la région promotrice d'un gène.

Tiré de Maddocks & Oyston, 2008.

1.2.6 Le régulateur transcriptionnel ScmR

ScmR est un régulateur transcriptionnel que l'on retrouve chez les espèces du groupe Bptm. Ce dernier a d'abord été identifié chez *B. thailandensis* (Mao *et al.*, 2017). Son nom provient de sa capacité à réguler divers métabolites secondaires : « SeCONDary Metabolite Regulator ». Il régule majoritairement ses gènes-cibles de façon négative, dont les opérons *mal* (malléilactone), *bta* (bactoboline) et *tha* (thailandamide), qui sont impliqués dans la biosynthèse de facteurs de virulence et de survie. Il est également impliqué dans la formation de biofilms ainsi que la production de métabolites secondaires (Mao *et al.*, 2017). Il semble favoriser la transition vers un mode de vie planctonique afin de trouver un environnement plus favorable pour la croissance de la bactérie.

ScmR fait partie de la famille des régulateurs transcriptionnels de type LysR (LTTR). (Mao *et al.*, 2017) En effet, selon les prédictions, on y retrouve un domaine hélice-coude-hélice en N-terminal,

une caractéristique des LTTR (Maddocks & Oyston, 2008). Tel qu'expliqué ci-haut, la partie C-terminal servirait à la liaison d'un co-facteur qui permettrait au régulateur transcriptionnel de moduler son activité (Le Guillouzer *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2020)

Bien qu'aucun co-facteur n'ait été identifié à ce jour, une étude récente propose que la xanthine puisse agir comme ligand de ScmR (Thapa *et al.*, 2022). Selon ces auteurs, ScmR est un répresseur du gène *mbaS*, impliqué dans la production de la malleobactine. Ils ont remarqué que lors d'ajout de xanthine ou d'allopurinol dans les cultures (ce qui augmente la concentration de xanthine ; Fig. 1.6), cela permet d'augmenter la répression du gène *mbaS*. Ils ont donc émis comme hypothèse qu'un dérivé purine, telle que la xanthine, agirait comme co-facteur de ScmR. Afin de tester leur hypothèse, les chercheurs ont utilisé AlphaFold2 afin de prédire la possible conformation d'un dimère de ScmR. Ils ont par la suite procédé à un « blind Docking » et ont identifié que la xanthine pourrait se lier à la protéine (Thapa *et al.*, 2022). Des vérifications *in vivo* seront toutefois nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

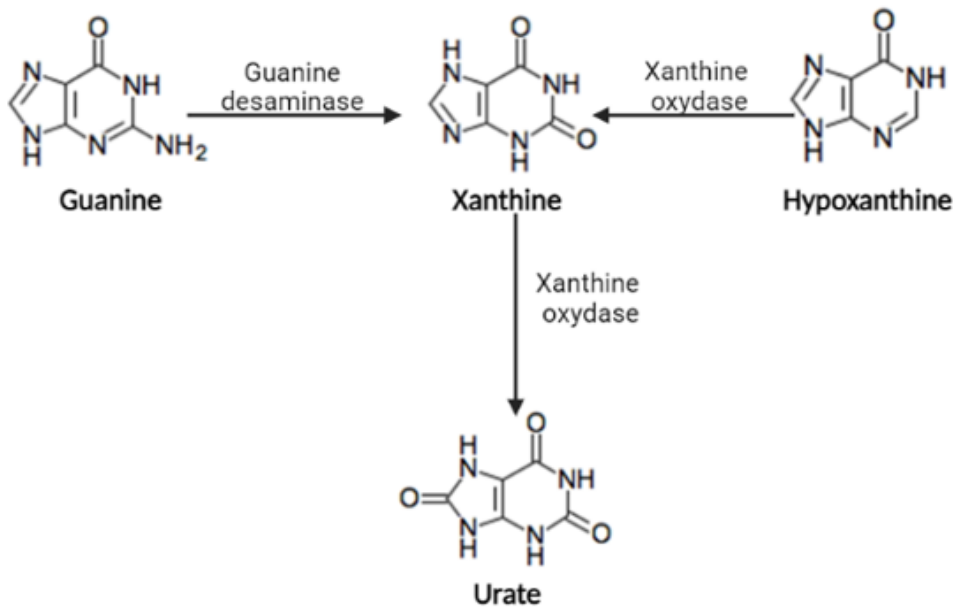


Figure 1.6 : Représentation d'une partie du métabolisme des purines chez *Burkholderia thailandensis*. Réalisé à l'aide de Biorender.

ScmR est important afin d'inhiber ou d'activer la transcription de divers opérons, tel que l'opéron *hmqABCDEFGF*, qui est responsable de la biosynthèse des HMAQ (Fig. 1.7). ScmR a d'ailleurs été découvert dans le laboratoire Déziel en 2009 lors de l'étude de la régulation de cet opéron.

En effet, lors d'un criblage de mutant aléatoire par transposon, l'étudiant Jean-Philippe Dumais a réussi à identifier sept mutants pour lesquels la production d'HMAQ et la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* étaient affectées (Dumais, 2010). Parmi ces mutants, il a identifié qu'une mutation dans le gène BTH_I1403 (plus tard identifié comme *scmR* par Mao *et al.* 2017) engendre une production presque nulle d'HMAQ expliquée par une perte de transcription de l'opéron *hmqABCDEFG*. Afin de vérifier si ScmR régule de façon directe cet opéron, l'étudiante Servane Le Guillouzer a effectué une expérience de transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* dans un système hétérologue chez *E. coli*. Cependant, aucune transcription significative n'a pu être observée lors de la présence de ScmR. Cela suggère que ScmR nécessiterait un co-activateur ou un régulateur intermédiaire, qui n'est pas présent, dans les conditions testées, chez *E. coli* afin de moduler son activité (Le Guillouzer, 2018).

ScmR semble également être impliqué dans la virulence. Il a été possible d'observer à l'aide de plusieurs modèles, tels que les drosophiles, le nématode ou la souris, que ScmR participe à l'inhibition de la virulence (Klaus *et al.*, 2018; Le Guillouzer *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2017). Mao *et al.*, 2017 ainsi que Klaus *et al.*, 2018 ont d'abord émis comme hypothèse que la modulation de la virulence était causée par la régulation des gènes *mal* participants à la biosynthèse de la malléilactone (Klaus *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2017). Cependant, aucune différence d'expression chez les gènes *mal* n'a été observée dans une étude transcriptomique de ScmR (Le Guillouzer, 2018). Cela suggère que ScmR ne régule pas directement les gènes *mal*, ou néanmoins, ne le fait pas dans les conditions de l'étude. Selon Klaus *et al.*, la régulation de la malléilactone se ferait sous forme de compétition entre les régulateurs ScmR et BtaR4 (Klaus *et al.*, 2018). Cependant, d'autres expériences seront nécessaires pour comprendre la régulation de la production de malléilactone.

ScmR est également impliqué dans le QS. En effet, la boîte *lux* qui précède le gène *scmR* permettrait aux régulateurs du QS (BtaR) de s'y lier pour activer sa transcription (Mao *et al.*, 2017). La transcription du gène *scmR* est diminuée chez un triple mutant QS ($\Delta btaR1 \Delta btaR2 \Delta btaR3$) (Le Guillouzer *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2017). Les systèmes de QS semblent donc activer la transcription de *scmR* afin que la protéine puisse à son tour activer ou inhiber la transcription d'autres gènes. Toutefois, plus d'expériences seront nécessaires afin de déterminer si un ou plusieurs de ces régulateurs affecte la transcription de *scmR*. La protéine ScmR arrive également à activer la biosynthèse des trois principaux AHL (C₈-HSL, 3OHC₈-HSL et 3OHC₁₀-HSL) chez *B. thailandensis* (Le Guillouzer *et al.*, 2020). ScmR pourrait donc utiliser trois méthodes

différentes afin de moduler son activité ; soit via le QS, en régulant directement certains gènes, ou en régulant d'autres régulateurs transcriptionnels (Mao *et al.*, 2017).

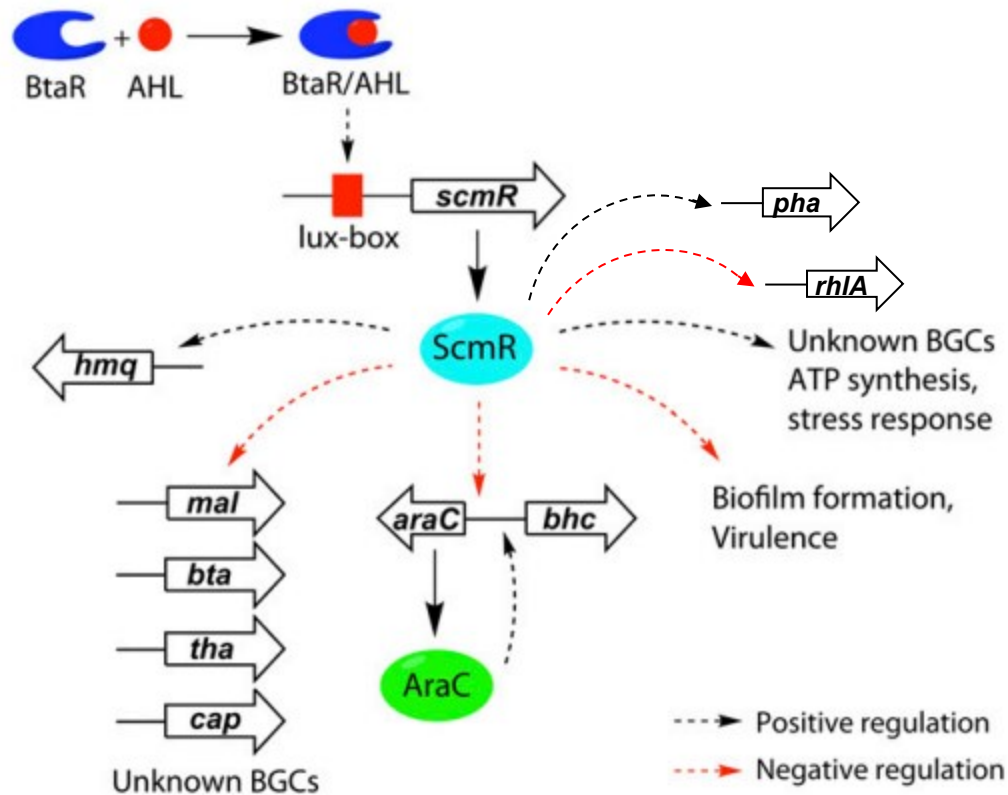


Figure 1.7 : Exemples d'opérons régulés par le régulateur transcriptionnel ScmR.

Adaptée de Mao *et al.*, 2017.

ScmR est également impliqué dans la biosynthèse de métabolites secondaires intéressants commercialement, tels que les polyhydroxyalkanoates (PHA), des polyesters biodégradables et les rhamnolipides, des biosurfactants (Martinez *et al.*, 2020). En effet, ScmR régule de façon positive les gènes *phaC* et *phaZ* impliqués dans la biosynthèse des PHA, et il régule de façon négative les gènes *rhIA1* et *rhIA2* qui sont responsables de la biosynthèse des rhamnolipides (Martinez *et al.*, 2020). Donc, l'inhibition ou l'augmentation de l'expression de ScmR pourrait augmenter la production de ces métabolites secondaires importants en industrie.

2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

2.1 Hypothèses

La première hypothèse émise est que le régulateur transcriptionnel ScmR nécessite un ligand afin de moduler son activité.

La deuxième hypothèse est que le régulateur transcriptionnel ScmR régule certains gènes de façon directe et d'autres de façon indirecte.

La troisième hypothèse est que la protéine HmqE de l'opéron *hmqABCDEFG* a une fonction similaire à la protéine homologue PqsE présente chez *P. aeruginosa*.

2.2 Objectifs

2.2.1 Objectif général

L'objectif général est de découvrir la fonction du régulateur transcriptionnel ScmR et celle de la protéine HmqE.

2.2.2 Objectifs spécifiques

- 1) Identifier le ligand hypothétique de ScmR via un criblage de mutants pour la production d'HMAQ.
- 2) Identifier les cibles directes et indirectes de ScmR en réalisant un ChIP-Seq.
- 3) Préciser la fonction d'HmqE par la réalisation d'un mutant propre, puis réaliser une étude phénotypique et fonctionnelle de ce dernier.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Souches bactériennes

Les bactéries utilisées dans cette étude sont toutes dérivées de la souche E264 de *Burkholderia thailandensis* provenant du laboratoire de E. Peter Greenberg (Department of Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA). Elles sont détaillées dans le tableau 3.1.

Les souches utilisées pour l'étude du ligand de ScmR sont décrites dans le tableau 4.1.

Le mutant *hmqA*- contient une mutation polaire, ce qui empêche la traduction de tous les gènes de l'opéron *hmqABCDEFG* (Vial *et al.*, 2008).

Les délétions $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$ ont été réalisés à l'aide d'un vecteur de recombinaison homologue. Ces mutants ne contiennent aucun gène de résistance supplémentaire et sont non polaires (Chandler *et al.*, 2009).

La souche *E. coli* SM10 est utilisée pour les conjugaisons. Son système de transfert RP4 lui permet le transfert d'un plasmide par conjugaison en contact avec une bactérie à Gram négatif (Simon *et al.*, 1983).

La souche *E. coli* χ 7213 est également utilisée pour les conjugaisons. Cette souche auxotrophe nécessite l'ajout d'acide diaminopimélique (DAP) dans son milieu de culture pour croître.

La souche *E. coli* BL21(DE3) est quant à elle utilisée comme vecteur d'expression pour la production de protéines.

Tableau 3.1 : Souches bactériennes utilisées durant cette étude.

Souche	Caractéristiques	Identification	Source
<i>Escherichia coli</i>			
Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell	F ⁻ , ϕ 80(<i>lacZ</i>) Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>hsdR</i> (rk-, mk+), Δ <i>recA1398</i> , <i>endA1</i> , <i>tonA</i>		pEASY-Uni Seamless Cloning and DNA Assembly Kit
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>] [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ^S))	ED778	Novagen
SM10 λ pir	<i>thi-1, thr-1, leuB6, tonA21, lacY1, supE44, recA1::RP4-2-Tc::Mu</i> [λ pir]; Km ^R	ED222	(Simon et al., 1983)

Souche	Caractéristiques	Identification	Source
χ7213	<i>thr-1, leuB6, fhuA21, lacY1, glnV44, recA1, ΔasdA4, Δ(zhf-2::Tn10), thi-1, RP4-2-Tc::Mu [λ pir]</i>	ED491	
DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻</i>	ED78	Invitrogen
Burkholderia thailandensis E264			
E264	Isolat clinique	ED864	(Brett <i>et al.</i> , 1998)
scmR-	E264 <i>scmR::pUT-mini-Tn5-Km; Km^R</i>	ED1023	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2020)
hmqA-	E264 <i>hmqA::pKNOCK-Cm; Cm^R</i> Mutation polaire.	ED999	(Vial <i>et al.</i> , 2008)
hmqG-	ISlacZ-PrhaBo-Tp/FRT; Tp ^R	ED2991	(Gallagher <i>et al.</i> , 2013)
ΔhmqE	Délétion de 496 pb du gène <i>hmqE</i> à l'aide du vecteur suicide pEX18tc- <i>pheS</i> . Mutation non polaire.	ED4520	Cette étude
E264::hmqA-lux	<i>hmqA-lux ; Tc^R</i>	ED3501	(Le Guillouzer, 2018)
hmqA::hmqA-lux	<i>hmqA-lux ; Tc^R</i>	ED3502	(Le Guillouzer, 2018)
hmqG::hmqA-lux	<i>hmqA-lux ; Tc^R</i>	ED3503	(Le Guillouzer, 2018)
ΔhmqE::hmqA-lux	<i>hmqA-lux ; Tc^R</i>	ED4521	Cette étude
ΔbtaR1	Délétion du gène <i>btaR1</i> à l'aide du vecteur suicide pJRC115.	ED867	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ΔbtaR2	Délétion du gène <i>btaR2</i> à l'aide du vecteur suicide pJRC115.	ED843	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
ΔbtaR3	Délétion du gène <i>btaR3</i> à l'aide du vecteur suicide pJRC115.	ED868	(Chandler <i>et al.</i> , 2009)
E264::bta1-lux	<i>bta1-lux ; Tc^R</i>	ED3330	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
hmqA::bta1-lux	<i>bta1-lux ; Tc^R</i>	ED3498	(Le Guillouzer, 2018)
ΔhmqE::bta1-lux	<i>bta1-lux ; Tc^R</i>	ED4530	Cette étude
E264::bta2-lux	<i>bta2-lux ; Tc^R</i>	ED3331	(Le Guillouzer <i>et al.</i> , 2017)
hmqA::bta2-lux	<i>bta2-lux ; Tc^R</i>	ED3499	(Chapalain <i>et al.</i> , 2017)
ΔhmqE::bta2-lux	<i>bta2-lux ; Tc^R</i>	ED4531	Cette étude

Souche	Caractéristiques	Identification	Source
E264::<i>btaI3-lux</i>	<i>btaI3-lux</i> ; Tc ^R	ED3332	(Le Guillouzer et al., 2017)
<i>hmqA</i>::<i>btaI3-lux</i>	<i>btaI3-lux</i> ; Tc ^R	ED3500	(Le Guillouzer, 2018)
Δ<i>hmqE</i>::<i>btaI3-lux</i>	<i>btaI3-lux</i> ; Tc ^R	ED4532	Cette étude

Le signe “ Δ ” est utilisé pour désigner une délétion qui entraîne une mutation non polaire, alors que le signe “.” est utilisé pour désigner une mutation par transposon, qui entraîne une mutation polaire.

3.2 Les plasmides

Les plasmides utilisés dans cette étude se retrouvent dans le tableau 3.2.

Les vecteurs d’expression pME6000 et pMLS7 permettent l’insertion de gènes dans leur site de clonage multiple. Ils permettent l’expression constitutive des gènes insérés et sont donc utilisés pour vérifier la complémentation d’une mutation (Lefebvre & Valvano, 2002).

Les plasmides construits à partir de mini-CTX-*lux* sont des vecteurs recombinants permettant une insertion chromosomique des gènes *lux* en aval de la région promotrice d’un gène voulu (Hoang *et al.*, 2000). Les gènes *lux* sont alors transcrits en même temps que la région promotrice qui les précède. Puisque les gènes *lux* permettent la production de luciférase qui peut être quantifiée par unité relative de lumière (URL), cela permet également de quantifier l’activité d’expression de la région promotrice dans lequel ils se retrouvent (Becher & Schweizer, 2000).

Le plasmide pET28a est utilisé pour ajouter une étiquette d’hexa poly histidine à une protéine à la position N-terminale ou C-terminale. Il contient un site de clonage multiple permettant d’insérer un gène d’intérêt dans le but de produire une protéine (Dubendorff & Studier, 1991).

Le plasmide pEX18tc-*pheS* est utilisé pour la création de mutants par recombinaison homologue. Ce plasmide possède une cassette de résistance à la tétracycline, ainsi que le gène *pheS* (Barrett *et al.*, 2008). Le gène *pheS*, en présence de Cl-phenylalanine, est toxique pour la bactérie. Ce système permet donc l’excision du reste du plasmide afin de ne garder que la mutation à l’endroit voulu.

Le plasmide pFTP1 contient le gène de résistance au triméthopime à l’intérieur d’une cassette «flippase recognition target» (FRT), ce qui permet d’ajouter une 2^e sélection lors de la construction d’un mutant (Choi *et al.*, 2005).

Le plasmide pFLPe4 code pour une recombinase de type flippase qui reconnaît les sites FRT. La recombinase permet l'excision d'une séquence d'ADN, comme un gène de résistance, qui est entouré de site FRT. Cela permet de créer un mutant sans sélection d'antibiotique (Choi *et al.*, 2008).

Tableau 3.2 : Plasmides utilisés durant cette étude

Plasmide	Caractéristiques	Source
pME6000	pBBR1 ori, <i>lacZ</i> , mob+, Tc ^R	(Maurhofer et al., 1998)
pMLS7	pBBR1 ori, promoteur PS7, Tp ^R , mob+	(Lefebvre & Valvano, 2002)
pJPD03	Insertion du gène BTH_I1403 aux sites de restrictions KpnI et HindIII de pME6000, Tc ^R	(Dumais, 2010)
pFTP1	Source de la cassette de résistance à la triméthopime FRT- <i>dhfrII</i> -FRT, Ap ^R Tp ^R	(Choi et al., 2005)
pFLPe4	pFLPe3::promoteur PS12 inséré en amont du gène <i>nptI</i> , Ap ^R Km ^R	(Choi et al., 2008)
pEX18tc-<i>pheS</i>	Plasmide de remplacement allélique basé sur <i>pheS</i> et Tc ^R	(Barrett et al., 2008)
pEX18tc-<i>pheS</i>::<i>hmqE</i>-Tp	Insertion de FRT- <i>dhfrII</i> -FRT entre les 200 premières et dernières paires de bases du gène <i>hmqE</i> , Tc ^R , Tp ^R	Cette étude
pSLG02	Région promotrice de <i>bta11</i> inséré aux sites de restrictions XhoI-BamHI dans mini-CTX- <i>lux</i> , Tc ^R	(Le Guillouzer et al., 2017)
pSLG03	Région promotrice de <i>bta12</i> inséré aux sites de restrictions XhoI-BamHI dans mini-CTX- <i>lux</i> , Tc ^R	(Le Guillouzer et al., 2017)
pSLG04	Région promotrice de <i>bta13</i> inséré aux sites de restrictions XhoI-BamHI dans mini-CTX- <i>lux</i> , Tc ^R	(Le Guillouzer et al., 2017)
pSLG05	Région promotrice de <i>hmqA</i> inséré aux sites de restrictions XhoI-BamHI dans mini-CTX- <i>lux</i> , Tc ^R	(Le Guillouzer, 2018)
pSLG17	pMLS7::BTH_I1931, Tp ^R	(Le Guillouzer, 2018)
pET28a	P _{T7} , <i>lacO</i> , MCS, facteur Xa, N et C-terminal 6xHis-Tag, <i>lacI</i> , Km ^R	Novagen
pGD1	Insertion du gène BTH_I1403 aux sites de restrictions BamHI et HindIII de pET28a, Km ^R	Cette étude
pGD2	Insertion du gène BTH_I1403 avec une étiquette de polyhistidine en N-terminal aux sites de restrictions BamHI et HindIII de pME6000, Tc ^R	Cette étude
pGD3	Insertion du gène BTH_I1403 aux sites de restrictions BamHI et HindIII de pET28a, Km ^R	Cette étude
pGD4	Insertion du gène BTH_I1403 avec une étiquette de polyhistidine en N-terminal aux sites de restrictions BamHI et HindIII de pME6000, Tc ^R	Cette étude
pGD5	Insertion du gène BTH_I1403 aux sites de restrictions NcoI et XhoI de pET28a, Km ^R	Cette étude
pGD6	Insertion du gène BTH_I1403 avec une étiquette de polyhistidine en C-terminal aux sites de restrictions BamHI et HindIII de pME6000, Tc ^R	Cette étude
pGD7	Insertion de la région promotrice du gène BTH_I1403 et du gène BTH_I1403 avec une étiquette de polyhistidine en N-	Cette étude

	terminal aux sites de restrictions BamHI et HindIII de pME6000, Tc ^R	
--	---	--

3.3 Les Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans cette étude sont décrits dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Site	Oligonucléotides	Séquence 5'-3' *
FRT	GD_FRTtp_Fwd	taaaacgacggccagtgccaATGCAGCACAGCACTCCAG
	GD_FRTtp_Rev	tagtacttcCAGCCAGTAGCGCAGGTG
Région 3' hmqE	GD_3_hmqE_Fwd	ctactggctgGAAGTACCTATTCCGAAG
	GD_3_hmqE_Rev	gaccgctgGAAGTTCCTATACTTTCTAGAG
Région 5' hmqE	GD_5_hmqE_fwd	taggaacttcGCACGCGGTCCGGCACGC
	GD_5_hmqE_Rev	attcgagctcgggtaccgggCTACGCGGCGCGCTGGAAC
Région 5' scmR	BamHI_scmR_fwd	tggacagcaaatgggtcgcctATGAACCAAATCCAGACC
Région 3' scmR	HindIII_scmR_rev	gggtcgcgagtcggccgcaTGCTGAAAAGAATCACGC
Région 5' scmR-6xHis	pET28a-scmR_fwd	cgaggtcgcggtatcgataATGGGCAGCAGCCATCATCATC
Région 3' scmR-6xHis	pET28a-scmR_rev	cggccgctctagaactagtgAGCCGGGCGTCACTGGAG
Région 5' scmR	NEW_6xHis_scmR_fwd	actttaagaaggagatatacATGCATCATCATCATCACATGAACCAAA TCC
Région 3' scmR	NEW_6xHis_scmR_rev	agtgggtggtggtggtgcaCTACTGGAGCCCGGCGAC
Région 5' scmR-6xHis	New_pET28a_6xHis_scmr_fwd	cgaggtcgcggtatcgataATGCATCATCATCATCACATGAACCAAA TCC
Région 3' scmR-6xHis	New_pET28a_6xHis_scmr_rev	cggccgctctagaactagtgTCACTGGAGCCCGGCGAC
Région 5' scmR	scmR_fwd	actttaagaaggagatatacATGAACCAAATCCAGACCATGCGTGTC
Région 3' scmR	scmR_rev	agtgggtggtggtggtgcaCTGGAGCCCGGCGACGAC
Région 5' 6xHis-scmR	pET28a_scmR_6xHis_s_fwd	cgaggtcgcggtatcgataATGAACCAAATCCAGACCATGC
Région 3' 6xHis-scmR	pET28a_scmR_6xHis_s_rev	cggccgctctagaactagtgTCAGTGGTGGTGGTGGTG
	P7 exo-adapter reverse	5' Phos-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-OH 3'
	P7 exo-adapter forward	5' OH-GATCGGAAGAGCACACGTCT-OH 3'
	P5 exo-adapter reverse	5' OH-AGATCGGAAGAGCG-OH 3'
	P5 exo-adapter forward	5' OH-TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-OH 3'
	P7 primer	5' OH-GACTGGAGTTCAGACGTGTGCT-OH 3'

	PCR Primer universal reverse	5' OH- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTTCTTCCCTA CACG*A-OH 3'
	PCR Primer index 2 forward	5' OH- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGC*T-OH 3'
	PCR Primer index 4 forward	5' OH- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGC*T-OH 3'

* Les lettres minuscules représentent les séquences qui s'hybrident aux fragments, alors que les lettres majuscules représentent les séquences qui s'hybrident avec les plasmides. 5' Phos ; phosphorylation en 5', * ; Phosphorothioates S-linkage

3.4 Les conditions de culture

Sauf indication contraire, les cultures bactériennes de *B. thailandensis* étaient cultivées à 37°C dans le milieu « Tryptic Soy Broth » (TSB ; BD Difco), sous agitation dans un tambour rotatif (New Brunswick TC-7 roller drum). Lors d'expériences incluant le mutant *scmR*-, 100 mM d'HEPES était ajouté dans le milieu de culture afin de tamponner le milieu. Pour la culture sur milieu solide, le milieu « Lysogeny Broth agar » (LB agar ; BD Difco) contenant 1,5% d'agar est utilisé.

Le milieu « Lysogeny Broth » (LB ; BD Difco) était également utilisé avec les mêmes conditions d'incubation lors de cultures bactériennes d'*E. coli*. Pour la culture sur milieu solide le milieu LB agar est également utilisé.

Le milieu M9 + chlorophénylalanine était utilisé pour la contre-sélection lors de la création du mutant $\Delta hmqE$. Les sels du milieu minimal M9 sont composés de 12,5 g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L NaCl et de 5 g/L NH₄Cl. Le milieu M9 + chlorophénylalanine est composé des sels du milieu M9, de 0.1% p-chlorophénylalanine, 1,5% d'agar, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂ et 0,2% dextrose.

Les concentrations d'antibiotiques utilisés dans cette étude sont présentées au tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Liste des antibiotiques utilisés durant ce projet chez *B. thailandensis* et *E. coli*.

Antibiotiques ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Burkholderia thailandensis</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Liquide	Solide	Liquide	Solide
Kanamycine (Km)	100	100	30	30
Tétracycline (Tc)	100	200	15	15
Triméthoprim (Tp)	100	100	100	100
Polymyxine B (PmB)		100		
Gentamicine (Gm)		50		

3.5 Biologie moléculaire

Afin d'extraire l'ADN génomique bactérien le « EasyPure® Bacteria Genomic DNA Kit » a été utilisé. Pour l'extraction d'ADN plasmidique c'est le « Favorprep Plasmid DNA Extraction MiniPrep Kit » qui a été utilisé. Pour les constructions, l'amplification de fragment d'ADN par « Polymerase Chain Reaction » (PCR), a été utilisé à l'aide de la « Q5® High-Fidelity DNA Polymerase » (NEB) afin de réduire les erreurs d'amplifications. Alors que pour les PCR de vérification, la « EasyTaq® DNA Polymerase » (TransGen Biotech) a été utilisé. Les enzymes de restriction de type « FastDigest » (Thermo Fisher Scientific) ont été utilisés pour les digestions. Tous les fragments issus de la digestion ou de l'amplification PCR ont été purifiés à l'aide du « FavorPrep GEL/PCR Purification Kit », puis quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre. Les fragments ont été assemblés par la méthode de Gibson à l'aide du « pEASY-Uni Seamless Cloning and DNA Assembly Kit » et les plasmides ont été transformés dans les *E. coli* compétentes « Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell ». Tous les kits ont été utilisés selon la description du manufacturier.

