

Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier

Étude de la régulation de la production des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines chez
Burkholderia ambifaria et *B. thailandensis*

Par
Jean-Philippe Dumais

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Richard Villemur
IAF-INRS

Examineur externe

Sylvie Chevalier
Université de Rouen

Directeur de recherche

Éric Déziel
IAF-INRS

Résumé

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* produit plusieurs types de molécules-signal impliquées dans la communication intercellulaire. Ces molécules, qui incluent les 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ), jouent un rôle dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes de virulence. L'opéron *pqsABCDE* est essentiel pour la biosynthèse des HAQ. Nous avons récemment découvert que certaines espèces de *Burkholderia*, notamment *B. ambifaria* et *B. thailandensis*, produisent des HAQ méthylés : des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ).

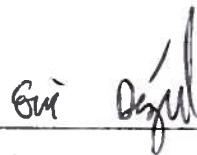
B. ambifaria est une bactérie à la fois un pathogène opportuniste chez les patients immunodéprimés dans le cas d'un isolat clinique, et un agent protecteur se liant à la rhizosphère des plantes dans le cas d'un isolat environnemental. Cette bactérie est regroupée dans le « *Burkholderia cepacia* complex » (Bcc), un groupe comprenant à ce jour une dizaine d'espèces phylogénétiquement similaire. *B. thailandensis* est une espèce bactérienne avirulente phylogénétiquement très reliée à *B. pseudomallei*, un pathogène humain responsable de la mélioïdose. La production de HMAQ par *B. thailandensis* est le résultat de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG*, homologue à *pqsABCDE* de *P. aeruginosa*, mais contenant deux gènes additionnels, *hmqF* et *hmqG*. Ce dernier est responsable de la méthylation des molécules de HAQ. Une autre différence importante entre les deux opérons est leur régulation. Chez *P. aeruginosa*, le gène *mvfR* est localisé à proximité de l'opéron *pqs* et code pour un régulateur transcriptionnel de type LysR contrôlant l'expression de *pqsABCDE*. Par contre, chez *Burkholderia*, aucun régulateur de ce type n'est présent à proximité de l'opéron *hmq*, et il ne semble pas y avoir de séquence de liaison de type LysR dans sa région promotrice, suggérant que la régulation de cet opéron est distincte du système de régulation de *P. aeruginosa*.

Le but de cette étude est d'identifier les gènes impliqués dans la régulation de l'opéron *hmq* chez *B. thailandensis*. Pour ce faire, j'ai utilisé une approche à deux volets. Premièrement, j'ai effectué un criblage dans lequel le critère de sélection était une morphologie similaire à une souche ne produisant pas de HMAQ. Dans l'autre approche, j'ai construit un rapporteur *hmqA-lacZ* génomique pour *B. thailandensis*, suivi d'une mutagénèse aléatoire du génome par

transposon. Après un criblage en utilisant un phénotype β -galactosidase atténué, j'ai identifié les gènes affectés dans chacun des mutants intéressants par une technique de ligation aléatoire et par amplification PCR. Après les criblages, d'environ 70000 colonies de *B. thailandensis* pour chacun, j'ai quantifié la production de β -galactosidase pour confirmer son atténuation ou inhibition et j'ai retenu les candidats intéressants. La production de HMAQ par les candidats a été quantifiée par analyse LC/MS. Les gènes impliqués dans la production de HMAQ ont été identifiés, et parmi la variété de gènes identifiés se trouvent des régulateurs transcriptionnels qui pourraient avoir un effet direct sur la production des HMAQ.



Jean-Philippe Dumais
Étudiant



Éric Déziel
Directeur de recherche

Remerciements

J'aimerais premièrement remercier mon directeur de recherche Éric Déziel pour toutes les formes de soutien. Ton expertise et ta passion pour la science m'ont permis de découvrir ce qu'est la recherche scientifique, et c'est suite à cette découverte que j'ai décidé d'en faire ma carrière. Je te remercie grandement de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et de m'avoir donné la chance d'apprendre et d'être un membre de cette merveilleuse équipe.

J'aimerais aussi remercier tous mes collègues de laboratoire, notamment Marie-Christine Groleau et Ludovic Vial, qui m'ont tous deux offert de l'aide à chaque fois que j'en avais besoin, et qui m'ont aidé à passer à travers toutes les nombreuses étapes difficiles d'une maîtrise. Pour votre aide et votre amitié, je suis extrêmement reconnaissant.

À Alain, Josée et Guillaume, ma famille, qui depuis le premier jour, n'ont cessé de m'appuyer à travers mes longues études et qui m'ont démontré l'importance de les compléter. Sans votre appui, je ne serais certainement pas arrivé à ce stade. Pour ceci, je vous remercie éternellement. Ce mémoire est le point culminant de mon long travail, et vous appartient autant qu'il m'appartient.

Et dernièrement, à Danielle. Nous avons parcouru cette étape de nos vies ensemble, et même si ce n'est que la première, c'était certainement une étape qui a défini et renforcé notre relation. Il y a plusieurs fois pendant les deux dernières années que je ne voyais pas le bout du chemin, mais tu étais là à chaque fois pour moi. Maintenant que ce chapitre de notre vie est terminé, nous sommes prêt à entamer le prochain. Je ne me verrais terminer ma vie avec personne d'autre que toi. Pour tout, merci.

JP

Table des matières

Résumé.....	2
Remerciements.....	4
Table des matières	5
Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	9
Liste des Abréviations	10
Introduction.....	11
1. Revue de littérature	14
1.1. <i>Burkholderia</i>	15
1.1.1. <i>Burkholderia pseudomallei</i>	18
1.1.2. <i>Burkholderia thailandensis</i>	19
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.3. <i>Quorum sensing</i>	21
1.3.1. Le <i>quorum sensing</i> chez <i>Burkholderia</i> : systèmes d'acyl-homosérine-lactones	23
1.3.2. Le <i>quorum sensing</i> chez <i>P. aeruginosa</i>	27
1.4. Système <i>hmqABCDEFG</i> et similarités avec le système <i>pqsABCDE-mvfR</i>	30
1.5. Famille de régulateurs transcriptionnels de type LysR	32
1.5.1. MvfR, un régulateur transcriptionnel de type LysR	35
1.6. Homologies entre <i>hmqABCDEFG</i> et <i>pqsABCDE</i> : contextes chromosomiques	37
1.7. Le locus <i>tad/cpa</i> : un îlot génomique conservé	38
2. Matériels et Méthodes	40
2.1. Bactéries	41
2.2. Plasmides.....	42
2.3. Milieux de culture.....	43
2.4. Criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production de HMAQ	44
2.4.1. Mutagenèse aléatoire avec <i>ISlacZ/hah</i>	44
2.4.2. Courbes de croissance	45
2.4.3. Détection et quantification des HMAQ par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse	46
2.4.4. Identification du site d'insertion des transposons par amplification PCR double	47
2.5. Criblage en utilisant le rapporteur chromosomique <i>hmqA-lacZ</i>	49
2.5.1. Construction de rapporteurs miniCTX- <i>hmqA-lacZ</i> chromosomiques	49

2.5.2. Excision du gène <i>tetR</i> de la construction miniCTX- <i>hmqA-lacZ</i>	54
2.5.3. Mutagenèse aléatoire par transposon miniTn5-Km sur <i>B. thailandensis</i>	57
2.5.4. Quantification de la production de β -galactosidase par un rapporteur <i>hmqA-lacZ</i>	58
2.5.5. Identification du site d'insertion du transposon miniTn5-Km	59
2.6. Étude de complémentation du mutant BTH_I1403-	62
2.6.1. Construction du plasmide pME6000::BTH_I1403	62
2.7. Essais de PCR quantitatif en temps réel (qRT-PCR)	64
3. Résultats	67
3.1. Hypothèses et objectifs	68
3.1.1. Hypothèses	68
3.1.2. Objectifs	68
3.2. Différences morphologiques entre la souche sauvage de <i>B. thailandensis</i> et le mutant <i>hmqA</i>⁻	69
3.3. Criblage fonctionnel en utilisant le milieu gélosé Ashdown pour <i>B. thailandensis</i>	70
3.4. Étude du lien entre la production de HMAQ et l'opéron <i>tad</i> de <i>B. thailandensis</i>	74
3.5. Rapporteurs <i>hmqA-lacZ</i> chromosomiques pour les espèces <i>B. ambifaria</i> et <i>B. thailandensis</i>	76
3.5.1. Criblage de mutants affectés dans la transcription de l'opéron <i>hmq</i> en utilisant <i>B. thailandensis</i> :: <i>hmqA-lacZ</i>	79
3.6. Étude de complémentation du mutant JPD-H (BTH_I1403⁻)	84
4. Discussion	86
4.1. Différences morphologiques entre <i>B. thailandensis</i> souche sauvage par rapport au mutant <i>hmqA</i>⁻	87
4.2. Criblage fonctionnel en utilisant le milieu gélosé Ashdown pour <i>B. thailandensis</i>	88
4.3. Suivi de l'expression de <i>hmqABCDEFG</i> à l'aide de rapporteurs chromosomiques <i>hmqA-lacZ</i> chez <i>B. thailandensis</i>	91
4.3.1. Criblage fonctionnel de <i>B. thailandensis</i> :: <i>hmqA-lacZ</i> en utilisant le phénotype bleu/blanc	93
4.4. Conclusion et perspectives	97
5. Références	98
6. Annexe	108
6.1 Résultats de séquençage et alignements avec le génome de <i>B. thailandensis</i>	109
6.1.1. Criblage de mutants sur milieu Ashdown's Agar	109
6.1.2. Criblage de mutants en utilisant le rapporteur <i>hmqA-lacZ</i> chromosomique	121
6.2. Résultats de « melt curve » pour essais de qRT-PCR :	127

Liste des figures

Figure 1.1. Arbre phylogénétique basé sur l'ARNr 16S démontrant la diversité des espèces de <i>Burkholderia</i> et d'autres espèces reliées.	17
Figure 1.2. Représentation graphique d'un système typique de QS LuxI/LuxR.	22
Figure 1.3. Représentation des molécules-signal de QS de la famille des AHL (C ₄ -AHL) et de la famille des HAQ (HHQ) chez <i>P. aeruginosa</i>	23
Figure 1.4. Représentation des structures chimiques des AHL produites par <i>B. thailandensis</i> selon Duerkop <i>et al.</i> 2009.	26
Figure 1.5. Représentation de la hiérarchie de la régulation des systèmes de QS las et rhI.	28
Figure 1.6. Représentation graphique de la production des HAQ chez <i>P. aeruginosa</i>	29
Figure 1.7. Représentation graphique de la synthèse d'HMAQ chez certaines espèces de <i>Burkholderia</i>	31
Figure 1.9. Représentation graphique de la synthèse d'HAQ chez <i>P. aeruginosa</i> et certaines espèces de <i>Burkholderia</i>	32
Figure 1.10. Représentation de la séquence de liaison d'un régulateur transcriptionnel de type LysR, MvfR.	34
Figure 1.11. Représentation de l'interaction entre les dimères d'un régulateur LTTR typique et les changements de conformation de l'ADN reliés à cette interaction.	34
Figure 1.12. Représentation de l'organisation génétique des opérons <i>pqs</i> chez <i>P. aeruginosa</i> et <i>hmq</i> chez <i>B. thailandensis</i>	37
Figure 2.1. Représentation graphique de l'emplacement de la mutation dans <i>hmqA</i> chez <i>B. thailandensis</i> <i>hmqA</i> -	41
Figure 2.1. Représentation visuelle de la technique d'identification de l'emplacement d'un transposon dans un génome bactérien.	47
Figure 2.2. Exemple de gel d'agarose représentant les amplifications obtenues suite à deux rondes de PCR semi-aléatoires nichées.	49
Figure 2.3. Représentation graphique de l'emplacement du site d'insertion attB où le plasmide miniCTX- <i>lacZ</i> s'insère chez <i>B. ambifaria</i> (haut) et <i>B. thailandensis</i>	50
Figure 2.4. Représentation de la région promotrice de l'opéron <i>hmq</i> pour <i>B. ambifaria</i> et <i>B. thailandensis</i>	51
Figure 2.5. Représentation du plasmide recombinant MiniCTX- <i>lacZ</i>	53
Figure 2.6. Confirmation de l'insertion du promoteur <i>hmqA</i> dans le plasmide.	54
Figure 2.7. Représentation de l'insertion de la construction miniCTX- <i>hmqA-lacZ</i> dans le génome de <i>Burkholderia</i>	56
Figure 2.8. Représentation du plasmide d'excision pFLPe4.	56
Figure 2.9. Représentation du plasmide pUT/Km contenant le minitransposon Tn5-Km.	57

Figure 2.10. Technique d'identification de gènes affectés par transposon aléatoire.....	60
Figure 2.11. Amplification de fragments spécifiques au transposon miniTn5/Km, pour identifier le gène muté dans les mutants du criblage en utilisant le rapporteur <i>hmqA-lacZ</i>	61
Figure 2.12. Confirmation de l'insertion de BTH_I1403 dans pME6000.	63
Figure 3.1. Phénotype de <i>B. thailandensis</i> souche sauvage (gauche) et mutant <i>hmqA</i> ⁻ sur gélose Ashdown suite à une incubation de 48 heures à 37 ⁰ C.....	70
Figure 3.2. Courbes de croissance de transposants obtenus par criblage différentiel phénotypique sur milieu gélosé Ashdown.	71
Figure 3.3. Représentation graphique de l'opéron <i>tad/cpa</i> chez <i>B. thailandensis</i> E264.....	73
Figure 3.4. Expression de l'opéron <i>hmq</i> chez <i>B. thailandensis</i> . Comparaison entre la souche sauvage E264 et un transposant dans le gène <i>tadC</i>	74
Figure 3.5. Détermination du C _T de la transcription de <i>rpoB</i> et <i>tadB</i> en fonction du cycle de PCR pour les souches <i>B. thailandensis</i> WT et <i>hmqA</i> ⁻	75
Figure 3.6. Quantification de la transcription de <i>hmqA</i> et <i>tadB</i> de <i>B. thailandensis hmqA</i> ⁻ par rapport à la souche sauvage.	76
Figure 3.7. Quantification de l'expression de l'opéron <i>hmq</i> entre les souches de <i>B. thailandensis</i> WT et mutant <i>hmqA</i> ⁻ , avec et sans addition de C _{9,2} -HMAQ.....	77
Figure 3.8. Quantification de l'expression de l'opéron <i>hmq</i> entre les souches de <i>B. thailandensis</i> WT et <i>hmqA</i> ⁻ , sans l'excision de <i>tetR</i> par la flipase.....	78
Figure 3.9. Détermination du C _T de la transcription de <i>rpoB</i> et <i>hmqA</i> en fonction du cycle de PCR pour les souches <i>B. thailandensis</i> WT et <i>hmqA</i> ⁻	78
Figure 3.10. Quantification de l'expression de l'opéron <i>hmq</i> chez deux mutants par rapport à la souche sauvage de <i>B. thailandensis</i>	80
Figure 3.11. Quantification de l'activité β-galactosidase de <i>hmqA-lacZ</i> chez deux mutants ayant des défauts de croissance par rapport à la souche sauvage de <i>B. thailandensis</i>	80
Figure 3.12. Quantification de l'activité β-galactosidase de <i>hmqA-lacZ</i> chez sept transposants par rapport à la souche sauvage de <i>B. thailandensis</i> , et quantification réelle de la production d'HMAQ par chaque souche.	81
Figure 3.13. Courbe de croissance de mutants obtenus par criblage différentiel phénotypique bleu/blanc.	84
Figure 3.14. Complémentation de la mutation du transposant JPD-H avec le gène BTH_I1403 sur un plasmide. pME6000. (A) Expression du gène rapporteur <i>hmqA-lacZ</i> et (B) quantification réelle de la production d'HMAQ par chaque souche.	85
Figure 6.1. Représentation graphique des « melt curves » pour <i>rpoB</i> et <i>hmqA</i> , démontrant des fragments spécifiques aux amorces lorsque les températures sont élevées (>85 ⁰ C).....	127
Figure 6.2. Représentation graphique des « melt curves » pour <i>rpoB</i> et <i>tadB</i> , démontrant des fragments spécifiques aux amorces lorsque les températures sont élevées (>85 ⁰ C).....	128

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Résumé des espèces ayant un opéron <i>hmqABCDEFG</i> homologue à celui trouvé chez <i>B. thailandensis</i> E264.	31
Tableau 2.1 Bactéries et plasmides utilisés dans cette étude.	43
Tableau 2.2. Réactifs utilisés pour l'amplification PCR, ronde 1 et ronde 2.	48
Tableau 2.3. Étapes de réaction pour les amplifications PCR, ronde 1 et ronde 2.	48
Tableau 2.4. Amorces utilisées lors de cette étude.	52
Tableau 2.5. Réactifs utilisés lors des expériences de qRT-PCR.	65
Tableau 3.1 Mutants retenus du criblage par différenciation phénotypique sur milieu gélosé Ashdown.	72
Tableau 3.2 Résultats de concentration de l'ARN extrait des bactéries <i>B. thailandensis</i> E264 sauvage et <i>hmqA</i> -	75
Tableau 3.3. Identification des gènes inactivés dans chacun des mutants retenus lors du criblage par phénotype bleu/blanc à l'aide du rapporteur <i>hmqA-lacZ</i> chromosomique. Les prédictions de fonctions putatives des gènes sont fournies par burkholderia.com	83

Liste des Abréviations

AA	Acide anthranilique
ABS	Activation binding site
AHL	Acyl-homosérine lactone
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
C6-AHL	Hexanoyl-acyl-homosérine lactone
C8-AHL	Octanoyl-acyl-homosérine lactone
C10-AHL	Decanoyl-acyl-homosérine lactone
C12-AHL	Dodecanoyl-acyl-homosérine lactone
C14-AHL	Tetradecanoyl-acyl-homosérine lactone
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CL / SM	Chromatographie liquide / spectrométrie de masse
FRT	Flipase Recognition Target
HAQ	Hydroxy-alkyl-quinoline
HAQNO	Hydroxy-alkyl-quinoline-N-oxide
HHQ	Hydroxy-heptyl-quinoline
HMAQ	Hydroxy-methyl-alkyl-quinoline
HMAQNO	hydroxy-méthyl-alkyl-quinoline-N-oxide
HTH	Hélice-tour-hélice
LTTR	LysR-type transcriptional regulator
PQS	3,4-dihydroxy-2-heptyl-quinoline, “ <i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal”
QS	<i>Quorum sensing</i>
RBS	Ribosomal binding site
SCM	Site de clonage multiple
TSB	Tryptic Soy Broth

Introduction

Les bactéries à Gram négatif peuvent produire des petites molécules chimiques qui sont reconnues comme étant des molécules de communication intercellulaire. Cette communication entre les bactéries, appelée *quorum sensing* (QS), permet de coordonner une grande variété d'activités bactériennes, et représente un système complexe de régulation et de contrôle afin de maximiser la performance de la bactérie. Il existe plusieurs types de molécules-signal qui ont tous des rôles différents en ce qui concerne les activités bactériennes. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* produit plusieurs de ces types de molécules-signal. Plus particulièrement, une famille de molécules nommée 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) joue un rôle important dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes de virulence. L'opéron *pqsABCDE* est essentiel pour la biosynthèse des HAQ, et sa régulation dépend en grande majorité d'un régulateur transcriptionnel nommé MvfR. Suite à la recherche d'homologues de l'opéron *pqs* chez d'autres espèces, à l'aide de prédictions informatiques, nous avons découvert que certaines espèces de *Burkholderia*, notamment *B. ambifaria* et *B. thailandensis*, produisent des HAQ méthylés : des 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ).

B. ambifaria est une bactérie à la fois un pathogène opportuniste chez les patients immunodéprimés dans le cas d'un isolat clinique, et un agent protecteur se liant à la rhizosphère des plantes dans le cas d'un isolat environnemental. Cette bactérie est regroupée dans le « *Burkholderia cepacia* complex » (Bcc), un groupe comprenant à ce jour une dizaine d'espèces phylogénétiquement similaires. *B. thailandensis*, quant à elle, est une espèce bactérienne avirulente phylogénétiquement très reliée à *B. pseudomallei*, un pathogène humain responsable de la mélioïdose. Ces espèces utilisent aussi plusieurs systèmes de QS, incluant la famille de molécules d'AHL. La production de HMAQ par *B. thailandensis* est le résultat de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG*, homologue à *pqsABCDE* de *P. aeruginosa*, mais contenant deux gènes additionnels, *hmqF* et *hmqG*. Ce dernier est responsable de la méthylation des molécules de HAQ.

Une autre différence importante entre les deux opérons est leur régulation. Chez *P. aeruginosa*, le gène *mvfR* est localisé à proximité de l'opéron *pqs* et code pour un régulateur

transcriptionnel de type LysR (LTTR) contrôlant l'expression de *pqsABCDE*. Les LTTR sont une famille de régulateurs pouvant contrôler une grande variété d'activités bactériennes. De nouveaux régulateurs appartenant à cette famille et leurs fonctions respectives sont découverts régulièrement. Les LTTR peuvent fonctionner à titre d'activateur ou répresseur transcriptionnel, dépendamment de leur conformation en dimère ou tétramère en amont de la séquence cible. Cette variabilité dans la conformation qu'un LTTR peut prendre rend sa caractérisation générale très difficile.