3.6 Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL/SM)

Pour les analyses CL/SM, la méthode précédemment décrite par Vial *et al.*, 2008 a été utilisée. Les cultures ont d'abord été incubées pendant 16 heures, puis diluées à une DO_{600} de 0,2. Les cultures ont été remises en incubation, puis un volume de 300 μL de culture a été récolté aux moments de croissance désirés et la DO_{600} notée pour chaque échantillon. Ensuite, 300 μL

de méthanol contenant 4 mg/L 5,6,7,8-Tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ-d4) comme standard interne (concentration finale dans l'échantillon préparé : 2 mg/L) ont été ajoutés aux échantillons. La molécule HHQ-d4 a quatre hydrogènes qui ont été remplacés par des ions deutérium (D) afin d'avoir une molécule synthétique comme standard de quantification. Les échantillons ont alors été mélangés au vortex pendant 10 secondes, et centrifugés à 16 000 x g pendant 15 minutes. Ensuite, 500 µl de l'échantillon a été transféré dans un tube en borosilicate (Vial *et al.*, 2008). Les analyses CL/SM ont été effectuées avec un chromatographe liquide à haute performance (CLHP) Agilent HP1100 et un spectromètre de masse Quattro II (Micromass Canada). La colonne de chromatographie utilisée pour la séparation était une Kinetex EVO C18 de 100 x 3,0 mm. Le programme d'élution passe par un gradient eau/acétonitrile avec une concentration constante d'acide acétique à 1%. La phase mobile est initialement composée de 100% H₂O, et après 5 min, un changement linéaire des concentrations entre l'eau et l'acétonitrile s'effectue jusqu'à un ratio 50/50, puis graduellement vers 100% acétonitrile, pour par la suite retourner à 100% H₂O pour le restant du programme. L'éluant est pompé à un taux de 0,4 ml/min. Le volume d'échantillon injecté était de 20 µL. Les analyses ont été effectuées par électrobulbation en mode positif. Le voltage du capillaire était de 3 kV et le voltage du cône était de 21 V. La température de la source était de 120°C et celle de désolvation était de 150°C. Un balayage entre un ratio m/z de 110 et 410 a permis la détection des ions pseudomoléculaires des HMAQ. En mode positif, le HMAQ-C9:2' est détecté à un m/z de 284 et le HMAQNO-C9:2' est détecté à un m/z de 300, alors que le standard interne HHQ-d4 est détecté à un m/z de 248. La quantification des HMAQ a été faite en calculant l'aire sous la courbe des pics chromatographiques correspondant aux ions pseudomoléculaires ciblés. Il en est de même pour le standard interne HHQ-d4. Le facteur de réponse relative a été calculé à l'aide d'une courbe standard du HHQ-d4. Le quotient résultant de l'aire sous la courbe des ions pseudomoléculaires et du standard interne a été multiplié par la concentration du standard interne, puis du facteur de réponse relative.

Pour ce qui est de l'analyse des dérivés de purine, les conditions pour l'extraction et l'analyse des métabolites sont les mêmes avec les modifications suivantes. La xanthine a été détectée à un m/z de 153, l'hypoxanthine à un m/z de 137 et l'urate à un m/z de 169. De plus, lorsque mentionné, des concentrations de xanthine, d'hypoxanthine ou d'allopurinol ont été ajoutées lors de l'ensemencement des cultures à la concentration indiquée.

Pour ce qui est de l'analyse des AHL, une extraction à l'acétate d'éthyle a été réalisée. Un volume de 5 mL de cultures a été prélevés à différents moments de la croissance. Par la suite, le standard

interne HHQ-d4 dilué dans du méthanol a été ajouté aux cultures pour obtenir une concentration finale de 0,2 ppm. Ensuite, 3 mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés, puis mélangés au vortex pendant 15 secondes. Les cellules ont par la suite été centrifugées à 4 000 x g pendant 20 minutes à 4°C, puis l'acétate d'éthyle a été transféré dans un tube de verre. L'extraction à l'acétate d'éthyle est répétée, puis les volumes de solvants sont combinés et évaporés des tubes à l'aide d'un jet d'azote. Les culots sont repris dans 500 µL de tampon d'acétonitrile 1% acide acétique afin d'obtenir une concentration finale de standard interne de 2 ppm. Les AHL sont par la suite quantifiés comme décrit précédemment avec les modifications suivantes. Pour la quantification des AHL c'est le mode « multiple reaction monitoring » (MRM) qui est utilisé, puis les transitions ioniques ont été détectées aux m/z suivants : HHQ-d4 : 148→163; C₈-HSL : 228→102; 3OH-C₈-HSL : 244→102; 3OH-C₁₀-HSL : 272→102; HMAQ-C9 :2' : 284→172.

3.7 Ajout d'une étiquette de poly-histidine à la protéine ScmR

3.7.1 Clonage moléculaire

Tout d'abord, la construction du vecteur pET28a_6xHis_scmR a été réalisée afin d'ajouter une étiquette de poly-histidine à la protéine ScmR en N-terminal. Il y a peu d'informations sur la structure de la protéine dans la littérature, mais puisqu'elle fait partie de la famille des LTTR, puis qu'elle est reconnue comme étant un répresseur, son site N-terminal devrait être nécessaire pour la liaison de la protéine à l'ADN, puis sa portion C-terminal pourrait être un site de liaison à un ligand. Une analyse de prédiction de structure a été réalisée à l'aide de l'application DNASTAR avec l'outil NovaFold. L'outil a permis d'identifier une similarité de structure avec la protéine 3hhgE avec un « template modeling score » de 0,89. La structure prédite a pu être observée à l'aide de l'application PyMOL (Fig. 3.1).

La prédiction montre que la partie N-terminal (représentée en bleu foncé) semble plus accessible que la partie C-terminal (représentée en rouge). L'étiquette de polyhistidine a donc été ajoutée en N-terminal afin d'éviter de modifier la structure de la protéine (Fig. 3.2).

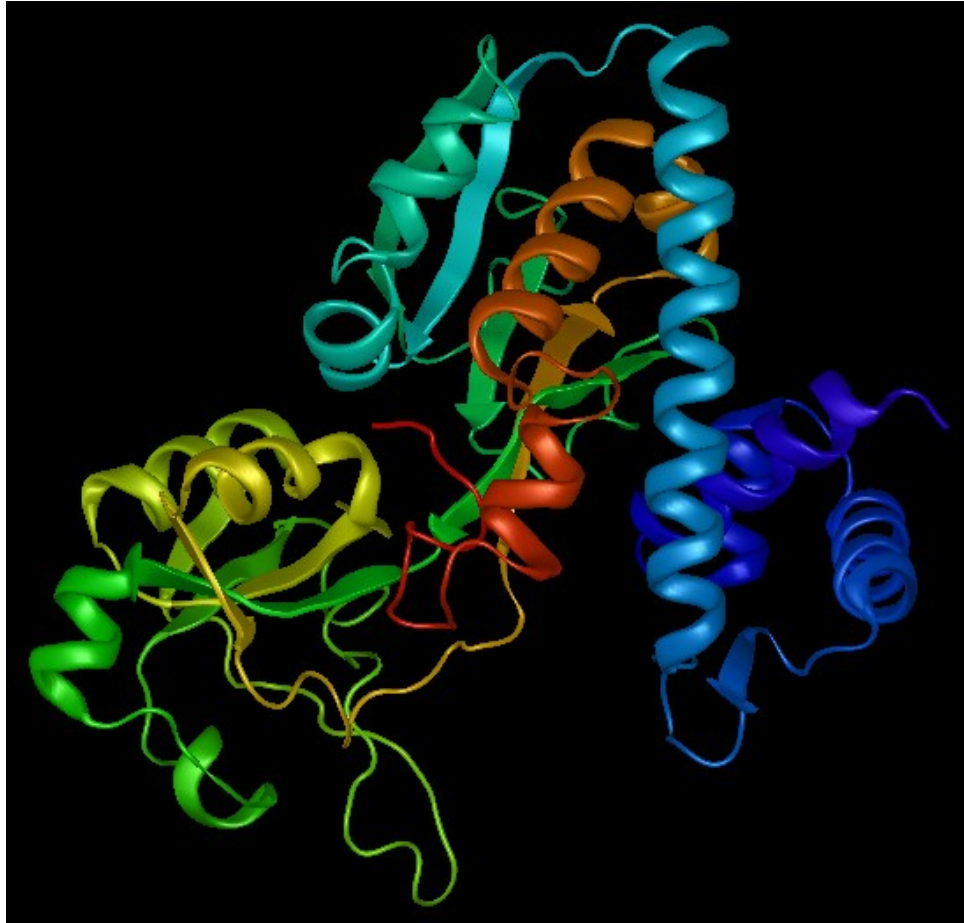
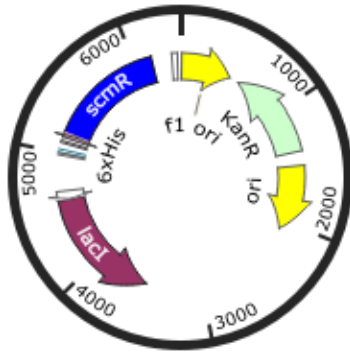
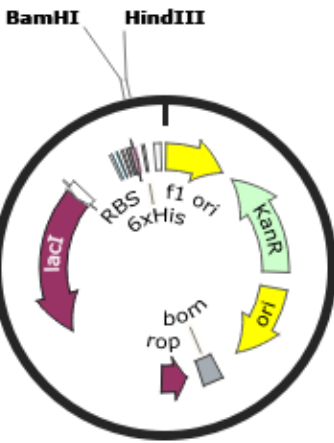


Figure 3.1 : Prédiction de la structure de la protéine ScmR à l'aide de l'application DNASTAR.

Prédiction de la structure de la protéine ScmR issue du gène BTH_I1403 de *B. thailandensis* E264 à l'aide de l'outil NovaFold. Tiré de la séquence de la protéine 3hhgE de la « Protein data bank ». Image produite à l'aide de l'application PyMOL.



pGD1
6391 bp



pET28a
5369 bp

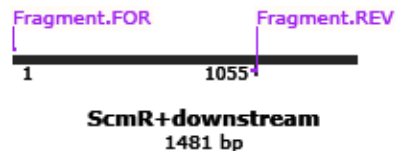
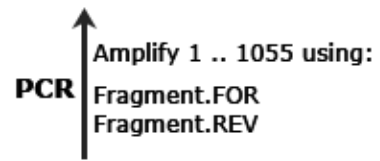


Figure 3.2 : Schématisation du clonage moléculaire pour ajouter une étiquette de poly histidine au gène *scmR*.

Figure réalisée à l'aide de l'application SnapGene.

Tout d'abord, l'ADN génomique de *B. thailandensis* E264 a été extrait, puis le plasmide pET28a a été extrait de *E. coli* DH5 α . Les 981 pb du gène *scmR* ont par la suite été amplifiées par PCR, à l'aide des oligonucléotides BamHI_scmR_fwd et HindIII_scmR_rev indiqués dans le tableau 3.3.

Le plasmide pET28a a par la suite été digéré à l'aide des enzymes de restriction BamHI et HindIII. À la suite de l'assemblage, les colonies transformées ont été sélectionnées sur LB agar avec 30 μ g/mL kanamycine. L'insertion des fragments a par la suite été vérifiée par digestion à l'aide des enzymes de restriction NcoI et SacI, puis par séquençage Sanger (IRCM). Le plasmide pET28a-6xHisScmR obtenu a été nommé pGD1.

La première vérification qui a été réalisée à la suite du clonage est la vérification de la production de la protéine avec son étiquette. Afin d'obtenir une meilleure production, le plasmide a été transféré chez *E. coli* BL21(DE3). Cette souche est optimisée pour la production de protéine et idéal pour l'utilisation de plasmide utilisant des systèmes d'expression avec un promoteur T7 comme pET28a.

Le plasmide pGD1 obtenu avec la trousse miniprep a été transféré chez des *E. coli* BL21(DE3) compétentes par choc thermique. Après avoir poussé pendant 18h, la culture d'*E. coli* a été diluée 1 : 10 et incubée pendant environ 2h30 jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ d'environ 0,5. Ensuite, 1 mL de culture a été incubé sur glace pendant 10 minutes. Après une centrifugation à 10 000 x g 5 minutes, les cellules ont été resuspendues dans 500 μ L CaCl₂ 50 mM froid. Après un 2^e cycle de lavage, les cellules ont été maintenues sur glace pendant 1h, puis 150 ng de plasmide a été ajouté. Pour le choc thermique, les cellules ont été incubés avec le plasmide 40 minutes sur glace, exposées 50 secondes à 42°C, puis 1 minute sur glace à nouveau. Par la suite, 1 mL de TSB a été ajouté, suivi d'une incubation pendant 1h à 37°C sous agitation. Finalement les cellules ont été étalées sur gélose LB agar avec 30 μ g/mL kanamycine. L'insertion du plasmide dans les colonies obtenues a été vérifié par PCR avec l'utilisation des oligonucléotides BamHI_scmR_fwd et HindIII_scmR_rev.

Pour vérifier la production de la protéine avec son étiquette, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), ainsi qu'un immunobuvardage de type Western ont été réalisés. Les *E. coli* BL21(DE3) avec ou sans notre plasmide ont poussés dans 5 mL de LB avec ajout de 30 μ g/mL kanamycine à 37°C pendant 18h. Ensuite 5 μ L de culture ont été repris dans 5 mL de LB avec l'ajout de 0,2 mM ou 1 mM d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), puis incubé pendant 18h à 37°C. Ensuite les cellules ont été centrifugées à 4 000 x g à 4°C pendant 30 minutes, puis les culots cellulaires ont

été repris dans 0,1 x de Pop culture (Millipore Sigma) et incubée à température pièce pendant 15 minutes sous agitation. Une centrifugation à 16 000 x *g* pendant 20 minutes à 4°C, a permis de séparer la phase soluble de la phase insoluble. Le surnageant (phase soluble) a été transféré dans un nouveau tube, puis la phase insoluble a été reprise dans 10 µL de SDS 10% et 290 µL d'eau ont été rajoutés, puis mélangé au vortex pendant 20 secondes. L'anticorps utilisé pour le western blot était l'anti-6XHis (Host mouse ; Meridian Life Science) puis le kit « Super signal west pico mouse » (Thermo Fisher Scientific) a été utilisé pour la révélation.

Il est possible de voir la production de notre protéine ScmR autour de 39 kDa, ce qui indique que notre protéine est bien produite avec son étiquette. Bien que la protéine semble se retrouver dans la phase insoluble, il est possible que puisqu'elle était exprimée chez *E. coli*, elle n'arrivait pas à bien se replier. Une vérification de la fonction de la protéine sera réalisée une fois exprimée chez *B. thailandensis*.

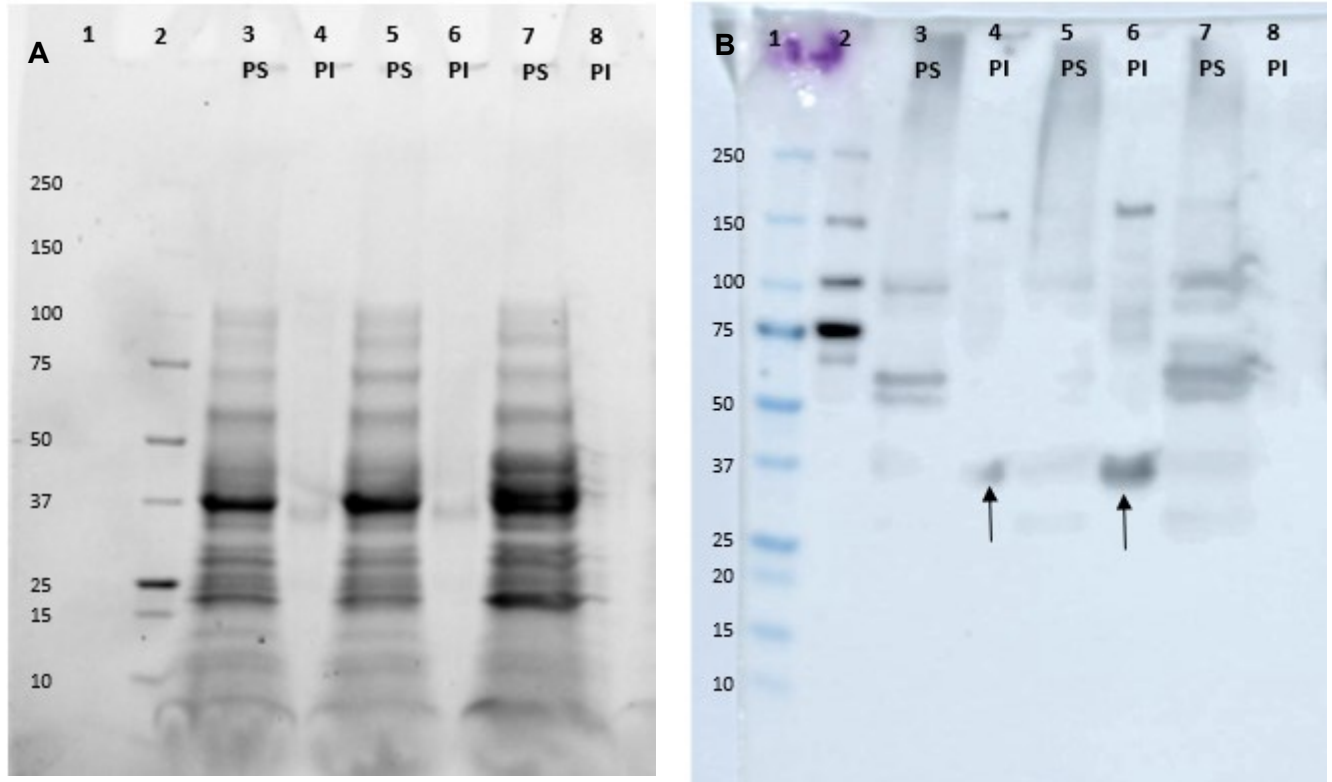


Figure 3.3 : Migration SDS-PAGE et immunobuvardage de type Western de la protéine ScmR avec son étiquette de polyhistidine.

(A) le gel de migration SDS-PAGE, (B) la membrane de l'immunobuvardage de type Western. Dans les deux premiers puits on retrouve les marqueurs de poids moléculaires (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards et Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard (BioRad)). Dans les puits 3 et 4 on retrouve la protéine avec son étiquette incubée avec l'ajout de 1 mM d'IPTG. Dans les puits 5 et 6 on retrouve également la protéine avec son étiquette, puis dans les puits 7 et 8 le témoin négatif qui ont été incubé avec l'ajout de 0,2 mM d'IPTG. On retrouve les phases solubles (PS) et les phases insolubles (PI) pour chaque condition.

3.7.2 Sous-clonage de 6xHisScmR dans un vecteur d'expression

Une fois que l'étiquette était ajoutée à ScmR, il fallait s'assurer que cette dernière était toujours fonctionnelle, par exemple en complétant le défaut de production d'HMAQ chez la souche E264 portant un gène *scmR* muté. Un vecteur d'expression dans lequel la protéine ScmR contient une étiquette de polyhistidine a été construit pour vérifier la complémentation.

Pour ce faire, le gène *scmR* avec son étiquette a été amplifié par PCR, à l'aide des oligonucléotides pET28a-scmR_fwd et pET28a-scmR_rev indiquées dans le tableau 3.3. Le plasmide pME6000 a été digéré à l'aide des enzymes de restriction BamHI et HindIII. L'assemblage de type Gibson a été effectué, puis les colonies ayant intégré le plasmide ont été sélectionnées sur LB agar avec 15 µg/mL tétracycline. L'insertion des fragments a par la suite

été vérifiée par digestion à l'aide des enzymes de restriction NcoI et XbaI « FastDigest » (Thermo Fisher Scientific). Le plasmide pME6000::6xHis-scmR obtenu a été nommé pGD2.

Le plasmide pGD2 a par la suite été transformé dans le mutant *scmR*⁻, par la méthode d'électroporation. Après avoir fait pousser notre mutant *scmR*⁻ pendant 16h, la culture a été diluée à une DO₆₀₀ d'environ 0,2, puis incubée pendant 2h jusqu'à une DO₆₀₀ de 1,0. Les bactéries ont été lavées avec 1 mL de tampon MEB (1M HEPES et 1M MgCl₂) trois fois. Le culot a été resuspendu dans 100 µL MEB, avec 150 ng du plasmide pGD2. Les cellules et l'ADN ont été transférés dans une cuvette à électroporation (Bio-Rad Laboratories) et exposé à un courant électrique de 1800 V dans un « Eppendorf Electroporator 2510 ». Les cellules ont par la suite été reprises dans 1 mL TSB et incubées pendant 1h à 37°C sous agitation, puis étalées sur gélose LB agar avec 100 µg/mL tétracycline. Le plasmide est maintenu chez la bactérie, puis le gène est transcrit sous le contrôle du promoteur constitutif T3 (séquence provenant de l'ARN polymérase du bactériophage T3).

Par la suite, afin de s'assurer que la protéine ScmR avec l'étiquette de polyhistidine est bien fonctionnelle, la quantification de la production d'HMAQ a été utilisée. Puisque la production est presque nulle chez le mutant *scmR*⁻, l'ajout de notre plasmide contenant la protéine et son étiquette dans cette souche devrait compléter la mutation et donc produire une quantité d'HMAQ similaire à celui de la souche sauvage si l'ajout de l'étiquette ne nuit pas à la fonction de la protéine ScmR. La souche sauvage et le mutant *scmR*⁻ avec le plasmide pME6000 vide, puis le mutant *scmR*⁻ avec le plasmide pJPD3 qui contient le gène *scmR* sans étiquette et sa région promotrice (Dumais, 2010) ont été utilisés comme témoins.

La figure 3.4 montre que la production d'HMAQ est présente mais très faible chez le mutant complémenté avec notre plasmide pGD2. La production est plus faible que celle chez le mutant complémenté avec le plasmide pJPD3.

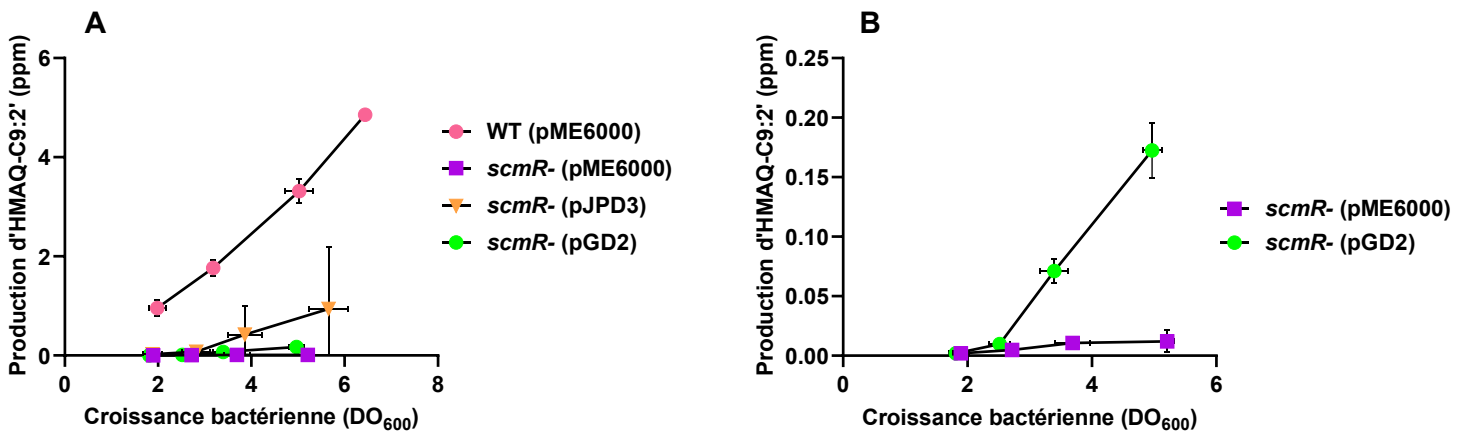


Figure 3.4 : Production d'HMAQ-C9 :2' chez la souche sauvage, le mutant *scmR*- et le mutant *scmR*- complétement avec les plasmides pGD2 et pJPD3.

La production d'HMAQ-C9:2' a été quantifiée par CL/SM à différents moments durant la croissance (A) de la souche sauvage, du mutant *scmR*- et du mutant *scmR*- complétement avec les plasmides pGD2 et pJPD3, (B) puis seulement le mutant *scmR*- et le mutant *scmR*- complétement avec le plasmide pGD2. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques.

Considérant la faible efficacité de complémentation de la construction avec l'étiquette en N-terminal, trois autres constructions ont été effectuées : une construction en N-terminal en insérant l'étiquette de polyhistidine directement avant le gène *scmR*, en enlevant l'espace pour l'excision de l'étiquette, une construction en C-terminal, puis une construction en N-terminal en ajoutant la région promotrice de *ScmR*

3.8 Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq ; Immunoprécipitation de la chromatine couplée au séquençage)

3.8.1 Méthode ChIP-Seq

Une expérience de type ChIP-Seq a été choisie afin d'identifier les cibles directes de *ScmR*. La méthode utilisée provient des protocoles récents mis en place par l'équipe de Rhee, et par celui de Serandour qui est adapté pour le séquençage à l'aide de la plateforme Illumina (Montanera & Rhee, 2020; Serandour *et al.*, 2013). La composition des tampons utilisés, ainsi que les conditions pour les réactions enzymatiques se retrouvent à l'annexe I.

La première étape pour la réalisation du ChIP-Seq était la réticulation de l'ADN. Afin de fortement lier notre protéine d'intérêt à l'ADN, le formaldéhyde est utilisé. La souche sauvage de *B. thailandensis* E264 ainsi que le mutant *scmR*- (pGD7) ont poussés pendant 16h. Les cultures ont ensuite été diluées à une DO₆₀₀ de 0,1 dans 50 mL de TSB, puis incubées à 37°C sous

agitation pendant 5h jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 4,5. Par la suite 1,35 mL de formaldéhyde 37% (MilliporeSigma) a été ajouté aux cultures pour obtenir une concentration finale de 1%, suivi d'une incubation à température pièce avec agitation pendant 10 minutes. Ensuite, 5 mL de glycine 2,5 M a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 250 mM. Les cellules ont ensuite été centrifugées à $2\ 000 \times g$ à $4^\circ C$ pendant 20 minutes, puis lavées avec 1 mL de PBS froid.

Une fois l'ADN réticulé aux protéines, une sonication a été réalisée afin de briser l'ADN en petits fragments de 100 à 500 pb. Pour y arriver, les cellules ont été reprises dans 10 mL de tampon de lyse. Les cellules ont été placées sur glace, puis une sonication a été réalisée avec l'appareil « Branson sonifier 450 » en utilisant 15 cycles d'une minute (30% output, 90% puissance) avec une minute de repos sur glace entre les cycles. À cette étape la taille des fragments d'ADN a été vérifiée à l'aide d'une migration sur gel d'agarose 1,5%. Ensuite 675 μL de Triton X100 10% a été ajouté, puis les débris cellulaires ont été centrifugés à $3\ 000 \times g$ à $4^\circ C$ pendant 20 minutes.

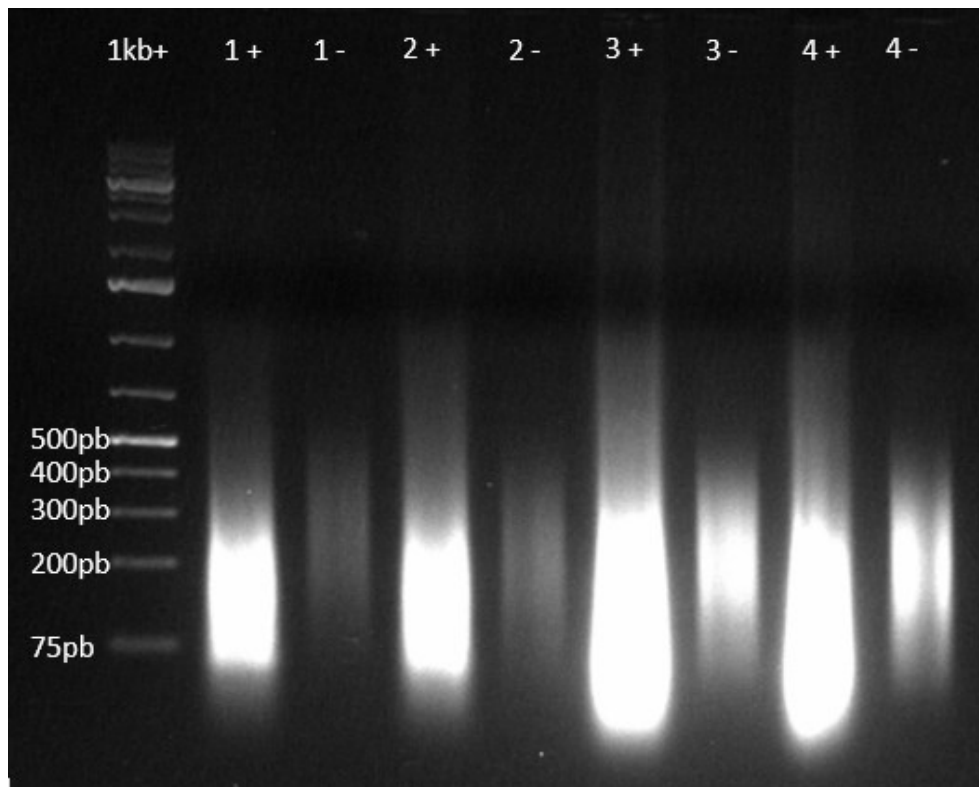


Figure 3.5 : Migration de notre produit de sonication sur gel d'agarose 1,5 %.

Migration des produits de sonication sur gel d'acrylamide 1,5% pendant 45 minutes afin de vérifier la taille des fragments issus de la sonication. Le premier puits représente le marqueur moléculaire 1kb+. Les puits identifiés 1 et 2 représente la sonication de la souche sauvage, alors que les puits identifiés 3 et 4 représente celle de notre mutant scmR- avec notre plasmide (pGD7). Le + représente que l'ADN est réticulé et le - représente que la réticulation a été annulée.

La prochaine étape était de coupler le complexe protéique voulu aux billes magnétiques. Afin de conserver uniquement l'ADN couplé à ScmR, notre protéine d'intérêt est liée à des billes magnétiques afin de pouvoir facilement laver l'ADN non spécifique. Pour y arriver, 25 µL de billes magnétiques de type « Protein A/G Mag Sepharose_» (Cytivia) a été utilisé. Les billes ont été lavées trois fois à l'aide de 1 mL de tampon de blocage. Ensuite, les billes ont été reprises dans 250 µL de ce tampon, puis 10 µg d'anticorps (Anti-6XHis, Host mouse ; Meridian Life Science) a été ajouté. Les billes et l'anticorps ont été incubés à 4°C pendant 16h avec une agitation de 500 rpm. Par la suite, les billes ont été lavées à l'aide de 1 mL de tampon de blocage, puis 1,5 mL de lysat de cellules a été ajouté. La chromatine et les billes liées aux anticorps ont été incubées à 4°C pendant 16h, toujours avec une agitation de 500 rpm.

Par la suite, le lysat de cellules a été lavé afin d'éluer les complexes d'ADN et protéines qui n'étaient pas liés aux billes. Trois tampons différents ont été utilisés pour faire les lavages, le premier avec une haute teneur en sels, le deuxième avec du LiCl, puis le dernier Tris-EDTA. Tous les lavages ont été effectués en ajoutant 1 mL du tampon approprié, puis en incubant pendant 5 minutes à la température de la pièce sous agitation à 900 rpm. Le surnageant des lavages a été récupéré et migré sur gel SDS-PAGE afin de s'assurer que 6xhis-ScmR n'avait pas éluée durant les lavages.

Une fois l'ADN non-attaché élué, la réticulation de l'ADN a été brisée et l'ADN a été élué. Pour y arriver, les billes ont été reprises dans 200 µL de tampon d'élution puis 1 µL de Protéinase K (20 mg/mL) a été ajouté, suivi d'une incubation à 65°C pendant 16h. Ensuite 200 µL du surnageant a été transféré dans un nouveau microtube 1,5 mL contenant 200 µL de 1 M Tris-Cl (pH 7.5), puis une extraction phénol chloroforme isoamide alcool (PCIAA) a été effectuée.

Par la suite le polissage de l'ADN a été effectué à l'aide de la T4 DNA polymérase (NEB). Les adaptateurs ont été ajoutés en 5' et en 3' à l'aide de la T4 ADN ligase (NEB). L'ADN a par la suite été purifié à l'aide de billes AMPure (Cytivia) selon le protocole du manufacturier. L'ADN a finalement été amplifié par PCR, puis purifié. Il est possible d'observer les fragments purifiés à la figure 3.6. Il est important de noter qu'il est normal d'observer une bande d'ADN plus faible pour le contrôle. C'est l'ADN lié aux protéines normalement produites par la souche sauvage, qui ont l'étiquette histidine, qui a été retenu par les billes lié à l'anticorps. Cet ADN représente le bruit de fond de notre analyse.

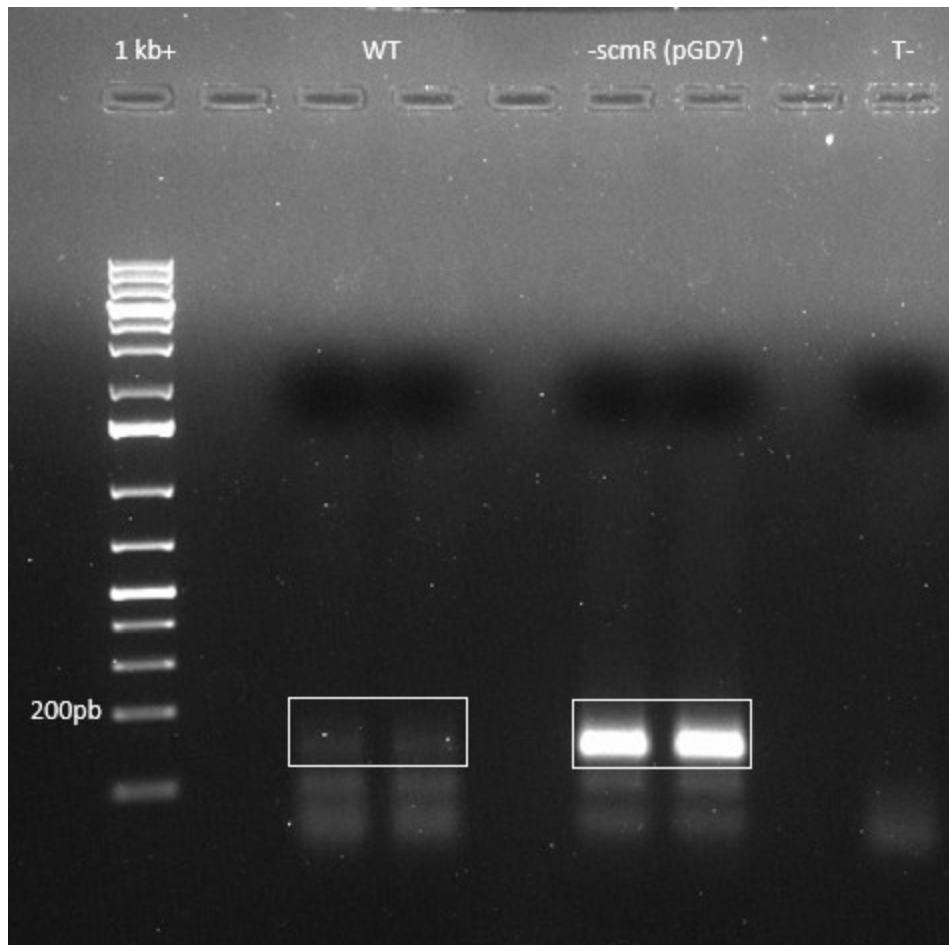


Figure 3.6 : Migration des fragments d'ADN amplifiés issus du ChIP sur gel d'agarose 1,5%.

Migration des fragments d'ADN issus de l'amplification finale sur gel d'agarose 1,5% pendant 45 minutes afin de vérifier leur taille. Le premier puits représente le marqueur moléculaire 1kb+. Les premiers puits représentent l'ADN amplifié de la souche sauvage, alors que les seconds ceux de notre mutant scmR- avec notre plasmide (pGD7), puis le dernier celui de notre témoin négatif.

L'ADN a été quantifié à l'aide du Picogreen (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay, Thermo Fisher Scientific), puis envoyé pour séquençage à la compagnie CD Genomics à l'aide de leur plateforme Illumina NovaSeq6000 2 x 150 pb avec une couverture de 20 M de paires de lectures.

3.8.2 Méthode d'analyse du ChIP-Seq

Pour l'analyse des résultats de séquençage issus du ChIP-Seq, l'outil Galaxy a été utilisé (use.galaxy.org). La qualité des séquences obtenues à tout d'abord été observée à l'aide de l'outil FastQC. Par la suite, les séquences ont été filtrées, puis les adaptateurs ont été enlevés à l'aide de l'outil Trimmomatic. Ensuite, l'outil Bowtie2 a été utilisé afin d'aligner les séquences sur le génome de référence de *B. thailandensis* E264, puis l'outil MACS2 a été utilisé afin de trouver les

régions consensus. Les résultats du ChIP-Seq ont été visualisés à l'aide de l'application Integrated genome browser (Freese *et al.*, 2016). L'analyse de découverte de motif de liaison du régulateur transcriptionnel a été réalisée à l'aide de l'outil MEME-ChIP (Machanick & Bailey, 2011).

3.9 Construction du mutant $\Delta hmqE$

Pour la 2^e partie du projet de maîtrise un mutant non polaire du gène *hmqE* a été réalisé. Pour y arriver, la méthode de remplacement allélique a été utilisée à l'aide du vecteur suicide pEX18Tc-*pheS* (Barrett *et al.*, 2008). Les 200 premières et dernières paires de bases du gène *hmqE* ont été amplifiées en utilisant l'ADN génomique de *B. thailandensis* E264 par PCR à l'aide des oligonucléotides GD_3_hmqE_Fwd et GD_3_hmqE_Rev, puis GD_5_hmqE_fwd et GD_5_hmqE_Rev respectivement. La cassette de résistance au triméthopime FRT-*dhfRII*-FRT présente dans le plasmide pFTP1 a également été amplifiée par PCR, à l'aide des oligonucléotides GD_FRTtp_Fwd et GD_FRTtp_Rev. Le plasmide est représenté à la figure 3.7.

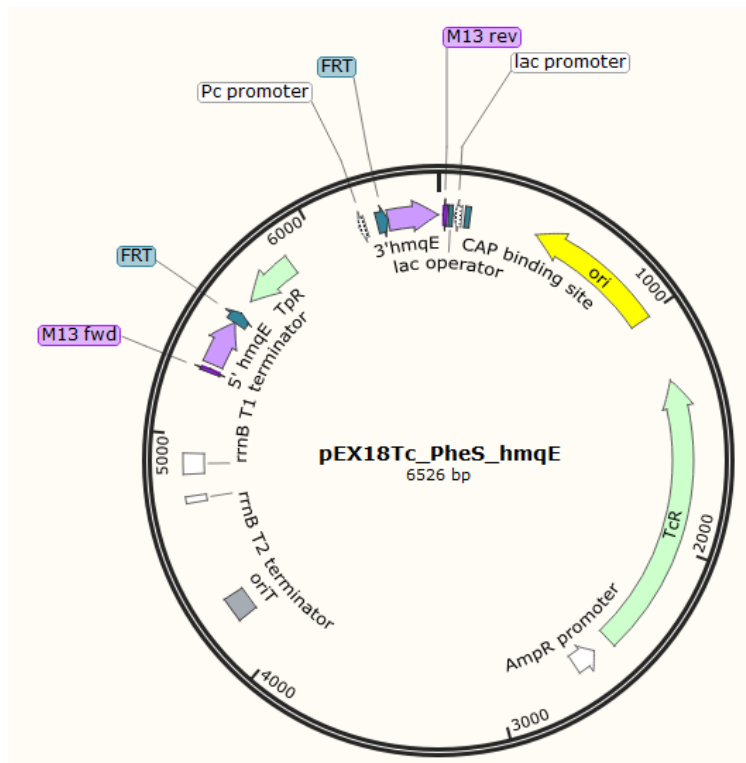


Figure 3.7 : Schéma du plasmide pEX18tc-*pheS*::*hmqE*tp.

Figure créée à l'aide de Snapgene.

Le plasmide pEX18Tc-*pheS* a ensuite été digéré à l'aide des enzymes de restriction *SacI* et *Sall*, puis un assemblage de type Gibson a été réalisé. Les colonies ayant intégré le plasmide ont été

sélectionnées sur LB agar avec 15 µg/mL tétracycline et 100 µg/mL triméthoprim. L'insertion des fragments a par la suite été vérifiée par PCR avec les amorces GD_5_hmqE_Fwd et GD_3_hmqE_Rev.

Le nouveau plasmide pEX18Tc-*pheS::hmqE*-Tp a été renommé pGD8. Ce dernier a ensuite été extrait, puis inséré chez *E. coli* SM10λpir à l'aide de la méthode de choc thermique comme décrit précédemment dans la section 3.7.1 avec sélection sur gélose LB agar avec 15 µg/mL tétracycline et 100 µg/mL triméthoprim.

Le plasmide pGD8 a été intégré à l'intérieur de la souche sauvage *B. thailandensis* E264 par conjugaison. Les souches donneuse (*E. coli* SM10λpir) et receveuse (*B. thailandensis* E264) ont été cultivées 16h dans 3 ml de TSB avec 15 µg/mL tétracycline, 100 µg/mL triméthoprim pour *E. coli* SM10λpir (pGD8). Les souches ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,05, suivi d'une incubation jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,5. Ensuite 1 mL de *E. coli* SM10λpir (pGD8) et 500 µL de E264 ont été centrifugés ensemble à 8 000 x *g* pendant 1 minute. Le culot a été repris dans 50 µl de LB, puis déposé sur une gélose LB agar, suivi d'une incubation à 37°C pendant 16h. Ensuite, à l'aide d'un écouvillon, la co-culture bactérienne a été récupérée, puis remise dans 1 mL de LB. La co-culture a ensuite été étalée sur une gélose LB agar avec 100 µg/mL de triméthoprim, 15 µg/mL de polymyxine B et 50 µg/mL de gentamicine (pour empêcher la croissance de *E. coli* SM10λpir (pGD8)), puis l'avons incubé pendant 48h à 37°C.

Les colonies obtenues, qui devaient avoir intégré le plasmide dans *hmqE* par recombinaisons homologues, ont par la suite été reprises dans le milieu LB avec 100 µg/mL de triméthoprim, puis étalées à des dilutions 1:10 et 1:100 sur le milieu M9 0.1% chlorophénylalanine avec 40 µg/mL de triméthoprim, afin de sélectionner la 2^e recombinaison des mérodiploïdes. Les géloses ont été incubées à 37°C pendant 48h, puis à température pièce pendant 72h. Les colonies ont ensuite été repiquées sur une gélose LB agar 200 µg/mL tétracycline, puis sur une gélose LB agar 100 µg/mL de triméthoprim. Les colonies isolées ayant perdu leur résistance à la tétracycline ont par la suite été reprises en TSB puis la délétion de *hmqE* a été vérifiée par PCR à l'aide des oligonucléotides GD_5_hmqE_fwd et GD_3_hmqE_Rev, puis GD_FRTtp_Fwd et GD_FRTtp_Rev.

La figure 3.8 montre que les clones correspondant aux numéros 2, 3 et 5 ont une seule bande pour le gène *hmqE* autour de 1213 pb et une bande autour de 823 pb pour la cassette de résistance au triméthoprim, ce qui confirme que ces clones sont des doubles recombinants.

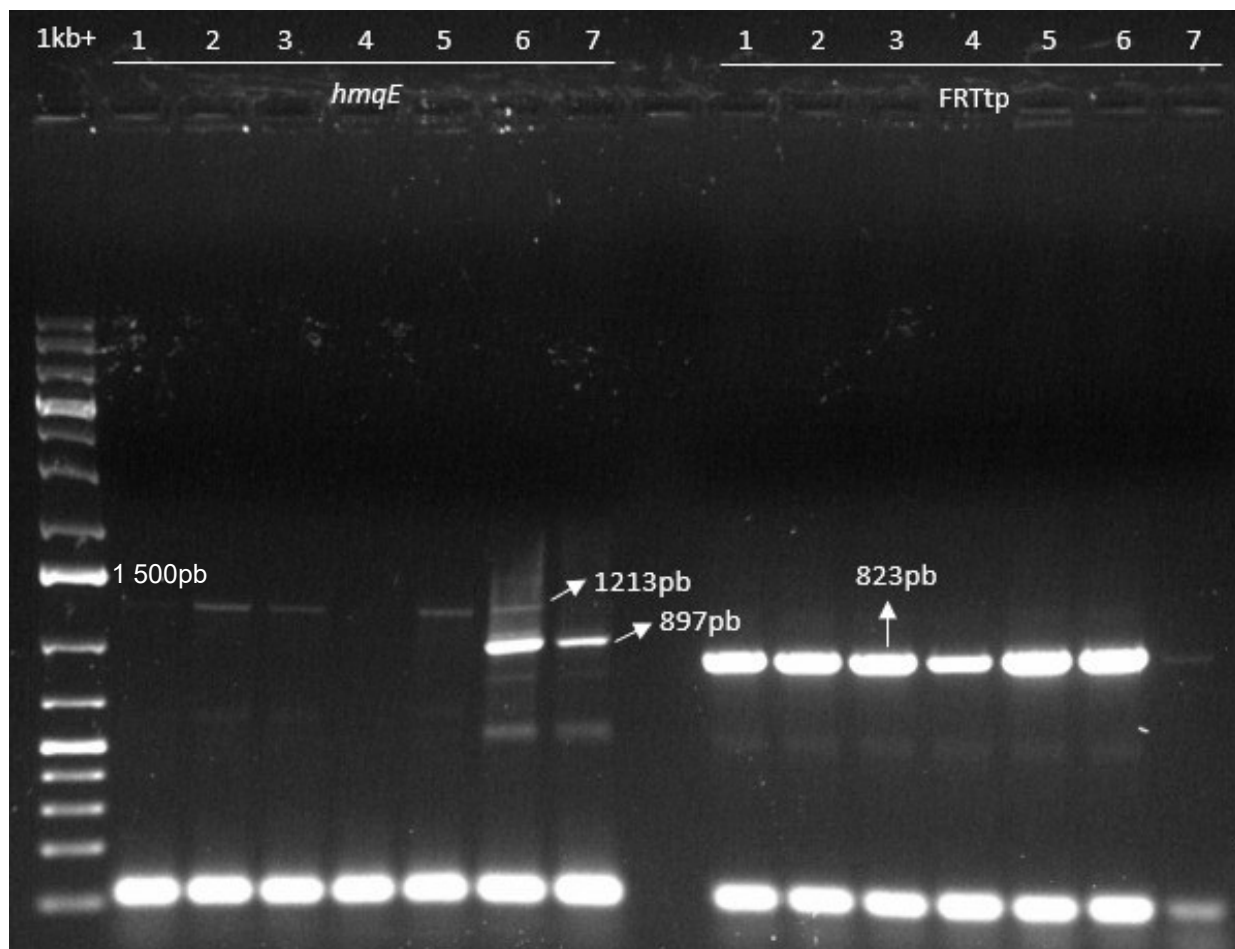


Figure 3.8 : Migration PCR des colonies isolées pour l'obtention d'un double recombinant sur gel d'agarose 1,5%.

Les chiffres 1 à 5 correspondent aux colonies isolées du milieu M9 chlorophénylalanine. Les chiffres 6 et 7 correspondent aux témoins négatifs, soit une colonie d'un simple recombinant, puis celle d'une souche sauvage respectivement. La partie gauche du gel représente une amplification du gène *hmqE*, puis la partie droite de la cassette de résistance au triméthoprim.

Une fois la confirmation de l'obtention de double recombinant, l'excision de la cassette de résistance au triméthoprim a été effectuée afin de n'avoir aucune sélection résiduelle. Pour y arriver, le plasmide pFLPe4 a été transformé dans un des clones positifs par électroporation comme décrit précédemment dans la section 3.7.2. Les cellules ont été étalées sur gélose LB agar et 100 µg/mL de kanamycine. Elles ont été incubées à 30°C (afin d'éviter la dégradation de la flippase) pendant 48h.

Afin d'activer le promoteur de la recombinase située sur pFLPe4, les colonies ont été striées sur LB agar avec 100 µg/mL de kanamycine et 0,2% de L-rhamnose, puis incubées à 30°C pendant 48h. Ensuite, 20 colonies ont été repiquées sur gélose LB agar avec et sans triméthoprim à 100 µg/mL puis incubés à 30°C pendant 48h. Les colonies ayant perdu leur résistance au

triméthoprime ont été reprises en TSB, puis vérifiées par PCR à l'aide des oligonucléotides mentionnés précédemment afin de vérifier la taille de leur gène *hmqE* résiduel et l'absence de la cassette de résistance triméthoprime.

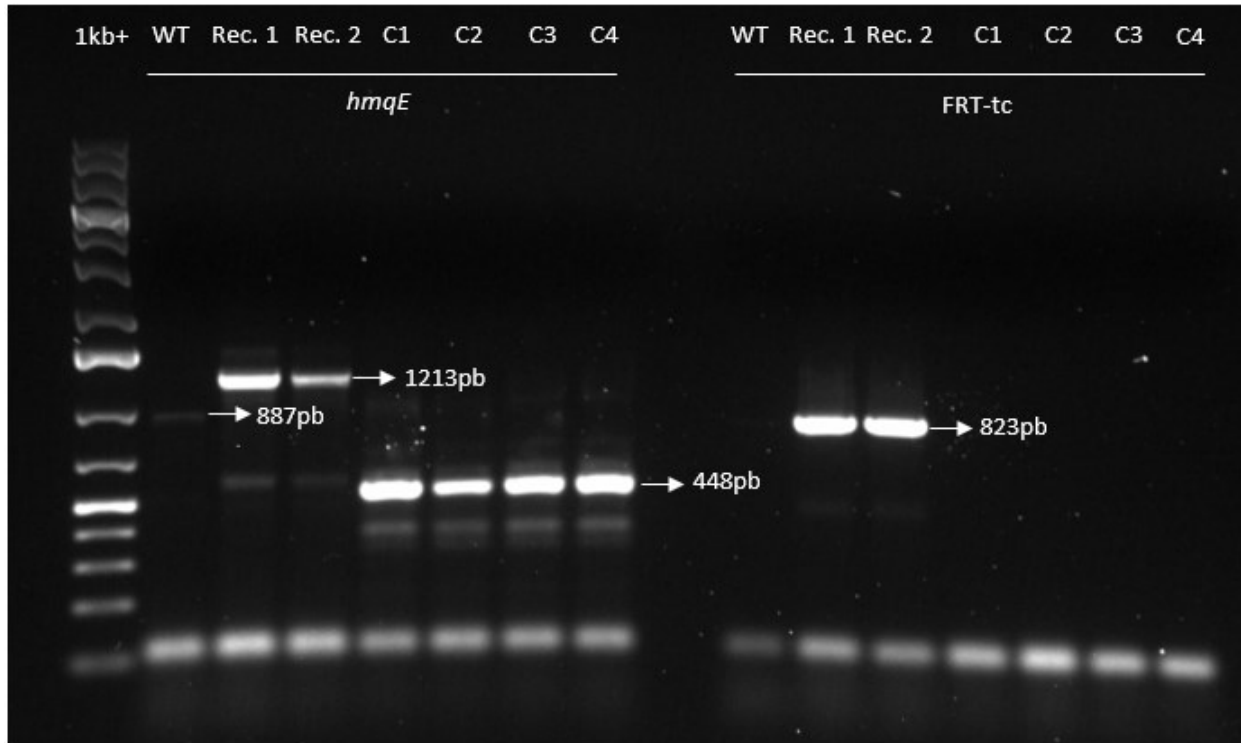


Figure 3.9 : Migration PCR des colonies isolées sur gel d'agarose 1,5% représentant la création du mutant propre $\Delta hmqE$.

Il est possible d'observer dans le premier puits le marqueur de poids moléculaire (1kb+). Les trois puits suivants représentent les témoins négatifs, soit la souche sauvage, un simple recombinant, puis un double recombinant. Les puits C1 à C4 représentent des colonies suspectées d'être des délétions propres. La partie gauche du gel représente une amplification du gène *hmqE*, puis la partie droite de la cassette de résistance au triméthoprime.

Une fois les vérifications terminées, un clone a été sélectionné et la caractérisation du nouveau mutant a été effectuée.

3.10 Caractérisation du mutant $\Delta hmqE$

3.10.1 Quantification de la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG*

Les rapporteurs mini-CTX-*lux* (*hmqA-lux*, *btaR1-lux*, *btaR2-lux* et *btaR3-lux*) ont été insérés dans le mutant $\Delta hmqE$ à l'aide de la conjugaison comme décrit précédemment dans la section 3.9 avec les modifications suivantes. Puisque la souche donneuse utilisée était *E. coli* χ 7213,

50 µg/mL d'acide diaminopimélique (DAP) ont été ajoutés dans les milieux liquides et solides. Pour la sélection finale, seulement 200 µg/mL tétracycline ont été ajoutés au milieu LB agar.

Pour les expériences de quantification, les cultures ont d'abord été cultivées dans du TSB avec 200 µg/mL tétracycline pendant 16h. Ensuite, les cultures ont été diluées à une DO_{600} de 0,2 et incubées jusqu'à la DO_{600} désirée. La DO_{600} a été notée, puis 200 µL de culture a été transféré dans une plaque 96 puits blanche à fond clair (BrandTech scientific), puis la luminescence a été déterminée à l'aide d'un lecteur de plaque (Cytation 3, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). La transcription est exprimée en unité de lumière relative en fonction de la densité optique de la culture (RLU/ DO_{600}).

3.10.2 Morphologie coloniale

Pour l'observation de la morphologie coloniale, le milieu Ashdown a été utilisé (Ashdown, 1979). Ce milieu est composé de TSB, avec l'ajout de 1,5% d'agar, 4% de glycérol, 5 mg/L de cristal violet et 50 mg/L de rouge neutre.

Les cultures bactériennes ont poussé pendant 16h. Elles ont par la suite été diluées à DO_{600} 0,2 et incubées pendant 4h jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 3,0. Par la suite, une goutte de 5 µL de culture a été déposée sur la surface des géloses qui ont ensuite été incubées pendant 48h à 37°C, puis à la température de la pièce pendant 72h. Les photos ont par la suite été prises par microscopie (Stereo microscope ; Leica).

3.10.3 Formation d'un biofilm flottant (pellicule)

Pour procéder à la formation de la pellicule, les cultures bactériennes ont d'abord été incubées pendant 16h. Elles ont par la suite été diluées à une DO_{600} de 0,05 dans 3 mL de TSB dans des tubes de verres, puis incubées sans agitation à 37°C pendant 24h.

3.10.4 Motilités de type *swarming* et *swimming*

Pour la motilité de type *swarming* le milieu « Nutrient Broth » (NB ; Difco), additionné de 4 % Glycérol et 0,5% agar a été utilisé. Après avoir laissé sécher les géloses pendant 45 minutes seulement, elles ont étéensemencées avec une goutte de 5 µL de culture à une DO_{600} de 3,0 puis incubées à 30°C pendant 18h.

Pour la motilité de type *swimming* le milieu LB avec 0,25% d'agar a été utilisé. Après avoir laissé sécher les géloses pendant 15 minutes, elles ont étéensemencées avec 2 µL de culture à une

DO₆₀₀ de 3,0 à l'intérieur de la gélose (en piquant dans la surface d'agar) et incubées à 30°C pendant 18h.

3.10.5 Essais d'infection de *Drosophila melanogaster*

Les infections de *D. melanogaster* ont été réalisées en suivant le protocole de Pilátová & Dionne (Pilátová & Dionne, 2012). Le milieu nutritif sec a été préparé en utilisant 5,10 g de fructose, 3,66 g de lait en poudre et 10,80 g de pommes de terre en poudre, puis 1 g a été déposé dans chaque tube d'infection. Les tubes ont ensuite été stérilisés sous UV pendant environ 1h. Pour ce qui est des cultures bactériennes, après une incubation de 16h, elles ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,2 dans 2 mL de TSB, puis incubées pendant 5 heures jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 4,5. Les cultures ont ensuite été culotées par centrifugation à 10 000 x g pendant 5 minutes. Les cellules ont par la suite été reprises dans 2 mL de PBS 0,02X avec 1 mM de CaCl₂ et MgCl₂, puis ont été déposées dans les tubes d'infections avec le milieu sec. Les mouches mâles de 5 jours ont ensuite été anesthésiées par CO₂, puis ont été transférées par groupes de 10 dans chaque tube. Le témoin négatif a été réalisé en ajoutant seulement 2 mL de PBS 0,02X avec 1 mM de CaCl₂ et MgCl₂. La mortalité des mouches a ensuite été vérifiée à tous les jours pendant une semaine. Le graphique de mortalité a été réalisé à l'aide de GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) et le test statistique Mantel-Cox a été utilisé.

3.10.6 Production de bactoboline

L'évaluation de la production de bactoboline s'est faite par l'observation de l'inhibition de croissance de *Bacillus subtilis* selon la méthode décrite précédemment (Duerkop *et al.*, 2009). Tout d'abord, trois colonies isolées pour chaque souche ont été reprises dans 3 mL de milieu LB, puis cultivées pendant 18h à 37°C. La culture de *B. subtilis* PY79 a été diluée 1:10, puis 100 µL de cette dilution a été étalée sur géloses LB agar pour former un tapis. Ensuite, 1 mL de surnageant des souches de *B. thailandensis* a été filtré (filtre 0,22 µm). Les disques de susceptibilité antibiotique (OXOID) ont été imbibés avec 25 µL des surnageants filtrés, puis déposés sur les géloses préalablement recouvertes avec *B. subtilis*. De plus, 5 µL de culture des souches de *B. thailandensis* ont été déposés sur les géloses préalablement recouvertes avec *B. subtilis* comme témoins négatifs. Les géloses ont été incubées pendant 24h à 37°C, puis le diamètre des zones d'inhibition de croissance de *B. subtilis* autour des disques et des colonies a été calculé.