Lorsque l'on regarde la régulation possible des HMAQ chez *Burkholderia*, on remarque qu'aucun régulateur de type LysR n'est présent à proximité de l'opéron *hmq*. Aussi, il ne semble pas y avoir de séquence de liaison de type LysR dans sa région promotrice, suggérant que la régulation de cet opéron est distincte du système de régulation de *P. aeruginosa*. Pourtant, on peut s'attendre à ce que la régulation de ces deux opérons soit similaire, étant donné la similarité de la structure des molécules dans chacun des systèmes. Jusqu'à maintenant, aucun gène régulant la production d'HMAQ n'a été identifié.

Le but de cette étude est donc d'identifier les gènes impliqués dans la régulation de l'opéron *hmq* chez *B. thailandensis*. Pour ce faire, j'ai utilisé une approche à deux volets. Premièrement, j'ai effectué un criblage dans lequel le critère de sélection était une morphologie similaire à une souche ne produisant pas de HMAQ. En utilisant le phénotype de la souche sauvage et le mutant *hmqA*⁻ de cette bactérie, j'ai découvert qu'un milieu gélosé permet de facilement différencier les deux souches. De plus, un phénotype de mutant *hmqA*⁻ peut être induit chez la souche sauvage en utilisant un inhibiteur compétitif du précurseur des HMAQ, confirmant que la différence en phénotype est strictement le résultat d'une déficience en production de cette molécule. Suite à l'obtention d'un milieu permettant donc de sélectionner des bactéries déficientes en production d'HMAQ, j'ai procédé à un criblage de 70000 colonies, permettant d'isoler des mutants de l'opéron et d'autres transposants ayant un rôle important dans cette production.

Dans une autre approche, j'ai construit un rapporteur *hmqA-lacZ* génomique pour *B. thailandensis*, suivi d'une mutagénèse aléatoire du génome par transposon. L'obtention d'un

rapporteur chromosomique *hmqA-lacZ* permet de suivre quantitativement l'expression de l'opéron, et permet en même temps d'évaluer visuellement l'activité d'expression selon la morphologie d'une colonie, représentée par un pigment bleu. Ce rapporteur chromosomique m'a permis de déterminer que l'expression de l'opéron *hmq* est supérieure dans la souche sauvage de *B. thailandensis* par rapport au mutant *hmqA-*, mais que l'activité n'est pas complètement abolie chez cette dernière. Ceci représente une différence par rapport à l'opéron *pqs* chez *P. aeruginosa*. Ces résultats ont été confirmés par un essai de PCR quantitatif en temps réel. Suite à cela, j'ai effectué un criblage en utilisant un phénotype β -galactosidase atténué, ce qui a permis de sélectionner plusieurs candidats. Ensuite, j'ai identifié les gènes affectés dans chacun des mutants intéressants par une technique de ligation aléatoire et par amplification PCR. Après le criblage d'environ 70000 colonies, j'ai quantifié la production de β -galactosidase pour confirmer son atténuation ou inhibition et j'ai retenu les candidats intéressants. La production de HMAQ par les candidats a été quantifiée par analyse de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL/SM). Les gènes impliqués dans la production de HMAQ ont été identifiés, et parmi la variété de gènes identifiés se trouvent des régulateurs transcriptionnels qui pourraient avoir un effet direct sur la production des HMAQ.

En résumé, les criblages effectués chez *B. thailandensis* ont permis d'identifier plusieurs gènes pouvant avoir un rôle spécifique dans la production d'HMAQ. De plus, un régulateur transcriptionnel de type LysR a été identifié comme ayant un rôle direct suite à une étude de complémentation. La découverte de gènes reliés au contrôle de l'opéron *hmq* pourra mener à l'élucidation d'une cascade de régulation et d'un modèle permettant de mieux comprendre le QS chez cette bactérie.

1. Revue de littérature

1.1. Burkholderia

Les bactéries du genre *Burkholderia* sont des bactéries à Gram négatif, et sont retrouvées dans une grande diversité de milieux. Auparavant, la plupart des espèces du genre *Burkholderia* faisaient partie du groupe d'homologie II du genre *Pseudomonas*, mais suite à la découverte de différences importantes entre les espèces de ce groupe et les autres espèces de *Pseudomonas*, une nouvelle désignation a été apportée pour ces bactéries (Yabuuchi *et al.* 1992).

Les espèces que regroupe le genre *Burkholderia* ont des fonctions très diverses, malgré leur phylogénie rapprochée (Fig. 1.1). Il existe aussi les espèces *B. caryophylli*, *B. plantarii*, *B. glumae*, et *B. andropogonis* qui sont reconnues comme étant des pathogènes de plantes. Par exemple, l'espèce *B. caryophylli* est pathogène envers les œillets, mais peut aussi infecter l'oignon (Ballard *et al.* 1970). *B. plantarii* est un pathogène envers les plants de riz, et produit une substance toxique nommée tropolone (Azegami *et al.* 1987). L'espèce *B. glumae* est considérée comme étant le plus grand pathogène du riz dans certaines parties de l'Asie et *B. andropogonis* est pathogène envers le sorgho et la fève de velours (Azegami *et al.* 1987).

La majorité des espèces du genre, par contre, sont reconnus comme étant des microorganismes du sol. Le rôle écologique de plusieurs espèces, notamment *B. glathei*, *B. graminis*, *B. phenazinium*, *B. sacchari*, et *B. caledonica*, n'a pas encore été identifié. Ces espèces ont toutes été isolées à partir de la rhizosphère de plusieurs différentes plantes. Chez ces espèces, par contre, il a été démontré qu'elles peuvent entre autres fixer l'azote atmosphérique et induire la formation de nodules, ce qui est bénéfique pour les plantes et donc servirait à renforcer une relation mutualiste.

Il existe aussi un groupe d'espèces considérées comme ayant plusieurs niches écologiques, où ces bactéries peuvent agir comme pathogène ou agent protecteur, et en même temps peuvent être considérées comme pathogènes pour certains humains. Ces espèces, regroupées sous le nom du complexe *Burkholderia cepacia* (Bcc), ne sont pas pathogènes pour la population générale, mais sont une menace pour les patients immunodéprimés comme les patients atteints de la fibrose kystique, ou les grands brûlés (Coenye et Vandamme 2003). La

bactérie donnant titre au groupe, *Burkholderia cepacia*, a originalement été identifiée comme étant pathogène de l'oignon (Burkholder 1950). Depuis ce temps, des isolats considérés comme étant *B. cepacia* ont été renommés suite à des études taxonomiques, qui ont permis d'observer des différences marquées entre certains isolats (Coenye *et al.* 2001b). À ce jour, il y a 14 différentes espèces regroupées dans le Bcc, suite à l'ajout récent de cinq espèces nouvelles (Vanlaere *et al.* 2008). Le meilleur exemple de la diversité des rôles de ces bactéries est probablement l'espèce *B. ambifaria*, qui est à la fois retrouvée chez les patients immunodéprimés, par exemple dans les poumons des patients atteints de fibrose kystique, et aussi dans la rhizosphère de certaines plantes, où la bactérie sert d'agent protecteur (Coenye *et al.* 2001a).

Une particularité importante de ce genre bactérien est que ces espèces sont hautement résistantes à une grande variété d'antibiotiques, ce qui complexifie l'étude de ces bactéries. En effet, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire, comme les marqueurs de sélection antibiotiques, sont très restreints, surtout en ce qui concerne les espèces très pathogènes, et donc les outils requis pour manipuler génétiquement ces espèces ont été construits de façon à faciliter la tâche (Choi *et al.* 2008; Rholl *et al.* 2008; Thongdee *et al.* 2008).

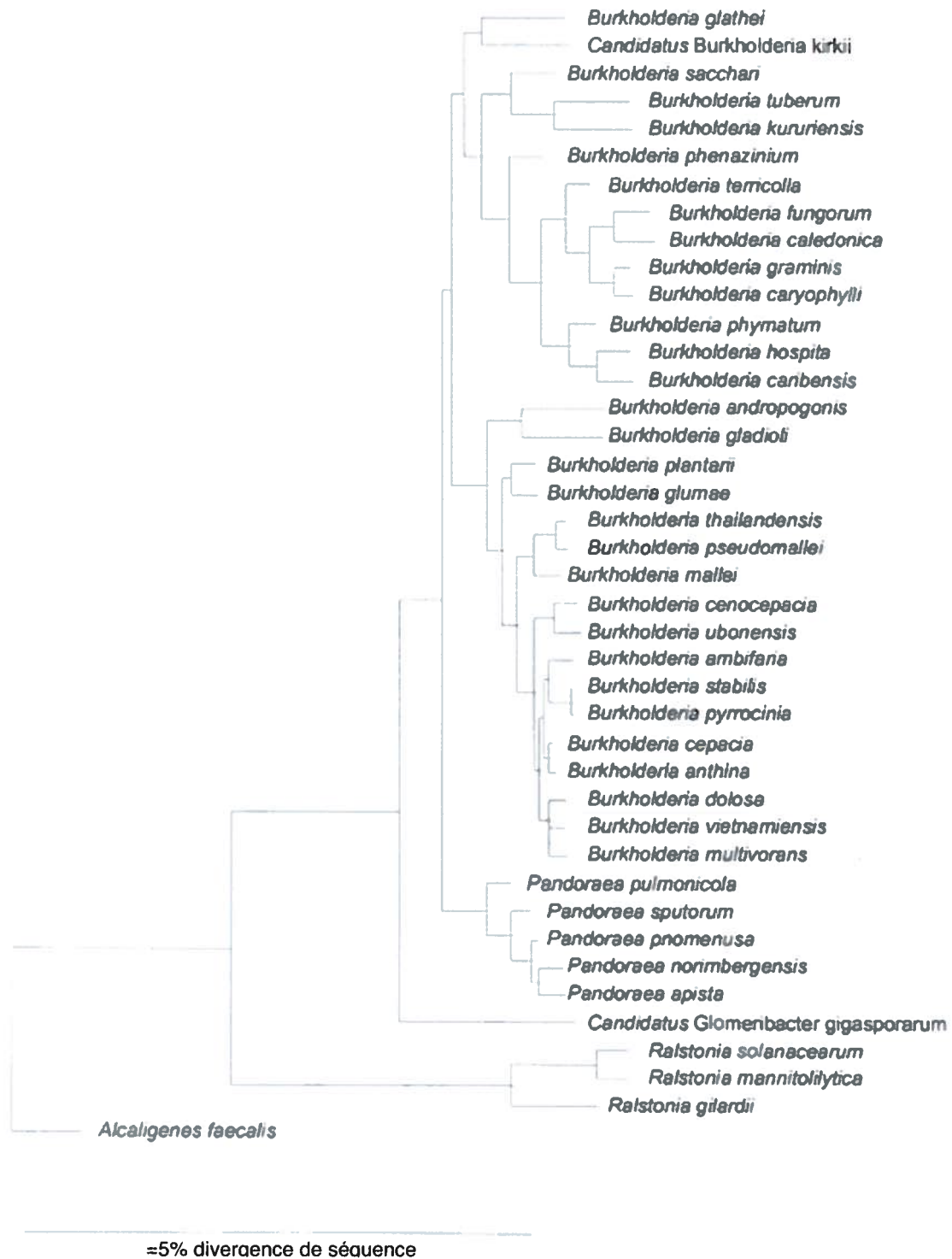


Figure 1.1. Arbre phylogénétique basé sur l'ARNr 16S démontrant la diversité des espèces de *Burkholderia* et d'autres espèces reliées.

Tiré de Coenye et Vandamme 2003.

Il existe tout de même quelques espèces de ce genre qui ne sont pas des pathogènes de plantes, mais plutôt des agents responsables de maladies chez les animaux. Par exemple, l'espèce *B. mallei* est un pathogène causant la morve chez le cheval, l'âne et la mule, et est considérée comme étant extrêmement pathogène pour ces animaux (Coenye et Vandamme 2003).

1.1.1. *Burkholderia pseudomallei*

La bactérie *B. pseudomallei* est une autre des espèces considérées comme un agent pathogène humain. Cette bactérie confère la mélioiïdose à l'humain, et c'est pour cette raison qu'elle est considérée comme un agent pathogène de type 3 (Brett *et al.* 1997). Sa présence dans l'environnement est quand même ubiquitaire, et son isolement est effectué de façon routinière à partir d'eaux stagnantes et les sols humides dans les régions endémiques tels le sud-est de l'Asie et le nord de l'Australie (Brett *et al.* 1997). Le premier cas de mélioiïdose a été rapporté par un médecin de l'armée en Birmanie en 1912 (Aung et Mar 2008). Une particularité intéressante de cette bactérie est sa capacité de latence. En effet, la bactérie peut persister dans l'environnement dans un pH de 5 à 8 pendant des années (Inglis et Sagripanti 2006). Un cas documenté rapporte son développement infectieux dans un patient qui a été exposé à la bactérie 62 ans auparavant (Ngauy *et al.* 2005). La virulence de la bactérie a été étudiée chez le hamster Syrien doré, démontrant différents niveaux d'infection. Certaines des souches ont été nommées comme étant « *pseudomallei-like* », compte tenu de leurs différences phénotypiques et des différences au niveau de la virulence (Brett *et al.* 1997). Ceci a mené à la différenciation entre l'espèce *B. pseudomallei* et la nouvelle espèce *B. thailandensis*, un sujet qui sera abordé plus loin (section 1.1.2).

Initialement, l'identification de *B. pseudomallei* était basée sur un profil analytique API, et son profil était très similaire à *Pseudomonas aeruginosa* (Ashdown 1979b). À ce stade, elle était encore appelée *Pseudomonas pseudomallei* puisque la différenciation qui a menée au genre *Burkholderia* s'est produite beaucoup plus tard. En parallèle avec l'identification par profil API, l'équipe menée par LR Ashdown a identifié un milieu de culture permettant de sélectionner et d'identifier des souches de *B. pseudomallei* et des espèces phylogénétiquement reliées à cette

dernière (Ashdown 1979a). Depuis ce temps, des avancements dans les méthodes d'identification par PCR et plusieurs différents systèmes de profilage, incluant une méthode de distinction par GC/MS des profils de dérivés d'acides gras entre *B. pseudomallei* et *B. thailandensis*, permettent une identification beaucoup plus rapide et efficace (Inglis *et al.* 2003; Inglis *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005; Schmoock *et al.* 2009; Wongprompitak *et al.* 2009).

En plus d'avoir une variété très limitée d'antibiotiques fonctionnels chez *B. pseudomallei*, les meilleurs étant tétracycline et triméthoprim, sa classification comme agent pathogène de Catégorie B due à son potentiel d'utilisation pour le bioterrorisme, fait que l'on peut seulement utiliser trois différents marqueurs de sélection antibiotiques, la kanamycine, zéocine, et gentamicine aux États-Unis (Choi *et al.* 2008). Les études principales sur *B. pseudomallei* portent sur sa virulence, et le système de sécrétion de type III a été identifié comme étant le principal responsable de cette virulence, un sujet qui sera abordé plus loin (Haraga *et al.* 2008).

1.1.2. *Burkholderia thailandensis*

La bactérie *Burkholderia thailandensis* a premièrement été identifiée par le laboratoire de Dr. Donald Woods suite à ses études sur la bactérie *B. pseudomallei*. Plusieurs de ces études démontraient certaines irrégularités par rapport aux phénotypes. Des études plus approfondies sur la caractérisation phénotypique, et le séquençage subséquent de l'ARN ribosomal 16S de plusieurs souches « *pseudomallei*-like », ont mené à la différenciation entre les espèces *B. pseudomallei* et *B. thailandensis* (Brett *et al.* 1997; Brett *et al.* 1998). Parmi les différences entre ces deux souches, ils ont démontré que *B. thailandensis* est presque avirulent, en utilisant le modèle de hamster par administration intrapéritonéale, au contraire de *B. pseudomallei* (Haraga *et al.* 2008). Suite au séquençage des génomes de chacune de ces espèces, il a été remarqué que les génomes sont hautement conservés, et donc certaines caractéristiques peuvent être étudiées chez *B. thailandensis*, et ensuite appliquées chez *B. pseudomallei* (Haraga *et al.* 2008). L'espèce *B. thailandensis* peut donc servir de modèle pour le très pathogène *B. pseudomallei*.

Un exemple de cette similarité entre les deux espèces se trouve dans les systèmes de sécrétion des bactéries. Un de ces systèmes de sécrétion, celui de type III (SSTT) est à un tel point conservé que *B. thailandensis* peut être utilisée comme système modèle pour étudier *B. pseudomallei*, qui est un agent pathogène de type 3, requérant donc des installations de laboratoire très spécialisées et réglementées (Haraga *et al.* 2008). Malgré la grande similarité de certains systèmes entre les deux espèces, la virulence de *B. thailandensis* est presque nulle. Des études sur le sujet démontraient initialement que l'assimilation de l'arabinose chez *B. pseudomallei* dépend de la présence ou absence d'un de ses SSTT, et ce système jouerait un rôle dans la virulence (Winstanley et Hart 2000). Plus tard, il a démontré qu'un système de SSTT est présent chez *B. thailandensis*, et que l'arabinose agirait en tant que répresseur de ce système (Moore *et al.* 2004). Suite à cette publication, Haraga *et al.* ont démontré qu'il existe plusieurs homologues d'effecteurs de SSTT entre ces deux espèces. Aussi, un mutant de SSTT chez *B. thailandensis* a démontré que les fonctions précises de ces systèmes dans les deux bactéries sont pareilles, donc *B. thailandensis* pourrait servir de modèle dans ce cas pour *B. pseudomallei* (Haraga *et al.* 2008). Plusieurs autres systèmes qui sont conservés entre les deux espèces ont premièrement été étudiés chez *B. thailandensis*, et les découvertes ont été ensuite appliquées chez *B. pseudomallei* (Harley *et al.* 1998). Évidemment, il existe parfois des différences entre les deux bactéries, par exemple dans l'assimilation d'autres sources de carbone. *B. thailandensis* peut assimiler, en plus de l'arabinose, le 5-céto-gluconate, et l'adonitol, tandis que *B. pseudomallei* peut assimiler l'erythritol et le dulcitol (Brett *et al.* 1998). Aussi, une série d'expériences a permis d'identifier un polysaccharide capsulaire qui pourrait être un facteur de virulence chez *B. pseudomallei* (Reckseidler *et al.* 2001).

D'autres études portant sur la différence de virulence entre les deux espèces, malgré leur phylogénie similaire, ont permis d'avancer les connaissances sur le fonctionnement de chacun (Kespichayawattana *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005). Donc, comme on peut observer, quoiqu'il existe des similarités significatives entre les deux espèces, leur distinction est nécessaire. Une analyse phylogénétique du gène ribosomal ARNr 16S démontre bien la similarité entre les deux espèces comme démontré à la figure 1.1.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif ubiquitaire dans l'environnement (Britigan *et al.* 1997). En effet, cette espèce est entre autres retrouvée dans les milieux hospitaliers, et est une source importante d'infections nosocomiales (Floret *et al.* 2009). C'est un pathogène opportuniste qui infecte principalement les patients immunodéprimés, comme les plaies des grands brûlés et les poumons des individus atteints de la fibrose kystique (Britigan *et al.* 1997; Pier *et al.* 1996). Le séquençage du génome de plusieurs souches de *P. aeruginosa*, les plus connues étant PAO1 (Stover *et al.* 2000) et PA14 (Lee *et al.* 2006), a permis d'avancer grandement les recherches. D'autres études portant sur le génome de cette bactérie, par exemple à l'aide de banques de mutants obtenues par mutagenèse aléatoire du génome, ont permis d'avancer les recherches, et à ce jour, *P. aeruginosa* est une des bactéries les plus exhaustivement étudiées (Jacobs *et al.* 2003; Liberati *et al.* 2006).

Initialement, il a été démontré que plusieurs souches de *P. aeruginosa* isolées de patients humains pouvaient infecter des plantes, mais la majorité de ces souches a été regroupée dans le genre *Burkholderia* par la suite. *P. aeruginosa* est tout de même pathogène pour le modèle végétal *Arabidopsis thaliana*, selon les études démontrant une spécificité d'infection de certains écotypes de cette plante selon la souche de *P. aeruginosa* utilisée (Rahme *et al.* 1995). L'hypothèse suggérée pour expliquer ce phénomène est que la plante pourrait avoir développé des mécanismes de résistance à certaines souches de la bactérie.

1.3. Quorum sensing

Les bactéries utilisent des systèmes de communication intercellulaire, appelé *quorum sensing* (QS), pour coordonner leurs activités. Chez les bactéries à Gram négatif, ces systèmes de communication se font principalement par l'entremise de petites molécules extracellulaires qui sont diffusibles (Fuqua *et al.* 1996). Le premier système de QS qui a été découvert était chez *Vibrio fischeri*, une bactérie retrouvée chez certains animaux marins, et parmi les activités régulées par QS est la fluorescence de cette bactérie (Sitnikov *et al.* 1995). Il existe aussi des systèmes de QS chez les bactéries à Gram positif, mais les molécules-signal sont des peptides, et

la captation du signal est différente (Miller et Bassler 2001). L'utilisation de QS mène à l'activation ou la répression d'une multitude de gènes, notamment les gènes reliés à la virulence chez certaines bactéries (Miller et Bassler 2001).

Le système de QS le plus étudié est sans doute le système LuxI/LuxR. Dans ce système, une protéine synthase de type LuxI synthétise la molécule-signal, une acyl-homosérine-lactone (AHL). La concentration de cette molécule augmente lorsque diffusée à l'extérieur de la cellule en fonction de la densité cellulaire (Fig. 1.2). Lorsque cette concentration atteint un certain seuil, la molécule agit en tant que ligand à un régulateur transcriptionnel de type LuxR. Ce régulateur aura pour rôle d'activer la transcription de plusieurs gènes-cibles, incluant le gène *luxI* codant pour la synthase responsable de la production du signal. Ceci forme donc une boucle de rétroaction positive, qui est une composante essentielle d'un système de QS (Miller et Bassler 2001).

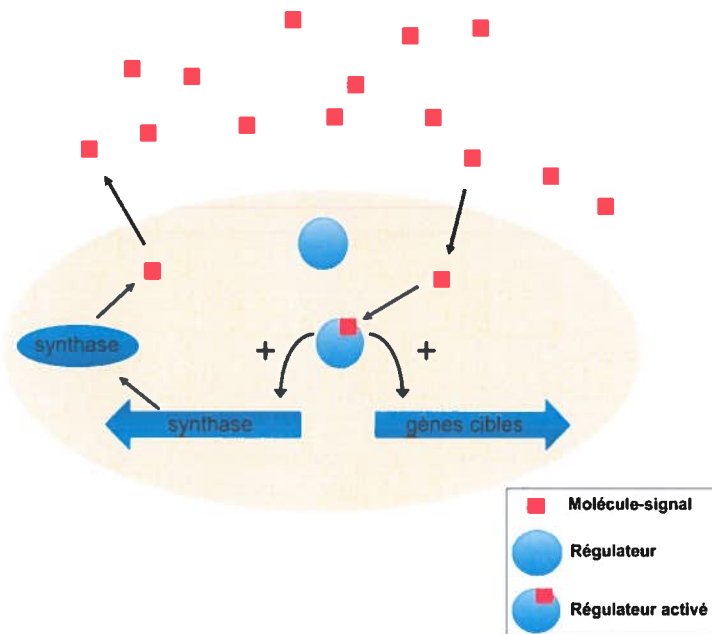


Figure 1.2. Représentation graphique d'un système typique de QS LuxI/LuxR.

On voit l'activation de la production du signal, son exportation par diffusion, et son rôle comme ligand activateur de transcription. Adapté de Fuqua *et al.* 1996.

Le système d'activation de ces gènes permettrait aux bactéries d'être invisibles au système immunitaire de l'hôte jusqu'à ce que la densité cellulaire soit adéquate pour envahir les défenses de l'hôte, augmentant les chances d'une infection efficace (Eberl 2006).

Un autre système de QS a été plus récemment découvert chez *P. aeruginosa* (Déziel *et al.* 2004; Dubern et Diggle 2008; Pesci *et al.* 1999). La structure chimique des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ), est différente des AHL (Fig. 1.3), mais les deux systèmes de QS semblent connectés par leur régulation globale, ce qui sera abordé plus loin (voir section 1.3.2.1). Des résultats récents ont également démontré que les HAQ sont présent chez d'autres espèces de bactéries à Gram négatif (voir section 1.4). On ne sait cependant pas si les HAQ jouent un rôle dans le QS chez ces autres espèces.

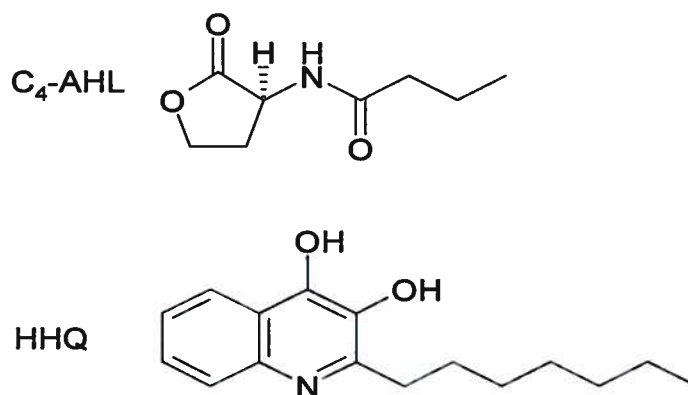


Figure 1.3. Représentation des molécules-signal de QS de la famille des AHL (C₄-AHL) et de la famille des HAQ (HHQ) chez *P. aeruginosa*.

1.3.1. Le *quorum sensing* chez *Burkholderia* : systèmes d'acyl-homosérine-lactones

Comme la vaste majorité des espèces bactériennes à Gram négatif, les bactéries du genre *Burkholderia* utilisent des systèmes de QS pour coordonner leurs activités bactériennes. Les AHL produites varient d'une espèce à l'autre, et l'élément variable est la longueur de la chaîne alkyl. Il a été observé que cette chaîne peut avoir de 4 à 12 carbones chez *Burkholderia* (Lewenza *et al.* 1999)

L'évidence que *Burkholderia* produit des signaux de communication a été trouvée lors d'une étude sur les exoproduits sécrétés par *B. cenocepacia*, en comparaison avec *P. aeruginosa*. Lors de cette étude, les auteurs ont évalué la production de lipases, protéases, et sidérophores chez *B. cenocepacia* en absence et présence de surnageant de culture de *P. aeruginosa* PAO1 et ont noté une différence importante. Vu que la synthèse de ces produits est contrôlée par le QS

chez *P. aeruginosa*, les auteurs ont suggéré que les AHL dans le surnageant de PAO1 ont pu activer les gènes requis pour la production des exoproduits chez *B. cenocepacia*, et donc catalysant la communication inter-espèces (McKenney *et al.* 1995). Suite à cette découverte, la même équipe a effectué une mutagenèse aléatoire par transposon et criblé des colonies de *B. cenocepacia* produisant un excès de sidérophores sur milieu CAS (Schwyn et Neilands 1987). Ceci a mené à l'identification d'un mutant produisant environ 50% plus de sidérophores, et le gène muté codait pour un régulateur de la famille LuxR (Lewenza *et al.* 1999). Suite à la découverte de ces gènes homologues à LuxRI, qu'ils ont nommés CepRI, les auteurs ont caractérisé l'AHL produite par ce système, l'octanoyl-homosérine-lactone (C₈-AHL). Aussi, le C₆-AHL est un produit de la synthase CepI (Lewenza *et al.* 1999). De plus, il existe une séquence de liaison de type *lux* en amont de CepI, confirmant la régulation de ce gène par un homologue LuxR comme CepR (Lewenza et Sokol 2001). Lorsque l'on effectue des recherches informatiques dans le but de trouver des homologues CepRI dans les espèces de *Burkholderia*, on remarque que le système est bien conservé chez plusieurs des espèces. Des études plus approfondies portant sur l'impact du régulateur CepR ont démontré qu'il contrôle plusieurs facteurs de virulence, incluant l'ornibactine, la motilité de type « swarming », et la maturation de biofilms chez *B. cenocepacia* (Huber *et al.* 2001; Lewenza *et al.* 1999; Lewenza et Sokol 2001).

CepR contrôle aussi une zinc métalloprotéase, nommée ZmpA, qui a été démontrée comme étant un facteur important dans la virulence, suite à son étude dans le modèle de la souris (Sokol *et al.* 2003). Cette protéase aurait un impact sur l'infection des voies respiratoires chez ce modèle animal, et donc les auteurs indiquent que l'expression des protéases régulée par CepRI pourrait être responsable en partie de la virulence de la bactérie (Sokol *et al.* 2003). Des études plus approfondies sur les facteurs de virulence ont démontré qu'une autre métalloprotéase dépendante du zinc, ZmpB, est impliquée dans la virulence, et est sous le contrôle du système CepRI (Kooi *et al.* 2006).

Suite à la découverte d'un système de QS de type Lux chez une espèce de *Burkholderia*, des études ont portées sur des homologues de ce système chez les autres espèces du complexe *Burkholderia cepacia*. En effet, la vaste majorité des espèces produisent du C₈-AHL, mais la concentration produite de cette molécule varie largement entre les espèces, donc plusieurs

facteurs pourraient intervenir dans l'expression de CepRI (Gotschlich *et al.* 2001). L'espèce *B. vietnamiensis* produit majoritairement du C₁₀-AHL, à un facteur de 10:1 par rapport au C₈-AHL, démontrant un nouveau système de QS nommé BviRI (Conway et Greenberg 2002). Le système *cciRI* chez *B. cenocepacia* a aussi été étudié en détail, démontrant une plus grande complexité (Malott *et al.* 2005). Ainsi, la région promotrice ne contient pas un site de liaison de type LuxR pour le régulateur CciR. Pourtant, la présence de ce régulateur est nécessaire pour l'expression de *cciI*. En tout, les auteurs démontrent que ce système contrôle positivement la motilité de type « swarming », ce qui semble être un trait commun à tous les systèmes d'AHL chez les espèces de *Burkholderia*.

Le QS chez les espèces *B. pseudomallei* et *B. mallei* semble plus complexe. Plusieurs régulateurs chez *B. pseudomallei* ont été identifiés, notamment le système BpsRI utilisant la C₈-AHL (Song *et al.* 2005). En tout, cinq homologues LuxR et trois homologues LuxI ont été identifiés chez *B. pseudomallei* (Ulrich *et al.* 2004a). Des analyses du surnageant de culture ont été effectuées pour déterminer les AHL produits par cette espèce, et cinq molécules ont été identifiées : C₈-AHL, C₁₀-AHL, 3-hydroxy-C₈-AHL, 3-hydroxy-C₁₀-AHL, et 3-hydroxy-C₁₄-AHL. Les trois gènes codant pour les synthèses homologues LuxI sont responsables de la synthèse de ces AHL, par contre une mutation dans les synthèses *bpmI1* et *bpmI3* ne réduit pas la production de ces molécules, laissant croire que la synthase *bpmI2* joue un rôle important dans le contrôle de la production (Ulrich *et al.* 2004a). Dans cette même étude, les auteurs ont noté une diminution de la virulence de la bactérie dans des modèles de souris et de hamsters lorsque les gènes des synthèses sont mutés, démontrant donc le rôle essentiel du QS dans la virulence chez *B. pseudomallei* aussi.

De nombreuses études sur le QS ont aussi porté sur *B. thailandensis* en raison de sa grande similarité phylogénétique à *B. pseudomallei*. En effet, comme chez cette dernière, *B. thailandensis* a trois synthèses homologues à LuxI et cinq régulateurs homologues à LuxR (Ulrich *et al.* 2004b). Originellement, les AHL produites par ces gènes de QS ont été identifiées comme étant le C₆-AHL, C₈-AHL, et le C₁₀-AHL. Ces systèmes de production de AHL joueraient un rôle dans la production de lipases et de β -hémolysines, et aussi affecteraient le métabolisme de carbohydrates (Ulrich *et al.* 2004b). Les auteurs ont aussi associé la production

de chacune des molécules à une synthase spécifique : BtaI1 est responsable de la production de C₈-AHL, BtaI2 est responsable de la production de C₆-AHL, et BtaI3 est responsable de la production de C₁₀-AHL. Par contre, il a plus tard été démontré par CL/SM/SM que les AHL majoritairement produit par *B. thailandensis* sont différents de ceux décrit par Ulrich et al, qui utilisait la chromatographie en couche mince. Le C₈-AHL serait produit via les gènes *btaI1* et *btaI3*, le 3-oxo-C₁₀-AHL serait produit par *btaI2*, le 3-oxo-C₈-AHL et une quantité faible de 3-oxo-C₁₂-AHL seraient produit par les trois synthases (Fig. 1.4) (Chandler *et al.* 2009; Duerkop *et al.* 2009). Pour sa part, le régulateur BtaR2 semble répondre au 3-oxo-C₈-AHL et au 3-oxo-C₁₀-AHL. Ces mêmes auteurs ont découvert la présence d'un antibiotique produit par *B. thailandensis* sous le contrôle du système BtaRI2. Cet antibiotique dépend de l'expression de plusieurs gènes dans un îlot situé entre BTH_II1233 et BTH_II1241 (Duerkop *et al.* 2009; Seyedsayamdost *et al.* 2010). Cet îlot d'environ 120kb est conservé entre les espèces *B. thailandensis* et *B. pseudomallei*, mais absent chez *B. mallei*. De ces gènes, quatre variantes de la molécule nommée bactoboline sont produits (Seyedsayamdost *et al.* 2010). Il est présumé qu'une délétion de ces gènes, qui ne sont pas requis pour la virulence de ce pathogène animal, est survenue au cours de l'évolution pour réduire la taille de son génome (Duerkop *et al.* 2009).

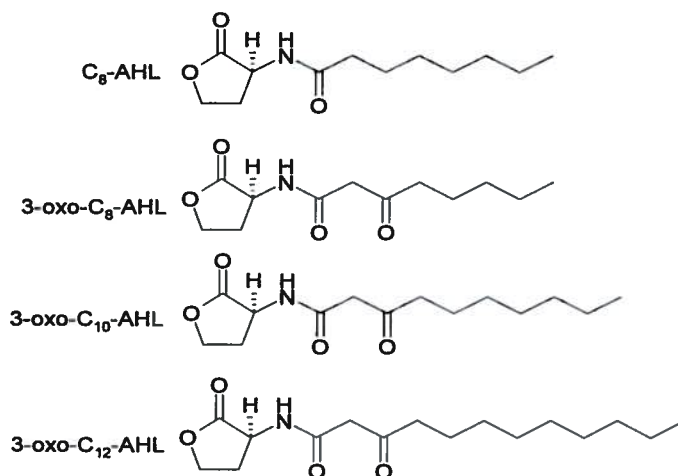


Figure 1.4. Représentation des structures chimiques des AHL produites par *B. thailandensis* selon Duerkop *et al.* 2009.

Évidemment, un mutant dans les trois synthases (*btaI1 btaI2 btaI3*⁻) perd complètement la production de AHL chez cette bactérie. Une observation qui a été notée chez les mutants déficients en AHL est l'absence de formation d'agrégats remarquée chez la souche sauvage de *B. thailandensis* E264. Dans le triple mutant *btaI1,2,3*⁻, par exemple, aucune formation d'agrégats

a été observée, et un ajout exogène de C₈-AHL ou 3-oxo-C₈-AHL a rétabli le phénotype sauvage. Le système BtaRII a été démontré comme étant responsable de l'aggrégation. Finalement, des études sur l'influence de ces trois systèmes de QS ont démontré que le QS n'a pas d'impact sur la virulence chez les souris (Chandler *et al.* 2009).

1.3.2. Le quorum sensing chez *P. aeruginosa*

1.3.2.1. Système d'acyl-homosérine-lactones

La découverte de systèmes de QS chez *P. aeruginosa*, plus particulièrement des systèmes utilisant des AHL (Jones *et al.* 1993), a mené à la découverte des signaux principaux, le 3-oxo-C₁₂-AHL et le C₄-AHL (Pearson *et al.* 1994; Pearson *et al.* 1995). Les deux systèmes principaux de régulation chez cette bactérie sont les systèmes *las* et *rhl*. Le système *lasR/lasI* contrôle la synthèse de 3-oxo-C₁₂-AHL tandis que le système *rhlR/rhlI* contrôle la synthèse de C₄-AHL (Fuqua *et al.* 1996). Les deux synthases RhlI et LasI sont régulées par RhlR et LasR, et ces derniers sont aussi responsables de la régulation de plusieurs facteurs de virulence. Par ailleurs, il a été démontré que la synthèse de ces AHL se produit à différents stades de croissance de la bactérie – l'oxo-C₁₂-AHL est produit tôt dans sa croissance, et le C₄-AHL est produit plus tardivement. Il a rapidement été découvert que chacun de ces systèmes exerce une influence sur l'autre, notamment que la protéine LasR exerce une influence de stimulation sur l'expression de RhlR (Pesci *et al.* 1997). Des découvertes récentes dans l'étude de la hiérarchie du QS chez *P. aeruginosa* ont démontré une régulation très complexe, impliquant notamment RhlR en tant qu'activateur du système *las*, comme on le voit dans le modèle le plus récent à la figure 1.5 avec les flèches hachurées (Dekimpe et Déziel 2009).

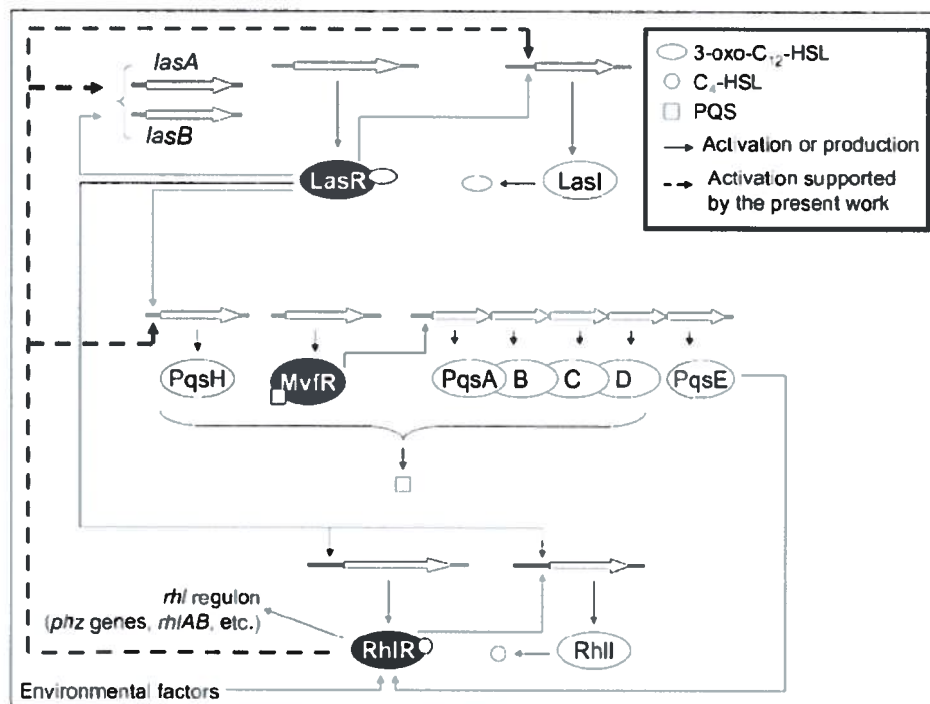


Figure 1.5. Représentation de la hiérarchie de la régulation des systèmes de QS *las* et *rhl*.
Tiré de Dekimpe et Déziel, 2009.

On voit donc que les deux systèmes de QS sont étroitement reliés dans leur régulation, et que les facteurs influençant l'expression des AHL démontrent une complexité qui n'est pas encore complètement résolue. On remarque aussi que toute la cascade d'activation de ces gènes est largement affectée par les facteurs environnementaux, et donc l'expression de ces gènes est extrêmement variable (Dekimpe et Déziel 2009).

1.3.2.2. Système *pqsABCDE-mvfR*, un deuxième système de QS

Il existe un deuxième système de QS chez *P. aeruginosa*, utilisant des molécules de HAQ. L'opéron *pqsABCDE* est nécessaire pour la production de cette famille de molécules (Fig. 1.6), dont la molécule HHQ est la base (Fig. 1.3). Il existe aussi plusieurs dérivés du HHQ. La protéine *PqsH* est responsable pour son hydroxylation en position 3, donnant une nouvelle molécule qui a pour nom le « *Pseudomonas* Quinolone Signal », ou PQS (Pesci *et al.* 1999). La transcription de l'opéron *pqsABCDE* est contrôlée par *MvfR*, un régulateur de type LysR, un sujet abordé à la section 1.5.1.

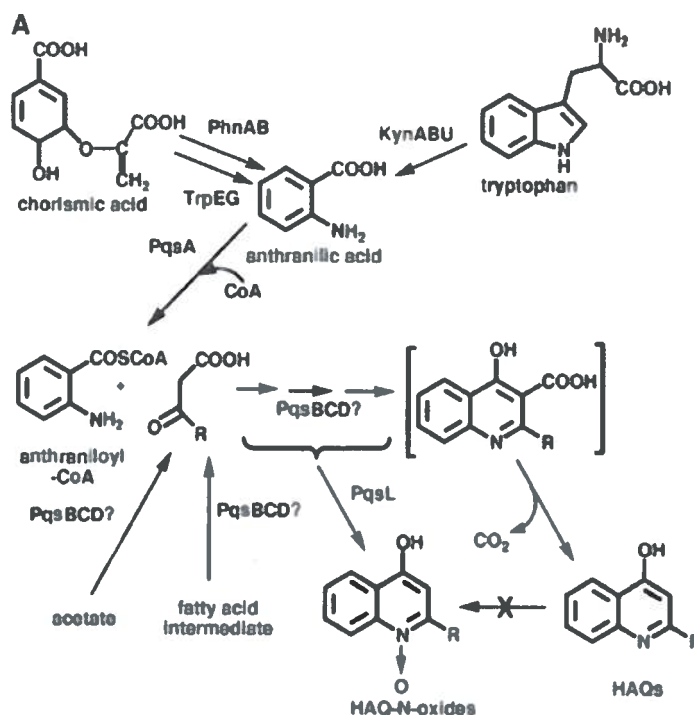


Figure 1.6. Représentation graphique de la production des HAQ chez *P. aeruginosa*.

L'expression des gènes *pqsABCD* mène à la production de molécules HAQ à partir du précurseur, l'acide anthranilique (AA), qui lui est dérivé soit du tryptophane ou de l'acide chorismique. Adapté de Vial *et al.* 2008.

Les molécules HHQ et PQS sont connues depuis déjà une dizaine d'années comme étant des molécules-signal impliquées dans divers aspects du QS (Dubern et Diggle 2008). Par exemple, le PQS est requis pour activer des gènes de virulence, comme l'expression des phénazines. D'autres études portant sur les précurseurs et intermédiaires de cette voie de synthèse ont démontré que l'inhibition compétitive du précurseur du HHQ, l'acide anthranilique (AA), avec des dérivés halogénés de l'acide anthranilique peuvent inhiber la production de HAQ et diminuer la virulence de la bactérie (Lesic *et al.* 2007). Le farnesol, une molécule-signal produite par *Candida albicans* impliquée dans les interactions inter-espèces, a aussi été identifiée comme un inhibiteur de la transcription de l'opéron *pqs* (Cugini *et al.* 2007).