4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Recherche du ligand de ScmR

4.1.1 Criblage de mutants pour la production d'HMAQ

Un objectif de cette maîtrise était de découvrir la fonction du régulateur transcriptionnel ScmR. Puisque ScmR est un régulateur transcriptionnel de type LysR (LTTR), il devrait nécessiter un ligand pour moduler son activité. Puisque typiquement les LTTR régulent directement les gènes responsables de la production de leur propre inducteur/ligand, j'ai tenté d'identifier quels gènes pourraient coder pour la production du ligand putatif en se basant sur le transcriptome de ScmR préalablement réalisé dans notre laboratoire (Le Guillouzer, 2018). Pour ce faire, des souches mutantes dans la collection développée dans la souche E264 disponible à l'University of Washington (Gallagher *et al.*, 2013) qui seraient impliqués dans des fonctions reliées à des molécules ou métabolites, identifiés ou non, et dont l'expression des gènes correspondants est sur- ou sous-exprimé chez le mutant *scmR*- selon l'étude transcriptomique ont d'abord été sélectionnés. Ceci a permis d'identifier 75 mutants à tester.

Tableau 4.1 : Souches utilisées pour la découverte du ligand.

Identification	Souche	Gène	Description	* Facteur de changement
ED3008	tnbt1_2r100317p03q151	BTH_II1071	Obc1 (oxalate)	-72,3
ED3009	tnbt1_er100421p02q168	BTH_II1071	Obc1 (oxalate)	-72,3
ED3011	tnbt1_er100329p06q174	BTH_II0931	Protéine hypothétique	-3,8
ED3033	tnbt1_er100406p05q110	BTH_II0274	Protéine hypothétique	-5,2
ED3034	tnbt1_er120620p01q139	BTH_II0276	Protéine contenant un domaine de liaison de l'AMP	-4,9
ED3035	tnbt1_er100419p02q143	BTH_II0276	Protéine contenant un domaine de liaison de l'AMP	-4,9
ED3036	tnbt1_er100428p02q159	BTH_II0278	JamB	-7,4
ED3037	tnbt1_er100406p08q171	BTH_II0279	Methoxy mycolic acid synthase (acide gras)	-6,7
ED3038	tnbt1_er100428p08q130	BTH_II0281	JamB	-11,4
ED3039	tnbt1_er100331p05q172	BTH_II1209	Protéine hypothétique	-274,2
ED3040	tnbt1_er100408p02q190	BTH_II1210	Protéine hypothétique	-123,4
ED3041	tnbt1_er100421p01q108	BTH_II1211	Polyketide synthase (métabolite secondaire)	-61,7
ED3042	tnbt1_2r100315p03q117	BTH_II1211	Polyketide synthase (métabolite secondaire)	-61,7
ED3043	tnbt1_2r100310p02q195	BTH_II1212	Syringomycin biosynthesis protein (lipopeptide)	-47,6
ED3044	tnbt1_er100503p08q156	BTH_II1212	Syringomycin biosynthesis protein (lipopeptide)	-47,6
ED3045	tnbt1_er100331p01q194	BTH_II1213	Peptide synthetase-like protein	-37,6

Identification	Souche	Gène	Description	* Facteur de changement
ED3046	tnbt1_2r100317p08q176	BTH_II1214	Peptide synthétase	-29,2
ED3047	tnbt1_2r100317p05q191	BTH_II1215	Protéine hypothétique	-34,8
ED3048	tnbt1_er100406p07q162	BTH_II1215	Protéine hypothétique	-34,8
ED3049	tnbt1_er120710p03q122	BTH_II1216	D-cysteine desulfhydrase (sulfide, NH ₃ , and pyruvate)	-17,2
ED3050	tnbt1_2r100317p01q109	BTH_II1217	Protéine de la famille des luciférases (bioluminescence)	-18,6
ED3051	tnbt1_er100503p03q114	BTH_II0204	Terphenyl (métabolite secondaire)	-10,1
ED3052	tnbt1_er100421p02q158	BTH_II0205	Terphenyl (métabolite secondaire)	-14,9
ED3053	tnbt1_er100504p03q163	BTH_II0206	Terphenyl (métabolite secondaire)	-13,8
ED3054	tnbt1_2r100315p02q188	BTH_II0207	Terphenyl (métabolite secondaire)	-14,2
ED3073	tnbt1_2r120619p01q191	BTH_I2444	amrB (multidrug efflux protein)	5,1
ED3074	tnbt1_er100415p07q133	BTH_I0680	bpeA (RND family efflux transporter MFP subunit)	4,4
ED3075	tnbt1_er100421p03q162	BTH_I0681	bpeB (hydrophobe/amphiphile efflux family protein)	3,8
ED3086	tnbt1_er100428p05q116	BTH_I1402	ldhA (D-lactate dehydrogenase)	-16,8
ED3087	tnbt1_2r100317p06q165	BTH_I1402	ldhA (D-lactate dehydrogenase)	-16,8
ED3088	tnbt1_er100329p02q193	BTH_I1401	nitroreductase family protein	-16,8
ED3101	tnbt1_er100412p05q160	BTH_I1955	Protéine hypothétique	-3
ED3102	tnbt1_2r100315p03q194	BTH_I1956	non-ribosomal peptide synthetase	-3
ED3103	tnbt1_er100505p07q111	BTH_I1956	non-ribosomal peptide synthetase	-3
ED3106	tnbt1_er100408p04q121	BTH_I1958	dioxygenase, TauD/TfdA	-3,4
ED3385	tnbt1_er100412p01q121	BTH_I2713	poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	-26,7
ED3386	tnbt1_er100505p05q176	BTH_I2713	poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	-26,7
ED3387	tnbt1_er100419p02q157	BTH_I2713	poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	-26,7
ED3388	tnbt1_er100412p01q129	BTH_I2713	poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	-26,7
ED3730	tnbt1_er100329p07q188	BTH_I2691	Protéine hypothétique	-4
ED3731	tnbt1_er100505p01q125	BTH_I2692	unnamed protein product; Unknown protein, putative	-3,2
ED3732	tnbt1_er120710p04q156	BTH_I2694	Protéine hypothétique	-3,6
ED3733	tnbt1_er100406p08q175	BTH_I2695	Protéine hypothétique	-4,8
ED3734	tnbt1_er100602p02q173	BTH_I2696	Protéine hypothétique	-3,5
ED3735	tnbt1_er100415p06q109	BTH_I2697	Rhs element Vgr protein, putative (système de sécrétion VI)	-3,9
ED3748	tnbt1_er100412p07q127	BTH_I0513	FHA domain protein (se lie aux protéines)	-10,2
ED3757	tnbt1_er100421p01q169	BTH_I2360	nonribosomal peptide synthetase, putative	3,5
ED3758	tnbt1_er100503p06q111	BTH_I2361	bhcG phosphotransferase enzyme family protein, putative	3,8
ED3759	tnbt1_er100412p04q107	BTH_I2362	bhcF Acyl-CoA dehydrogenase domain protein (Burkholdac)	3,3
ED3760	tnbt1_er100329p06q133	BTH_I2363	bhcE Polykétide synthase (Burkholdac)	4,1

Identification	Souche	Gène	Description	* Facteur de changement
ED3761	tnbt1_er100503p08q121	BTH_I2364	<i>bhcD</i> Peptide synthétase, putative (Burkholdac)	3,7
ED3762	tnbt1_er100329p01q189	BTH_I2366	<i>bhcB</i> Polykétide synthase (Burkholdac)	3,8
ED3763	tnbt1_er100406p07q150	BTH_I2367	<i>bhcA</i> dihydroaeruginoic acid synthetase (Burkholdac)	4,9
ED3092	tnbt1_er100415p03q136	BTH_I2367	<i>bhcA</i> dihydroaeruginoic acid synthetase (Burkholdac)	4,9
ED3093	tnbt1_2r100317p01q134	BTH_I2367	<i>bhcA</i> dihydroaeruginoic acid synthetase (Burkholdac)	4,9
ED3777	tnbt1_er100421p08q135	BTH_II0416	<i>ackA</i> (acétate kinase)	-17,7
ED3778	tnbt1_2r100317p03q101	BTH_II0417	Phosphate acetyl/butyryltransferase family protein	-22,8
ED3779	tnbt1_er100408p04q187	BTH_II0418	Poly-beta-hydroxybutyrate polymérase	-18,4
ED3785	tnbt1_er100421p07q157	BTH_II0542	mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase	-17,9
ED3786	tnbt1_er100421p01q177	BTH_II0543	undecaprenyl-phosphate glycosyl-1-phosphate transferase BceB	-21,2
ED3788	tnbt1_2r100317p06q166	BTH_II0545	Low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase wzb	-11,7
ED3789	tnbt1_er120619p03q188	BTH_II0546	Capsular polysaccharide biosynthesis/export periplasmic protein	-14,9
ED3813	tnbt1_2r100315p03q121	BTH_II1983	<i>rfbG</i> (CDP-glucose 4,6-dehydratase)	-51,4
ED3814	tnbt1_2r100317p03q129	BTH_II1981	Perosamine synthetase	-40,8
ED3815	tnbt1_er100331p08q156	BTH_II1980	Protéine membranaire, putative (membrane cytoplasmique)	-32,9
ED3816	tnbt1_er100421p04q120	BTH_II1979	Glycosyl transferase, family 2: Mitochondrial substrate carrier	-55,7
ED3818	tnbt1_er100329p03q129	BTH_II1974	Protéine membranaire, putative (membrane cytoplasmique)	-16,1
ED3819	tnbt1_er100331p02q144	BTH_II0700	Acyltransferase family protein	-4,4
ED3820	tnbt1_er100415p05q190	BTH_II0699	<i>galU-3</i>	-7
ED3821	tnbt1_er100412p02q160	BTH_II0698	Protéine hypothétique	-44,5
ED3823	tnbt1_er100504p02q146	BTH_II0695	Glycosyl transferase, group 1 family protein	-8,8
ED3824	tnbt1_er100428p05q110	BTH_II0693	Protéine hypothétique conservée	-23,2
ED3825	tnbt1_er100329p01q127	BTH_II0691	acyltransferase family protein	-14,1
ED3828	tnbt1_er100505p03q132	BTH_I0533	cyclic nucleotide-binding domain protein	-7,1
ED3830	tnbt1_er120621p03q110	BTH_I0531	Acyl-CoA dehydrogenase domain protein	-3,3

* Facteur de changement : issue des résultats de l'étude transcriptomique de Le Guillouzer, 2018.

L'opéron *hmqABCDEFGF*, qui est responsable de la biosynthèse des HMAQ, est régulé par ScmR. De plus, il a été proposé que ScmR nécessite un coactivateur afin d'y arriver. Une souche mutante contenant un défaut dans l'activation de ScmR pourrait donc être détectée par l'observation d'un effet sur la production d'HMAQ et la transcription de l'opéron *hmqABCDEFGF*. La production de

HMAQ ainsi que le niveau d'activation de l'opéron à l'aide du rapporteur mini-CTX-*hmqA-lux* ont été utilisés afin d'identifier des mutants qui seraient susceptibles d'affecter la production d'un ligand de ScmR.

La production d'HMAQ a tout d'abord été observée une première fois chez les 75 souches mutantes sélectionnées durant la phase exponentielle (non montré) et au début de la phase stationnaire (Fig. 4.1). Aucun phénotype similaire à celui du mutant *scmR*-, soit une inhibition complète de la production d'HMAQ, n'a été observé. Cependant, il est possible d'observer que certains mutants ont une sous- ou surproduction d'HMAQ en comparaison avec la souche sauvage. Pour les prochaines expériences, les quatre souches ayant un phénotype le plus proche du mutant *scmR*-, soit ED3102, ED3777, ED3819 et ED3088 ont été sélectionnées. La souche ED3052 a été choisie, puisqu'elle fait partie d'un opéron prédit pour synthétiser un métabolite secondaire, puis que la morphologie coloniale d'un de ces gènes était similaire à celui du mutant *scmR*- (non montré). Les souches ED3760 et ED3828 ont été sélectionnées, puisqu'elles présentaient une faible production d'HMAQ durant la phase exponentielle (non montré), en comparaison à une production intermédiaire d'HMAQ durant la phase stationnaire (Fig. 4.1). De plus, la souche ED3011 a été sélectionnée, puisque c'était celle avec la plus grande production. Ces huit souches ont été sélectionnées afin d'observer leur production d'HMAQ à différents moments de la croissance.

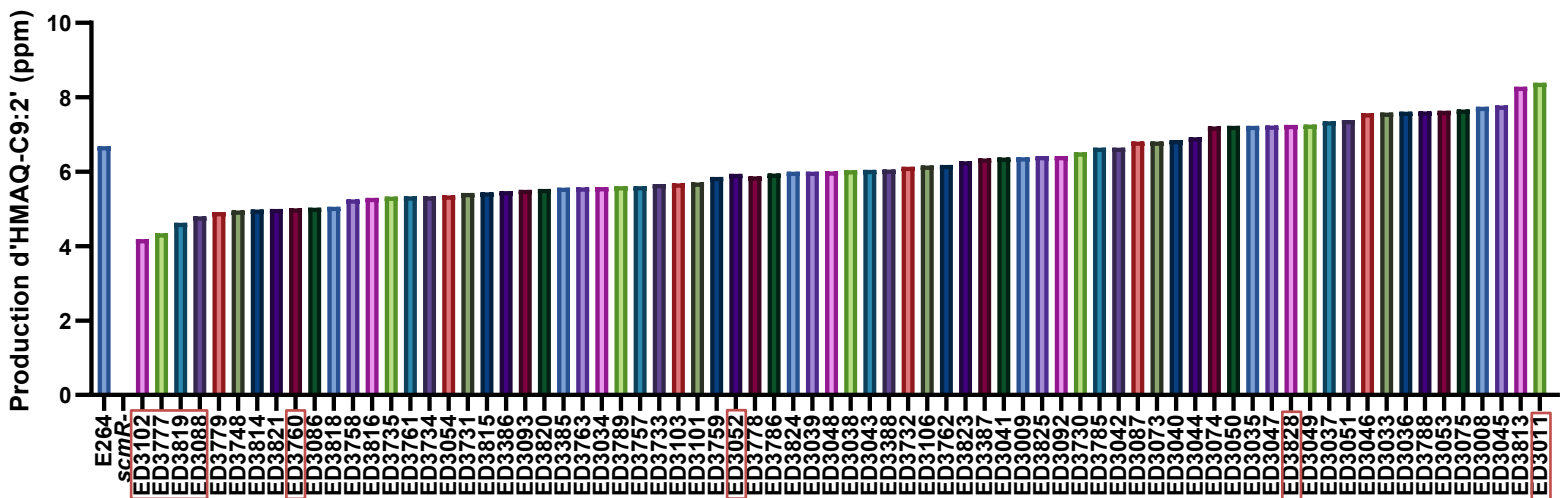


Figure 4.1 : Criblage des mutants sélectionnés pour la production d'HMAQ-C9 :2'.

La production d'HMAQ-C9 :2' a été quantifiée par CL/SM durant le début de la phase stationnaire des différentes souches (DO₆₀₀ de 7,0), sans réplica.

Ces analyses montrent que la souche ED3011 a une production d'HMAQ supérieure à celle de la souche sauvage, alors que les souches ED3052, ED3777 (Fig. 4.2A), ED3088, ED3102, ED3760 et ED3819 (Fig 4.2B) semblent produire moins d'HMAQ que la souche sauvage. Puisque les souches ED3011, ED3052, ED3777 et ED3819 avaient une production d'HMAQ la plus différente en comparaison avec la souche sauvage, l'activation de l'opéron *hmqABCDEFG* a également été observée chez ses souches.

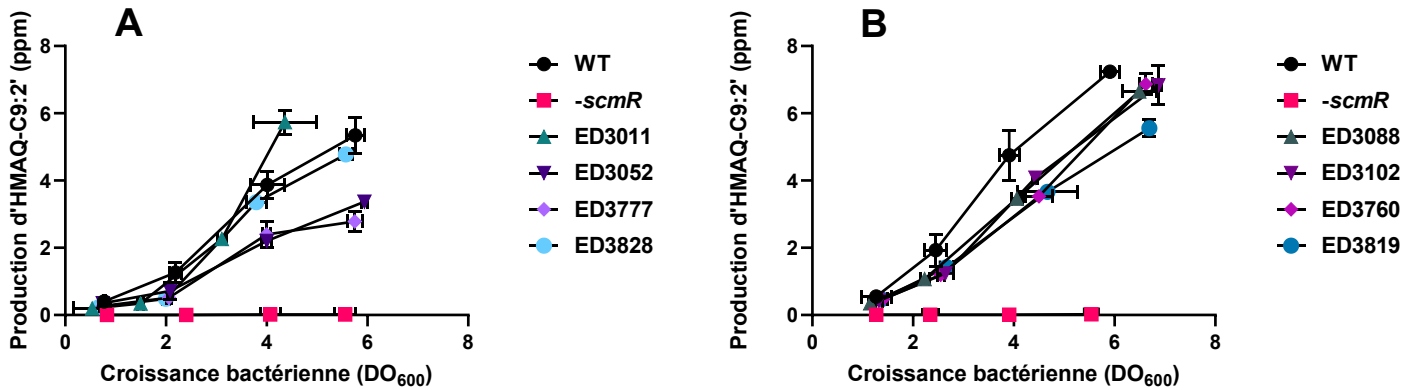


Figure 4.2 : Production d'HMAQ-C9 :2' chez la souche sauvage et les mutants sélectionnés de *B. thailandensis* E264.

La production d'HMAQ-C₉:2' a été quantifiée par CLISM à différents moments durant la croissance des différentes souches. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques.

L'activation de la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* a été observée chez ces souches à l'aide du rapporteur chromosomique *hmqA-luxCDABE*. Il est tout d'abord possible d'observer que presque toutes les souches mutantes testées surexpriment l'opéron *hmqABCDEFG* (Fig. 4.3). Il est intéressant d'observer que les souches chez lesquelles le rapporteur est le plus actif, soit ED3052 et ED3777, étaient celles dont la production d'HMAQ était la plus faible à la figure 4.2.

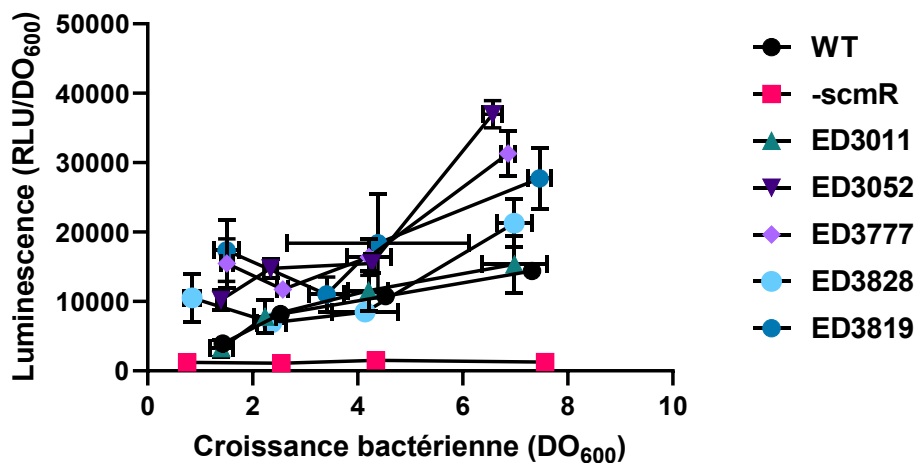


Figure 4.3 : Expression de l'opéron *hmqABCDEFG* chez la souche sauvage et les mutants sélectionnés de *B. thailandensis* E264.

L'activité luciférase du rapporteur transcriptionnel *hmqA-luxCDABE* a été observée à différents moments durant la croissance des différentes souches. La luminescence est exprimée en unité relative de lumière en fonction de la densité optique (RLU/DO₆₀₀). Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois réplicas.

Le mutant ED3052 contient une mutation dans un gène codant pour une protéine hypothétique. En utilisant l'outil Blast à l'aide de la séquence protéique, une identité de 92,3% avec une déshydratase présente chez *B. pseudomallei* a été observée. Alors que le mutant ED3777 contient une mutation dans le gène *ackA* qui code pour une acétate kinase. Les deux mutations semblent être impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA, qui pourrait être un précurseur des HMAQ, ce qui pourrait expliquer pourquoi une plus faible production d'HMAQ a été observée chez ses mutants.

Malheureusement, à la suite de notre criblage, aucune piste significative n'a été obtenue pour la découverte du ligand. Tout d'abord une inhibition de la production d'HMAQ similaire à celle du mutant *scmR*-, pouvant indiquer qu'un de ces gènes serait nécessaire pour la régulation de l'opéron, n'a pas été observée chez les souches sélectionnées. Cependant, des différences de productions d'HMAQ significatives chez certains mutants en comparaison avec la souche sauvage ont été observées. Malheureusement, en observant les gènes affectés par ses mutations, il est ressorti que ces derniers semblent impliqués dans la biosynthèse de précurseur d'HMAQ, ce qui pourrait expliquer l'inhibition de la production d'HMAQ chez ses souches. Il est important de noter que même si notre banque de mutants de *B. thailandensis* au laboratoire est grande, elle n'est pas complète. Il est possible que le gène codant pour le ligand de ScmR ne se retrouve pas dans notre banque de mutant. Donc, ces résultats n'ont pas présenté assez

d'informations pour avoir des doutes suffisants permettant de supposer que les mutants étudiés coderaient pour le ligand de ScmR. Cette piste n'a pas été davantage poursuivie.

4.1.2 Vérification de la xanthine comme possible ligand de ScmR

Vers la fin des travaux pour cette maîtrise, Thapa et al. ont suggéré que la xanthine pourrait être un ligand de ScmR (Thapa *et al.*, 2022); quelques expériences *in vivo* ont donc été effectuées afin de tester cette hypothèse.

La production de divers dérivés du métabolisme des purines, soit l'hypoxanthine, la xanthine et l'urate chez notre mutant *scmR*⁻ et notre souche sauvage a tout d'abord été étudiée. Pour débiter, on remarque que le niveau d'hypoxanthine est plus élevé dans des cultures de notre mutant *scmR*⁻ que chez la souche sauvage (Fig. 4.4A). Une accumulation d'hypoxanthine pourrait indiquer une inhibition de la fonction de la xanthine oxydase qui s'occupe de faire la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis de la xanthine en urate (Fig. 1.6). Ce qui pourrait également expliquer pourquoi le niveau de production de xanthine est diminué chez le mutant *scmR*⁻ (Fig. 4.4B). Il est également possible d'observer une petite augmentation de la production d'urate chez le mutant *scmR*⁻ en comparaison avec la souche sauvage (Fig. 4.4C). Il faut également comprendre que le mécanisme de dégradation des dérivés de purines est complexe et qu'il est possible pour la bactérie de produire de la xanthine et de l'urate par d'autres mécanismes que via l'utilisation de xanthine oxydase. Tel que l'utilisation de la guanine comme précurseur à l'aide de la guanine désaminase.

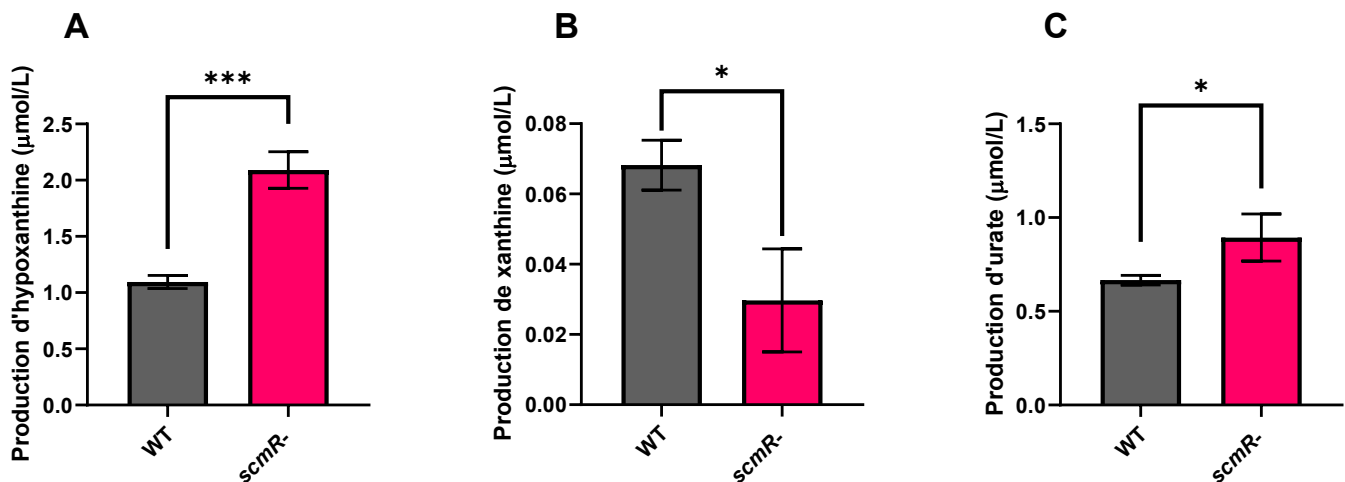


Figure 4.4 : Observation de la production d'hypoxanthine, de xanthine et d'urate chez la souche sauvage et le mutant *scmR*⁻ de *B. thailandensis*.

La production d'hypoxanthine (A), de xanthine (B) et d'urate (C) a été quantifiée par CL/SM durant la phase stationnaire. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Par la suite, de la xanthine ou de l'hypoxanthine ont été ajoutés dans le milieu de culture afin d'observer si une accumulation de ces derniers allait affecter la production d'HMAQ. La souche sauvage, le mutant *scmR*- et le mutant *scmR*- complémenté avec le plasmide pJPD3 ont été utilisés. L'ajout de xanthine au milieu de culture augmente de façon significative la production d'HMAQ chez la souche sauvage (Fig. 4.5). Aucun changement n'est observé chez le mutant *scmR*- complémenté ou non. Il semble donc que la xanthine puisse jouer un rôle dans la biosynthèse des HMAQ. Nous nous attendions à observer aucun changement chez le mutant *scmR*-, puisque même si on ajoute un ligand, si la protéine n'est pas présente nous ne nous attendons pas à observer de différences. Cependant nous nous attendions à observer un résultat similaire entre notre souche sauvage et le mutant complémenté. Il est possible que puisque le gène *scmR* est exprimé à partir de l'ADN plasmidique que sa fonction ne soit pas optimale, ou que la production de son ligand soit affectée.

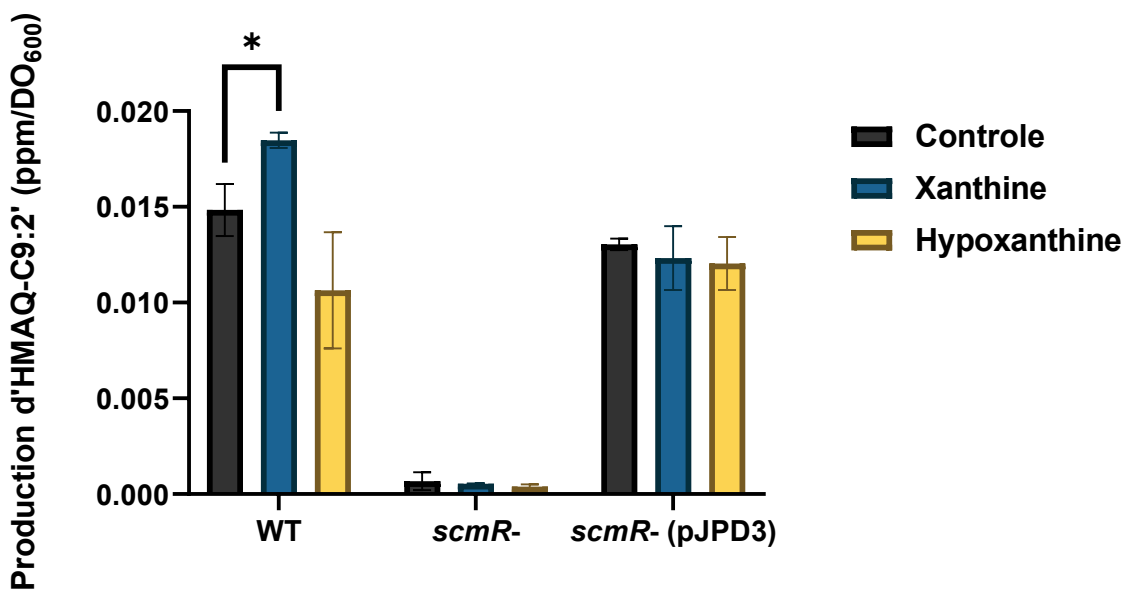


Figure 4.5 : Effet de l'ajout de xanthine ou d'hypoxanthine sur la production d'HMAQ-C9:2' chez la souche sauvage, le mutant *scmR*- et le mutant *scmR*- complémenté.

Une quantité de 5 mM de xanthine ou d'hypoxanthine été ajoutée dans les cultures, l'eau a été utilisée comme témoin. La production d'HMAQ-C9:2' a été quantifiée par CL/SM durant la phase stationnaire de la souche sauvage, puis du mutant *scmR*- complémenté ou non avec le plasmide pJPD3. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques. *, $p < 0,05$.