Le HHQ et le PQS sont aussi des ligands activateurs de MvfR, le régulateur transcriptionnel de l'opéron *pqsABCDE* (Xiao *et al.* 2006a). En effet, des études portant sur le PQS et le HHQ ont démontré que chacune peut activer MvfR dans la transcription de *pqsABCDE*, formant ainsi la boucle de rétroaction positive typique d'un système de QS où la molécule produite induit sa propre production. Par contre, le PQS est beaucoup plus efficace en

tant que ligand de MvfR que le HHQ, représentant une activation presque 100 fois plus importante (Xiao *et al.* 2006a). Dans ce même article, les auteurs ont démontré que le PQS est requis pour activer des gènes de virulence, comme l'expression des phénazines, laissant donc penser que le PQS est le ligand naturel de MvfR. Cependant, un mutant *pqsH*- est tout aussi virulent que la souche sauvage dans le modèle de la souris brûlée, démontrant ainsi l'importance du HHQ (Xiao *et al.* 2006a).

Le système *pqsABCDE-phnAB-mvfR* est un système contrôlant non seulement sa propre induction, mais ayant aussi un pouvoir de régulateur sur plusieurs autres gènes de virulence. Son expression et sa régulation sont très complexes, et il semble que quelques facteurs soient encore non-identifiés. La fonction de *pqsE*, quoique encore indéterminée, a un rôle important dans la virulence, notamment dans la production de pyocyanine, même si les niveaux de HHQ et PQS dans un mutant *pqsE*- ne sont pas affectés par rapport à la souche sauvage (D'Argenio *et al.* 2002). PqsE n'est pas requise pour la production du PQS, mais semble être nécessaire pour son action finale, plus spécifiquement dans l'activation de la virulence. Certaines équipes de recherche ont élaboré l'hypothèse que PqsE serait impliquée dans l'hierarchie du QS au niveau du système *rhl* (Farrow *et al.* 2008). Il existe une autre enzyme impliquée dans le système de l'opéron *pqs*, PqsL, responsable de la conversion du précurseur du HHQ en une autre molécule, le 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HAQNO) (Fig. 1.6) (Lépine *et al.* 2004).

1.4. Système *hmqABCDEFG* et similarités avec le système *pqsABCDE-mvfR*

Suite à la découverte du système de QS des HAQ chez *P. aeruginosa*, des recherches bioinformatiques ont permis de déterminer que plusieurs espèces du genre *Burkholderia* ont des gènes homologues aux gènes *pqsABCDE* (Diggle *et al.* 2006). Ces auteurs ont montré que le premier gène homologue chez *B. pseudomallei*, nommé par les auteurs *hhqA*, pouvait compléter un mutant *pqsA*- chez *P. aeruginosa*. Par contre, les auteurs n'ont pas démontré la présence d'une molécule-signal chez *Burkholderia*, et aucun autre lien n'a été fait entre la présence de ces gènes et la communication interbactérienne. Suite à cela, l'équipe du Dr. Déziel a identifié le HAQ principal produit par cet opéron, le HMAQ avec une substitution C₉ insaturé

en position 2 (Vial *et al.* 2008). Cette molécule appartient à la famille des HAQ mais avec un groupement méthyl en position 3 (Fig 1.7). De plus, une investigation plus exhaustive a permis d'identifier un opéron homologue chez plusieurs espèces de *Burkholderia* (Tableau 1.1).

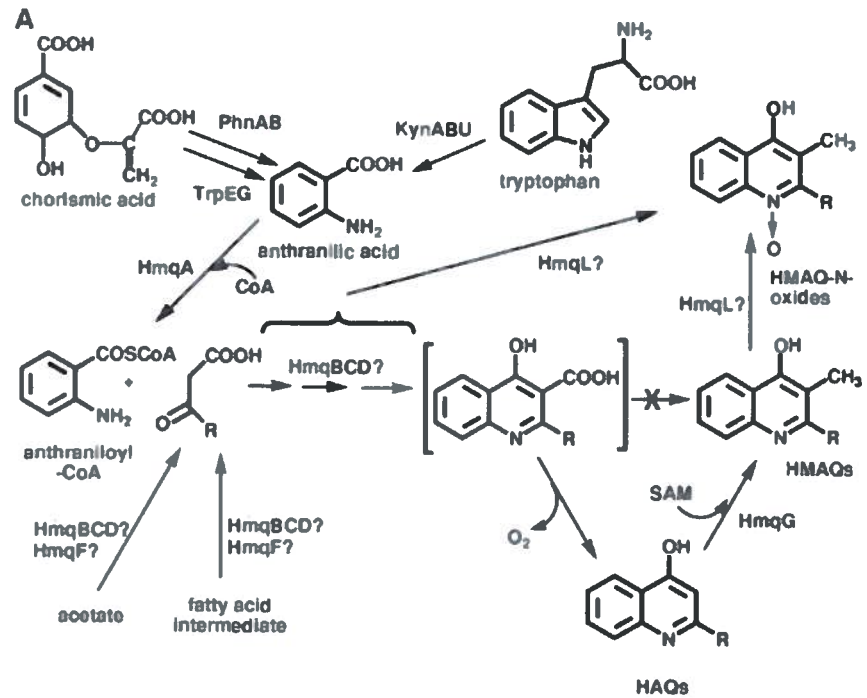


Figure 1.7. Représentation graphique de la synthèse d'HMAQ chez certaines espèces de *Burkholderia*.

Adapté de Vial *et al.* 2008.

Tableau 1.1. Résumé des espèces ayant un opéron *hmqABCDEFG* homologue à celui trouvé chez *B. thailandensis* E264.

Pour chacune des espèces ayant un opéron homologue, l'emplacement sur le chromosome est noté, selon les annotations fournies par burkholderia.com.

Espèce	Emplacement de l'opéron
<i>B. thailandensis</i> E264	BTH_II1935-BTH_II1929
<i>B. ambifaria</i> AMMD*	Bamb_5763-Bamb_5769
<i>B. pseudomallei</i> K96243	BPSS0481-BPSS0487
<i>B. oklahomensis</i> C6786	BokIC_010100020706-BokIC_010100020736
<i>B. ubonensis</i> Bu	BuboB_010100021936-BuboB_010100021966

*Utilisée comme référence pour *B. ambifaria* HSJ1.

En comparant les voies de synthèses de chacune des molécules d'HMAQ chez *Burkholderia* et d'HHQ chez *P. aeruginosa*, on voit qu'il existe des questions irrésolues par rapport à l'ordre des étapes de synthèse, notamment dans la production du HMAQNO, catalysé par HmqL (Fig. 1.9). Par contre, il faut noter que seules *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* ont aussi *hmql* sur leur génome (Vial *et al.* 2008).

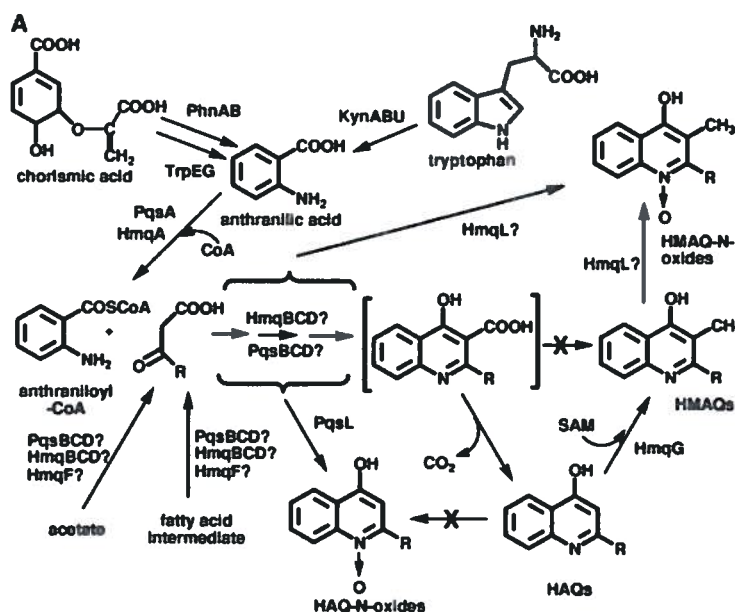


Figure 1.9. Représentation graphique de la synthèse d'HAQ chez *P. aeruginosa* et certaines espèces de *Burkholderia*.

Adapté de Vial *et al.* 2008.

1.5. Famille de régulateurs transcriptionnels de type LysR

La famille des régulateurs transcriptionnels de type LysR (LTTR) a été très bien étudiée jusqu'à maintenant, et a été observée presque partout dans le monde bactérien, et des orthologues de ces régulateurs ont même été trouvés chez des eucaryotes (Maddocks et Oyston 2008; Perez-Rueda et Collado-Vides 2001). Cette désignation a été choisie suite aux nombreuses études portées sur le régulateur LysR, un activateur de *lysA* qui est une carboxylase impliquée dans la production de la lysine. Ce groupe incluait à l'origine neuf protéines, incluant cette dernière retrouvée chez *E. coli*, mais au cours du temps, des protéines de nombreux genres bactériens ont été regroupées dans cette famille suite à des études d'homologie (Henikoff *et al.* 1988; Maddocks et Oyston 2008). C'est en fait le groupe de protéines se liant à l'ADN le plus

abondant, incluant plus de 800 membres suite à des recherches informatiques se basant strictement sur l'homologie de la séquence protéique, avec de nouveaux membres découverts sur une base régulière (Maddocks et Oyston 2008; Schell 1993).

Les LTTR ont initialement été identifiés comme des régulateurs d'un seul gène, mais il a été découvert qu'ils pouvaient contrôler la transcription d'opérons, et même être des régulateurs transcriptionnels globaux (Heroven et Dersch 2006). La fonction d'un LTTR dépend au moins en partie d'un ligand permettant son activation et ces systèmes forment habituellement une boucle de rétroaction positive pour l'activation de la production du ligand. Un LTTR a aussi comme particularité d'inhiber sa propre expression chez certains modèles lorsqu'il est à proximité de son promoteur-cible et lorsqu'il est actif (Picossi *et al.* 2007; van Keulen *et al.* 2003).

Une composante commune à tous les LTTR est le motif de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice (HTH) (Maddocks et Oyston 2008). Des petites variations dans ce motif expliquent la variabilité de la fonction de chaque LTTR dans des espèces différentes. Par exemple, de façon générale, l'emplacement du domaine HTH en C-terminal est conservé chez les activateurs transcriptionnels, et son emplacement en N-terminal est conservé chez les répresseurs (Perez-Rueda et Collado-Vides 2000). Par contre, certains LTTR ont leur domaine HTH à environ 20-90 acides aminés du N-terminal, et peuvent donc agir en tant qu'activateur ou répresseur (Maddocks et Oyston 2008).

La liaison d'un régulateur transcriptionnel à l'ADN se fait selon une séquence d'ADN spécifique, mais dans le cas d'un LTTR, la liaison peut se faire de -210 à -10 paires de bases du site d'initiation de la traduction (Viswanathan *et al.* 2007; Wilson *et al.* 1995). Ces régulateurs peuvent en fait se lier à deux sites différents, nommés ABS pour « activation binding site » et RBS pour « regulatory binding site » (Maddocks et Oyston 2008). La séquence précise de liaison sur la région promotrice a été identifiée. Cette séquence de 13 nucléotides représente une symétrie dyadique, ce qui est démontré à la figure 1.10. Le premier nucléotide doit être un T et le dernier un A, et les 11 nucléotides entre ces deux doivent former une symétrie complémentaire. Ainsi, si le deuxième nucléotide est un C, l'avant dernier doit être un G, etc.

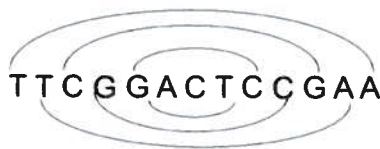


Figure 1.10. Représentation de la séquence de liaison d'un régulateur transcriptionnel de type LysR, MvfR.

Cette séquence se trouve à -513 pb du site d'initiation de la traduction (Xiao *et al.* 2006b).

Cette séquence se trouve aux sites de liaison RBS et ABS. Ce dernier se situe en aval du RBS et donc plus près du site d'initiation de la transcription (Parsek *et al.* 1994). Par contre, la séquence consensus au site ABS n'est pas une symétrie dyadique, ayant comme seule particularité une séquence T-N₁₁-A (Parsek *et al.* 1994). L'affinité de liaison à la boîte LTTR dépend de la conformation de la protéine – en effet, si le LTTR est lié à son ligand, alors l'affinité pour un site par rapport à l'autre sera affectée (Maddocks et Oyston 2008). Lorsque le ligand est reconnu par le régulateur, ce complexe aura de l'affinité seulement pour l'ABS, et lorsque le régulateur est seul et sans ligand, il aura de l'affinité que pour le RBS (Tropel et van der Meer 2004). Les régulateurs LTTR sont connus comme fonctionnant sous forme de tétramères, comprenant un dimère à chaque site de liaison (Muraoka *et al.* 2003). Ainsi, les deux dimères ensemble sont capable d'induire une nouvelle conformation d'ADN en pliant ce dernier pour que les deux forment un tétramère, comme on le voit à la figure 1.11.

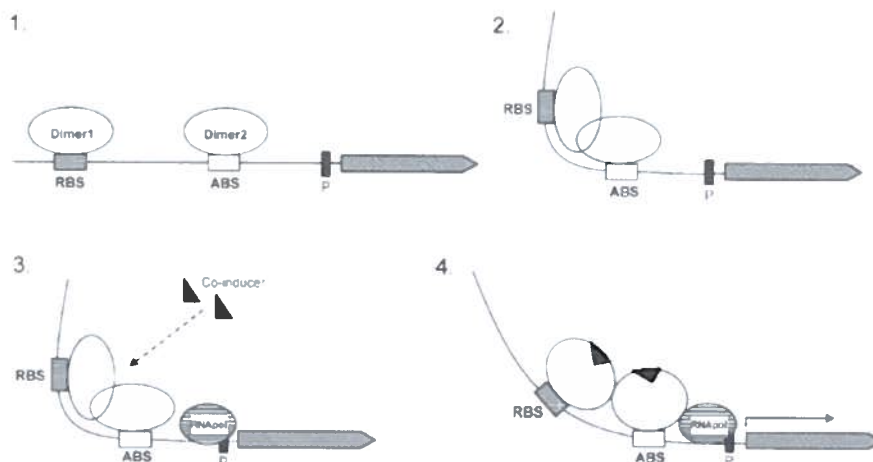


Figure 1.11. Représentation de l'interaction entre les dimères d'un régulateur LTTR typique et les changements de conformation de l'ADN reliés à cette interaction.

Tiré de Maddocks et Oyston 2008.

En premier lieu, on remarque les deux dimères se liant aux sites de liaison ABS et RBS. Ensuite, les interactions entre les deux dimères font que l'ADN sera susceptible à un changement de conformation. En troisième lieu, on voit la liaison de l'ARN polymérase pour démarrer la transcription. Par contre, l'ARN polymérase n'est pas activée par le tétramère de LTTR si le ligand ne s'y lie pas. En dernier lieu, la liaison du ligand au LTTR permet l'activation de la transcription du gène-cible. Selon les études déjà effectuées, la position de cette région-complexe et le degré de changement de conformation causé par un LTTR, de façon générale, ne sont pas reliés au rôle du régulateur, soit en tant qu'activateur ou répresseur. Par contre, le degré de changement de conformation de l'ADN est influencé par la présence ou absence du ligand sur le régulateur (van Keulen *et al.* 1998). Évidemment, des études si poussées sur le fonctionnement de chaque membre de la famille LTTR sont rares, et il est probable que certains fonctionnent autrement.

1.5.1. MvfR, un régulateur transcriptionnel de type LysR

La découverte de la production du PQS par *P. aeruginosa* a vite mené à la recherche de gènes responsables de sa régulation, et de facteurs pouvant influencer la virulence de la bactérie (Pesci *et al.* 1999). L'équipe de Dr. Laurence Rahme a découvert un gène régulateur responsable d'une atténuation de la virulence de *P. aeruginosa* en utilisant *Arabidopsis thaliana* et la souris comme modèles d'infection (Cao *et al.* 2001). Ils ont aussi remarqué qu'une mutation dans ce gène provoque une perte de la production de pyocyanine, un pigment bleu impliqué dans la virulence chez cette bactérie, ainsi qu'une atténuation de la production d'élastase et de phospholipase, entre autres. De plus, ils ont quantifié la production de la molécule de PQS chez ce mutant, et ils ont noté une diminution d'environ 90% (Cao *et al.* 2001).

Des études plus approfondies ont apporté beaucoup de clarifications sur l'impact direct de MvfR sur la virulence bactérienne. Par exemple, MvfR contrôle directement l'opéron *pqs* et les gènes *phnAB* (Déziel *et al.* 2004). Dans ce même article, il a été élaboré que la production de PQS n'est pas directement contrôlée par MvfR. Ce dernier contrôle les gènes *pqsABCDE*, et l'expression de cet opéron produit la molécule HHQ qui est le précurseur du PQS, donc il est normal que MvfR, affectant le HHQ, affectera aussi indirectement la production de PQS, comme

démontré à la figure 1.6 (Déziel *et al.* 2004). Par contre, MvfR n'est pas directement impliqué dans le contrôle de PqsH, l'enzyme responsable de l'hydroxylation du HHQ en PQS. La régulation de PqsH se ferait plutôt par LasR (Déziel *et al.* 2004; Gallagher *et al.* 2002). L'implication de MvfR dans la régulation de l'opéron *pqsABCDE* est confirmée en regardant la région promotrice de cet opéron, où une séquence de liaison de type LysR a été trouvée (Xiao *et al.* 2006b).

Il était déjà connu que les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* sont régulés au moins en partie par les régulateurs transcriptionnels LasR et RhlR. Cao *et al.* (2001) ont donc déterminé par quantification de l'activité transcriptionnelle de MvfR n'est pas affectée dans des mutants *lasR*- et *rhlR*-. Inversement, l'activité transcriptionnelle de *lasR* et *rhlR* n'est pas affectée dans un mutant *mvfR*- par rapport à la souche sauvage. On pouvait donc à ce point en conclure que MvfR agit indépendamment des deux régulateurs dans son contrôle du PQS. Ensuite, l'équipe de Pesci a démontré l'effet activateur de LasR et l'effet répresseur de RhlR sur MvfR, remettant donc en question les résultats obtenus par Cao *et al.* en 2001 (Wade *et al.* 2005). Le système des HAQ est donc dépendant des systèmes *las* et *rhl*; en effet, il a été prouvé que LasR active la transcription de *mvfR*, et RhlR réprime la transcription de *pqsA* et donc entre en compétition avec MvfR pour la transcription de l'opéron *pqs*, ce qui contredit les résultats obtenus par Wade (Xiao *et al.* 2006b). La boîte *lux*, qui est le site d'attachement pour la protéine régulatrice RhlR, est située à -311 pb du codon d'initiation de la transcription de *pqsA*, tandis que la boîte de type LysR qui est le site de reconnaissance pour la liaison de *mvfR* est située à -45 pb de ce même codon d'initiation (Xiao *et al.* 2006b).

En caractérisant davantage, les auteurs ont déterminé que MvfR est un LTTR, mais que comparativement à la majorité de ces derniers, MvfR n'a aucune influence sur sa propre transcription, ce qui a été déterminé par quantification de sa transcription. MvfR ferait donc partie d'une nouvelle classe de LTTR puisque l'élément de régulation négative provient des molécules produites par les gènes qu'il contrôle (Cao *et al.* 2001).

Des études portant sur le spectre d'activité de MvfR ont démontré l'expression différentielle de plusieurs groupes de gènes dans un mutant *mvfR*- par rapport à la souche

sauvage, ce qui a été fait par des biopuces à ADN (Déziel *et al.* 2005). Parmi ces gènes, on retrouve les opérons *pqs/phn*, ainsi que des gènes reliés à la synthèse de phénazines (opérons *phz*), et des gènes impliqués dans la production de facteurs de virulence, comme le cyanure d'hydrogène (*hcnABC*) et la chitinase (*chiC*). Dans le même article, les auteurs ont démontré que *pqsE* est essentiel pour l'activité du système de régulation (Déziel *et al.* 2005). En fait, PqsE serait le médiateur principal de plusieurs facteurs de virulence en absence de PQS ou de MvfR, mais la présence de RhIR est requise pour l'activation de PqsE. De plus, cette dernière est requise pour que le PQS active le système de QS *rhl*, sauf lorsque l'on ajoute du C₄-AHL exogène, ce qui est le produit de ce système (Farrow *et al.* 2008).

1.6. Homologies entre *hmqABCDEFG* et *pqsABCDE* : contextes chromosomiques

En comparant les contextes chromosomiques des opérons homologues *pqsABCDE* et *hmqABCDEFG*, on peut constater plusieurs différences. Premièrement, chez les espèces de *Burkholderia* ayant cet opéron, il existe deux gènes additionnels, *hmqF* et *hmqG*, qui sont absents du génome de *P. aeruginosa*. L'enzyme HmqG est responsable de la méthylation de la molécule, donnant ainsi le HMAQ (Vial *et al.* 2008). Aussi, le régulateur transcriptionnel MvfR contrôlant l'opéron *pqsABCDE* est situé en aval à proximité de ce dernier, comme on voit à la figure 1.12. Par contre, il n'existe aucun régulateur transcriptionnel chez *Burkholderia* à proximité de *hmqABCDEFG*, ni les gènes *phnAB* qui sont aussi régulés par MvfR chez *P. aeruginosa*. En ce qui concerne un ligand potentiel pour un régulateur transcriptionnel de type LysR chez *Burkholderia*, les HMAQ, étant similaires aux HAQ produits par *P. aeruginosa*, pourraient avoir ce rôle, une question non-répondue jusqu'à maintenant.