La xanthine oxydase est l'enzyme responsable de la conversion de l'hypoxanthine à la xanthine (Fig. 1.6). Il est possible d'inhiber la fonction de la xanthine oxydase à l'aide de l'allopurinol. L'allopurinol est un médicament utilisé pour diminuer la production d'acide urique chez l'humain via l'inhibition de la xanthine oxydase. Il permet également une diminution de la production de xanthine. Afin de vérifier si la xanthine est le ligand de ScmR, l'ajout d'allopurinol chez la souche

sauvage a été utilisé afin d'inhiber la xanthine oxydase et donc la production de xanthine. Si la xanthine est le ligand de ScmR, l'ajout d'allopurinol pourrait engendrer un défaut dans l'activation de ScmR qui pourrait être détectée par l'observation d'un effet sur la production d'HMAQ et la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG*. Il est tout d'abord possible d'observer que l'ajout d'allopurinol, à faible concentration, permet une surproduction d'HMAQ (Fig. 4.6A). Cependant, il est également possible d'observer que l'ajout d'allopurinol affecte la croissance bactérienne (Fig. 4.6B).

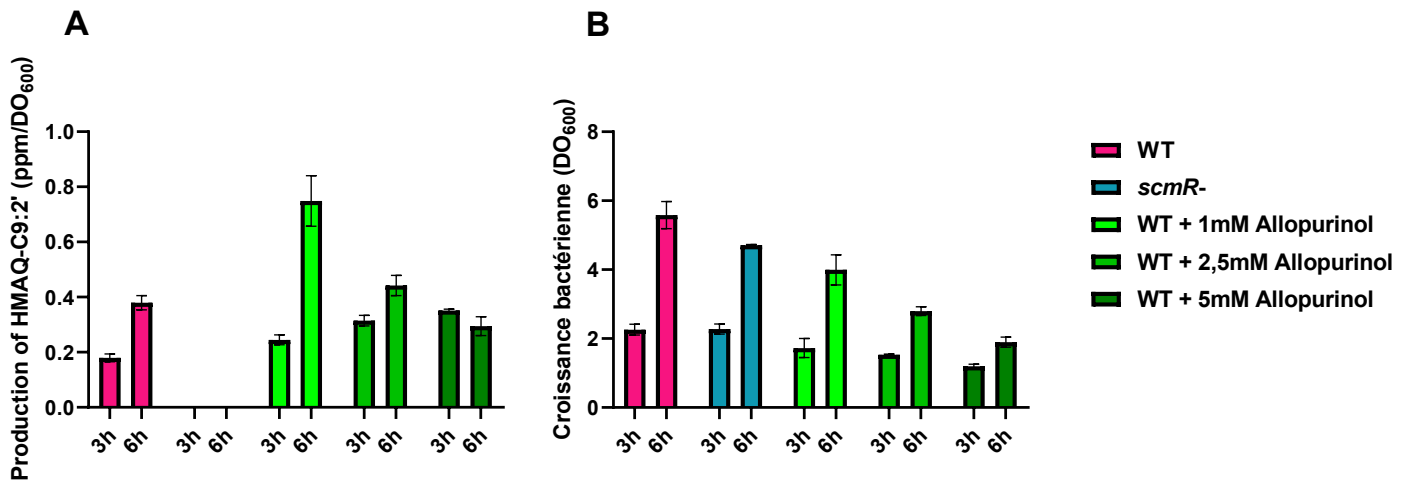


Figure 4.6 : Effet de l'ajout d'allopurinol sur la production d'HMAQ-C9:2' et la croissance bactérienne chez la souche sauvage et le mutant *-scmR*.

1 mM, 2,5 mM et 5 mM d'allopurinol ont été ajoutée à la souche sauvage, l'eau a été utilisée comme contrôle. La production d'HMAQ-C₉:2' a été quantifiée par CL/SM (A), ainsi que la croissance bactérienne (B) durant la phase exponentielle et stationnaire des différentes souches. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques.

L'ajout d'allopurinol ne semble donc pas optimal pour observer l'effet de l'inhibition de la xanthine oxydase. Le défaut de croissance pourrait lui-même affecter la production d'HMAQ. Il est toutefois intéressant de noter que la transcription des gènes de la xanthine oxydase, *xdhA* et *xdhB*, étaient également inhibée dans un mutant *scmR-* dans l'étude transcriptomique préalablement réalisée dans notre laboratoire (réduction d'expression de -6,8 et -6,6 fois respectivement) (Le Guillouzer, 2018). Avec l'étude de Thapas et al. (2022), puis nos résultats démontrant une modulation de la production des dérivés de purine chez un mutant *scmR-*, l'étude de la xanthine comme ligand possible de ScmR reste intéressante. Cependant, d'autres expériences seront nécessaires afin de confirmer que la xanthine serait le ligand de ScmR.

4.2 Ajout d'une étiquette de polyhistidine à la protéine ScmR

Afin de réaliser le CHIP-Seq, une étiquette de polyhistidine a d'abord été ajoutée à la protéine ScmR. Afin de s'assurer que l'ajout de l'étiquette n'affectait pas la fonction de la protéine, cette dernière a été ajoutée dans un mutant *scmR*- afin de vérifier la production d'HMAQ. Malheureusement, la première construction, qui ajoutait l'étiquette en N-terminal, ne complémentait pas beaucoup le mutant *scmR*- pour la quantification des HMAQ (Fig. 3.4), ce qui pourrait impliquer un mauvais repliement de la protéine, et donc affecter la fonction de cette dernière. Donc deux nouvelles constructions ont été réalisées pour tenter d'obtenir une construction qui semblait le moins affecter la fonction de la protéine. L'étiquette a donc été ajoutée en N-terminal, en diminuant l'espace entre la protéine et l'étiquette (pGD4), puis en C-terminal (pGD6).

Malheureusement, les deux nouvelles constructions (pGD4 et pGD6) ne démontraient pas d'amélioration en comparaison au plasmide pGD2 pour la complémentation de la production d'HMAQ chez le mutant *scmR*- (Fig. 3.5A). Une nouvelle construction a donc été réalisée avec l'étiquette en N-terminal, puis en ajoutant la région promotrice du gène *scmR*. Ce plasmide a été nommé pGD7. Heureusement, la production d'HMAQ est deux fois plus grande avec le plasmide pGD7, que pGD2 (Fig. 3.5B), quoiqu'elle reste moindre qu'avec pJPD3, qui contient le gène *scmR* avec sa région promotrice (Fig. 3.5C). Lorsqu'on regarde de plus près, on remarque tout de même que la production est clairement plus grande chez le mutant *scmR*- avec le plasmide pGD7 en comparaison avec le plasmide pME6000 vide (Fig. 3.5D). La construction pGD7 est celle qui confère la meilleure production d'HMAQ. Cette construction a donc été utilisée pour le CHIP-Seq.

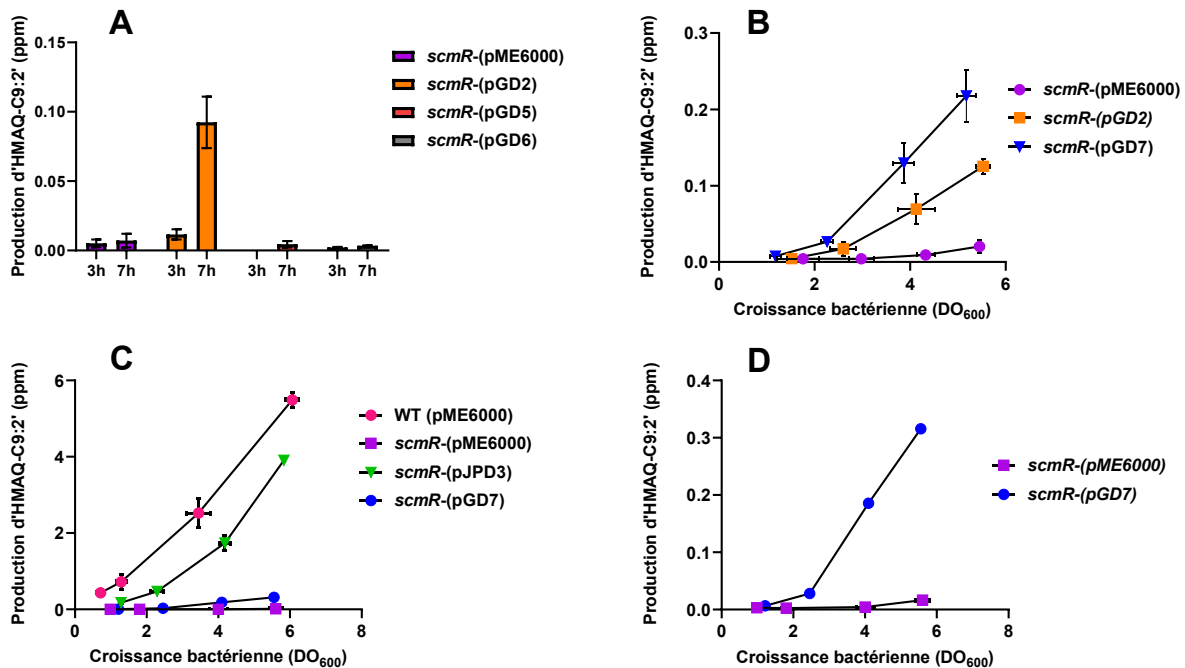


Figure 4.7 : Production d'HMAQ-C9 :2' chez la souche sauvage, le mutant *scmR*- et le mutant *scmR*- complétement avec les plasmides pGD2, pGD4, pGD6, pGD7 et pJPD3.

La production d'HMAQ-C9:2' a été quantifiée par CL/SM à différents moments durant la croissance des différentes souches afin de comparer la complémentation du mutant *scmR* avec les constructions; (A) pGD2, pGD4, pGD6, (B) pGD2 et pGD7, (C) pJPD3 et pGD7 et (D) pGD7. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques. La souche sauvage a été masquée dans les figures B et D afin de faciliter la visualisation des différences entre les plasmides de complémentation.

4.3 ChIP-Seq de la protéine ScmR

Il a fallu surmonter plusieurs obstacles lors de l'exécution du ChIP-Seq et plusieurs étapes du protocole ont dû être optimisées. Plusieurs paramètres ont d'abord été testés pour obtenir des fragments de la taille désirée lors de la sonication. Le temps d'incubation avec le formaldéhyde a également été allongé afin d'obtenir une meilleure liaison des protéines à l'ADN. Plusieurs expériences ont également été regroupées afin d'obtenir une plus grande quantité d'ADN pour le séquençage.

Finalement, le ChIP-Seq a permis d'identifier 120 régions consensus où se lierait ScmR (Fig. 4.7). Malheureusement, à cause d'une faible quantité d'ADN, le témoin négatif, qui consistait de notre souche sauvage sans étiquette de polyhistidine lié à la protéine ScmR, n'a pas pu être utilisé lors de notre analyse. En effet, à la suite du séquençage, trop peu de séquences ont été obtenues pour l'alignement au génome, puis pour la découverte de régions consensus. Ce témoin est important afin de réduire le bruit de fond de notre analyse. Puisqu'on utilise une étiquette de

polyhistidine, puis un anticorps anti-his, plusieurs protéines normalement présente chez la bactérie, peuvent contenir plusieurs histidines et donc se lier à nos billes durant la méthode. L'utilisation de témoins négatifs est souvent utilisée afin de diminuer le nombre de faux positifs. Puisque nous n'avons pas de témoin négatif pour notre analyse, les régions consensus avec un $1/q\text{-value} \leq 5$ ont été exclues. Cela a permis de réduire à 74 régions potentiellement intéressantes nos résultats. Parmi ces-dernières, plusieurs régions se retrouvaient autour de gènes codants pour des protéines hypothétiques, des régulateurs transcriptionnels, des gènes impliqués dans les systèmes de sécrétion et la mobilité de la bactérie.

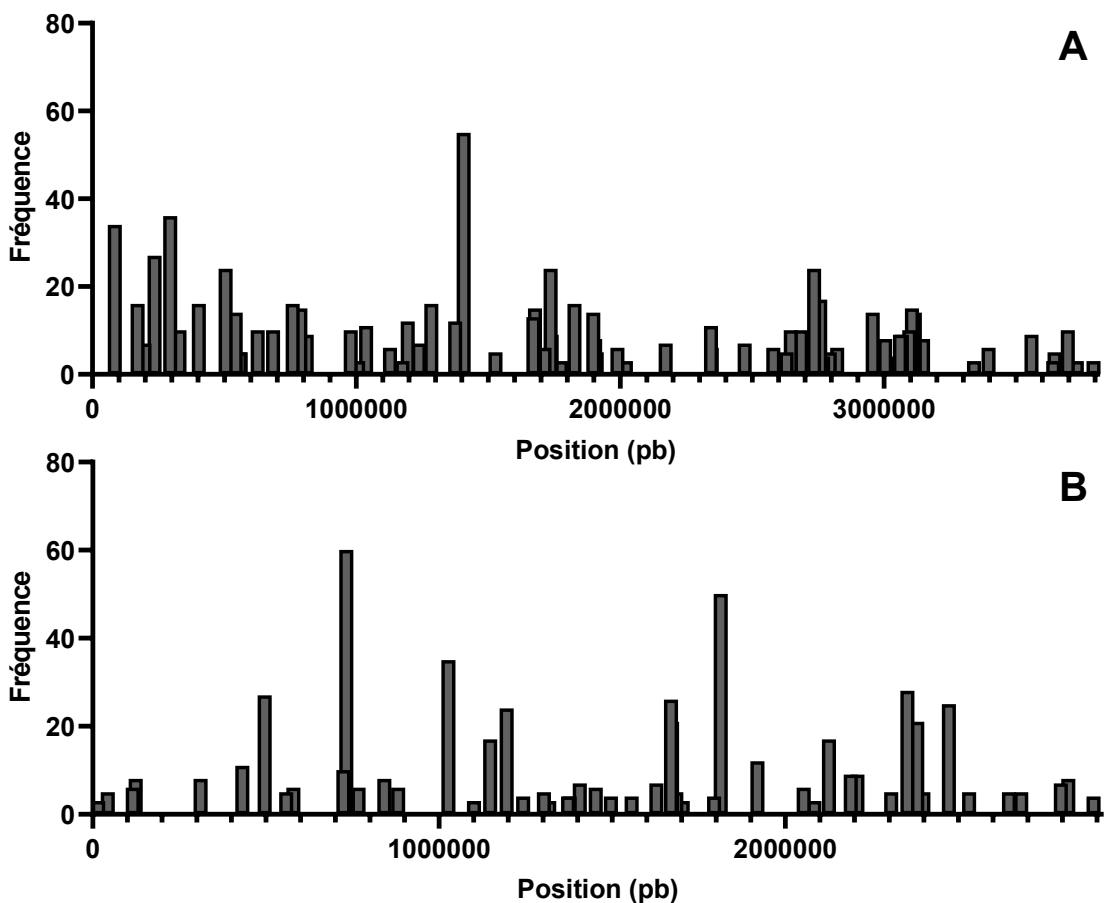


Figure 4.8 : Distribution des régions consensus issues du ChIP-Seq de la protéine ScmR sur le génome de *B. thailandensis* E264.

Fréquence et position des pics de régions amplifiées du ChIP-Seq issus de l'analyse MACS2 répandu sur le chromosome I (A) et chromosome II (B) du génome de *B. thailandensis* E264.

Puisque plusieurs régions ont été identifiées, mais que les témoins négatifs n'étaient pas utilisables pour extraire le bruit de fond de notre analyse, seulement les cibles qui se retrouvent dans la région promotrice d'un gène ou d'un opéron ont été retenues. Ces 15 régions semblaient les plus probables d'être régulées par ScmR, un régulateur transcriptionnel (Tableau 4.2)

Tableau 4.2 : Possible cibles régulées directement par ScmR d'après les résultats du ChiP-Seq.

Chromosome	Position	1/p-value	Gène/opéron	Facteur de changement *
Chromosome I	84402..84892	38,3409	BTH_I0078 : protéine hypothétique	-3,9
Chromosome I	197281..197741	8,51692	BTH_I0165-BTH_I0164 : ATP-dependent protease peptidase subunit	
Chromosome I	329633..330093	12,2718	BTH_I0296-BTH_I0297 : Protéines hypothétiques	
Chromosome I	403526..404217	17,2196	BTH_I0360-BTH_I0361 : lclR family transcriptional regulator BTH_I0362 : fumarylacetoacetate hydrolase family protein	
Chromosome I	787714..788086	18,1021	BTH_I0683 : xanthine/uracil permease family protein BTH_I0684 : xylulokinase	
Chromosome I	1237102..1237410	8,2694	BTH_I1095 : Protéine hypothétique BTH_I1096 : 16S ribosomal RNA (<i>rrsB</i>)	
Chromosome I	1374134..1374406	13,716	BTH_I1225 : glutamate/aspartate ABC transporter periplasmic glutamate/aspartate-binding protein	
Chromosome I	1904849..1905272	10,5783	BTH_I1696 : ferredoxin BTH_I1697 : nicotinate phosphoribosyltransferase	
Chromosome I	2172255..2172593	8,64821	BTH_I1924-BTH_I1928 : Protéine hypothétique BTH_I1929 : gp33	
Chromosome I	2471289..2471644	10,1539	BTH_I2194-BTH_I2196 : protéine hypothétique BTH_I2197 : aminotransferase AlaT	
Chromosome I	3066822..3067176	11,4196	BTH_I2686 : H-NS histone family protein (<i>hns</i>)	-7,9
Chromosome II	123833..124141	10,2483	BTH_II0110 : fusaric acid resistance protein	
Chromosome II	431881..432276	11,4064	BTH_II0356-BTH_II0358 : IS407A, transposase OrfA	
Chromosome II	1147368..1147798	16,142	BTH_II0962 : protéine hypothétique	
Chromosome II	1406162..1406606	8,2694	BTH_II1198 : methyl-accepting chemotaxis protein	

(*) Données issues de l'étude transcriptomique de ScmR réalisée préalablement dans le laboratoire (Le Guillouzer, 2018).

Parmi les cibles identifiées, on peut noter que la transcription de deux gènes était modulée dans le transcriptome de ScmR préalablement réalisé dans notre laboratoire (Le Guillouzer, 2018). On retrouve d'abord le gène BTH_I0078 (Fig. 4.9) qui code pour une protéine hypothétique, qui se retrouve parmi nos régions les plus probables (pvalue : 38,3409). En regardant les résultats de l'étude transcriptomique préalable, la transcription de ce gène est réduite chez le mutant *scmR*-(-3,9). Il pourrait être intéressant d'étudier ce gène plus en détail, par exemple via la caractérisation d'un mutant.

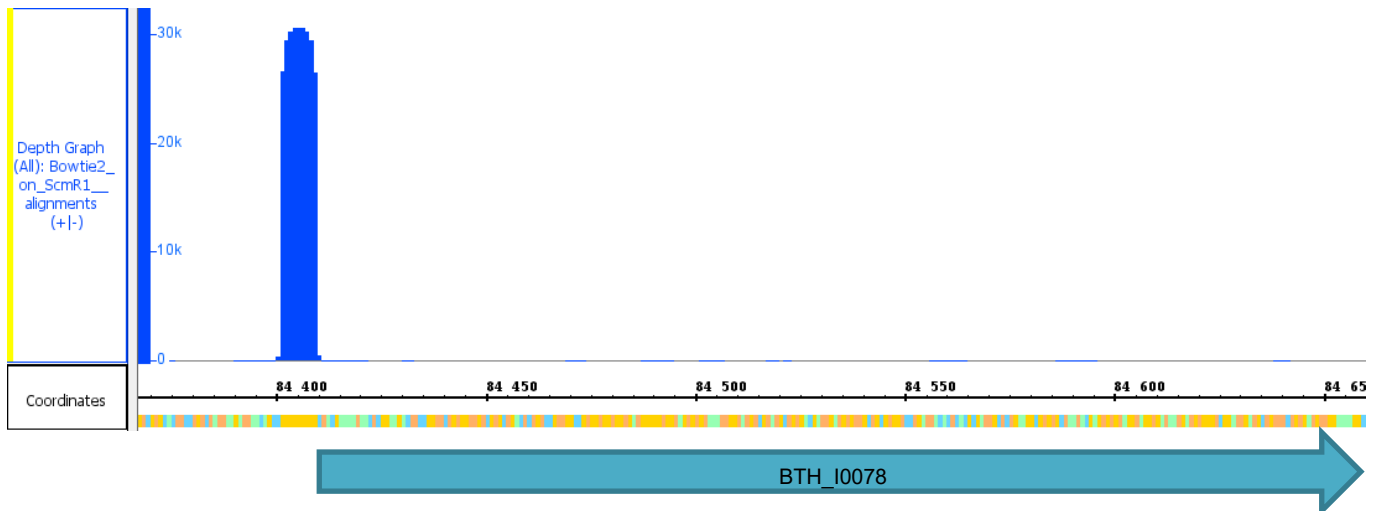


Figure 4.9 : Représentation de l'alignement des séquences issues du CHIP-Seq dans la région promotrice du gène BTH_I0078.

Empilement et alignement des séquences issues du CHIP-Seq analysé avec l'outil Bowtie2 dans la région promotrice du gène BTH_I0078 de *B. thailandensis* E264. Réalisée à l'aide de Integrated Genome Browser.

On retrouve également le gène BTH_I2686 (*hns*) (Fig. 4.10) qui code pour une protéine de la famille des histones H-NS. La transcription de ce gène est également diminuée selon l'étude transcriptomique (-7,9) (Le Guillouzer, 2018). Les histones de la famille H-NS permettent la compaction du nucléotide et affecte donc diverses fonctions cellulaires. Elles sont répandues chez les bactéries à Gram négatif et sont reconnues pour être des répresseurs de divers gènes, particulièrement ceux impliqués dans la virulence (Bertin *et al.*, 2001). Il serait intéressant d'étudier plus en profondeur l'effet de cette histone chez *B. thailandensis* afin de vérifier si les phénotypes observés chez le mutant *scmR*- sont similaires. ScmR pourrait possiblement passer par la régulation de cette histone afin de réguler plusieurs gènes, dont ceux impliqués dans la virulence.

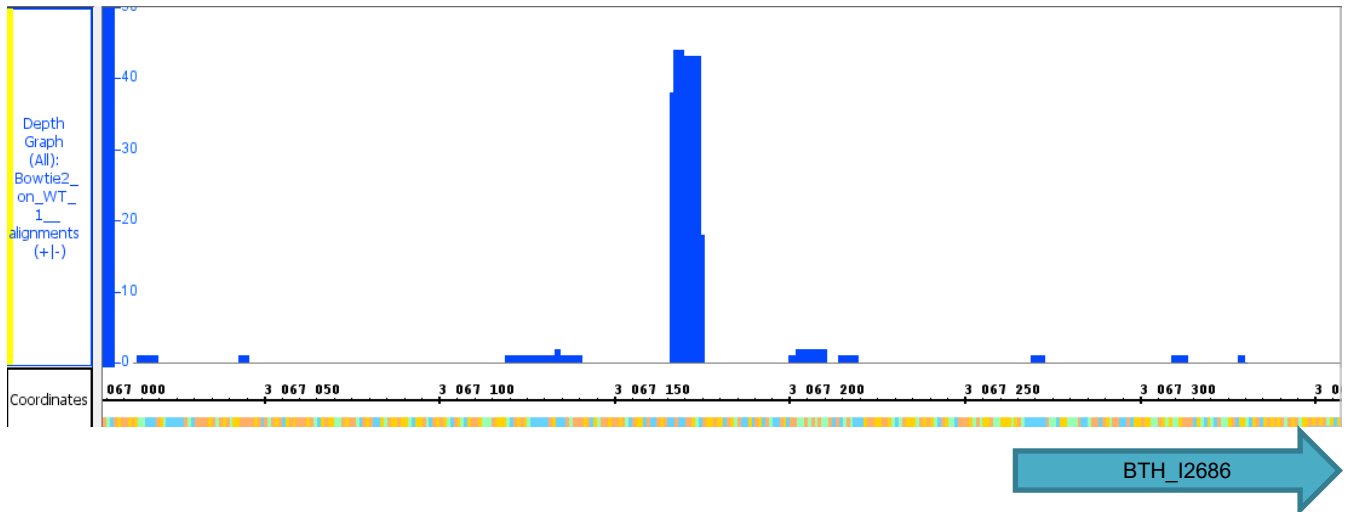


Figure 4.10 : Représentation de l’alignement des séquences issues du ChIP-Seq dans la région promotrice du gène BTH_I2686.

Empilement et alignement des séquences issues du ChIP-Seq analysé avec l’outil Bowtie2 dans la région promotrice du gène BTH_I2686 de *B. thailandensis* E264. Réalisée à l’aide de Integrated Genome Browser.

Parmi les cibles trouvées, nous avons également utilisée l’outil MEME-ChIP afin d’identifier quelle serait la boîte LTTR où se lie la protéine ScmR (Fig. 4.11). Les séquences complètes des 15 cibles se retrouvant dans la région promotrice d’un gène au tableau 4.2 ont été utilisées pour cette analyse. Cette séquence était présente dans 62,5 % des cibles utilisées. Malheureusement, elle ne forme pas un palindrome parfait puis ne respecte pas les caractéristiques T-n11-A d’une boîte LTTR (Parsek *et al.*, 1994). Il est possible que nous ayons toujours des faux positifs dans nos séquences identifiées ce qui pourrait nous empêcher de trouver le réel motif de liaison de la protéine ScmR.



Figure 4.11 : Motif de liaison potentiel du régulateur transcriptionnel ScmR.

Tiré de l’analyse STREAM à partir de l’outil MEME-ChIP

Il faut noter que puisque les témoins négatifs n'étaient pas utilisables pour nos analyses, il serait préférable de répéter l'expérience pour s'assurer que les résultats obtenus soient significatifs. En effet, même après avoir exclus les cibles non significatives ($q\text{-value} \leq 5$), 79,73% des cibles restantes ne semblaient pas se retrouver dans la région promotrice d'un gène. De plus, une des cibles attendues du ChIP-Seq était celle de la région promotrice de *ScmR*. En effet, Le Guillouzer a démontré que la protéine *ScmR* s'auto-régule de façon négative (Le Guillouzer *et al.*, 2020). Cependant, cette région n'est pas ressortie de notre analyse. Il faut également noter que bien que les LTTRs s'auto-régulent de façon négative, il n'existe toujours pas de consensus dans la littérature sur la présence généralisée de boîte LTTR dans leur région promotrice (Maddocks & Oyston, 2008).

Plusieurs paramètres ont pu affecter la réalisation du ChIP-Seq. Tout d'abord, l'ajout de l'étiquette de polyhistidine à notre protéine semble affecter sa fonction. En effet, lors de la complémentation d'un mutant *scmR-* avec notre protéine liée à son étiquette, la production d'HMAQ n'est pas revenue à des niveaux similaires à celui d'un mutant *scmR-* complémenté avec la même construction sans l'étiquette (Fig. 3.5C). Même si la meilleure des constructions réalisées a été utilisée, il est possible que la protéine liée à l'étiquette n'ait pas pu se lier à toutes ces cibles comme elle le ferait sans l'étiquette. Il est donc possible que certaines cibles se retrouvent dans la liste des 15 régions identifiées, mais il faudra effectuer des essais supplémentaires pour les confirmer.

4.4 La fonction de la protéine HmqE de l'opéron *hmqABCDEFG*

4.4.1 Implication de HmqE dans la production d'HMAQ

À la suite de l'obtention d'un mutant $\Delta hmqE$, la production d'HMAQ chez ce dernier a été observée. Selon l'hypothèse qu'HmqE a une fonction similaire à PqsE, puis que PqsE n'est pas nécessaire pour la biosynthèse des HAQ, HmqE ne serait pas nécessaire pour la production des HMAQ. En quantifiant la production des HMAQ, il est également possible de vérifier si tous les autres gènes de l'opéron sont transcrits correctement, puisque les gènes suivants *hmqE* sont également nécessaires à la biosynthèse des HMAQ (Vial *et al.*, 2008). Afin de quantifier la production d'HMAQ, la souche sauvage E264 a été utilisée comme témoin positif, ainsi que les mutants *hmqA-* et *hmqG-* comme témoins négatifs.

La figure 4.12 montre que le mutant $\Delta hmqE$ ne présente pas de défaut de production d'HMAQ, ce qui valide l'hypothèse. En effet, on retrouve des niveaux de productions d'HMAQ similaires à

la souche sauvage, tout comme un mutant *pqsE* permet la production d'HAQ de façon similaire sa souche sauvage (Déziel *et al.*, 2004). Cela suppose donc que HmqE aurait une autre fonction dans l'opéron *hmqABCDEFG*, possiblement de régulation. Cela a également permis de confirmer que notre mutation est bien non polaire. En effet, le gène *hmqG* qui se retrouve après *hmqE* et *hmqF* dans l'opéron *hmqABCDEFG* est nécessaire pour la production d'HMAQ. Puisque le mutant $\Delta hmqE$ ne présente pas de défaut de production d'HMAQ, cela confirme que les gènes qui le suivent, *hmqF* et *hmqG* sont quant à eux bien transcrits.

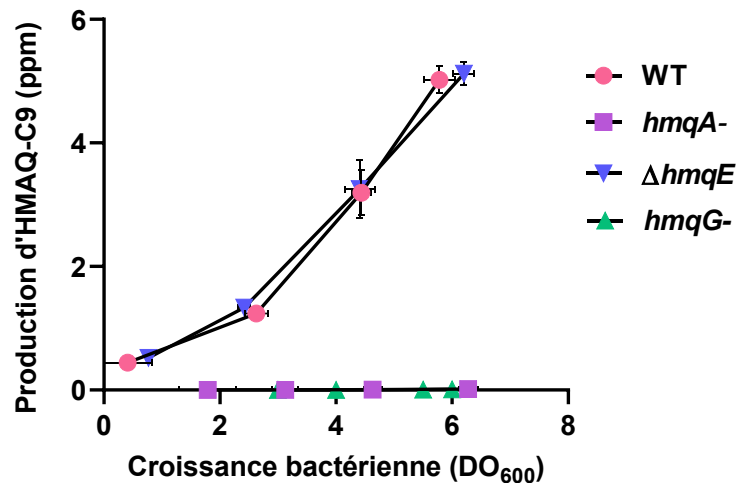


Figure 4.12 : Production d'HMAQ-C9:2' chez la souche sauvage et les mutants *hmqA*-, *hmqG*- et $\Delta hmqE$ de *B. thailandensis* E264.

La production d'HMAQ-C9:2' a été quantifiée par CL/SM à différents moments durant la croissance des différentes souches. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques.

4.4.2 Activation de l'opéron *hmqABCDEFG*

Puisque la protéine HmqE ne semble pas nécessaire pour la production d'HMAQ, son implication dans la régulation de l'opéron *hmqABCDEFG* a été étudiée afin de vérifier si la protéine n'avait pas plutôt une fonction régulatrice. Pour y arriver, le rapporteur *hmqA-lux* a été utilisé. Ce dernier permet de quantifier les niveaux de transcription de l'opéron via la quantification de l'activité luciférase. La souche sauvage E264, ainsi que le mutant *-hmqA* ont été utilisés comme témoins.

Le rapporteur révèle une surexpression de l'opéron *hmqABCDEFG* chez les mutants $\Delta hmqE$ et *hmqA*- en comparaison à la souche sauvage (Fig. 4.13). Ceci indique que la protéine HmqE pourrait être impliquée dans la répression de l'opéron *hmqABCDEFG*. Ce résultat est similaire à

que ce que l'on retrouve dans la littérature concernant PqsE chez *P. aeruginosa*. En effet, un mutant *pqsE* surexprime l'opéron *pqsABCDE* (Rampioni *et al.*, 2010).

Il peut être étonnant de voir que la protéine HmqE n'est pas essentielle pour la production des métabolites de son opéron, mais semble plutôt être importante pour sa régulation. Cependant, c'est également ce que l'on observe pour la protéine PqsE de *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2004). Bien que la protéine PqsE ait une fonction de thioestérase qui agit au niveau de la synthèse des HAQ, il semble que d'autres thioestérases présentent chez *P. aeruginosa* pourraient assumer cette fonction en absence de PqsE (Drees & Fetzner, 2015). Il est possible qu'un phénomène similaire se produisent au sein de l'opéron *hmqABCDEFG* de *B. thailandensis*. Il serait donc possible que d'autres enzymes puissent remplacer la fonction de HmqE lorsque cette dernière n'est pas présente.

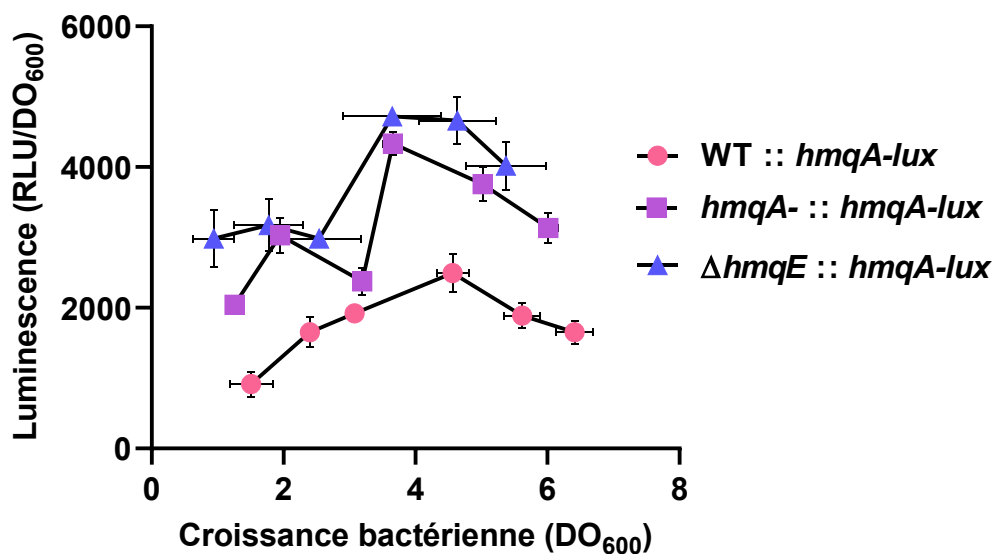


Figure 4.13 : Expression de l'opéron *hmqABCDEFG* chez la souche sauvage et les mutants *hmqA-* et Δ *hmqE* de *B. thailandensis* E264.

L'activité luciférase du rapporteur transcriptionnel *hmqA-lux* a été observée à différents moments durant la croissance des différentes souches. La luminescence est exprimée en unité relative de lumière en fonction de la densité optique (RLU/DO₆₀₀). Les barres d'erreurs représentent l'écart type de trois répliques.

4.4.3 Observation de la morphologie des colonies sur milieu Ashdown

Afin de caractériser le mutant Δ *hmqE*, l'observation de la morphologie des colonies qu'il forme a d'abord été vérifiée. Le mutant *hmqA-* du labo Déziel forme des colonies beaucoup plus lisses que celle de sa souche sauvage E264. Le labo Déziel a également montré que ce phénotype

n'est pas complétement par l'ajout d'HMAQ (Le Guillouzer, 2018). La disponibilité de ce nouveau mutant permet alors de vérifier si cette modification serait plutôt liée à la perte de la fonction de la protéine HmqE. En effet, considérant que le mutant *hmqA-* doit être polaire car il est le résultat de l'insertion d'un plasmide complet (pKNOCK-Cm) dans son cadre de lecture (Vial *et al.*, 2008), il est possible que les phénotypes observés chez ce mutant soient également dûs à l'absence des autres gènes de l'opéron, comme *hmqE*. Puisque PqsE est impliqué dans le QS de *P. aeruginosa* (Groleau *et al.*, 2020; Letizia *et al.*, 2022), j'ai voulu vérifier si certains phénotypes du mutant $\Delta hmqE$ pourraient être similaires à ceux d'autres mutants QS. La morphologie des colonies sur milieu Ashdown de notre mutant $\Delta hmqE$ a donc été comparée à la souche sauvage, et aux mutants *hmqA-*, *hmqG-* $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$.

La figure 4.14 illustre que la morphologie de colonie des divers mutants est différente de celle de la souche sauvage. La colonie du mutant $\Delta hmqE$ est ronde et ne forme pas d'excroissances comme la souche sauvage, sa texture est également différente. La taille des colonies des mutants *hmqA-* et $\Delta hmqE$ est similaire, mais la colonie du mutant *hmqA-* est beaucoup plus lisse. À l'inverse le mutant *hmqG-* forme une colonie plus grosse avec plus d'excroissances que la souche sauvage. La production d'HMAQ, la méthylation de ces derniers et HmqE semblent donc tous affecter la morphologie des colonies, mais de façon différente. Il est également possible de remarquer que la morphologie du mutant $\Delta hmqE$ est similaire à celle des mutants QS $\Delta btaR1$ et $\Delta btaR2$. Ils ont une taille, une forme et une texture similaires. HmqE pourrait donc influencer la morphologie coloniale de façon similaire à BtaR1 et BtaR2 ou passer par les mêmes mécanismes de régulation.

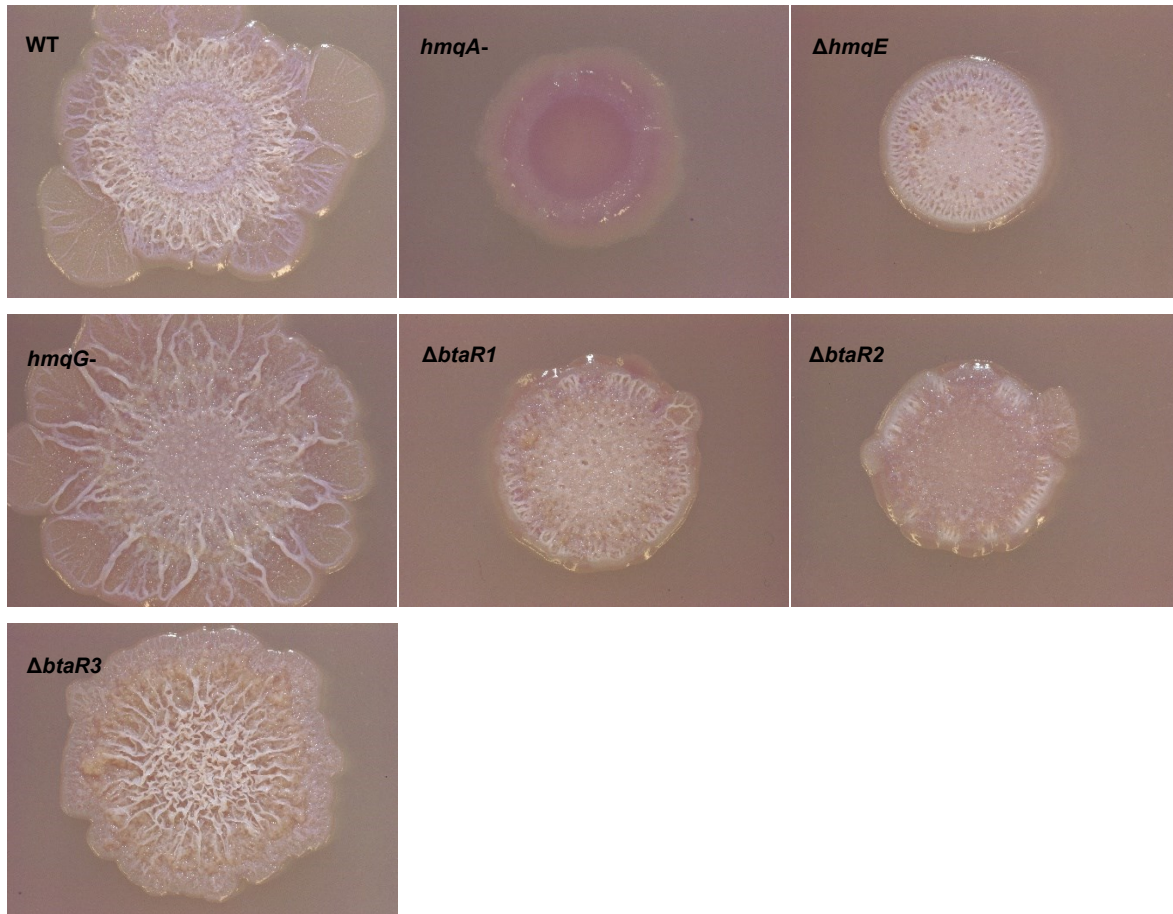


Figure 4.14 : Observation de la morphologie coloniale chez la souche sauvage, les mutants *quorum sensing* $\Delta btaR1$, $\Delta btaR2$ et $\Delta btaR3$, les mutants *hmqA*-, *hmqG*- et $\Delta hmqE$ de *B. thailandensis* E264.

Pour observer la morphologie des colonies, 5 μ L de culture bactérienne ajustée à une DO_{600} de 3,00 ont été déposés sur milieu Ashdown (Ashdown, 1979). Les colonies ont été observées après une incubation de 48 heures à 37°C, suivie d'une incubation de 72 heures à température pièce. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope.

4.4.4 Observation de la production de pellicule en culture statique

Une des caractéristiques observées dans le laboratoire Déziel qui semble nécessiter la production d'HMAQ est la formation d'un biofilm de surface (pellicule). On retrouve la pellicule à la surface d'une culture liquide statique. Il avait été émis comme hypothèse que les HMAQ sont nécessaires pour la formation de pellicule, puisqu'un mutant *hmqA*- ne produit aucune pellicule, alors qu'un mutant *hmqA*- auquel on ajoute des HMAQ peut se remettre à produire une pellicule (Le Guillouzer, 2018). J'ai voulu vérifier cette hypothèse en observant si HmqE est important dans la formation de pellicule.

Tel qu'on peut le voir à la figure 4.15, le mutant $\Delta hmqE$ produit une pellicule de façon similaire à la souche sauvage. HmqE ne semble donc pas impliquée dans la formation de pellicule.

Cependant, il semble que les autres gènes de l'opéron soient importants pour la production de la pellicule. En effet, on observe chez le mutant *hmqA*- aucune production de pellicule, comme prévu. La production d'HMAQ elle-même semble donc être un facteur important dans la formation de pellicule. Cependant, la méthylation de ces derniers ne semble pas nécessaire, puisqu'on observe quand même la formation de la pellicule par le mutant *hmqG*-, bien qu'elle semble plus lisse que celle de la souche sauvage.

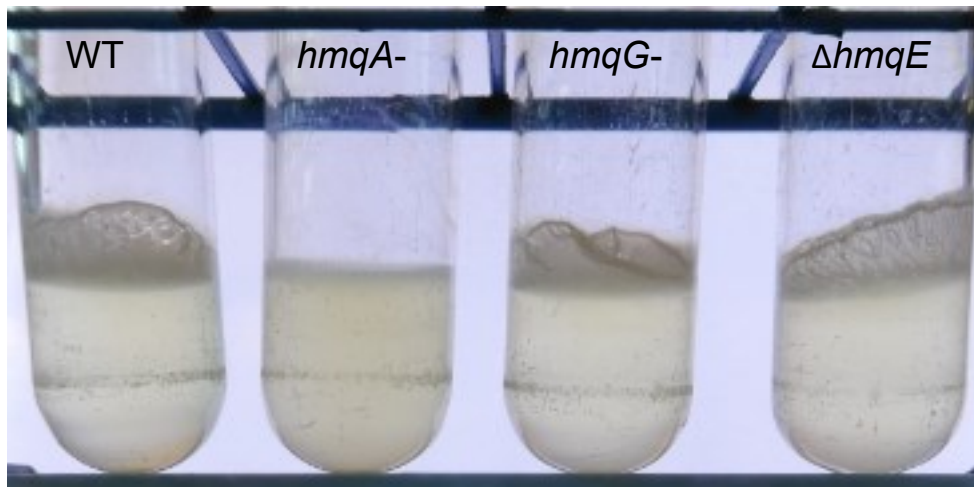


Figure 4.15 : Observation de la formation de pellicule chez la souche sauvage, les mutants *hmqA*-, *hmqG*- et Δ *hmqE* de *B. thailandensis* E264.

La formation de pellicule chez les différentes souches est observée après avoir dilué des cultures à une DO_{600} de 0,05 et laissé croître de façon statique pendant 24 heures à 37°C.

4.4.5 Motilités de type *swarming* et *swimming*

Une autre des caractéristiques observées chez le mutant *hmqA*- est un changement dans la motilité de la bactérie (Le Guillouzer, 2018). Afin de vérifier si cette modification de la motilité est causée par le manque de production d'HMAQ ou par l'absence de transcription de *hmqE* des expériences de motilité ont été réalisées.

L'essai de motilité de type *swarming* montre que le patron de déplacement de la colonie est différent entre la souche sauvage et les mutants *hmqA*- et Δ *hmqE* (Fig. 4.16). Les HMAQ, ainsi que HmqE semblent influencer la motilité de type *swarming*. En effet, on peut remarquer une grande augmentation de la taille de la colonie chez le mutant Δ *hmqE*.

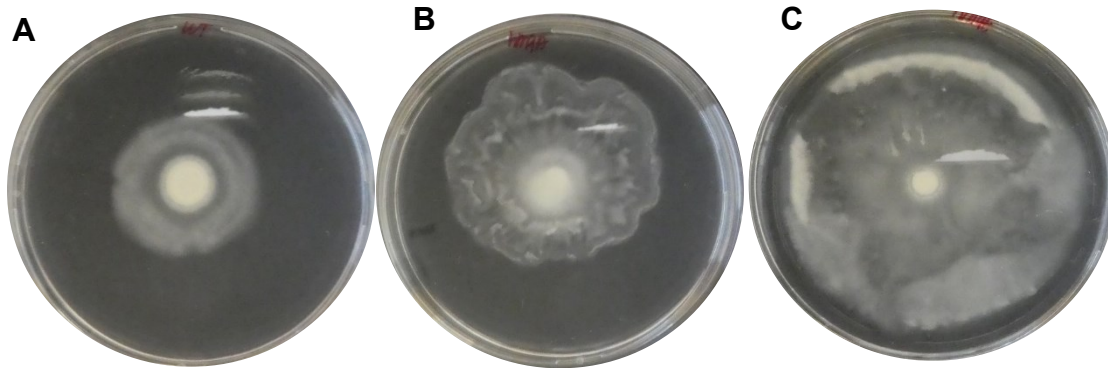


Figure 4.16 : Observation de la motilité de type *swarming* des colonies de la souche sauvage, des mutants *hmqA*- et Δ *hmqE* de *B. thailandensis* E264.

La motilité de type *swarming* est observé chez (A), la souche sauvage, (B) le mutant *hmqA*- et (C) le mutant Δ *hmqE* après une incubation des colonies à 30°C pendant 24h sur milieu NB, 4 % glycérol et 0,5% d'agar.

On voit que la motilité de type *swimming* est également augmentée chez le mutant Δ *hmqE* (Fig. 4.17). Cela semble donc indiquer que HmqE pourrait participer à l'inhibition de ce type de motilité. On peut observer chez le mutant *hmqA*- une diminution de la mobilité de type *swimming*. Les HMAQ semblent donc également importants dans la motilité de cette bactérie.

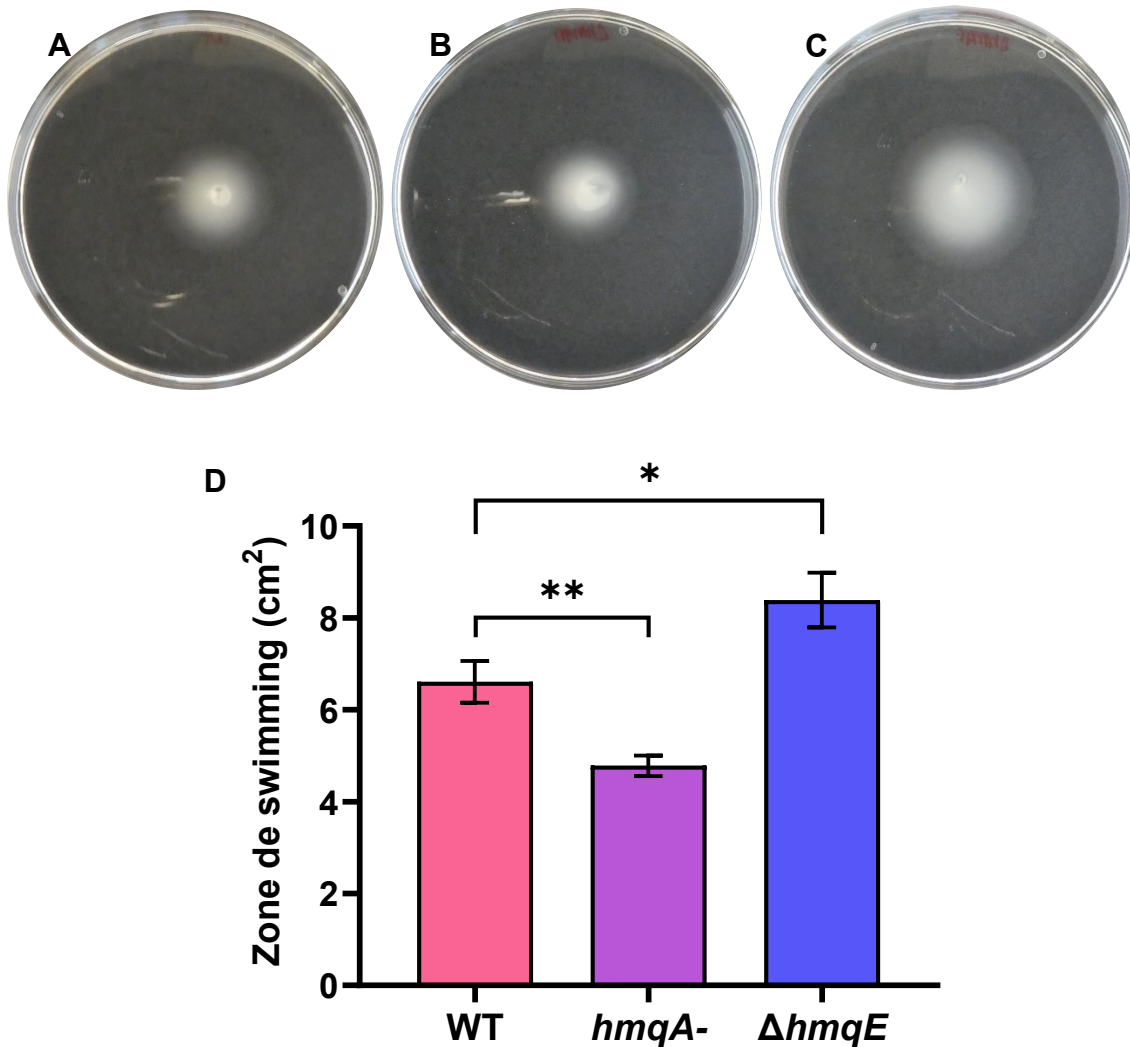


Figure 4.17 : Observation de la motilité de type swimming des colonies de la souche sauvage, des mutants *hmqA*- et Δ *hmqE* de *B. thailandensis* E264.

La motilité de type swimming est observé chez (A) la souche sauvage, (B) le mutant *hmqA*- et (C) le mutant Δ *hmqE* après une incubation à 30°C pendant 24h à l'intérieur du milieu LB 0,25% d'agar. Calcul de l'aire de déplacement des colonies (D). Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Il semble donc qu'en général la protéine HmqE soit importante pour la motilité de la bactérie. HmqE inhiberait les motilités de type *swarming* et *swimming*. Il est possible d'observer que les HMAQ sont également importants pour la motilité de la bactérie. En effet, lorsque l'opéron *hmqABCDEFG* n'est pas fonctionnel, on remarque un changement dans le patron de *swarming* ainsi qu'une réduction de la motilité de type *swimming*. Il est tout d'abord surprenant d'observer un phénotype distinct chez les deux mutants. Bien que HmqE soit inactif chez le mutant *hmqA*, on remarque que lorsque tout l'opéron est inactif, qu'il n'y a donc pas de production d'HMAQ, on observe une diminution du déplacement des colonies. Ce qui impliquerait que l'opéron

hmqABCDEFG serait impliqué dans la motilité des colonies. Cependant, lorsque seulement la protéine HmqE est inactive, on observe un sur-déplacement de la colonie, ce qui impliquerait que HmqE aurait un rôle dans l'inhibition de la motilité de la colonie.

Chez *P. aeruginosa*, la protéine PqsE influence également la motilité (Rampioni *et al.*, 2010). Dans les conditions de l'étude de Rampioni *et al.* 2010, on observe chez un mutant *pqsE* une abolition de la motilité de type *swarming*. Cependant, il est possible d'observer un regain de motilité de type *swarming* chez un double mutant *pqsA pqsE*. En effet, le produit de l'opéron, PQS, pourrait se lier au petit ARN *rsmZ* qui pourrait à son tour affecter la fonction de la protéine RsmA (Righetti, 2011). Cette protéine est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de divers gènes, dont plusieurs associés à la motilité et la virulence (Pessi *et al.*, 2001). Il serait intéressant de vérifier si les HMAQ pourraient avoir une fonction similaire chez *B. thailandensis*.

En ce qui concerne PqsE, l'abolition de la motilité de type *swarming* semble être causée par son interaction avec RhIR. Il serait donc possible que les phénotypes contradictoires observés chez le mutant $\Delta hmqE$ et le mutant *hmqA*- soit causé par une implication dans la régulation de la mobilité par la protéine HmqE et les HMAQ, mais de façon différente.

4.4.6 Étude de l'implication de HmqE dans la virulence

Puisque la protéine PqsE est requise pour la pleine virulence de *P. aeruginosa* (Borgert *et al.*, 2022), j'ai voulu vérifier si la protéine HmqE de *B. thailandensis* l'est également. Par la même occasion, il était possible de vérifier si l'inhibition de la virulence observée chez le mutant *hmqA*- provient de l'absence d'HMAQ, ou l'absence de la transcription du gène *hmqE* (Le Guillouzer, 2018). Ces questions ont été testées en effectuant une expérience d'infection de la mouche à fruit *D. melanogaster* par la méthode décrite par Pilátová & Dionne, 2012.

Le test statistique de Mantel-cox révèle une différence significative entre les mutants et la souche sauvage ($p < 0,001$) (Fig. 4.18), alors que la différence entre les mutants *hmqA*- et $\Delta hmqE$ est quant à elle non significative. Cependant, il est possible d'observer que la cinétique de mortalité est quant à elle différente. En effet, il est possible d'observer que pour le mutant *hmqA*-, la mortalité semble arriver plus rapidement que pour le mutant $\Delta hmqE$, mais la survie de la population totale semble moins longue pour le mutant $\Delta hmqE$. Ces résultats suggèrent que les HMAQ ainsi que HmqE seraient impliqués dans la virulence. D'autres expériences seront nécessaires afin de valider si les deux mutants sont différents ou non, et afin de mieux comprendre le mécanisme d'action.

Il faut noter que la protéine PqsE de *P. aeruginosa* joue également un rôle dans la virulence (Borgert *et al.*, 2022). En effet, dans un mutant *pqsE* on observe un défaut de production de pyocyanine, un facteur de virulence important chez *P. aeruginosa* (Mukherjee *et al.*, 2018). La protéine agit à titre de chaperonne en se liant au régulateur transcriptionnel RhIR qui à son tour ira modifier la transcription de divers facteurs de virulence, tel que les gènes responsables de la production de pyocyanine (Borgert *et al.*, 2022; Groleau *et al.*, 2020). D'autres expériences seront nécessaires afin de vérifier si HmqE pourrait avoir un rôle similaire avec un des régulateurs transcriptionnels du QS chez *B. thailandensis*.

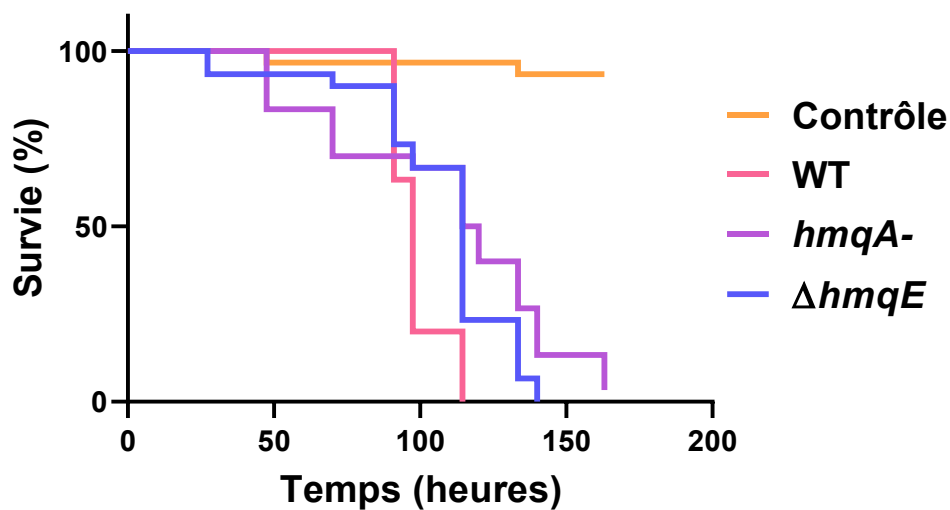


Figure 4.18 : Virulence de la souche sauvage, des mutants *hmqA-* et Δ *hmqE* de *B. thailandensis* E264 envers *Drosophila melanogaster*.

4.4.7 Étude de l'implication de HmqE dans la production de bactoboline

Chez *P. aeruginosa*, PqsE agit comme modulateur de l'activité d'un régulateur de type LuxR nommé RhIR (Groleau *et al.*, 2020). Afin de vérifier si le QS est également sous le contrôle de HmqE, l'observation de la production de l'antibiotique nommé bactoboline a été réalisée. La production de bactoboline est principalement régulée par le système QS-2 chez *B. thailandensis* (Seyedsayamdost *et al.*, 2010). On peut détecter la production de cet antibiotique par son activité envers *Bacillus subtilis* (Duerkop *et al.*, 2009).