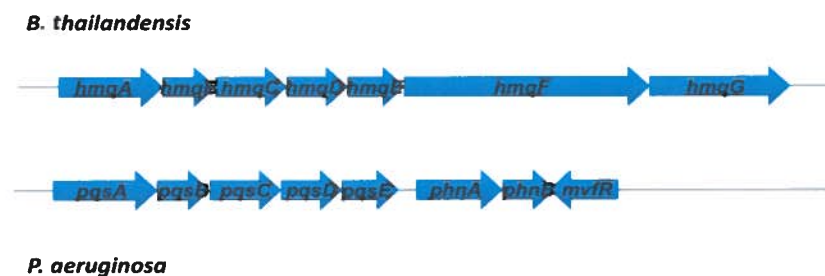


Figure 1.12. Représentation de l'organisation génétique des opérons *pqs* chez *P. aeruginosa* et *hmq* chez *B. thailandensis*.

La région promotrice en amont de *hmqA* doit contenir une séquence de liaison d'un régulateur transcriptionnel. Si on tente de trouver une séquence de liaison de type LysR dans cette région, contenant le même motif reconnu par MvfR, on remarque qu'elle est absente. On pourrait donc présumer que la régulation de la production de HMAQ est d'un type différent que le HHQ et PQS chez *P. aeruginosa*.

Par contre, il existe plusieurs différentes variantes de la séquence de liaison de symétrie diadique, donc on ne peut pas exclure la possibilité que la régulation de l'opéron *hmq* soit contrôlée par un régulateur LTTR. De plus, en pensant à la complexité de régulation des systèmes de QS chez *P. aeruginosa*, on peut présumer qu'il existe plusieurs différents facteurs de régulation des HMAQ, formant ainsi une cascade de régulation. Il est donc important d'identifier les gènes reliés au contrôle de l'opéron.

1.7. Le locus *tad/cpa* : un îlot génomique conservé

Les études sur la bactérie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ont mené à la découverte d'un îlot génomique comprenant des gènes impliqués dans l'adhérence et la formation de biofilms tenaces. Des mutants de cet opéron perdent leur morphologie très rugueuse et deviennent lisses, perdant leur potentiel d'agrégation (Kachlany *et al.* 2000). Cet opéron comprend sept gènes qui, selon les prédictions informatiques, sont impliqués dans la formation de pili de type Flp. Les gènes dans cet îlot ont été nommés *tad* pour «tight adherence», ce qui peut se traduire par «adhérence tenace». Une des observations immédiates des auteurs était la conservation de ces gènes à travers plusieurs différents genres bactériens qui avaient été séquencés à ce temps, de *Yersinia pestis* à *Pasteurella multocida* (Kachlany *et al.* 2000). L'hypothèse initiale de l'importance de cette adhérence était qu'elle pourrait contribuer à la virulence de la bactérie. Sept gènes ont été désignés comme étant requis pour l'adhérence tenace, et ont été nommés *tadABCDEFG*. Parallèlement, des recherches chez d'autres bactéries, notamment *Caulobacter crescentus*, des gènes en opéron ont été identifiés comme ayant une influence sur la formation de biofilms et la synthèse de pili, et ces gènes ont été nommés *cpa* (Skerker et Shapiro 2000). La majorité des gènes dans les deux systèmes sont homologues, et c'est pour cette raison que l'opéron est maintenant connu sous le nom de *tad/cpa*.

Des recherches informatiques ont été effectuées pour démontrer à quel point les gènes *tad* sont conservés entre les genres bactériens, et il a été démontré qu'au moins 74 espèces ont au moins une copie de ces gènes dans leur génome, dont *B. pseudomallei* (Rosenfeld *et al.* 2004). Cette dernière semble avoir trois copies de cet îlot de gènes, aussi appelé le « Widespread Colonization Island » (WCI). Par recherche informatique, on peut aussi démontrer la présence de deux copies de cet opéron chez *B. thailandensis*, de BTH_I2450-BTH_I2461 et de BTH_I2565-BTH_I2276. Par contre, malgré la conservation des gènes entre les genres bactériens, le rôle précis des gènes *tad* reste variable entre les espèces, donc on ne peut pas attribuer une fonction spécifique. Chez *P. aeruginosa*, on sait que le régulateur global de QS VqsR contrôle l'expression de plusieurs des gènes *tad* suite à des analyses transcriptomiques, donc ces gènes semblent être sous le contrôle du QS (Juhas *et al.* 2005; Schuster *et al.* 2003; Wagner *et al.* 2003).

Chez d'autres espèces, par contre, comme *Caulobacter crescentus*, la régulation se fait à partir du régulateur CtrA qui régule aussi le cycle cellulaire de la bactérie (Laub *et al.* 2000; Skerker et Shapiro 2000). Il existe un autre facteur de régulation nommé PleC, qui est un senseur histidine kinase, qui lorsqu'activé et à la bonne position par rapport au flagelle va activer l'assemblage des pili à l'aide de PilA (Viollier *et al.* 2002a; Viollier *et al.* 2002b). Ces deux facteurs sont les principaux joueurs, chez *C. crescentus* et *P. aeruginosa*, dans une cascade d'assemblage des pili de type IVb, qui sont responsables de l'agrégation et l'adhérence bactérienne (de Bentzmann *et al.* 2006).

2. Matériels et Méthodes

2.1. Bactéries

Les bactéries étudiées étaient la souche E264 de *B. thailandensis* isolée par l'équipe de Donald Woods en Thaïlande (Brett *et al.* 1998). La souche HSJ1 de *B. ambifaria* a été isolée à l'hôpital Ste-Justine (Mtl) du sputum d'un individu atteint de fibrose kystique (Vial *et al.* 2008). Un résumé des souches utilisées se trouve dans le tableau 2.1.

Les mutants *hmqA*⁻ de chacune de ces deux souches ont été générés par recombinaison homologue avec un plasmide contenant une cassette de résistance pour le chloramphénicol flanquée par des fragments du gène à muter (Vial *et al.* 2008). Ainsi, cette mutation polaire invalide la traduction du gène muté, et de tous les gènes dans l'opéron. Dans chacun des cas, l'insertion s'est produite telle que démontrée dans la figure 2.1.



Figure 2.1. Représentation graphique de l'emplacement de la mutation dans *hmqA* chez *B. thailandensis hmqA*⁻.

La position des amorces utilisées pour l'essai de qRT-PCR est aussi démontrée pour *B. thailandensis*. Donc, malgré la mutation, la transcription du gène est tout de même détectée lors de l'essai de qRT-PCR (voir section 2.7) (Vial *et al.* 2008).

La souche *E. coli* SM10 contient sur son chromosome un système de transfert RP4. Ce système, composé de gènes de type IncP, est habituellement localisé sur un vecteur, permettant la mobilisation d'un plasmide par conjugaison avec n'importe quelle bactérie à Gram négatif comme cible (Simon *et al.* 1983). Ceci rend donc la bactérie SM10 apte à conjuguer un vecteur par elle-même lorsqu'elle entre en contact avec une bactérie receveuse.

2.2. Plasmides

Le transposon IS/*lacZ*/hah (6,16 kpb) est porté par le plasmide pIT2 (Jacobs *et al.* 2003). Il s'agit d'un transposon dérivé de l'élément IS50L du transposon Tn5, capable de s'insérer dans le génome d'une souche receveuse de manière aléatoire. Ce transposon contient un gène de résistance à la tétracycline, ainsi qu'un gène *lacZ* complet. IS/*lacZ*/hah est flanqué de sites *loxP*, qui peuvent être reconnus par la recombinase Cre. Suite à une recombinaison des deux sites *loxP*, la mutation résultante est une insertion de 63 codons codant pour une étiquette d'hexahistidine (hah) (Jacobs *et al.* 2003). Le plasmide pUT/Km contient un minitransposon de type Tn5, qui peut s'insérer aléatoirement dans le génome de la bactérie receveuse (Fig. 2.9). Ce transposon contient un marqueur de résistance à la kanamycine permettant de sélectionner les bactéries qui l'ont intégré. Le plasmide, quant à lui, contient un gène de résistance à l'ampicilline (de Lorenzo *et al.* 1990).

Le plasmide mini-CTX-*lacZ* est un vecteur recombinant permettant l'insertion génomique dans le site silencieux d'insertion du phage CTX. L'insertion peut inclure un gène ou une région promotrice en amont du gène *lacZ* permettant ainsi la quantification de l'activité d'expression du gène en question. Le plasmide contient aussi un gène de résistance à la tétracycline, permettant de sélectionner une bactérie ayant incorporé la construction *lacZ* (voir section 2.5.1) (Hoang *et al.* 2000).

Le vecteur d'expression pME6000 contient un marqueur de résistance à la tétracycline. Ce plasmide est un dérivé du plasmide pBBR1, isolé chez *Bordetella bronchiseptica* (Antoine et Loch 1992). Il contient aussi un promoteur fonctionnel chez les espèces du complexe *Burkholderia cepacia* en amont du site de clonage multiple (Lefebvre et Valvano 2002). Ainsi, lorsqu'on clone un gène dans ce site, le gène résultant est exprimé constitutivement. Ce plasmide a été utilisé pour l'étude de complémentation du gène BTH_I1403. Un résumé de la description des plasmides utilisés se trouve dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 Bactéries et plasmides utilisés dans cette étude.

Souche	Caractéristiques	Collection ED	Référence ou source
<i>B. thailandensis</i>			
E264	Isolat environnemental	ED324	(Brett <i>et al.</i> 1998); Provenance ATCC700388
<i>hmqA</i> -	Cm ^R	ED351	(Vial <i>et al.</i> 2008)
<i>B. ambifaria</i>			
HSJ1	isolat clinique	ED336	Patient FK, Hôpital Ste-Justine
<i>hmqA</i> -	Cm ^R	ED350	(Vial <i>et al.</i> 2008)
<i>E. coli</i>			
DH5α	F' <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169, hsdR17(γ_K⁻ m_K⁺), λ-</i>	ED74	
SM10	<i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km^r λpir</i>	ED222	(Simon <i>et al.</i> 1983)
Plasmides	Caractéristiques	Référence	
pIT2	contient le transposon IS <i>lacZ</i> /hah, Tc ^R ,	ED47	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
pJPD1	<i>hmqA-lacZ</i> (<i>B. thailandensis</i>), Tc ^R ,	ED638	Cette étude
pJPD2	<i>hmqA-lacZ</i> (<i>B. ambifaria</i>), Tc ^R ,	ED632	Cette étude
pJPD3	pME6000::BTH I1403, Tc ^R	ED989	Cette étude
pFLPe4	<i>rhaS-rhaR-P_{rhaBAD}-FLPe</i> , Ap ^R , Km ^R ,	ED509	(Choi <i>et al.</i> 2008)
mini-CTX- <i>lacZ</i>	FRT-attP-Ω- <i>lacZ</i> -MCS-Ω-FRT, Tc ^R ,	ED196	(Hoang <i>et al.</i> 2000)
pUT/Km	Contient le transposon mini-Tn5, Km ^R	ED767	(de Lorenzo <i>et al.</i> 1990)
pME6000	pBBR1 ori, Tc ^R , <i>lacZ</i> , <i>mob</i> ⁺	ED772	(Maurhofer <i>et al.</i> 1998)

2.3. Milieux de culture

Les souches ont été cultivées en milieu liquide Tryptic Soy Broth (TSB) (BD – Difco Laboratories) avec agitation dans un tambour rotatif à 240 tours par minute ou sur milieu solide TSB avec 1,5% agar (BD - Difco Laboratories) à 37°C.

Pour le criblage de colonies ne produisant pas de HMAQ selon le phénotype visuel, le milieu de culture solide était la recette décrite par Ashdown, consistant en 3% p/v TSB, 1,5% p/v agar, 4% v/v glycérol, 5 mg/L crystal violet, et 50 mg/L rouge neutre (Ashdown 1979a). La tétracycline (225 µg/ml) était ajoutée pour sélectionner les bactéries ayant incorporé le transposon, et la gentamycine (50 µg/ml) était ajoutée pour sélectionner contre la souche donneuse du transposon *E. coli*.

Pour la détection de sidérophores, le milieu de culture Chrome Azurol S (CAS) a été utilisé. Ce milieu contient un colorant lié à un ion de fer. Lorsque des sidérophores sont produits par la bactérie, ils cliveront cette liaison, et donc le colorant sera libéré, ce qui induit un changement de couleur du milieu (Schwyn et Neilands 1987).

Pour le criblage de colonies avec un défaut d'expression de l'opéron *hmqABCDEFG* selon la sélection bleu/blanc en utilisant le rapporteur *hmqA-lacZ* chromosomique, le milieu de culture solide était 3% TSB, 1,5% agar, 40 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal), 100 µg/ml kanamycine, et 50 µg/ml gentamycine. Les antibiotiques étaient ajoutés pour sélectionner les colonies ayant incorporé le transposon (kanamycine), et pour inhiber la souche donneuse du transposon *E. coli* SM10λpir (gentamycine).

2.4. Criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production de HMAQ

2.4.1. Mutagenèse aléatoire avec ISlacZ/hah

La mutagenèse aléatoire de *B. thailandensis* a été effectuée par conjugaison. En premier lieu, une culture sur la nuit de *B. thailandensis* E264 (ATCC 700388) et une de *E. coli* SM10λpir contenant pIT2/ISLacZ ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,05 pour croître jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,5, ce qui correspond à une incubation d'environ 5 heures à 37°C. Ensuite, les bactéries ont été récoltées par centrifugation pendant trois minutes à 8000 x g et dispersées dans 100 µl de NaCl 0,8% stérile. Après une incubation sur gélose TSB de 24 heures à 37°C, les bactéries ont été récoltées et des dilutions étalées sur géloses TSB avec 225 µg/ml tétracycline et 50 µg/ml

gentamycine pour sélectionner contre *E.coli*, pour une incubation de 48 heures à 37°C. La dilution pour avoir le nombre optimal de colonies par gélose a été déterminée pour le criblage.

Le criblage, fait sur le milieu de culture gélosé Ashdown contenant les mêmes concentrations antibiotiques, d'environ 70000 colonies a été effectué sur des plaques de polystyrène de 20 cm x 20 cm contenant 200 ml de milieu, et chaque gélose contenait environ 500 colonies. La détection a été effectuée visuellement à l'aide des différences phénotypiques entre le phénotype d'une souche qui produit des HMAQ et une souche qui n'en produit pas suite à une incubation de 96 heures à 37°C.

Après la sélection de candidats intéressants, des courbes de croissance ont été effectuées afin de déterminer si les bactéries avaient des défauts de croissance, ce qui pourrait nuire aux analyses ou fausser l'interprétation des résultats. Ensuite, la quantification des HMAQ produits par chacun des candidats a été effectuée en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL/SM). Suite à l'isolement de mutants considérés intéressants selon leur phénotype et suite à la confirmation d'un défaut de production de HMAQ par CL/SM, les gènes mutés dans chacun de ces mutants ont été identifiés selon la méthode de PCR semi-aléatoire nichée en deux rondes (Jacobs *et al.* 2003).

2.4.2. Courbes de croissance

Les courbes de croissance ont été effectuées avec l'appareil BioScreen (OY Growth Curves AB, Ltd, Helsinki, Finlande), qui permet incubation, agitation et suivi de la croissance par spectrophotométrie. La cinétique de croissance a duré 24 heures pour remarquer les défauts de croissance potentiels de certains mutants, qui étaient incubés à 37°C. Un prélèvement de la croissance cellulaire par densité optique (DO) (mode balayage, 420-580 nm) a été pris à chaque 15 minutes pour toutes les cultures. L'inoculation des cultures a été faite à partir de cultures de 16 heures, et ajusté à une DO₆₀₀ initiale de 0,05. Les cultures ont été effectuées en triplicata pour évaluer la précision.

2.4.3. Détection et quantification des HMAQ par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse

Pour préparer les échantillons pour l'analyse par CL/SM, 500 µl de chaque culture à analyser a été prélevé. Ensuite, 500 µl de méthanol contenant le standard interne, HHQ-D₄, à une concentration de 5 mg/L (concentration finale dans l'analyte : 2.5 mg/L) a été ajouté. 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 16000 x g pendant 15 minutes. Ensuite, 500 µl de l'échantillon ont été prélevés et transférés dans un vial en borosilicate (Vial *et al.* 2008).

Les analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (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 Agilent Eclipse XDB-C₈ de 4,5 x 150 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, jusqu'à la marque des 10 min. De 10 à 24 minutes, le gradient change encore graduellement vers 100% acétonitrile, et suite à cela, la concentration retourne à 100% H₂O pour le restant du programme, c'est-à-dire un total de 29 min. L'éluant est pompé à un taux de 0,4 ml/min. Le volume d'échantillon injecté est de 20 µl. Les analyses ont été effectuées par électronebulisation en mode positif. Le voltage du capillaire était de 3 kV et le voltage du cône était de 21V. La température de la source était de 120°C et celle de désolvatation 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-C_{9,2} principal produit par *B. thailandensis* est détecté à un m/z de 284, et le HMAQ-C_{7,2} principal produit par *B. ambifaria* est détecté à un m/z de 256. 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 quotient résultant de ces deux chiffres a été multiplié par la concentration du standard interne.

2.4.4. Identification du site d'insertion des transposons par amplification PCR double

Suite à l'isolement de transposants considérés intéressants selon leur phénotype, les sites d'insertion du transposon ont été identifiés afin de connaître le gène affecté, selon la méthode de PCR semi-aléatoire nichée en deux rondes (Jacobs *et al.* 2003). En utilisant une amorce spécifique au transposon et trois amorces aléatoires pour la première ronde, on obtient un nombre indéterminé d'amplicons de longueurs différentes ayant comme origine commune l'extrémité du transposon. Par la suite, une deuxième amplification PCR est effectuée en utilisant une amorce interne spécifique au transposon et commune aux amorces aléatoires, amplifiant ainsi les produits spécifiques de la première ronde de PCR. Suite à l'amplification, les résultats des PCR ont été envoyés au Centre d'innovation Génome Québec (Université McGill) pour le séquençage, en utilisant une amorce spécifique au transposon et interne à l'amorce de la deuxième ronde de PCR (Fig. 2.1).

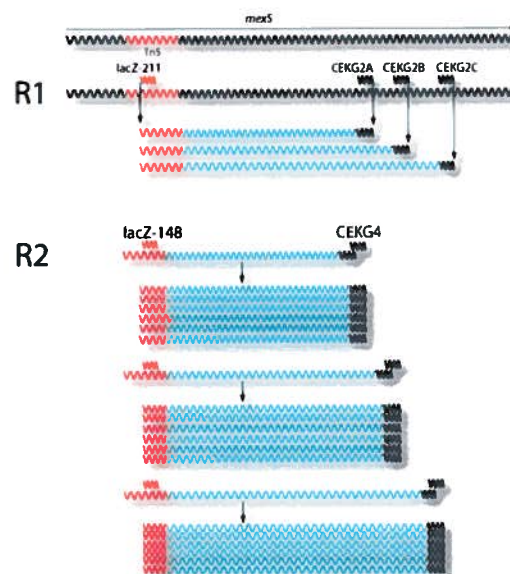


Figure 2.1. Représentation visuelle de la technique d'identification de l'emplacement d'un transposon dans un génome bactérien.

Tiré de Tremblay 2007.

Les réactifs utilisés pour chaque ronde sont présentés au tableau 2.2.

Tableau 2.2. Réactifs utilisés pour l'amplification PCR, ronde 1 et ronde 2.

A) Ronde 1 :

Réactif	µl par réaction
10X Tampon TSG	1
dNTPs 10mM	0,2
Amorce lacZ, ronde 1 (LacZ211)	0,5
Amorce aléatoire 1 (CEKG2A)	0,2
Amorce aléatoire 2 (CEKG2B)	0,2
Amorce aléatoire 3 (CEKG2C)	0,2
H ₂ O	7,1
TSG Enzyme	0,1
ADN matrice	0,4
Total	10

B) Ronde 2 :

Réactif	µl par réaction
10X Tampon TSG	5
dNTPs 10mM	1
Amorce lacZ, ronde 2 (LacZ148)	2,5
Amorce aléatoire, ronde 2 (CEKG4)	2,5
H ₂ O	36,4
TSG Enzyme	0,1
Produit de la ronde 1	2,5
Total	50

Le tableau 2.3 présente les étapes pour la réaction de PCR pour chaque ronde.

Tableau 2.3. Étapes de réaction pour les amplifications PCR, ronde 1 et ronde 2.

A) Ronde 1

Étape	Temp	Temps (min)	# cycles
1	94°C	12	1
2	94°C	0,5	6
3	42°C	0,5	
4	72°C	3	
5	94°C	0,5	
6	64°C	0,5	25
7	72°C	3	
8	72°C	7	

B) Ronde 2

Étape	Temp	Temps (min)	# cycles
1	94°C	10	1
2	94°C	0,5	30
3	64°C	0,5	
4	72°C	3	
5	72°C	7	

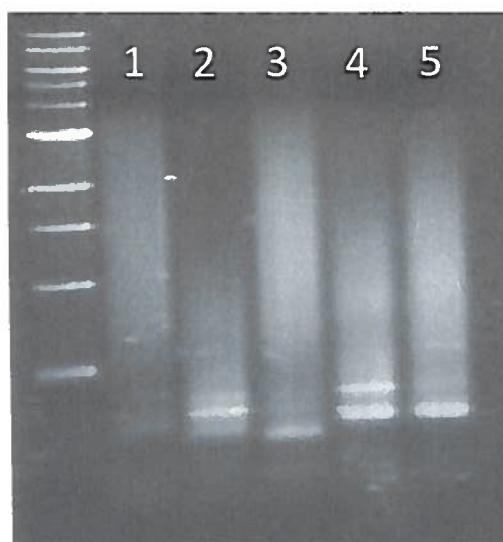


Figure 2.2. Exemple de gel d'agarose représentant les amplifications obtenues suite à deux rondes de PCR semi-aléatoires nichées.