Tel qu'attendu, puisque le QS-2 est responsable de la régulation de la production de bactoboline, il n'y avait aucune zone d'inhibition pour le mutant Δ *btaR2* (Fig. 4.19). Cependant, une augmentation significative de la production de bactoboline a été observée chez le mutant Δ *hmqE*

en comparaison à la souche sauvage, alors que le mutant *hmqA*- n'affecte pas la production de bactoboline. Cependant, selon une RT-qPCR réalisée dans le laboratoire, le gène *hmqE* n'est pas transcrit dans le mutant *hmqA*- (Le Guillouzer, 2018), ce qui semble incompatible avec ce résultat. Seulement, ce résultat pourrait être expliqué par une fonction activatrice des HMAQ, par exemple via un effet post-transcriptionnel, comme observé pour les HAQ (Rampioni *et al.*, 2010). Si la protéine HmqE et les HMAQ ont une fonction inverse, il serait possible d'observer une production similaire à la souche sauvage lorsque tout l'opéron *hmqABCDEFG* est inactif. En ce qui concerne HmqE, ce dernier semble inhiber la production de bactoboline. Alors que la fonction de chaperonne de PqsE est importante pour la régulation des gènes cibles du régulateur transcriptionnel RhIR, ici HmqE semble plutôt inhiber la fonction du régulateur transcriptionnel BtaR2. Une hypothèse serait que HmqE pourrait plutôt nuire à la stabilité de BtaR2, ou de sa liaison avec son ligand comme le 3OHC₁₀-HSL. Il serait également possible que HmqE ait une activité de chaperonne pour un inhibiteur de BtaR2, comme RsaM2. D'autres expériences seront nécessaires pour tester ces hypothèses.

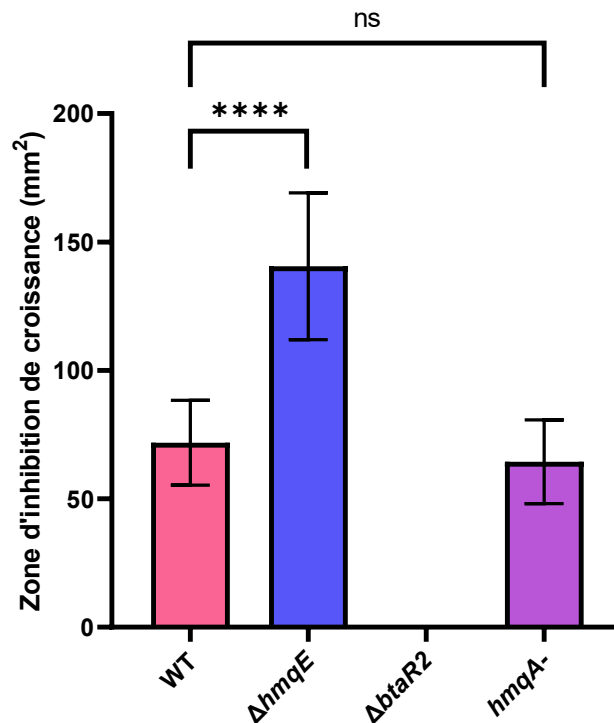


Figure 4.19 : Zone d'inhibition de croissance de *Bacillus subtilis* liés à la production de bactoboline chez la souche sauvage et les mutants *hmqA*-, *ΔbtaR2* et *ΔhmqE* de *B. thailandensis* E264.

Représentation de la production de bactoboline par l'observation de zone d'inhibition de croissance de *B. subtilis* autour de disques imbibés de surnageant filtré après une incubation à 37°C pendant 24h sur milieu LB agar. Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques. Ns, non significatif ; ****, $p < 0,0001$.

4.4.8 Production des autoinducteurs acyl-homosérines lactones

Afin de découvrir si HmqE est impliquée dans le QS de la bactérie, comme PqsE l'est chez *P. aeruginosa*, la production des AHL majoritaires chez la bactérie, ainsi que l'activation des synthèses par lesquels ils sont produits ont été quantifiés. La quantité d'AHL produite à différents moments de la croissance a été quantifiée par CL/SM. Pour ce qui est de l'activation des synthèses, les rapporteurs *bta1-lux*, *bta2-lux* et *bta3-lux* ont été insérés dans notre mutant $\Delta hmqE$ et l'activité de la luciférase a été quantifiée à différents moments de la croissance.

Les analyses démontrent une surproduction de 3OH-C₁₀-HSL chez le mutant $\Delta hmqE$ (Fig. 4.20B). En accord avec ce résultat, il est également possible d'observer, une surexpression du gène *bta2*, qui code pour la synthase majoritairement responsable de la biosynthèse du 3OH-C₁₀-HSL (Fig. 4.20E). HmqE semble donc inhiber l'expression de *bta2*, et donc sa production de 3OH-C₁₀-HSL. Cela semble en accord avec les résultats précédents qui démontraient une inhibition de la production de bactoboline, qui est contrôlée par le système BtaR2/BtaI2. Comme expliqué précédemment, contrairement à PqsE, HmqE pourrait plutôt nuire à la stabilité de BtaR2, ou de sa liaison avec le 3OHC₁₀-HSL. Il serait également possible que HmqE ait une activité de chaperonne pour un inhibiteur de BtaR2, comme RsaM2.

Ces résultats montrent également aucune différence significative chez le mutant *hmqA-*, dans lequel HmqE est également inactif, selon les résultats de l'étude RT-qPCR réalisée par Le Guillouzer. Ce qui pointe également vers une fonction contraire chez les HMAQ, possiblement similaire à celle des HAQ, soit en agissant sur de petits ARN qui influencent la régulation post-transcriptionnelle.

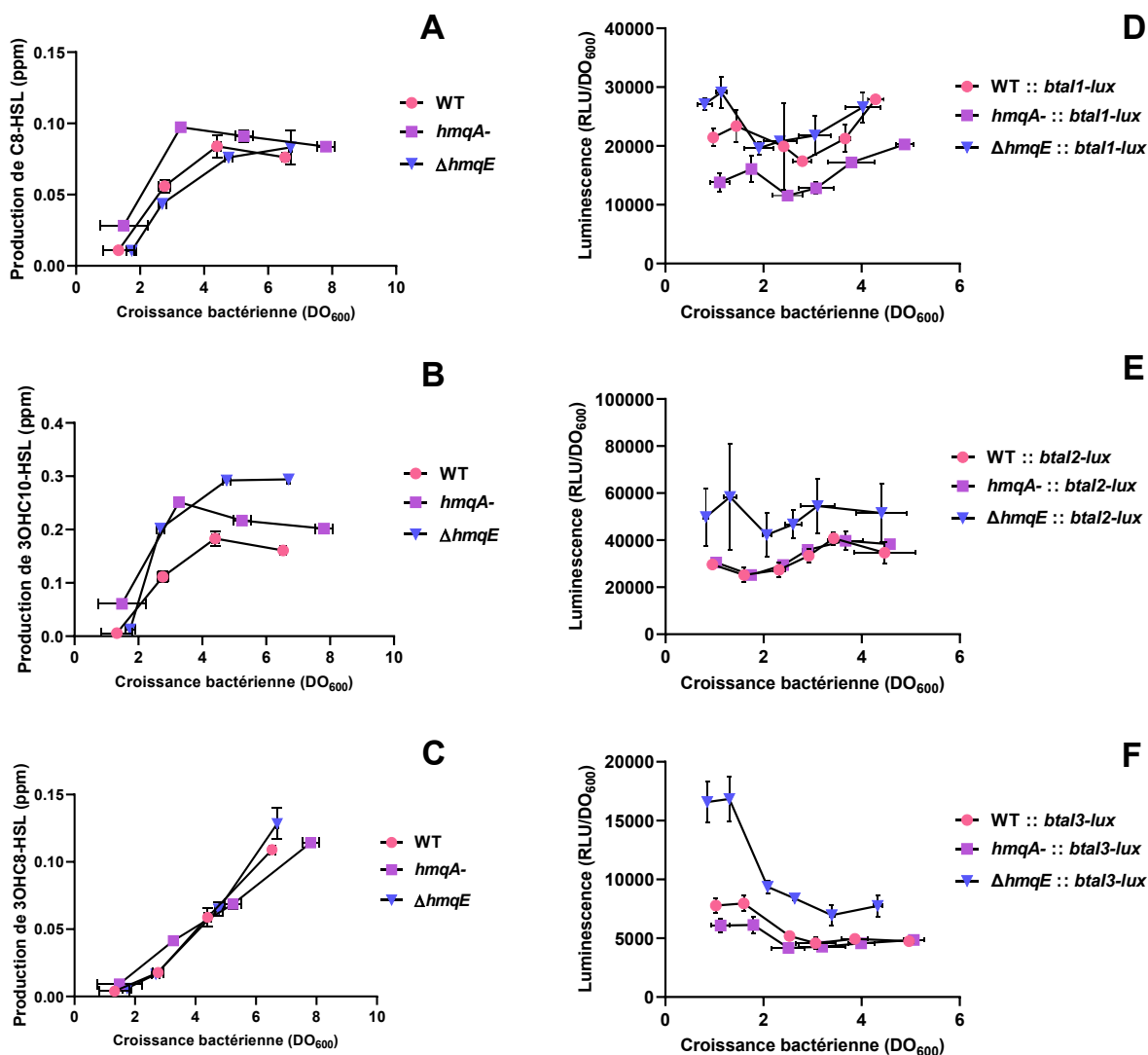


Figure 4.20 : Biosynthèse des AHL et expression des différentes synthases du QS chez la souche sauvage et les mutants *hmqA-* et Δ *hmqE* de *B. thailandensis* E264.

Les productions de (A) C₈-HSL, (B) 3OHC₁₀-HSL et (C) 3OHC₈-HSL ont été quantifiées par CL/SM à différents moments durant la croissance des différentes souches. L'activité luciférase des rapporteurs transcriptionnel *bta1-lux* (D), *bta2-lux* (E) and *bta3-lux* (F) ont été observée différents moments durant la croissance des différentes souches. La luminescence est exprimée en unité relative de lumière en fonction de la densité optique (RLU/DO₆₀₀). Les barres d'erreurs représentent l'écart type standard de trois répliques.

5 CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet était d'identifier la fonction du régulateur transcriptionnel ScmR, ainsi que la fonction de la protéine HmqE.

Mon premier objectif était de découvrir quel serait le ligand de ScmR. Pour y arriver, le transcriptome de *B. thailandensis* E264, préalablement déterminé dans le laboratoire (Le Guillouzer, 2018) a été étudié pour sélectionner 75 mutants (présents dans la banque de mutants du laboratoire), dont l'expression du gène muté est affectée chez le mutant *scmR*. Par la suite, les produits d'un opéron fortement activé par ScmR (*hmqABCDEFG*), les HMAQ, ont été quantifiés chez les mutants sélectionnés. Cependant, cette expérience contenait certaines limitations. Bien que la banque de mutants de notre laboratoire soit grande, elle n'est pas complète. Il y avait donc la possibilité de passer à côté de certaines cibles qui auraient pu être intéressantes, mais dont nous ne possédions pas les mutants, tel que des gènes codants pour des enzymes produisant des dérivés du métabolisme des purines. Il est possible que la souche mutante, chez laquelle le ligand est absent, ne se retrouvait pas dans la banque du laboratoire. Il serait possible de produire ou d'obtenir d'autres souches provenant de banques de mutants afin d'augmenter nos chances de trouver le ligand. De plus, seulement des gènes codants pour des enzymes produisant des molécules ou métabolites dont la transcription était modulée dans l'étude transcriptomique préalablement réalisée dans notre laboratoire ont été sélectionnées (Le Guillouzer, 2018). Il aurait été possible d'élargir notre recherche en sélectionnant d'autres gènes qui n'étaient pas nécessairement modulés dans l'étude transcriptomique. Puisque cette étude s'est faite à un temps et dans des conditions précises, il est possible qu'une différence significative de transcription n'ait pas été observée pour le ligand dans ces conditions.

Cependant, la piste selon laquelle un dérivé de purine pourrait être le ligand de ScmR est intéressante. Cette avenue n'avait pas été étudiée lors de notre criblage, puisque nous n'avons pas les mutants correspondants au laboratoire. Cependant, il serait intéressant de se les procurer afin de les caractériser et de réaliser plus de tests *in vivo*. En effet, puisque l'utilisation de l'allopurinol n'était pas optimale pour observer l'effet d'une inhibition de production de xanthine, la réalisation d'un mutant des gènes BTH_I1408 et BTH_I1409 (*xdhA* et *xdhB*) qui codent pour la xanthine oxydase serait une meilleure façon d'observer son implication dans la production d'HMAQ. Il serait possible de caractériser ces mutants et vérifier s'ils présentent des phénotypes similaires au mutant *scmR*⁻, tel qu'une inhibition de la production d'HMAQ. Il faudrait cependant faire attention à vérifier si la xanthine est essentielle au métabolisme des purines de la bactérie.

Il serait important de vérifier si la croissance cellulaire est affectée et au besoin compléter le milieu de croissance avec de la xanthine ou de la guanine. Si la xanthine oxydase ne semble pas être une cible intéressante, il pourrait également être intéressant de réaliser des mutants pour les gènes participants à la synthèse de la xanthine comme BTH_I1610 (guanine deaminase), puis participant à la synthèse de l'hypoxanthine comme BTH_I1612 (adenosine deaminase). Il pourrait être intéressant d'observer la production d'HMAQ chez ses mutants ou d'autres phénotypes modulée par ScmR. Il serait également intéressant de purifier la protéine ScmR et de réaliser des tests d'affinité entre la protéine et la xanthine ou l'hypoxanthine.

Mon second objectif était de déterminer quelles sont les cibles directes de ScmR. Pour y arriver, un ChIP-Seq de la protéine ScmR a été réalisé. Tout d'abord, différents plasmides navettes ont été construits afin d'ajouter une étiquette de polyhistidine à la protéine ScmR. L'étiquette a été ajoutée en N-terminal, en C-terminal, puis en N-terminal avec la région promotrice du gène pour obtenir la meilleure expression possible. La protéine avec son étiquette a par la suite été transférée dans un vecteur d'expression afin de l'exprimer chez *B. thailandensis*. Bien que la fonction de la protéine semble être affectée par l'ajout de l'étiquette, la meilleure construction a été sélectionnée, soit celle avec l'ajout de l'étiquette en N-terminal, avec la région promotrice de ScmR.

Une expérience de type ChIP-Seq a par la suite été réalisée. Malgré l'optimisation de plusieurs paramètres, notre expérience n'était pas optimale. En effet, les quantités d'ADN obtenues étaient très faibles et l'utilisation des témoins négatifs pour diminuer le bruit de fond a donc été impossible lors de l'analyse. À la suite de l'analyse des résultats, plusieurs cibles ont pu être identifiées. La plus intéressante semble celle du gène BTH_I2686 (*hns*) qui code pour une protéine de la famille des histones H-NS. Puisqu'elle permet la modification de la transcription de plusieurs gènes, cela pourrait expliquer pourquoi ScmR est impliqué dans la modulation de la transcription de plusieurs gènes. Il serait intéressant de caractériser un mutant BTH_I2686 afin de vérifier s'il comporte des phénotypes similaires à celui d'un mutant *scmR*-.

Même si quelques cibles possibles ont été identifiées, il serait préférable de répéter l'expérience afin d'avoir des témoins négatifs qui permettraient de réduire la découverte de faux positifs. Pour ce faire, je proposerais d'abord de faire plus d'expériences en parallèle, afin de pouvoir combiner l'ADN avant d'envoyer séquencer afin d'avoir une plus grande concentration. En effet, même si deux expériences ont été combinées, les concentrations d'ADN étaient très faibles, à la limite des capacités de séquençage pour obtenir la couverture désirée. De plus, puisque notre construction ne permet pas une bonne complémentarité, peut-être que l'ajout de l'étiquette de polyhistidine

pourrait nuire à sa production. Il aurait également été possible d'essayer d'utiliser d'autres types d'étiquette afin d'obtenir une meilleure complémentation de la mutation. La purification de la protéine et son ajout à une concentration définie pourraient aider à obtenir une meilleure quantité d'ADN liés. Il serait alors possible de réaliser un ChIP-Seq in vitro. Bien que cette méthode représente moins bien la réalité de ce qui se passe normalement au sein de la bactérie, elle pourrait être envisagée si la bactérie a de la difficulté à produire la protéine avec son étiquette. Il serait également possible de tester si l'insertion chromosomique d'une étiquette de polyhistidine au gène *scmR* affecte la fonction de la protéine.

Mon troisième objectif était de vérifier si la fonction de la protéine HmqE de *B. thailandensis* est similaire à celle de PqsE chez *P. aeruginosa*. Un mutant $\Delta hmqE$ non polaire à tout d'abord été réalisé. Ce dernier a permis d'en apprendre plus sur sa fonction au sein de l'opéron *hmqABCDEFG*, ainsi que son rôle plus général chez *B. thailandensis*. Il a été possible d'observer que certains phénotypes de morphologie, ainsi que de mobilité semblent être affectés par cette protéine, suggérant que son rôle s'étend au-delà de celui au sein de son opéron. À l'aide d'un modèle d'infection réalisé à l'aide de *D. melanogaster* il a été soulevé que HmqE semble avoir un rôle dans la virulence, tout comme la protéine PqsE. Il serait intéressant d'observer plus particulièrement par quel mécanisme HmqE semble influencer la virulence de la bactérie. HmqE semble également impliqué dans l'inhibition de la production d'antibiotiques, tel que la bactoboline. Il a également été souligné que cette protéine n'est pas nécessaire à la biosynthèse des HMAQ, soit le produit de son opéron, mais qu'elle semble plutôt avoir un rôle dans la régulation de sa production, tout comme la protéine PqsE. La protéine HmqE semble inhiber la production de 3OHC₁₀-HSL, ainsi que la transcription de la synthase *BtaI2*, responsable de sa production. Ce qui suggère que cette protéine semble avoir un rôle au sein du QS de cette bactérie, plus précisément chez le système BtaR2/BtaI2. Cependant, le mécanisme par lequel HmqE y arrive est toujours inconnu. En considérant que sa fonction est similaire à celle de PqsE, il serait possible que HmqE ait également un rôle de chaperonne envers un inhibiteur du système BtaR2/BtaI2, tel que RsaM2. Il serait également possible que HmqE affecte directement la stabilité de la protéine BtaR2, ou bien sa liaison avec le 3OHC₁₀-HSL. Il pourrait être intéressant de réaliser une étude transcriptomique chez le mutant $\Delta hmqE$ afin d'identifier ces cibles.

De plus, ces expériences ont permis d'identifier divers phénotypes différents entre un mutant *hmqA*- et $\Delta hmqE$. Ces résultats semblent indiquer que les HMAQ sont également importants dans divers systèmes et qu'ils pourraient avoir un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle comme les HAQ chez *P. aeruginosa*. Les HMAQ et la protéine HmqE pourraient avoir des

fonctions activatrices et inhibitrices sur de mêmes gènes, ce qui pourrait expliquer pourquoi certains phénotypes semblent contradictoires. Afin de mieux comprendre la fonction des HMAQ, il serait intéressant de réaliser un mutant $\Delta hmqA$ non polaire. Puisque la protéine HmqA est nécessaire à la biosynthèse des HMAQ, cela permettrait de voir directement l'effet des HMAQ, lorsque *hmqE* est transcrit.

Somme toute, plusieurs similitudes entre la fonction de HmqE et celle de PqsE ont été observées. Les deux protéines ne semblent pas être nécessaires pour la synthèse du produit de leur opéron, mais semblent plutôt être impliquées dans leur régulation. Elles semblent également être impliquées dans la virulence, puis dans le QS. Cependant, la fonction d'HmqE au sein du QS semble inhibitrice et non activatrice comme celle de PqsE. D'autres expériences seront nécessaires afin de comprendre le mécanisme d'action utilisé par HmqE pour moduler le QS.

Les travaux de ce projet de maîtrise ont pu amener plusieurs pistes quant à la précision de la fonction des protéines ScmR et HmqE. Cette étude souligne l'intérêt de réaliser plus d'études afin de confirmer la possibilité qu'un dérivé de purine agisse comme co-activateur de ScmR, par exemple via la caractérisation de mutants ou de tests d'affinité. Elle souligne également que le gène BTH_I2686, codant pour une protéine de la famille des histones, pourrait être une cible directe de ScmR. Il serait intéressant de réaliser une étude fonctionnelle de cette dernière afin de vérifier si elle pourrait être impliquée dans la régulation de plusieurs gènes similaires à ScmR. De plus, les travaux effectués sur la protéine HmqE confirment plusieurs similarités entre cette dernière et la protéine PqsE de *P. aeruginosa* et son rôle diversifié chez *B. thailandensis*. Il pourrait être intéressant de réaliser un mutant *hmqA* non polaire afin de confirmer les phénotypes associés aux HMAQ et ceux de HmqE. Il pourrait également être intéressant de réaliser une étude transcriptomique de la protéine HmqE afin de confirmer l'étendue de sa fonction chez *B. thailandensis*.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal A, Kahyaoglu C & Hansen DB (2012) Characterization of HmqF, a protein involved in the biosynthesis of unsaturated quinolones produced by *Burkholderia thailandensis*. *Biochemistry* 51(8):1648-1657.
- Antunes LC & Ferreira RB (2009) Intercellular communication in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 35(2):69-80.
- Ashdown LR (1979) An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology* 11(2):293-297.
- Barka EA, Belarbi A, Hachet C, Nowak J & Audran JC (2000) Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS microbiology letters* 186(1):91-95.
- Barrett AR, Kang Y, Inamasu KS, Son MS, Vukovich JM & Hoang TT (2008) Genetic tools for allelic replacement in *Burkholderia* species. *Applied and environmental microbiology* 74(14):4498-4508.
- Becher A & Schweizer HP (2000) Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *Biotechniques* 29(5):948-950, 952.
- Bertin P, Hommais F, Krin E, Soutourina O, Tendeng C, Derzelle S & Danchin A (2001) H-NS and H-NS-like proteins in Gram-negative bacteria and their multiple role in the regulation of bacterial metabolism. *Biochimie* 83(2):235-241.
- Biggins JB, Ternei MA & Brady SF (2012) Malleilactone, a polyketide synthase-derived virulence factor encoded by the cryptic secondary metabolome of *Burkholderia pseudomallei* group pathogens. *J Am Chem Soc* 134(32):13192-13195.
- Borgert SR, Henke S, Witzgall F, Schmelz S, Zur Lage S, Hotop SK, Stephen S, Lübken D, Krüger J, Gomez NO, van Ham M, Jänsch L, Kalesse M, Pich A, Brönstrup M, Häussler S & Blankenfeldt W (2022) Moonlighting chaperone activity of the enzyme PqsE contributes to RhlR-controlled virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 13(1):7402.
- Brett PJ, Deshazer D & Woods DE (1997) Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiology and infection* 118(2):137-148.
- Brett PJ, DeShazer D & Woods DE (1998) *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *International journal of systematic bacteriology* 48 Pt 1:317-320.
- Burkholder WH (1950) Sour skin, a bacterial rot. *Phytopathology* 40:115-117.
- Butt A, Halliday N, Williams P, Atkins HS, Bancroft GJ & Titball RW (2016) *Burkholderia pseudomallei* *kynB* plays a role in AQ production, biofilm formation, bacterial swarming and persistence. *Res Microbiol* 167(3):159-167.
- Carr G, Seyedsayamdost MR, Chandler JR, Greenberg EP & Clardy J (2011) Sources of diversity in bactobolin biosynthesis by *Burkholderia thailandensis* E264. *Organic letters* 13(12):3048-3051.
- Celis RT (1999) Repression and activation of arginine transport genes in *Escherichia coli* K 12 by the ArgP protein. *J Mol Biol* 294(5):1087-1095.

- Chandler JR, Duerkop BA, Hinz A, West TE, Herman JP, Churchill ME, Skerrett SJ & Greenberg EP (2009) Mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation. *Journal of bacteriology* 191(19):5901-5909.
- Chandler JR, Truong TT, Silva PM, Seyedsayamdost MR, Carr G, Radey M, Jacobs MA, Sims EH, Clardy J & Greenberg EP (2012) Bactobolin resistance is conferred by mutations in the L2 ribosomal protein. *mBio* 3(6).
- Chapalain A, Groleau M-C, Le Guillouzer S, Miomandre A, Vial L, Milot S & Déziel E (2017) Interplay between 4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinoline and N-Acyl-Homoserine Lactone Signaling in a *Burkholderia cepacia* Complex Clinical Strain. *Frontiers in Microbiology* 8(1021).
- Cheng AC & Currie BJ (2005) Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clinical microbiology reviews* 18(2):383-416.
- Choi K-H, Mima T, Casart Y, Rholi D, Kumar A, Beacham IR & Schweizer HP (2008) Genetic Tools for Select-Agent-Compliant Manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and environmental microbiology* 74(4):1064-1075.
- Choi KH, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff-Schweizer RR & Schweizer HP (2005) A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* 2(6):443-448.
- DeShazer D & Waag D (2005) Glanders: new insights into an old disease. *Biological Weapons Defense*, Luther E. Lindler FJL, George W. Korch (Édit.) Humana Press. p 209-237.
- Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lepine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G & Rahme LG (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhIRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Molecular microbiology* 55(4):998-1014.
- Déziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG & Rahme LG (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(5):1339-1344.
- Diggle SP, Cornelis P, Williams P & Camara M (2006a) 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *International journal of medical microbiology : IJMM* 296(2-3):83-91.
- Diggle SP, Lumjiaktase P, Dipilato F, Winzer K, Kunakorn M, Barrett DA, Chhabra SR, Camara M & Williams P (2006b) Functional genetic analysis reveals a 2-Alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chemistry & biology* 13(7):701-710.
- Drees Steffen L & Fetzner S (2015) PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* Acts as Pathway-Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Alkylquinolone Signaling Molecules. *Chemistry & biology* 22(5):611-618.
- Dubendorff JW & Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219(1):45-59.
- Duerkop BA, Varga J, Chandler JR, Peterson SB, Herman JP, Churchill ME, Parsek MR, Nierman WC & Greenberg EP (2009) Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of bacteriology* 191(12):3909-3918.

- Dumais J-P (2010) *Étude de la régulation de la production des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines chez Burkholderia ambifaria et B. thailandensis*. Mémoire (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique). 128 p
- Eberl L & Vandamme P (2016) Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Res* 5.
- Egland KA & Greenberg EP (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Molecular microbiology* 31(4):1197-1204.
- Estrada-De Los Santos P, Bustillos-Cristales R & Caballero-Mellado J (2001) *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and environmental microbiology* 67(6):2790-2798.
- Freese NH, Norris DC & Loraine AE (2016) Integrated genome browser: visual analytics platform for genomics. *Bioinformatics* 32(14):2089-2095.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176(2):269-275.
- Gallagher LA, Ramage E, Patrapuvich R, Weiss E, Brittnacher M & Manoil C (2013) Sequence-defined transposon mutant library of *Burkholderia thailandensis*. *mBio* 4(6):e00604-e00613.
- Godoy D, Randle G, Simpson AJ, Aanensen DM, Pitt TL, Kinoshita R & Spratt BG (2003) Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J Clin Microbiol* 41(5):2068-2079.
- Groleau M-C, Pereira TdO, Dekimpe V & Déziel E (2020) PqsE Is Essential for RhlR-Dependent Quorum Sensing Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSystems* 5(3):e00194-00120.
- Haraga A, West TE, Brittnacher MJ, Skerrett SJ & Miller SI (2008) *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and immunity* 76(11):5402-5411.
- Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM & Wallace JC (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(18):6602-6606.
- Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A & Schweizer HP (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43(1):59-72.
- Horton RE, Grant GD, Matthews B, Batzloff M, Owen SJ, Kyan S, Flegg CP, Clark AM, Ulett GC, Morrison N, Peak IR & Beacham IR (2013) Quorum sensing negatively regulates multinucleate cell formation during intracellular growth of *Burkholderia pseudomallei* in macrophage-like cells. *PLoS one* 8(5):e63394.
- Janesomboon S, Muangsombut V, Srinon V, Meethai C, Tharinjaroen CS, Amornchai P, Withatanung P, Chantratita N, Mayo M, Wuthiekanun V, Currie BJ, Stevens JM & Korbsrisate S (2021) Detection and differentiation of *Burkholderia* species with pathogenic potential in environmental soil samples. *PLoS one* 16(1):e0245175.
- Kaur C, Selvakumar G & Ganeshamurthy AN (2017) *Burkholderia* to *Paraburkholderia*: The Journey of a Plant-Beneficial-Environmental Bacterium. *Recent advances in Applied*

- Microbiology*, Shukla P (Édit.) Springer Singapore, Singapore 10.1007/978-981-10-5275-0_10. p 213-228.
- Klaus JR, Deay J, Neuenswander B, Hursh W, Gao Z, Bouddhara T, Williams TD, Douglas J, Monize K, Martins P, Majerczyk C, Seyedsayamdost MR, Peterson BR, Rivera M, Chandler JR & O'Toole G (2018) Malleilactone Is a *Burkholderia pseudomallei* Virulence Factor Regulated by Antibiotics and Quorum Sensing. *Journal of bacteriology* 200(14):e00008-00018.
- Klaus JR, Majerczyk C, Moon S, Eppler NA, Smith S, Tuma E, Groleau MC, Asfahl KL, Smalley NE, Hayden HS, Piochon M, Ball P, Dandekar AA, Gauthier C, Deziel E & Chandler JR (2020) *Burkholderia thailandensis* Methylated Hydroxyalkylquinolines: Biosynthesis and Antimicrobial Activity in Cocultures. *Applied and environmental microbiology* 86(24).
- Le Guillouzer S (2018) *Étude de la régulation des systèmes de communication intercellulaire chez la bactérie Burkholderia thailandensis*. (Institut National de la Recherche Scientifique).
- Le Guillouzer S, Groleau MC & Deziel E (2017) The Complex Quorum Sensing Circuitry of *Burkholderia thailandensis* Is Both Hierarchically and Homeostatically Organized. *mBio* 8(6).
- Le Guillouzer S, Groleau MC & Déziel E (2018) Two *rsaM* Homologues Encode Central Regulatory Elements Modulating Quorum Sensing in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of bacteriology* 200(14).
- Le Guillouzer S, Groleau MC, Mauffrey F & Deziel E (2020) ScmR, a Global Regulator of Gene Expression, Quorum Sensing, pH Homeostasis, and Virulence in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of bacteriology* 202(13).
- Leelarasamee A (2004) Recent development in melioidosis. *Curr Opin Infect Dis* 17(2):131-136.
- Lefebvre MD & Valvano MA (2002) Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and environmental microbiology* 68(12):5956-5964.
- Letizia M, Mellini M, Fortuna A, Visca P, Imperi F, Leoni L & Rampioni G (2022) PqsE Expands and Differentially Modulates the RhIR Quorum Sensing Regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology spectrum* 10(3):e0096122.
- Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, Chaowagul W, Day NP & Peacock SJ (2010) Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 82(6):1113-1117.
- Liu X & Cheng YQ (2014) Genome-guided discovery of diverse natural products from *Burkholderia* sp. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41(2):275-284.
- Lumjiaktase P, Diggle SP, Loprasert S, Tungpradabkul S, Daykin M, Camara M, Williams P & Kunakorn M (2006) Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 152(Pt 12):3651-3659.
- Machanick P & Bailey TL (2011) MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27(12):1696-1697.
- Maddocks SE & Oyston PCF (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology (Reading)* 154(Pt 12):3609-3623.
- Majerczyk CD, Brittnacher M, Jacobs M, Armour CD, Radey M, Schneider E, Phattarasokul S, Bunt R & Greenberg EP (2014a) Global analysis of the *Burkholderia thailandensis* quorum sensing-controlled regulon. *Journal of bacteriology* 196(7):1412-1424.

- Majerczyk CD, Brittnacher MJ, Jacobs MA, Armour CD, Radey MC, Bunt R, Hayden HS, Bydalek R & Greenberg EP (2014b) Cross-species comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei* quorum-sensing regulons. *Journal of bacteriology* 196(22):3862-3871.
- Majerczyk CD, Greenberg EP & Chandler JR (2013) Quorum Sensing in *Burkholderia*. In Vasil, M., Darwin, A. (ed), *Regulation of Bacterial Virulence*. ASM Press, Washington, DC. 10.1128/9781555818524.ch3:p 40-57.
- Majerczyk CD, Schneider E & Greenberg EP (2016) Quorum sensing control of Type VI secretion factors restricts the proliferation of quorum-sensing mutants. *eLife* 5.
- Mao D, Bushin LB, Moon K, Wu Y & Seyedsayamdost MR (2017) Discovery of *scmR* as a global regulator of secondary metabolism and virulence in *Burkholderia thailandensis* E264. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(14):E2920-E2928.
- Martinez S, Humery A, Groleau M-C & Déziel E (2020) Quorum Sensing Controls Both Rhamnolipid and Polyhydroxyalkanoate Production in *Burkholderia thailandensis* Through *ScmR* Regulation. *Front Bioeng Biotechnol* 8:1033-1033.
- Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D & Défago G (1998) Salicylic Acid Biosynthetic Genes Expressed in *Pseudomonas fluorescens* Strain P3 Improve the Induction of Systemic Resistance in Tobacco Against Tobacco Necrosis Virus. *Phytopathology* 88(7):678-684.
- Miotto-Vilanova L, Jacquard C, Courteaux B, Wortham L, Michel J, Clément C, Barka EA & Sanchez L (2016) *Burkholderia phytofirmans* PsJN Confers Grapevine Resistance against *Botrytis cinerea* via a Direct Antimicrobial Effect Combined with a Better Resource Mobilization. *Front Plant Sci* 7:1236.
- Molchanova EV & Ageeva NP (2015) Use of the phytopathogenic effect for studies of *Burkholderia* virulence. *Bull Exp Biol Med* 158(4):517-519.
- Mongkolrob R, Taweechaisupapong S & Tungpradabkul S (2015) Correlation between biofilm production, antibiotic susceptibility and exopolysaccharide composition in *Burkholderia pseudomallei* *bpsI*, *ppk*, and *rpoS* mutant strains. *Microbiology and immunology* 59(11):653-663.
- Montanera KN & Rhee HS (2020) High-Resolution Mapping of Protein-DNA Interactions in Mouse Stem Cell-Derived Neurons using Chromatin Immunoprecipitation-Exonuclease (ChIP-Exo). *J Vis Exp* 10.3791/61124(162).
- Mou S, Jenkins CC, Okaro U, Dhummakupt ES, Mach PM & DeShazer D (2021) The *Burkholderia pseudomallei* *hmqA-G* Locus Mediates Competitive Fitness against Environmental Gram-Positive Bacteria. *Microbiology spectrum* 9(1):e0010221.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B & Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411(6840):948-950.
- Mukherjee S, Moustafa DA, Stergioula V, Smith CD, Goldberg JB & Bassler BL (2018) The PqsE and RhlR proteins are an autoinducer synthase-receptor pair that control virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(40):E9411-E9418.
- Muraoka S, Okumura R, Ogawa N, Nonaka T, Miyashita K & Senda T (2003) Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit

- forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol* 328(3):555-566.
- Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, Davidsen TD, Deboy RT, Dimitrov G, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Khouri H, Kolonay JF, Madupu R, Mohammoud Y, Nelson WC, Radune D, Romero CM, Sarria S, Selengut J, Shamblin C, Sullivan SA, White O, Yu Y, Zafar N, Zhou L & Fraser CM (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(39):14246-14251.
- Parsek MR, Ye RW, Pun P & Chakrabarty AM (1994) Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. *catBC* promoter activation by CatR. *J Biol Chem* 269(15):11279-11284.
- Pérez-Rueda E & Collado-Vides J (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 28(8):1838-1847.
- Perreault AA & Venters BJ (2016) The ChIP-exo Method: Identifying Protein-DNA Interactions with Near Base Pair Precision. *JoVE* doi:10.3791/55016(118):e55016.
- Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Cámara M, 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.
- Pilátová M & Dionne MS (2012) *Burkholderia thailandensis* is virulent in *Drosophila melanogaster*. *PloS one* 7(11):e49745.
- Podnecky NL, Rhodes KA & Schweizer HP (2015) Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front Microbiol* 6:305.
- Rampioni G, Pustelny C, Fletcher MP, Wright VJ, Bruce M, Rumbaugh KP, Heeb S, Cámara 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):1659-1673.
- Righetti KM (2011) *Study of Rsm/Gac posttranscriptional regulation by quorum sensing, extracellular and intracellular signals in Pseudomonas aeruginosa*. (University of Nottingham).
- Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM & Hughes JM (2002) Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerging infectious diseases* 8(2):225-230.
- Sawana A, Adeolu M & Gupta RS (2014) Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front Genet* 5:429.
- Serandour AA, Brown GD, Cohen JD & Carroll JS (2013) Development of an Illumina-based ChIP-exonuclease method provides insight into FoxA1-DNA binding properties. *Genome Biology* 14(12):R147.
- Seyedsayamdost MR, Chandler JR, Blodgett JA, Lima PS, Duerkop BA, Oinuma K, Greenberg EP & Clardy J (2010) Quorum-sensing-regulated bacteriocin production by *Burkholderia thailandensis* E264. *Organic letters* 12(4):716-719.

- Simon R, Prierer U & Pühler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1(9):784-791.
- Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK & Venturi V (2012) Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microb Ecol* 63(2):249-266.
- Thapa SS, Al-Tohamy A & Grove A (2022) The Global Regulator MftR Controls Virulence and Siderophore Production in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of bacteriology* 204(11):e0023722.
- Tseng BS, Majerczyk CD, Passos da Silva D, Chandler JR, Greenberg EP & Parsek MR (2016) Quorum Sensing Influences *Burkholderia thailandensis* Biofilm Development and Matrix Production. *Journal of bacteriology* 198(19):2643-2650.
- Ulrich RL, Deshazer D, Brueggemann EE, Hines HB, Oyston PC & Jeddelloh JA (2004a) Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of medical microbiology* 53(Pt 11):1053-1064.
- Ulrich RL, Deshazer D, Hines HB & Jeddelloh JA (2004b) Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infection and immunity* 72(11):6589-6596.
- Ulrich RL, Hines HB, Parthasarathy N & Jeddelloh JA (2004c) Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. *Journal of bacteriology* 186(13):4350-4360.
- Valade E, Thibault FM, Gauthier YP, Palencia M, Popoff MY & Vidal DR (2004) The PmlI-PmlR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease. *Journal of bacteriology* 186(8):2288-2294.
- van Keulen G, Ridder AN, Dijkhuizen L & Meijer WG (2003) Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. *Journal of bacteriology* 185(4):1245-1252.
- Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM & Hardie KR (2005) Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LUXS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3(5):383-396.
- Vial L, Chapalain A, Groleau MC & Déziel E (2011) The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environ Microbiol* 13(1):1-12.
- Vial L, Groleau MC, Dekimpe V & Déziel E (2007) *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. *J Microbiol Biotechnol* 17(9):1407-1429.
- Vial L, Lepine F, Milot S, Groleau MC, Dekimpe V, Woods DE & Deziel E (2008) *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *Journal of bacteriology* 190(15):5339-5352.
- Whitlock GC, Estes DM & Torres AG (2007) Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS microbiology letters* 277(2):115-122.
- Wiersinga WJ, van der Poll T, White NJ, Day NP & Peacock SJ (2006) Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nature reviews. Microbiology* 4(4):272-282.

- Xiao G, Deziel E, He J, Lepine F, Lesic B, Castonguay MH, Milot S, Tampakaki AP, Stachel SE & Rahme LG (2006a) MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Molecular microbiology* 62(6):1689-1699.
- Xiao G, He J & Rahme LG (2006b) Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* 152(Pt 6):1679-1686.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T & Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and Transfer of Seven Species of the Genus *Pseudomonas* Homology Group II to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology* 36(12):1251-1275.
- Yu S, Jensen V, Seeliger J, Feldmann I, Weber S, Schleicher E, Häussler S & Blankenfeldt W (2009) Structure Elucidation and Preliminary Assessment of Hydrolase Activity of PqsE, the *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Response Protein. *Biochemistry* 48(43):10298-10307.
- Yu Y, Kim HS, Chua HH, Lin CH, Sim SH, Lin D, Derr A, Engels R, DeShazer D, Birren B, Nierman WC & Tan P (2006) Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis*. *BMC microbiology* 6:46.

7 ANNEXE I

Composition des tampons utilisés pour le ChIP-Seq

La composition des tampons est tiré du protocole de Perreault et al. (Perreault & Venters, 2016). Tous les tampons ont été filtré à l'aide d'un filtre 0,22µm, puis 1x de CPI (complete protease inhibitor stock) a été ajouté avant l'utilisation. Ils ont été conservés à 4°C.

Tampon de lyse 3

Produit	Concentration finale
1M Tris-HCl (8)	10mM
5M NaCl	100mM
0,25M EDTA	1mM
0,25M EGTA	0,5mM
10% Deoxycholate	0,10%
N-laurylsarcosine	0,5%
H ₂ O milli-Q	

« Blocking Buffer »

Produit	Concentration finale
10x PBS	1x
Bovine Serum Albumin	0,50%
H ₂ O milli-Q	

Tampon de lavage 1 « High Salt Washing Buffer »

Produit	Concentration finale
1M HEPES-KOH (7,5)	50mM
5M NaCl	500mM
0,25M EDTA (8)	1mM
10% Triton X-100	1%
10% Deoxycholate	0,1%
10% SDS	0,1%
H ₂ O milli-Q	

Tampon de lavage 2 « LiCl Washing Buffer »

Produit	Concentration finale
1M Tris-HCl (8)	20mM
0,25M EDTA (8)	1mM
1M LiCl	250mM
10% IGEPAL	0,5%
10% Deoxycholate	0,5%
H ₂ O milli-Q	

Tampon de lavage 3 « Tris-EDTA Buffer »

Produit	Concentration finale
1M Tris-HCl (8)	10mM
0,25M EDTA (8)	1mM
H ₂ O milli-Q	

Tampon d'éluion

Produit	Concentration finale
1M Tris-Cl (7.5)	50mM
0,25M EDTA	10mM
10% SDS	1%
H ₂ O milli-Q	

Préparation des adaptateurs d'oligonucléotides

Mélange pour l'hybridation des adaptateurs P7

Produit	Concentration finale
100 µM P7_fwd	15 µM
100 µM P7_Rev	15 µM
1M Tris (7,5)	100 mM
5M NaCl	50 mM
H ₂ O milli-Q	

Mélange pour l'hybridation des adaptateurs P5

Produit	Concentration finale
100 µM P5_fwd	15 µM
100 µM P5_Rev	15 µM
1M Tris (7,5)	100 mM
5M NaCl	50 mM
H ₂ O milli-Q	

Les adaptateurs ont été hybridés au thermocycleur selon le cycle suivant, puis ont été conservé à -80°C.

Température (°C)	Temps (minutes)
95	5
72	5
65 à 60	5
55 à 50	3
45 à 40	3
30	3
20	3
10	3

Description des réactions enzymatiques utilisées lors du protocole du ChIP-Seq

Polissage

20 µL d'ADN ont été ajoutés à 30 µL de la solution suivante, suivi d'une incubation à 12°C pendant 20 minutes.

Produits	Concentration finale
H ₂ O Milli-Q	
T4 DNA polymerase	0.09 U/µL
dNTPs	100 µM
10x Reaction Buffer 2	1x

Ligation des adaptateurs P7 et P5

40 µL d'ADN ont été ajoutés à 60 µL de la solution suivante, suivi d'une incubation à 22°C pendant 60 minutes.

Produits	Concentration finale
T4 ADN ligase buffer	1x
10x Reaction Buffer 2	1x
400 U/µL T4 DNA Ligase	15 U/µL
15mM P7 exo-adapter	0,75 picomoles/µL
15mM P5 exo-adapter	0,75 picomoles/µL

Amplification PCR

36 µL d'ADN a été ajouté à 14 µL de la solution suivante. L'ADN a été remplacé par de l'eau pour le témoin négatif.

Produits	Concentration finale
5x Hot Start Buffer	1x
10 mM of each dNTP	1x
20 µM INDEX Primer Fwd	0,5µM
2 U/µL Hot Start Polymerase	0,02 U/µL
20 µM Primer Rev	0,5µM

La réaction PCR a été réalisée au thermocycleur selon le cycle suivant.

Température (°C)	Temps	Cycle
98	30 secondes	1
98	10 secondes	23
53	30 secondes	
72	20 secondes	
72	2 minutes	1

Résultats du CHIP-Seq

chromosome	Début	Fin	Longueur	Abs summit	pileup	1/pvalue	Fold enrichment	1/qvalue	Nom
refseq NC_007650.1 chromosome	15725	16067	343	15896	3	4.1862	3.31339	2.04254	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_1
refseq NC_007650.1 chromosome	43325	43722	398	43459	5	7.37403	5.07906	4.82397	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_2
refseq NC_007650.1 chromosome	115715	116031	317	115763	6	8.21773	5.67663	5.6287	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_3
refseq NC_007650.1 chromosome	123833	124141	309	123867	8	10.2483	6.86585	7.49163	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_4
refseq NC_007650.1 chromosome	311255	311522	268	311265	8	10.2483	6.86585	7.49163	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_5
refseq NC_007650.1 chromosome	431881	432276	396	431914	11	11.4064	7.39977	8.57138	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_6
refseq NC_007650.1 chromosome	495780	496127	348	496114	27	32.1135	15.3098	28.1387	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_7
refseq NC_007650.1 chromosome	558194	558536	343	558259	5	5.46481	4.32107	3.13923	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_8
refseq NC_007650.1 chromosome	579362	579833	472	579586	6	8.96211	5.92557	6.28094	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_9
refseq NC_007650.1 chromosome	723492	723873	382	723827	10	12.9348	8.22898	9.98658	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_10
refseq NC_007650.1 chromosome	731818	732267	450	731826	60	68.7148	21.6834	61.8875	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_11
refseq NC_007650.1 chromosome	766741	767178	438	767172	6	7.62729	5.44776	5.0641	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_12
refseq NC_007650.1 chromosome	841827	842095	269	842036	8	8.52276	6.03154	5.89904	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_13
refseq NC_007650.1 chromosome	881708	881969	262	881727	6	8.75728	5.86131	6.10757	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_14
refseq NC_007650.1 chromosome	1026770	1027243	474	1027232	35	41.8383	17.9085	37.5216	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_15
refseq NC_007650.1 chromosome	1100478	1100854	377	1100507	3	4.1862	3.31339	2.04254	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_16
refseq NC_007650.1 chromosome	1147368	1147798	431	1147453	17	16.142	8.95426	12.9718	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_17
refseq NC_007650.1 chromosome	1195079	1195454	376	1195084	24	29.3647	14.7112	25.4729	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_18
refseq NC_007650.1 chromosome	1242752	1243025	274	1242889	4	4.41246	3.66934	2.20441	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_19
refseq NC_007650.1 chromosome	1302917	1303300	384	1302981	5	5.81854	4.48854	3.46864	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_20
refseq NC_007650.1 chromosome	1317928	1318303	376	1317951	3	4.45205	3.39921	2.20441	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_21
refseq NC_007650.1 chromosome	1372421	1372853	433	1372448	4	5.70727	4.18665	3.36783	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_22
refseq NC_007650.1 chromosome	1377453	1377810	358	1377507	4	5.57179	4.14173	3.23629	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_23
refseq NC_007650.1 chromosome	1406162	1406606	445	1406219	7	8.2694	5.87095	5.66777	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_24

refseq NC_007650.1 chromosome	1452020	1452283	264	1452229	6	7.62729	5.44776	5.0641	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_25
refseq NC_007650.1 chromosome	1496290	1496561	272	1496488	4	5.32535	4.05473	3.00865	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_26
refseq NC_007650.1 chromosome	1555690	1556102	413	1555847	4	5.85242	4.23255	3.48922	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_27
refseq NC_007650.1 chromosome	1627433	1627894	462	1627869	7	9.75466	6.48757	7.02707	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_28
refseq NC_007650.1 chromosome	1669875	1670312	438	1669909	26	25.3249	11.6327	21.7342	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_29
refseq NC_007650.1 chromosome	1672613	1672901	289	1672893	21	18.5926	9.27152	15.3156	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_30
refseq NC_007650.1 chromosome	1685183	1685492	310	1685347	5	7.37403	5.07906	4.82397	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_31
refseq NC_007650.1 chromosome	1703074	1703338	265	1703206	3	4.45205	3.39921	2.20441	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_32
refseq NC_007650.1 chromosome	1793636	1793967	332	1793802	4	4.7286	3.81436	2.46935	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_33
refseq NC_007650.1 chromosome	1812954	1813307	354	1813293	50	59.7563	21.4931	54.7864	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_34
refseq NC_007650.1 chromosome	1919033	1919322	290	1919300	12	14.6023	9.02558	11.538	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_35
refseq NC_007650.1 chromosome	2052532	2052859	328	2052727	6	7.37257	5.3401	4.82397	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_36
refseq NC_007650.1 chromosome	2083142	2083445	304	2083294	3	4.45205	3.39921	2.20441	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_37
refseq NC_007650.1 chromosome	2126113	2126583	471	2126120	17	21.3531	11.9593	17.9481	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_38
refseq NC_007650.1 chromosome	2188808	2189218	411	2189190	9	12.1247	7.78251	9.23135	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_39
refseq NC_007650.1 chromosome	2207756	2208096	341	2208064	9	12.1247	7.78251	9.23135	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_40
refseq NC_007650.1 chromosome	2305646	2305974	329	2305929	5	7.03569	4.97008	4.5539	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_41
refseq NC_007650.1 chromosome	2352700	2353064	365	2352717	28	32.5618	15.2103	28.5728	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_42
refseq NC_007650.1 chromosome	2380781	2381155	375	2381147	21	24.7574	12.9459	21.1837	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_43
refseq NC_007650.1 chromosome	2398390	2398839	450	2398651	5	6.47343	4.76557	4.04042	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_44
refseq NC_007650.1 chromosome	2471936	2472276	341	2471938	25	26.5031	12.6887	22.8113	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_45
refseq NC_007650.1 chromosome	2529919	2530316	398	2530306	5	6.01753	4.57723	3.63043	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_46
refseq NC_007650.1 chromosome	2645750	2646021	272	2645881	5	7.37403	5.07906	4.82397	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_47
refseq NC_007650.1 chromosome	2681129	2681395	267	2681207	5	6.73838	4.86568	4.27776	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_48
refseq NC_007650.1 chromosome	2795658	2795937	280	2795666	7	9.5718	6.42014	6.85174	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_49
refseq NC_007650.1 chromosome	2816867	2817320	454	2816874	8	11.3425	7.29852	8.52601	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_50
refseq NC_007650.1 chromosome	2890039	2890502	464	2890074	4	5.57179	4.14173	3.23629	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_51
refseq NC_007651.1 chromosome	84402	84892	491	84411	34	38.3409	16.2588	34.1591	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_52
refseq NC_007651.1 chromosome	170985	171480	496	171462	16	20.787	11.8027	17.4012	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_53
refseq NC_007651.1 chromosome	197281	197741	461	197569	7	8.51692	5.98471	5.89653	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_54

refseq NC_007651.1 chromosome	235225	235644	420	235616	27	30.5624	14.3925	26.621	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_55
refseq NC_007651.1 chromosome	294443	294824	382	294819	36	43.4024	18.406	39.0748	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_56
refseq NC_007651.1 chromosome	329633	330093	461	329756	10	12.2718	7.92196	9.3631	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_57
refseq NC_007651.1 chromosome	403526	404217	692	403537	16	17.2196	9.85345	13.9848	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_58
refseq NC_007651.1 chromosome	503869	504362	494	504355	24	28.9807	14.4904	25.1306	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_59
refseq NC_007651.1 chromosome	542872	543203	332	543191	14	17.6387	10.4141	14.3789	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_60
refseq NC_007651.1 chromosome	558957	559394	438	559045	5	6.23467	4.6695	3.81568	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_61
refseq NC_007651.1 chromosome	562035	562377	343	562368	5	6.47343	4.76557	4.04042	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_62
refseq NC_007651.1 chromosome	625848	626137	290	625869	10	12.2718	7.92196	9.3631	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_63
refseq NC_007651.1 chromosome	684576	684961	386	684779	10	9.93422	6.67648	7.20258	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_64
refseq NC_007651.1 chromosome	758175	758527	353	758516	16	19.6189	11.1985	16.2759	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_65
refseq NC_007651.1 chromosome	787714	788086	373	787794	15	18.1021	10.5398	14.8318	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_66
refseq NC_007651.1 chromosome	811693	812116	424	812102	9	11.5848	7.55408	8.73403	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_67
refseq NC_007651.1 chromosome	978321	978760	440	978441	10	11.9738	7.77689	9.08777	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_68
refseq NC_007651.1 chromosome	1006674	1006949	276	1006812	3	4.45205	3.39921	2.20441	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_69
refseq NC_007651.1 chromosome	1036525	1036990	466	1036635	11	14.4877	8.97707	11.4334	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_70
refseq NC_007651.1 chromosome	1126950	1127221	272	1127031	6	7.37257	5.3401	4.82397	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_71
refseq NC_007651.1 chromosome	1174327	1174626	300	1174401	3	4.08535	3.27822	1.96742	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_72
refseq NC_007651.1 chromosome	1194776	1195186	411	1194833	12	13.9952	8.71222	10.9723	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_73
refseq NC_007651.1 chromosome	1237102	1237410	309	1237374	7	8.2694	5.87095	5.66777	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_74
refseq NC_007651.1 chromosome	1283755	1284194	440	1283786	16	20.3756	11.5942	17.0018	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_75
refseq NC_007651.1 chromosome	1374134	1374406	273	1374179	12	13.716	8.56356	10.7113	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_76
refseq NC_007651.1 chromosome	1405946	1406358	413	1406345	55	65.1885	22.1495	59.8236	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_77
refseq NC_007651.1 chromosome	1527207	1527684	478	1527207	5	6.12363	4.62291	3.72247	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_78
refseq NC_007651.1 chromosome	1670412	1670841	430	1670437	13	16.2818	9.80805	13.1018	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_79
refseq NC_007651.1 chromosome	1677255	1677647	393	1677283	15	17.0185	9.94579	13.7863	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_80
refseq NC_007651.1 chromosome	1712944	1713307	364	1713204	6	6.72359	5.04125	4.27654	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_81
refseq NC_007651.1 chromosome	1736166	1736624	459	1736229	24	26.0518	12.7655	22.4012	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_82
refseq NC_007651.1 chromosome	1739408	1739893	486	1739888	9	7.12121	5.10618	4.63532	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_83
refseq NC_007651.1 chromosome	1774930	1775200	271	1775010	3	4.45205	3.39921	2.20441	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_84

refseq NC_007651.1 chromosome	1826142	1826535	394	1826149	16	20.1786	11.4927	16.8257	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_85
refseq NC_007651.1 chromosome	1896991	1897461	471	1897456	14	13.8723	8.3195	10.8605	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_86
refseq NC_007651.1 chromosome	1904849	1905272	424	1904885	8	10.5783	7.00426	7.7996	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_87
refseq NC_007651.1 chromosome	1911111	1911424	314	1911363	5	7.37403	5.07906	4.82397	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_88
refseq NC_007651.1 chromosome	1989584	1990031	448	1989643	6	7.13904	5.23663	4.64836	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_89
refseq NC_007651.1 chromosome	2021340	2021647	308	2021402	3	3.90106	3.21007	1.80908	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_90
refseq NC_007651.1 chromosome	2172255	2172593	339	2172585	7	8.64821	6.04327	6.00984	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_91
refseq NC_007651.1 chromosome	2343891	2344153	263	2344145	11	12.7059	8.11246	9.76866	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_92
refseq NC_007651.1 chromosome	2346806	2347144	339	2346902	6	6.04407	4.6912	3.65094	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_93
refseq NC_007651.1 chromosome	2471289	2471644	356	2471621	7	10.1539	6.62677	7.40376	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_94
refseq NC_007651.1 chromosome	2579341	2579782	442	2579682	6	8.96211	5.92557	6.28094	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_95
refseq NC_007651.1 chromosome	2630237	2630553	317	2630381	5	7.03569	4.97008	4.5539	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_96
refseq NC_007651.1 chromosome	2646269	2646553	285	2646546	10	12.2718	7.92196	9.3631	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_97
refseq NC_007651.1 chromosome	2685193	2685492	300	2685248	10	13.3069	8.39159	10.3207	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_98
refseq NC_007651.1 chromosome	2734827	2735129	303	2734843	24	28.9807	14.4904	25.1306	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_99
refseq NC_007651.1 chromosome	2758157	2758544	388	2758174	17	21.1605	11.8572	17.7623	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_100
refseq NC_007651.1 chromosome	2768212	2768544	333	2768505	4	5.90627	4.24901	3.52798	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_101
refseq NC_007651.1 chromosome	2793955	2794286	332	2794259	5	7.03569	4.97008	4.5539	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_102
refseq NC_007651.1 chromosome	2821334	2821675	342	2821633	6	8.21773	5.67663	5.6287	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_103
refseq NC_007651.1 chromosome	2956338	2956779	442	2956722	14	16.0117	9.55496	12.879	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_104
refseq NC_007651.1 chromosome	3003132	3003557	426	3003492	8	10.7551	7.07558	7.96557	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_105
refseq NC_007651.1 chromosome	3012975	3013370	396	3013206	4	5.90627	4.24901	3.52798	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_106
refseq NC_007651.1 chromosome	3059224	3059601	378	3059559	9	12.3216	7.86175	9.40831	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_107
refseq NC_007651.1 chromosome	3066822	3067176	355	3067155	9	11.4196	7.48089	8.57783	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_108
refseq NC_007651.1 chromosome	3095331	3095695	365	3095666	10	10.7261	7.12452	7.94193	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_109
refseq NC_007651.1 chromosome	3105063	3105474	412	3105073	15	16.4721	9.6355	13.2871	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_110
refseq NC_007651.1 chromosome	3116038	3116484	447	3116476	14	15.0868	9.03328	12.0026	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_111
refseq NC_007651.1 chromosome	3146827	3147199	373	3147128	8	9.28327	6.42171	6.57288	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_112
refseq NC_007651.1 chromosome	3340161	3340574	414	3340243	3	4.08535	3.27822	1.96742	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_113
refseq NC_007651.1 chromosome	3394979	3395410	432	3395107	6	7.37257	5.3401	4.82397	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_114

refseq NC_007651.1 chromosome	3557973	3558283	311	3558274	9	12.9758	8.10947	10.0252	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_115
refseq NC_007651.1 chromosome	3640230	3640666	437	3640484	3	4.40922	3.38604	2.20441	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_116
refseq NC_007651.1 chromosome	3645339	3645621	283	3645510	5	5.46481	4.32107	3.13923	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_117
refseq NC_007651.1 chromosome	3695510	3695806	297	3695523	10	11.5611	7.56897	8.7115	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_118
refseq NC_007651.1 chromosome	3730192	3730461	270	3730327	3	4.1862	3.31339	2.04254	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_119
refseq NC_007651.1 chromosome	3792900	3793258	359	3793079	3	4.45205	3.39921	2.20441	Bowtie2_on_ScmR1__alignments_peak_120

Résultats de l'analyse MACS2 à l'aide de usegalaxy.org.