Le marqueur de poids moléculaire (1Kb) est dans le premier puits. Les amplifications obtenues suite aux rondes sont de tailles aléatoires.

La Figure 2.2 présente un exemple de résultat démontrant le profil d'amplification PCR suite à la deuxième ronde. On remarque qu'il y a plusieurs bandes dans chaque puits. Ceci est normal puisqu'il y a quatre différentes amorces dans la première ronde, donnant lieu à plusieurs amplifications semi-aléatoires. Il est donc possible que deux des amorces aléatoires aient amplifié un fragment. Par contre, ces fragments non-spécifiques ne seront pas séquencés, puisque l'amorce spécifique au transposon est employée pour le séquençage. Donc, le séquençage est spécifique au transposon, et non aux amorces aléatoires.

2.5. Criblage en utilisant le rapporteur chromosomique *hmqA-lacZ*

2.5.1. Construction de rapporteurs miniCTX-*hmqA-lacZ* chromosomiques

La première étape pour la construction d'un rapporteur *hmqA-lacZ* chromosomique est de déterminer si le plasmide miniCTX-*lacZ* peut se recombiner dans le génome (Hoang *et al.* 2000). Pour que cela soit possible, il existe un site sur le plasmide nommé *attP* qui doit reconnaître une séquence complémentaire spécifique sur un génome, nommée *attB* et composée d'une vingtaine de nucléotides. Sans cette séquence, la recombinaison dans le génome de ce plasmide est impossible – expliquant pourquoi le plasmide ne se recombine pas au génome de *E.*

coli, la souche donneuse du plasmide. Il a donc fallu vérifier qu'il existait un site *attB* sur les génomes de *B. ambifaria* et *B. thailandensis*, puisque l'utilisation de vecteurs CTX chez ces espèces de *Burkholderia* n'avait pas été rapportée dans la littérature. Après des recherches informatiques sur le site burkholderia.com, j'ai confirmé qu'il existait une séquence correspondant à la séquence de reconnaissance *attB* dans chacun des génomes de ces espèces. La séquence *attB* est composée de 27 nucléotides et a pour séquence GTTCGAATCTCACCGCCTCCGCCATAT. Chez *B. thailandensis*, le site d'attachement du phage CTX est sur le premier chromosome, à la position du gène BTH_I1581, codant pour l'ARNt de la sérine. Chez *B. ambifaria*, le site d'insertion est situé à la position du gène Bamb_R0027, qui code aussi pour l'ARNt de la sérine (Fig. 2.3).

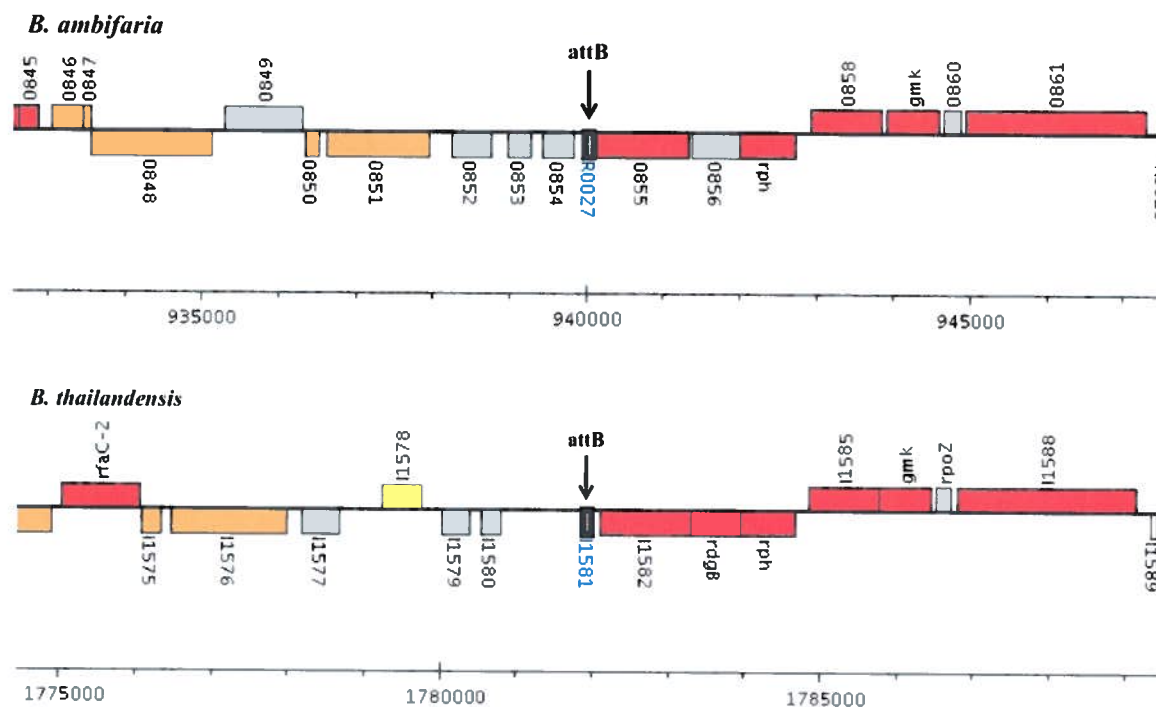


Figure 2.3. Représentation graphique de l'emplacement du site d'insertion *attB* où le plasmide miniCTX-*lacZ* s'insère chez *B. ambifaria* (haut) et *B. thailandensis*.

Schématisation adaptée de burkholderia.com.

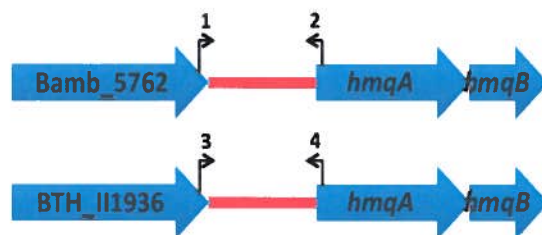


Figure 2.4. Représentation de la région promotrice de l'opéron *hmq* pour *B. ambifaria* et *B. thailandensis*.

Les amorces construites pour l'amplification promotrice étaient, pour *B. ambifaria*, pTZhmqAAL-3 (1) et pTZhmqAAR (2), et pour *B. thailandensis*, pTZhmqATL-3 (3) et pTZhmqATR (4). Une amplification par PCR en utilisant ces amorces permettra d'amplifier le promoteur ainsi qu'une petite partie du gène en amont, et du gène *hmqA*.

En utilisant les séquences disponibles sur burkholderia.com et en utilisant la souche *B. cepacia* AMMD comme référence, les amorces pTZhmqATR, pTZhmqAAR, pTZhmqATL-3, et pTZhmqAAL-3, dont les séquences sont dans le tableau 2.4, ont été conçues afin d'amplifier la région en amont du site d'initiation de la traduction (ATG) et devant contenir la région promotrice, et ensuite de la cloner dans le vecteur miniCTX-*lacZ* (Figs. 2.4 et 2.5). Chacune de ces amorces contient un site de restriction pour une enzyme. Les amorces pTZhmqATR et pTZhmqAAR contiennent un site de reconnaissance pour l'enzyme BamHI et les amorces pTZhmqATL-3 et pTZhmqAAL-3 contiennent un site de reconnaissance pour l'enzyme EcoRI. Les enzymes de restriction ont été choisies ainsi puisqu'elles se trouvent dans le site de clonage multiple (SCM) en amont du *lacZ* dans lequel je voulais cloner la région promotrice. La sélection de deux différentes enzymes de restriction a ainsi permis le clonage directionnel de mon insert. Suite à une amplification PCR de cette région promotrice, une digestion enzymatique par ces enzymes a été effectuée, ainsi qu'une digestion enzymatique du plasmide miniCTX-*lacZ* par les mêmes enzymes. Ensuite, une ligation de l'amplification PCR digérée avec le plasmide digéré a été effectuée. Le résultat était des plasmides rapporteurs *lacZ* avec le promoteur de l'opéron *hmq* ainsi que 23 codons de *hmqA* de *B. thailandensis* ou *B. ambifaria* contrôlant l'expression de *lacZ*. Le plasmide contient aussi un site *attP* qui peut reconnaître son homologue *attB* si présent sur le génome, comme décrit auparavant.

Tableau 2.4. Amorces utilisées lors de cette étude.

Amorce	Séquence (5' → 3')	Référence
LacZ211	TGCGGGCCTCTTCGCTATTA	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
LacZ148	GGGTAACGCCAGGGTTTTCC	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
LacZ124L	CAGTCACGACGTTGTAAAACGACC	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
CEKG2A	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNAGAG	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	(Jacobs <i>et al.</i> 2003)
pTZhmqATL-3	AAAAGAATTCAAGACGGGTGCGATTCT	Cette étude
pTZhmqATR	CGCGGATCCGGCAACTCGAAGACGAACTC	Cette étude
pTZhmqAAL-3	AAGAATTCATCCCGACTAGCTGGTGATG	Cette étude
pTZhmqAAR	CGCGGATCCGTTCTTCGACTGCGGTATCC	Cette étude
LacZCTerm	CGGTCGCTACCATTACCAG	Cette étude
P7U	CTGCAGGCATGCAAGCTTCG	(Karlyshev <i>et al.</i> 2001)
P6U	CGAGCTCGAATTCGGCCTAG	(Karlyshev <i>et al.</i> 2001)
P7M	GCCGAACCTGTGTATAAGAGTC	(Karlyshev <i>et al.</i> 2001)
P6M	GCCAGATCTGATCAAGAGAC	(Karlyshev <i>et al.</i> 2001)
Tn5Km-OEnd-Rd1	TCTTCACGAGGCAGACCTCA	Cette étude
Tn5Km-IEnd-Rd1	CATCACGACTGTGCTGGTCA	Cette étude
Tn5-OEnd-Seq	GCCGCACTTGTGTATAAGAGTC	Cette étude
BTH 11403-F-KpnI	CGGGGTACCCCGAAGACAAGCCCTGTGCTGAT	Cette étude
BTH 11403-R-HindIII	CCCAAGCTTGGGAGGTGCGCGTCAGTTTACTT	Cette étude
TadBThaiF	TCTACCGGATCAAGGAGTTC	Cette étude
TadBThaiR	CCAGATCGCGCATGAACAC	Cette étude
RpoBThaiRTF	ATCGAAGAGAAGCGTCACCA	Cette étude
RpoBThaiRTR	GCGAGGTACACCTTGACCA	Cette étude
hmqAThaiRTF	AATCTGCCTGCAACGACCGATCT	Cette étude
hmqAThaiRTR	AGCTCGAGCAGTTCGCGATACGA	Cette étude
BambiCTXup	ACGACCTGCAGGAATTGTTC	Cette étude
BambiCTXdown	CTGGAGCTCGTTTTCTTCA	Cette étude
BthaiCTXup	GCCAGCGTTTCCTCAACGA	Cette étude
BthaiCTXdown	CGTCGGTATCTCTGGCTGT	Cette étude
YLinker1	TTTCTGCTCGAATTCAAGCTTCTAACGATGTACGGGGACACATG	(Kwon et Ricke 2000)
YLinker2	TGTCCCGTACATCGTTAGAACTACTCGTACCATCCACAT	(Kwon et Ricke 2000)
YLinkerPrimer	CTGCTCGAATTCAAGCTTCT	(Kwon et Ricke 2000)

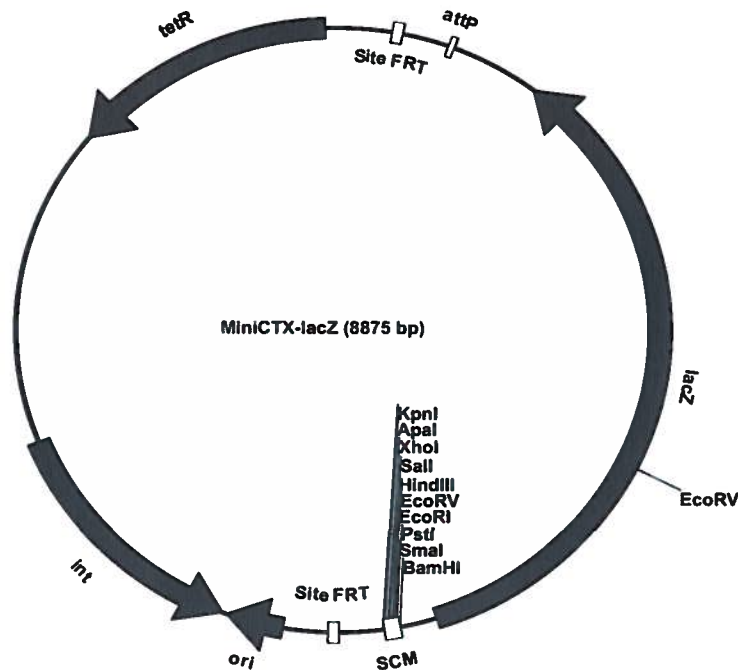


Figure 2.5. Représentation du plasmide recombinant MiniCTX-*lacZ*.

Les sites FRT permettent une recombinaison par la flipase, excisant ainsi le gène de résistance à la tétracycline. Le SCM est en amont du gène *lacZ*.

La construction a initialement été transformée dans *E. coli* DH5 α . La transformation a été faite en rendant les cellules thermocompétentes avec un protocole utilisant le chlorure de calcium (CaCl₂). Premièrement, les cellules d'une culture fraîche de *E. coli* DH5 α ont été récupérées par centrifugation et dispersées dans 100 μ l de CaCl₂ 50 mM sur glace. Ensuite, 1 μ l du produit de ligation a été ajouté aux cellules et incubé pendant 1 h. Un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes, suivi de 2 minutes sur glace, a permis au plasmide ligué de s'introduire dans la bactérie. Ensuite, une incubation à 37°C pendant une heure après ajout de TSB a permis la réplication initiale du plasmide dans la bactérie. Les cellules ayant reçu le plasmide ont alors été sélectionnées sur des géloses TSB contenant 15 μ g/ml de tétracycline. Trois colonies obtenues ont été mises en culture pendant 16 heures et l'ADN plasmidique a été extrait. Une digestion enzymatique sur l'ADN plasmidique, à l'aide de BamHI et EcoRI pour *B. ambifaria* et XhoI et BamHI pour *B. thailandensis* a permis de vérifier que l'insert (la région promotrice de l'opéron *hmq*) s'était bien ligué dans le plasmide (Fig. 2.6).

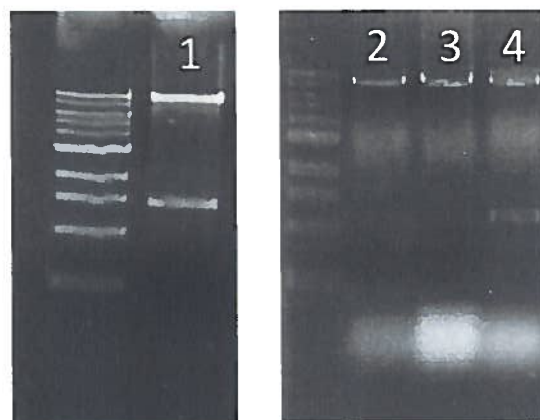


Figure 2.6. Confirmation de l'insertion du promoteur *hmqA* dans le plasmide.

Une extraction plasmidique des colonies, suivie d'une digestion enzymatique avec EcoRI et BamHI pour *B. ambifaria* (puits 1) et XhoI et BamHI pour *B. thailandensis* pendant 4 heures à 37°C, a permis de confirmer que l'insert était présent. Pour *B. thailandensis*, on remarque que seul le plasmide de la troisième colonie contenait l'insert (puits 4).

Les constructions ont ensuite été transférées chez *E. coli* SM10 afin de pouvoir utiliser cette dernière comme souche donneuse du plasmide par conjugaison. Lorsque cette transformation a été complétée suivant le même protocole que décrit ci-haut, j'ai effectué une conjugaison entre *B. thailandensis* E264 ou *B. ambifaria* HSJ1 et la souche SM10/miniCTX-*hmqA^{Bt}*-*lacZ* ou SM10/miniCTX-*hmqA^{Ba}*-*lacZ* comme décrit auparavant. Les colonies ayant reçu le plasmide ont été sélectionnées sur des géloses TSB contenant 225 µg/ml de tétracycline et 50 µg/ml de gentamycine pour sélectionner contre *E.coli*. La confirmation que l'insertion s'était effectuée au bon endroit a été vérifiée en utilisant une amplification par PCR de la région recombinante sur le génome, avec des amorces entourant le site d'insertion, BambiCTXup et LacZCTerm pour *B. ambifaria*, et BthaiCTXup et LacZCTerm pour *B. thailandensis* (voir Tableau 2.2). Un essai β-galactosidase a été effectué pour confirmer le bon fonctionnement de la construction.

2.5.2. Excision du gène *tetR* de la construction miniCTX-*hmqA-lacZ*

Le rapporteur miniCTX-*hmqA-lacZ* sur le génome inclut des sites «Flipase Recognition Target» (FRT) qui flanquent le gène de résistance à la tétracycline (Fig. 2.7). La raison pour laquelle les sites ont été inclus est que ce gène de résistance peut être excisé de la construction, après la sélection et confirmation que la bactérie a bien intégré le rapporteur *lacZ* dans son

chromosome (Becher et Schweizer 2000). Cette excision du gène *tetR* se fait par recombinaison du génome, un procédé qui est activé par la présence de l'enzyme nommée flipase. Cette enzyme reconnaît les sites FRT, et une double recombinaison fait que le gène *tetR* est éjecté du génome, et que les sites FRT s'apparient ensemble (Becher et Schweizer 2000). Afin d'avoir une souche *hmqA-lacZ* propre résistance à la tétracycline, j'ai effectué le procédé d'excision de *tetR* par flipase. Premièrement, le plasmide pFLPe4 (Fig. 2.8) a été électroporé dans des cellules de *B. thailandensis::hmqA-lacZ (tetR)* compétentes (Choi *et al.* 2008). Ensuite, les cellules ont été récoltées par centrifugation, et dispersées dans du tampon MEB (HEPES-MgCl₂ 1 mM, pH 7,0). Après trois lavages avec le tampon MEB, les cellules ont été dispersées dans 70 µl final, et 1 µl (environ 100 ng) d'une extraction plasmidique de pFLPe4 a été ajouté à la solution (Dennis et Sokol 1995). L'électroporation de la solution a suivi, à un voltage de 1800V dans un électroporateur Electroporator 2510 (Eppendorf), dans des cuvettes Bio-Rad « Gene Pulser Cuvette » de 0,2 cm. Ensuite, 1 ml de TSB a été ajouté aux cellules, suivi d'une incubation à 37°C pendant 1,5 h. Suite à cela, j'ai étalé la solution sur des géloses contenant 100 µg / ml de kanamycine, puisque le pFLPe4 contient le gène *nptI* conférant la résistance à cet antibiotique. Suite à l'électroporation et l'obtention de colonies sur le milieu sélectif, j'ai repiqué 4 colonies sur un milieu contenant 100 µg/ml de kanamycine et 0,2% rhamnose. Cet ajout de rhamnose permet l'activation du promoteur d'expression pBAD pour la flipase. Suite à une incubation à 30°C pendant 48 h, j'ai repiqué les colonies obtenues sur un milieu contenant 225 µg/ml de tétracycline, et en parallèle sur un milieu contenant 100 µg / ml de kanamycine, le but étant de confirmer si chacune des colonies avait perdu la résistance à la tétracycline. Les colonies sensibles à la tétracycline ont été repiquées sur TSB, et incubées à 42°C pendant 48 h. Cette incubation à haute température empêche le plasmide de se répliquer, vu qu'il contient un gène le rendant thermosensible, alors que *B. thailandensis* peut croître à cette température. Après obtention de colonies, j'ai repiqué sur trois milieux différents, kanamycine 100 µg/ml, tétracycline 225 µg/ml, et TSB seul, afin de trouver un clone toujours sensible à la tétracycline, et ayant perdu le plasmide pFLPe4, la rendant sensible aussi à la kanamycine. Les colonies résultantes avaient donc subies une recombinaison des sites FRT de la construction *hmqA-lacZ*, et étaient donc maintenant sensibles à la tétracycline. Cette technique a été élaborée par l'équipe de Herbert Schweizer, et le plasmide utilisé a été conçu spécifiquement pour être utilisé dans des

espèces de *Burkholderia*, vu que ces espèces sont hautement résistantes à une majorité d'antibiotiques (Choi *et al.* 2008).

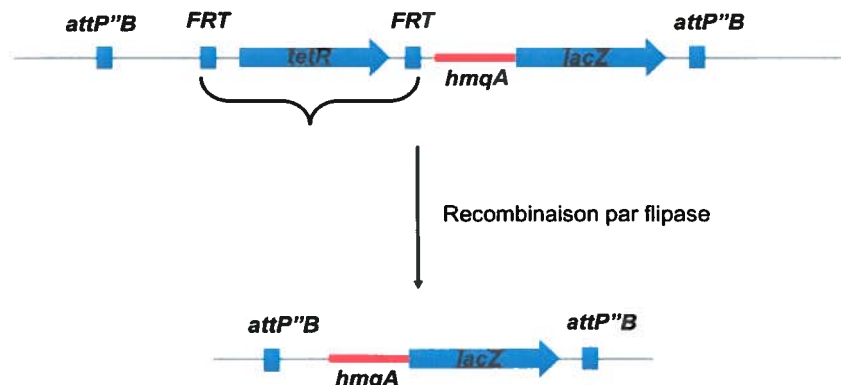


Figure 2.7. Représentation de l'insertion de la construction miniCTX-*hmqA-lacZ* dans le génome de *Burkholderia*.

L'action de la flipase provoque une recombinaison homologue des sites FRT, excisant ainsi le gène de résistance à la tétracycline qui se trouve entre ces sites.

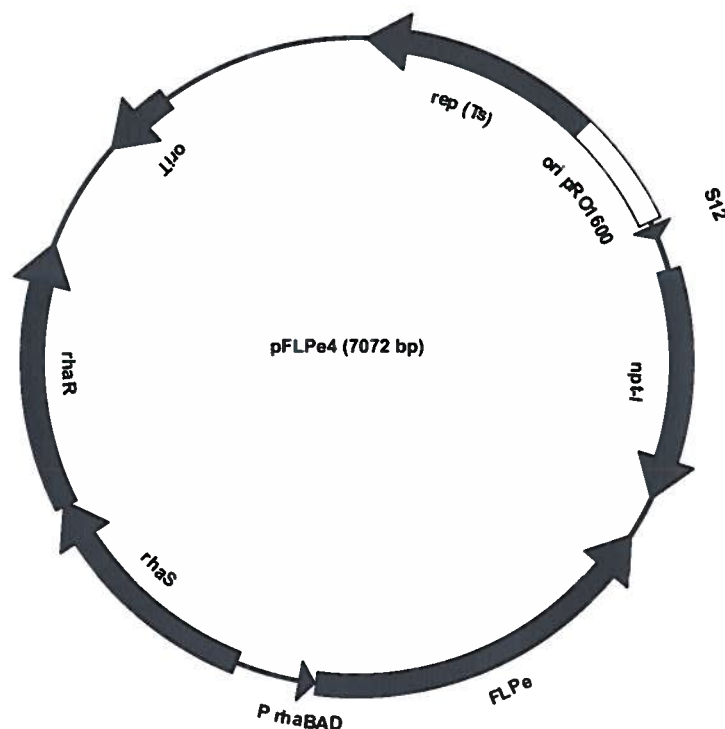


Figure 2.8. Représentation du plasmide d'excision pFLPe4.

L'action de la flipase (FLPe4) provoque une recombinaison homologue des sites FRT. Ce gène est inducible par le rhamnose (P_{rhaBAD}).

2.5.3. Mutagenèse aléatoire par transposon miniTn5-Km sur *B. thailandensis*

Une mutagenèse aléatoire du génome de *B. thailandensis::hmqA-lacZ* a ensuite été effectuée en utilisant le minitransposon miniTn5-Km, conférant une résistance à la kanamycine (Fig. 2.9). Ce transposon a été utilisé pour ce criblage parce que la construction du rapporteur plasmidique précédant la mutagenèse aléatoire utilisait aussi la tétracycline. Donc, la mutagenèse aléatoire a été faite par conjugaison, comme décrit auparavant. Un criblage a ensuite été effectué sur des grandes plaques carrées 20 cm x 20 cm, contenant 200 ml de milieu de culture solide TSB 3% avec 1,5% agar, ainsi que 40 µg/ml X-gal pour que l'activité β -galactosidase soit visible, et 100 µg/ml de kanamycine et 50 µg/ml de gentamycine, afin de sélectionner les mutants ayant incorporé le minitransposon et sélectionner contre la souche donneuse du transposon, *E. coli* SM10. L'approche du criblage était d'utiliser un phénotype de β -galactosidase atténué, ce qui se traduit en colonies produisant un pigment bleu atténué ou blanc. Les transposants ayant ce phénotype d'activité β -galactosidase atténué sont donc potentiellement des mutants dans lesquels l'expression de l'opéron *hmq* est diminuée.

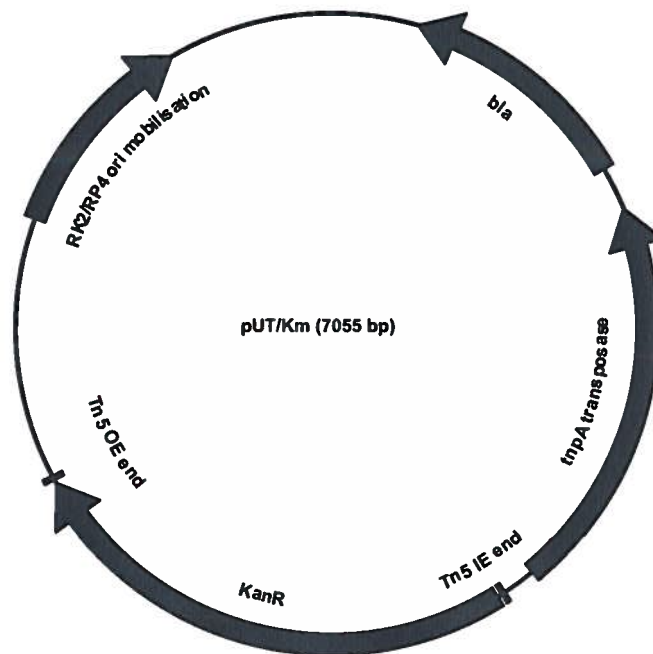


Figure 2.9. Représentation du plasmide pUT/Km contenant le minitransposon Tn5-Km. La transposase TnpA permet le transfert du transposon dans l'organisme cible. La cassette de résistance à la kanamycine (Kan^R) est flanquée des terminaisons du transposon I et O. Adapté de: de Lorenzo *et al.* 1990.

Les candidats sélectionnés ont été repiqués sur le même milieu pour confirmer le phénotype visuel atténué ou inhibé. Ensuite, une cinétique d'activité β -galactosidase a été effectuée en cultures liquides pour quantifier l'activité β -galactosidase des candidats par rapport à la souche sauvage. Les transposants intéressants ont été retenus, et leur production réelle de HMAQ a été quantifiée par CL/SM (tel que décrit à la section 2.4.3). L'identité des gènes mutés des candidats ayant une activité *hmqA-lacZ* et/ou une production réelle de HMAQ atténuée ont été déterminés par une méthode de ligation et PCR qui sera vue plus loin (section 2.5.5).

2.5.4. Quantification de la production de β -galactosidase par un rapporteur *hmqA-lacZ*

La production de β -galactosidase par le rapporteur *hmqA-lacZ* est une représentation de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFG*. Il est possible de quantifier cette production de β -galactosidase en utilisant une réaction enzymatique. Premièrement, des cultures liquides ont été inoculées à partir de cultures de 16 heures, et ajustées à une DO_{600} initiale de 0,1. Les cultures ont été effectuées en triplicata pour évaluer la précision. Plusieurs points d'échantillonnage ont été prélevés pendant la croissance des bactéries afin d'observer la cinétique de production de β -galactosidase de chaque candidat par rapport à la souche sauvage. À partir du volume prélevé, la DO_{600} de la culture a été déterminée en utilisant le spectrophotomètre. Du tampon Z (40 mM NaH_2PO_4 , 60 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mM β -mercaptoethanol, pH 7.0) a été ajouté pour compléter le volume à 1 ml. Ensuite, une goutte de SDS 0,1% et deux gouttes de chloroforme ont été ajoutées afin de lyser les cellules. Suite à une agitation par vortex, les solutions étaient incubées à 30°C pendant un minimum de 5 minutes afin que tous les échantillons soient à la même température, et pour que la réaction se produise à une température optimale. Enfin, 200 μ l du réactif ONPG (ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) a été ajouté pour démarrer la réaction. Le temps pour que la couleur jaune apparaisse est noté. Pour arrêter la réaction, 200 μ l de Na_2CO_3 1 M ont été ajoutés aux tubes. Après centrifugation à 16000 x g pendant 1 min afin de précipiter les débris cellulaires, l'absorbance à 420 nm de l'échantillon a été déterminée afin de quantifier le degré d'apparition de couleur jaune, le produit de dégradation enzymatique de l'ONPG (Miller 1972). La quantification de la production de β -galactosidase a été faite en utilisant la formule suivante. Dans l'équation, le temps correspond au temps total de

la réaction en minutes, et le volume correspond au volume en ml de la culture bactérienne à vérifier, en tenant compte de la dilution si nécessaire.

$$\text{Unités Miller} = \frac{1000 \times A_{420}}{\text{Temps} \times \text{volume} \times \text{DO}_{600}}$$

2.5.5. Identification du site d'insertion du transposon miniTn5-Km

Afin de déterminer le gène affecté dans chacun des mutants intéressants, une méthode de PCR qui a été développée chez *Salmonella typhimurium* dans ce but a été utilisée (Kwon et Ricke 2000). Cette méthode consiste en la digestion du génome du mutant contenant le transposon, et de sa ligation à un oligonucléotide avec une séquence pré-déterminée, suivi d'une amplification PCR.

Premièrement, un oligonucléotide double-brin a été formé à partir de deux oligonucléotides simple-brin. Une quantité de 3,15 µg d'un des oligonucléotides (nommé Linker 2) a été phosphorylé en 5' pour faciliter la ligation subséquente du *linker* double-brin au génome. La phosphorylation a été produite avec une trousse T4 polynucleotide kinase (PNK) (Promega USA, Madison, WI). Après l'inactivation de la PNK à 65°C pendant 20 min, 3,15 µg de l'oligonucléotide Linker 1 a été ajouté au mélange, qui a ensuite été chauffé pendant 2 minutes à 95°C et refroidi graduellement à la température de la pièce pour que les deux fragments se renaturent ensemble, formant ainsi un oligonucléotide double-brin (*Y-Linker*). Le *Y-Linker*, lorsque formé, a un "overhang" en 3' de CATG, qui est aussi la séquence de reconnaissance pour l'enzyme de restriction *NlaIII*.

Pendant ce temps, l'extraction génomique de chacun des transposants a été effectuée en utilisant une trousse d'extraction génomique de bactéries et en suivant le protocole fourni par la compagnie (Omega Bio-Tek, USA). Ensuite, 40 ng de l'ADN génomique de chacun des transposants a été digéré pendant trois heures à 37°C avec 0,5 µl de l'enzyme de restriction *NlaIII* (New England Biolabs, USA), formant ainsi des bouts avec une protubérance de CATG en 3'. Ensuite, une ligation a été effectuée entre cet ADN digéré et 1 µg de *Y-Linker* à l'aide de

0.5 µl de T4 DNA ligase (New England Biolabs, USA). Cette ligation se fait sur chacun des fragments de l'ADN du mutant, et donc éventuellement aussi à proximité de l'emplacement du transposon. Après une incubation pendant 16 heures à la température-pièce de cette solution à 20 µl, 180 µl d'eau est ajouté et la solution est chauffée à 65°C pendant 10 minutes pour dénaturer la T4 ligase.

Après que la ligation ait été effectuée, une amplification par PCR a été faite sur 2 µl de ce produit. Une des amorces utilisées est spécifique au *Y-Linker*, et l'autre amorce est spécifique au transposon (voir Tableau 2.2). Les réactifs pour cette amplification étaient 5 µl du tampon PCR fourni par New England Biolabs, 350 ng pour chaque amorce, 3 µl de dNTP 10mM, 3 µl de DMSO, 2 µl de l'ADN matrice, et 1 µl de Taq Polymérase (New England Biolabs, USA). Le programme d'amplification était 95°C pendant 2 minutes, ensuite 30 cycles d'amplification comprenant 95°C pendant 30 secondes, 58°C pour 1 minute, et 70°C pour 1 minute, et finalement une dernière élongation à 70°C pour 5 minutes. L'amplification a donc été faite sur une partie du transposon, et une partie du génome adjacent au transposon. Les séquences des amplifications à partir de l'amorce spécifique au transposon ont été obtenues par le service de séquençage du Centre d'innovation Génome Québec. La figure 2.10 représente visuellement la technique.

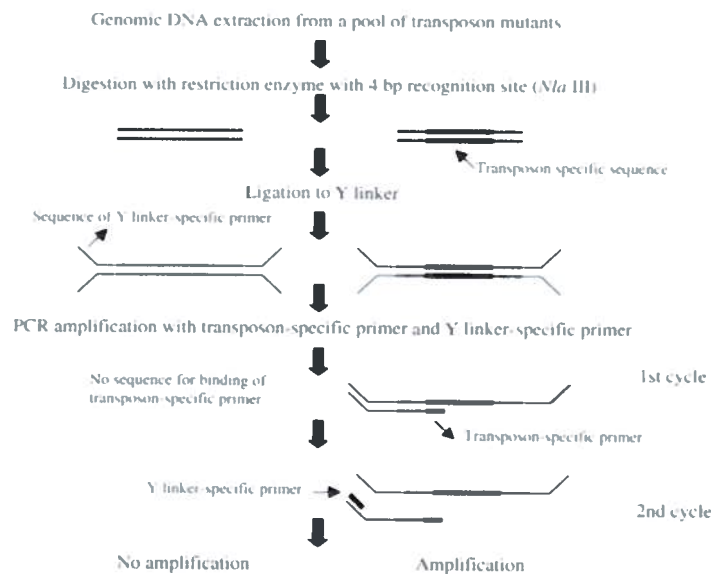


Figure 2.10. Technique d'identification de gènes affectés par transposon aléatoire.
Tiré de Kwon et Ricke 2000.

Suite à l'amplification PCR, un seul fragment a été obtenu pour chaque mutant, tel qu'attendu. Ces fragments étaient de taille variable entre les mutants (Fig. 2.11). J'ai été capable d'obtenir des amplifications de taille raisonnable pour chacun des mutants que je voulais identifier, en utilisant des amorces qui se lient à des endroits différents sur le transposon.

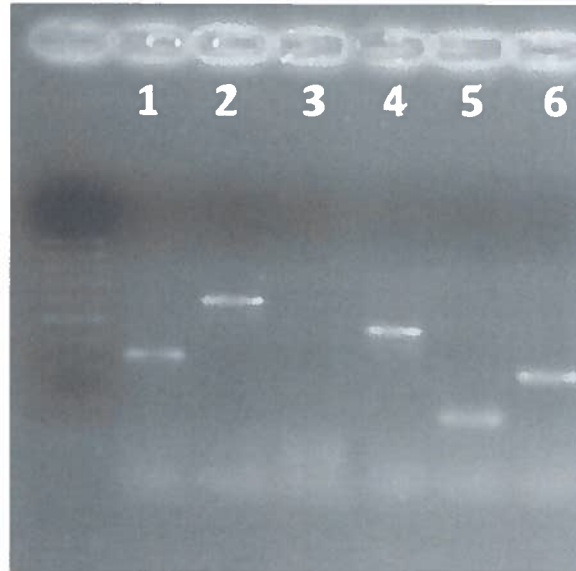


Figure 2.11. Amplification de fragments spécifiques au transposon miniTn5/Km, pour identifier le gène muté dans les mutants du criblage en utilisant le rapporteur *hmqA-lacZ*. Les fragments amplifiés sont de tailles différentes, ce qui est attendu. L'échelle de poids moléculaire dans le premier puits est l'échelle 100pb. Les six puits suivants démontrent l'amplification chez six transposants retenus du criblage phénotypique.

On remarque que les amplifications ont des tailles plus hautes que 100 paires de bases, ce qui est un minimum pour pouvoir séquencer les fragments PCR. Dans le quatrième puits, il n'y a pas d'amplification distincte entre 100 et 1000 paires de bases, donc j'ai utilisé une différente amorce pour la réaction de PCR qui était plus interne dans le transposon, et j'ai pu obtenu un fragment séquençable pour chaque mutant.

2.6. Étude de complémentation du mutant BTH_I1403-

2.6.1. Construction du plasmide pME6000::BTH_I1403

Afin de pouvoir déterminer si la production inhibée d'HMAQ dans le mutant BTH_I1403⁻ était causée spécifiquement par ce gène, il a fallu construire un plasmide d'expression contenant ce gène pour ensuite le transformer dans le mutant. Premièrement, une amplification de BTH_I1403 a été effectuée en utilisant les amorces BTH_I1403-F-KpnI et BTH_I1403-R-HindIII (voir Tableau 2.2). L'amplification a ensuite été liguée dans pGEM-T-Easy (Promega) pendant 16 heures à 4°C, et ce plasmide a été transformé dans DH5α par électroporation. Suite au repiquage de colonies blanches en culture liquide, et extraction plasmidique par la méthode décrite auparavant (section 2.5.1), une digestion enzymatique en utilisant les enzymes de restriction KpnI et HindIII pour une réaction de 4 heures à 37°C a été effectuée pour récupérer l'insert. En parallèle, le plasmide pME6000 a été digéré avec les mêmes enzymes (Maurhofer *et al.* 1998). Une ligation a suivi pendant 16 heures à 16°C, en utilisant le même protocole que décrit auparavant (section 2.5.1). Une transformation de la ligation a ensuite été effectuée par électroporation dans *E. coli* DH5α. Suite à l'étalement de la transformation, quatre colonies ont été obtenues. Ces colonies ont été repiquées en culture liquide, et ensuite une extraction plasmidique a été effectuée pour récupérer le plasmide suivant les mêmes méthodes que décrites auparavant. Une digestion enzymatique en utilisant KpnI et HindIII pendant 4 heures à 37°C a ensuite été effectuée pour confirmer que l'insert était présent dans la construction (Fig. 2.12).

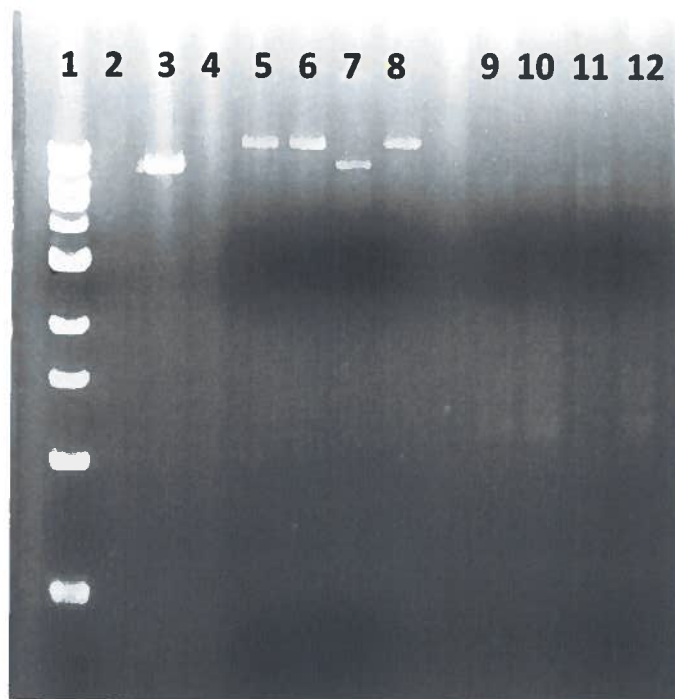


Figure 2.12. Confirmation de l'insertion de BTH_I1403 dans pME6000.

Une extraction plasmidique a été effectuée, suivi d'une digestion enzymatique en utilisant KpnI et HindIII, pour identifier si l'insert était présent. On remarque dans les puits 5-8 le résultat de l'extraction plasmidique de quatre colonies ayant possiblement incorporé le plasmide avec l'insert. Les puits 9-12 représentent une digestion enzymatique de chacune de ces extractions plasmidiques en utilisant KpnI et HindIII, et on voit que trois des quatre candidats ont le plasmide avec l'insert.

Une fois la construction confirmée, le plasmide avec l'insert a été électroporé dans *B. thailandensis* BTH_I1403. En parallèle, une électroporation du plasmide pME6000 sans insert a aussi été effectuée dans cette souche, à titre de témoin négatif. Finalement, les mêmes électroporations ont été effectuées dans la souche sauvage de *B. thailandensis*: *hmqA-lacZ* pour déterminer l'impact de la présence du plasmide sans insert par rapport au plasmide avec l'insert. Suite à l'obtention de colonies après incubation pendant 48 heures à 37°C sur milieu TSB avec tétracycline 225 µg/ml pour sélectionner les bactéries ayant incorporé un plasmide, un essai β -galactosidase a été effectué en cinétique sur les quatres souches, ainsi qu'une quantification de production de HMAQ en parallèle par CL/SM.

2.7. Essais de PCR quantitatif en temps réel (qRT-PCR)

Pour les essais de qRT-PCR, il a fallu premièrement extraire l'ARN de chacune des bactéries à l'étude. Les extractions d'ARN total de la souche sauvage *B. thailandensis* E264 et de son mutant *hmqA*⁻ ont été effectuées sur des cultures liquides dans le milieu TSB à DO₆₀₀ de 2,9. Premièrement, 2 ml de culture ont été centrifugés pendant 5 min à 12000 x g pour recueillir les cellules. Ensuite, 400 µl de Trizol (Invitrogen) ont été ajoutés pour disperser les bactéries. Suite à une incubation de 10 min. à 65°C, 80 µl de chloroforme ont été ajoutés avec agitation. Après une incubation à température-pièce pendant 5 min, et une centrifugation à 12000 x g pendant 20 min, la phase supérieure claire a été transférée dans un nouveau tube. L'ARN a ensuite été précipité en ajoutant un volume d'isopropanol égal au volume recueilli de l'étape précédente, suivi d'une congélation à -80°C pendant environ 16 h. Une centrifugation de 12000 x g pendant 30 min a suivi pour recueillir l'ARN précipité. Après un lavage à l'éthanol 70%, l'ARN précipité a été resuspendu dans de l'eau DEPC de la compagnie Ambion (Applied Biosystems Canada) à un volume de 50 µl par point de densité optique. Finalement, les échantillons ont été incubés pendant 10 minutes à 55°C.

Le traitement à la désoxyribonucléase (DNase) a été effectué avec les réactifs de la trousse «Turbo DNA-free» de la compagnie Ambion (Applied Biosystems Canada). Une quantité de 5 µg de l'ARN à traiter a été ajoutée à 2 µl de tampon DNase 10X, et 2,5 µl de l'enzyme DNase, et le volume a été complété à 20 µl avec de l'eau RNase-free. Après une incubation de 30 min. à 37°C, 2,5 µl de DNase a été ajouté, suivi d'une autre incubation de 30 minutes à 37°C. L'inactivation de l'enzyme DNase a été effectuée en utilisant la solution DNase Inactivation Reagent : 2 µl ont été ajoutés à la solution, le tout a été mélangé vigoureusement par vortex, et ensuite incubé à température de la pièce pendant 5 min. Ensuite, une centrifugation à 10000 x g pendant 2 minutes a permis de retirer le « Inactivation Reagent ». Environ 20 µl de la solution d'ARN sans ADN ont été récupérés. Les concentrations d'ARN utilisées pour faire les calculs de qRT-PCR ont été évaluées par spectrophotométrie à 260 nm. L'appareil utilisé pour l'essai de qRT-PCR était un Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences). Les réactifs pour la réaction provenaient de la trousse « iScript One-Step RT-PCR Kit avec Sybr Green » (Bio-Rad). Le tableau 2.5 présente les détails des mélanges pour un essai.

Tableau 2.5. Réactifs utilisés lors des expériences de qRT-PCR.

	WT	<i>hmqA</i> -	WT sans RT	<i>hmqA</i> - sans RT
Solution mère (avec Sybr Green)*	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
Amorces	2 x 0.75 µl	2 x 0.75 µl	2 x 0.75 µl	2 x 0.75 µl
Transcriptase inverse (iScript)	1	1	0	0
ARN (=100 ng)	0.55 µl	0.45 µl	0.55 µl	0.45 µl
H ₂ O	9.45 µl	9.55 µl	10.45 µl	10.55 µl

*Contient 0,4 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), iTaq ADN polymérase, 20 nM fluorescéine, SYBR Green I

La quantification des transcrits a été effectuée par méthode de $\Delta\Delta C_T$ (Applied Biosystems, 2008). Cette méthode implique la détermination du cycle de PCR auquel un seuil de fluorescence est atteint (C_T). Le fluorophore Sybr Green émet cette fluorescence lorsqu'il se lie à de l'ADN double-brin aux extrémités 5'. Ensuite, une normalisation est effectuée en utilisant le C_T d'un gène normalisateur, dans notre cas *rpoB*, qui a le même taux de transcription dans chacun des échantillons. Donc, pour un essai de qRT-PCR, on doit obtenir un C_T (une moyenne des trois essais pour un triplicata) pour le gène d'intérêt et un C_T pour le gène de référence pour chaque condition. On peut ensuite calculer le taux de transcription relatif entre les conditions en se basant sur les formules suivantes.

$$\Delta C_T = C_{T \text{ cible}} - C_{T \text{ référence}}$$

Cette formule nous donne un ΔC_T pour chaque condition. Dans notre cas, la condition cible est le mutant *hmqA*- et la condition référence est la souche sauvage. L'écart-type est calculé en utilisant l'approche suivante (Applied Biosystems, 2008). Premièrement, l'écart-type (s) de chacun des C_T est calculé en utilisant cette formule :

$$s = (s_1^2 + s_2^2)^{1/2}$$

où s_1 et s_2 sont les écart-types de $C_{T \text{ cible}}$ et $C_{T \text{ référence}}$, respectivement.

La comparaison entre les conditions se fait en utilisant la formule suivante.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ cible}} - \Delta C_{T \text{ référence}}$$

Le taux de transcription par rapport à la condition initiale (souche sauvage) est donc calculé en utilisant le $2^{-\Delta\Delta C_T}$. L'écart-type du $\Delta\Delta C_T$ est calculée en utilisant l'écart-type s (Applied Biosystems, 2008). Donc, les limites inférieure et supérieure de l'écart-type sont calculées de cette façon:

$$\text{Limite inférieure : } 2^{-(\Delta\Delta C_T - s)}$$

$$\text{Limite supérieure : } 2^{-(\Delta\Delta C_T + s)}$$

Les amorces utilisées pour ces essais sont RpoBThaiRTF et RpoBThaiRTR pour le gène *rpoB*, TadBThaiF et TadBThaiR pour le gène *tadB*, et hmqAThaiRTF et hmqAThaiRTR pour *hmqA* chez *B. thailandensis*. L'emplacement des amorces pour le gène *hmqA* est démontré à la figure 2.1.

Le programme utilisé pour la RT-PCR est le suivant. Premièrement, la synthèse de cDNA se fait lors d'une étape de 10 minutes à 50°C. Ensuite, l'inactivation de la transcriptase inverse se fait à 95°C pendant 5 minutes. Suite à cela, 35 cycles de PCR sont effectués (10 secondes à 95°C et 30 secondes à 55°C). Finalement, l'analyse de « Melt Curve » pour déterminer la température à laquelle l'ADN se dénature a été effectué, avec un programme de 1 minute à 95°C, 1 minute à 55°C, et 80 cycles de 10 secondes à 55°C avec un gradient de +0,5°C par cycle. Cette dernière analyse permet de déterminer si l'ADN auquel le Sybr Green se lie n'est que des dimères d'amorces (basses températures) ou un brin d'ADN correspondant à une amplification complète (hautes températures).

3. Résultats

3.1. Hypothèses et objectifs

3.1.1. Hypothèses

Tel que décrit auparavant, la région promotrice en amont de *hmqA* doit contenir une séquence de liaison d'un régulateur transcriptionnel. Une séquence de liaison de type LysR dans cette région est vraisemblablement absente. On peut donc émettre l'hypothèse que la régulation de la production des HMAQ chez *Burkholderia* est d'un type différent que la régulation des HAQ chez *P. aeruginosa*. On ne peut pas exclure la possibilité que la régulation de l'opéron *hmq* soit contrôlée par un régulateur comme MvfR. La séquence de liaison d'un régulateur LTTR suit un modèle spécifique, mais il est possible qu'un régulateur de ce type puisse reconnaître une séquence jusqu'à maintenant inconnue. De plus, considérant la complexité de régulation des systèmes de QS chez *P. aeruginosa*, il existe probablement plusieurs facteurs de régulation des HMAQ. Il est donc important d'identifier les gènes reliés au contrôle de l'opéron. On émet l'hypothèse que plusieurs facteurs de régulation pourraient avoir un effet indirect d'atténuation ou d'inhibition de la production des HMAQ. En ce qui concerne un ligand potentiel pour un régulateur transcriptionnel de type LysR chez *Burkholderia*, on peut émettre l'hypothèse que les HMAQ puissent tenir un rôle sans être directement impliqués.

3.1.2. Objectifs

L'objectif principal de ce projet est d'identifier les gènes impliqués dans la régulation de l'opéron *hmq* chez *B. ambifaria* et *B. thailandensis*. Plus spécifiquement, il faut identifier un régulateur transcriptionnel direct de cet opéron. Un autre objectif est de déterminer l'effet des HMAQ sur leur propre transcription et régulation. Finalement, lorsque des gènes ayant un effet sur la production des HMAQ seront identifiés, un modèle préliminaire sera élaboré démontrant une cascade de régulation potentielle.

3.2. Différences morphologiques entre la souche sauvage de *B. thailandensis* et le mutant *hmqA*⁻

L'approche expérimentale initiale du projet fut de trouver des milieux de culture gélosés permettant de distinguer des colonies produisant des HMAQ de colonies qui n'en produisent pas. Suite à une mutagenèse aléatoire du génome en utilisant le transposon IS*lacZ*/hah (Jacobs *et al.* 2003), avec un milieu de culture sur lequel la souche sauvage et le mutant *hmqA*⁻ présentent des colonies de morphologies différentes, et donc des morphologies liées à la production de HMAQ, on pourrait cribler à grande échelle et sélectionner des mutants ayant un défaut dans la production d'HMAQ. Après étalement de ces deux souches sur un milieu de culture précédemment utilisé pour identifier et sélectionner la bactérie *B. pseudomallei* (Ashdown 1979a), la souche E264 et son mutant *hmqA*⁻ produisent des colonies de morphologie différente lorsqu'ils sont cultivés à 37°C pendant 48 heures. Sur ce milieu appelé Ashdown's Agar, la souche sauvage a une morphologie rugueuse et plane, et le mutant *hmqA*⁻ a une apparence lisse et bombée (Fig. 3.1). D'autres milieux de culture gélosés ont été utilisés pour tenter d'observer des différences morphologiques entre la souche sauvage E264 et le mutant *hmqA*⁻, tels les milieux Mueller-Hinton, Brain Heart Infusion, et « *Burkholderia cepacia* Selective Agar », mais aucun milieu autre qu'Ashdown n'a permis d'observer ces différences phénotypiques.

Parallèlement, plusieurs milieux ont été utilisés pour tenter d'observer une différence morphologique entre une souche de *B. ambifaria* produisant des HMAQ (HSJ1) et une souche n'en produisant pas (*hmqA*⁻). Le milieu Mueller-Hinton permettait d'observer des différences morphologiques entre les deux souches, mais la différence n'était pas assez importante pour pouvoir utiliser ce critère pour effectuer un criblage à grande échelle. Par ailleurs, une expérience où la souche sauvage a été incubée sur le milieu gélosé Mueller-Hinton en présence d'un inhibiteur compétitif de la production des HMAQ, le 6-FABA, n'a pas induit le changement de morphologie observé chez *hmqA*⁻. On peut donc en conclure que la différence morphologique n'était pas due à la présence ou absence de production d'HMAQ par la bactérie. Le criblage par différenciation phénotypique n'a donc pas pu être effectué pour *B. ambifaria* HSJ1.



Figure 3.1. Phénotype de *B. thailandensis* souche sauvage (gauche) et mutant *hmqA*⁻ sur gélose Ashdown suite à une incubation de 48 heures à 37°C.

Photos par Marie-Christine Groleau.

3.3. Criblage fonctionnel en utilisant le milieu gélosé Ashdown pour *B. thailandensis*

L'apparence lisse et mucoïde du mutant *hmqA*⁻ était la base sur laquelle j'ai pu effectuer mon premier criblage. Suite à l'analyse d'environ 50 000 colonies, j'ai retenu quatorze candidats ayant un phénotype associé au mutant *hmqA*⁻. Un deuxième test phénotypique a été effectué sur le milieu CAS, qui permet d'observer visuellement la production de sidérophores d'une colonie, représentée par un halo orange dans sa périphérie immédiate (Schwyn et Neilands 1987). La production de sidérophores a été évaluée sur une base qualitative. Sur ce milieu, le mutant *hmqA*⁻ de *B. thailandensis* produit un halo plus grand que la souche sauvage E264 (Vial *et al.* 2008). Les niveaux relatifs de chacun des mutants par rapport à la souche sauvage ont été compilés dans le tableau 3.1. On remarque que presque tous les mutants ont une production de sidérophores atténuée.

Les courbes de croissance ont été effectuées pour vérifier si les transposants choisis avaient un défaut dans une fonction importante dans le métabolisme de base. Il est possible que les souches qui ont des croissances affaiblies soient des mutants dans des gènes essentiels, expliquant non seulement leur croissance mais aussi leur production atténuée de HMAQ, qui sont des métabolites secondaires. Le seul mutant présentant un défaut important de croissance est T11, qui n'a pas assez poussé pour que l'essai soit réalisé (Fig. 3.2).

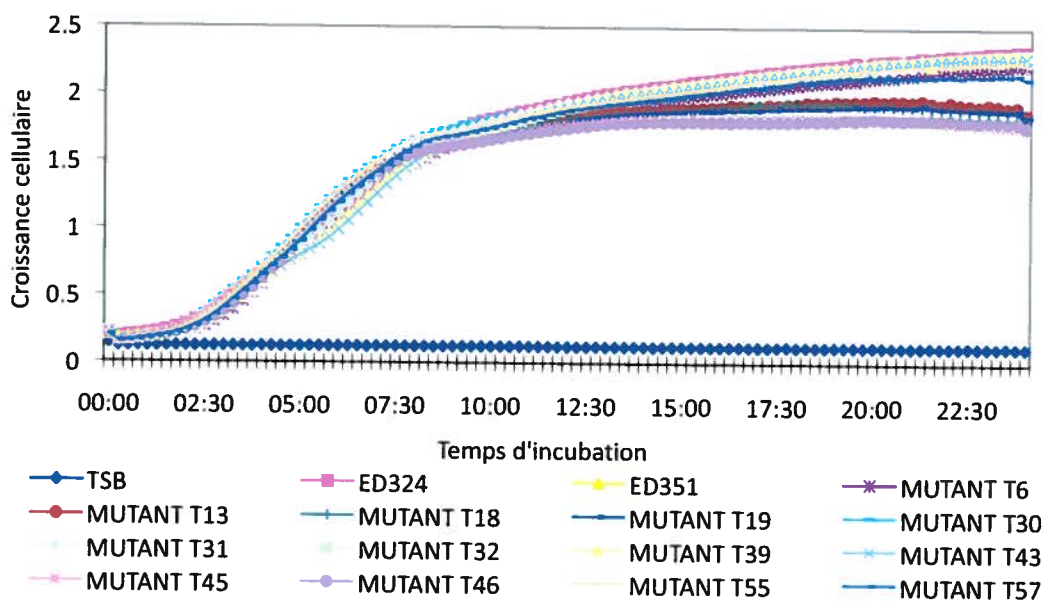


Figure 3.2. Courbes de croissance de transposants obtenus par criblage différentiel phénotypique sur milieu gélosé Ashdown.

Les cultures témoins sont la souche sauvage E264 (ED324) et le mutant *hmqA* (ED351) de *B. thailandensis*, ainsi que le TSB non-ensemencé pour un témoin négatif. Les souches ont été cultivées en TSB liquide. Les prélèvements de densité optique (balayage 420-580 nm) pour les courbes de croissance ont été effectués par Bioscreen (Growth Curves AB) sur une période de 24 heures d'incubation à 37°C.

La quantification des HMAQ a été effectuée en utilisant le CL/SM pour vérifier leur production. Les résultats de quantification des HMAQ et l'identification des gènes mutés dans chacun des candidats sont présentés au tableau 3.1. On remarque que plusieurs transposants ont une production de HMAQ atténuée.

Tableau 3.1 Mutants retenus du criblage par différenciation phénotypique sur milieu gélosé Ashdown.

Pour chacun des candidats, on voit le gène affecté par l'insertion du transposon dans la souche sauvage E264 en triplicata. Les cultures ont été incubées à 37°C dans du milieu TSB pendant 16 heures.

Transposant	Gène	Fonction/Annotation ^a	Longueur du gène affecté (pb)	Position de l'insertion du transposon	Production de sidérophores ^b	% HMAQ ^d
T6	BTH_I2739	Protéine de réparation de l'ADN putative ou ATPase putative	1983	710	+	22%
T11	BTH_III1740	Senseur Histidine Kinase (BaeS)	1328	258	++	0%
T45	BTH_II1366	Protéine Hypothétique	221	112	++	6.4%
T55	entre BTH_I2690 et BTH_I2691	BTH_I2690 : Transposase BTH_I2691 : Protéine Hypothétique	4563 ^c	1960	+++	104%
T13	BTH_II1935	HmqA	1625	133	++	0%
T31	BTH_II1932	HmqD	998	285	++	0%
T39	BTH_II1930	HmqF	3971	516	++	0%
T43	BTH_II1930	HmqF	3971	1369	++	0%
T32	BTH_II1929	HmqG	2135	452	++	0%
T18	BTH_I2535	Protéine Hypothétique – opéron <i>tad</i>	1808	65	++	45%
T57	BTH_I2539	Protéine Membranaire Putative (TadB)	1010	170	++	105%
T30	BTH_I2539	Protéine Membranaire Putative (TadB)	1010	287	++	105%
T19	BTH_I2538	Protéine Membranaire Putative (TadC)	1121	657	++	95%
T46	BTH_I2538	Protéine Membranaire Putative (TadC)	1121	94	++	7.3%

^aSelon burkholderia.com

^bProduction relative à la souche sauvage sur gélose CAS (+++)

^cLongueur de la région intergénique

^dProduction relative à la souche sauvage

On remarque que j'ai sélectionné cinq transposants dans mon criblage qui étaient en fait des mutants de l'opéron *hmq*, ce qui prouve que la méthode de criblage est valide. Un seul autre transposant ne produit aucun HMAQ selon les analyses de spectrométrie de masse et dont le gène affecté est un « Sensor Histidine Kinase » de type BaeS selon les prédictions COG (burkholderia.com).

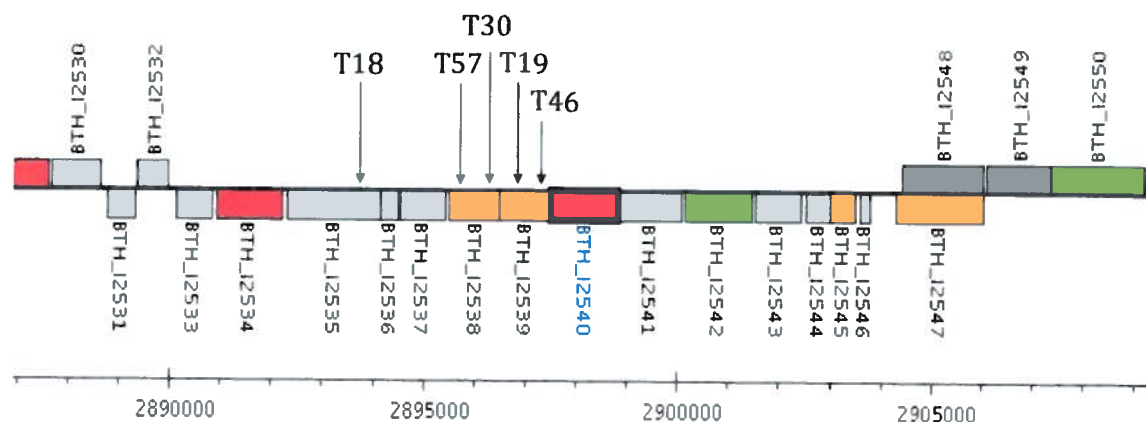


Figure 3.3. Représentation graphique de l'opéron *tad/cpa* chez *B. thailandensis* E264.

Cinq transposants obtenus par le criblage phénotypique sur milieu Ashdown étaient des transposants de cet opéron, et l'endroit où le transposon s'est inséré pour chacun est démontré avec une flèche. BTH_I2538 correspond à *tadB*, et *tadC* correspond à BTH_I2539. La transcription de cet opéron se fait de BTH_I2546 vers BTH_I2533, c'est-à-dire de droite à gauche.

On remarque aussi la sélection de transposants dans les gènes BTH_I2535, BTH_I2538, et BTH_I2539 (Fig. 3.3). Ces gènes font partie d'un opéron nommé *tad/cpa* selon les prédictions fournies par burkholderia.com. Par contre, l'opéron en question n'a pas encore été caractérisé chez aucune espèce du genre *Burkholderia*, et aucune fonction précise n'y a été rattachée. Il existe deux façons d'expliquer cette fréquence de sélection lors du criblage : [1] soit qu'il y a un lien entre la production de HMAQ et l'expression de l'opéron *tad/cpa* chez *B. thailandensis*, tel que suggéré par le transposant T46 qui a une production HMAQ atténuée, [2] soit que ma méthode de criblage est non-spécifique, c'est-à-dire que la différence phénotypique utilisée comme marqueur de sélection pour le criblage est non seulement valide pour détecter les colonies déficientes dans la production de HMAQ, mais aussi les colonies ayant un opéron *tad/cpa* non-fonctionnel. Les deux mutants *tadB*⁻ n'ont pas de déficience dans la production de ces molécules. Par contre, un des mutants *tadC* produit des HMAQ normalement, mais l'autre mutant en produit 20 fois moins. La position du transposon dans le gène pourrait donc avoir un effet.

Finalement, j'ai sélectionné trois colonies dont la mutation était dans une protéine hypothétique. Chez ces transposants, T6 et T45 avaient une production de HMAQ atténuée par rapport à la souche sauvage, et T55 avait une production normale.

3.4. Étude du lien entre la production de HMAQ et l'opéron *tad* de *B. thailandensis*

Suite à l'obtention de transposants ayant une mutation dans un gène de l'opéron *tad/cpa*, j'ai décidé d'élucider le lien potentiel entre les HMAQ et cet opéron. En premier lieu, j'ai voulu confirmer si l'expression de l'opéron *hmq* était affectée par une mutation dans *tadC*. Donc, j'ai transformé le transposant T19 *tadC*⁻ avec le plasmide rapporteur *hmqA-lacZ* (construit par Marie-Christine Groleau), pour pouvoir quantifier l'effet de l'inactivation de ce gène sur l'expression de l'opéron *hmq*. Le raisonnement est que si l'activité de *hmqA-lacZ* et la production d'HMAQ sont plus faibles dans un mutant *tadC*⁻ que dans la souche sauvage, alors cet opéron doit avoir un effet régulateur sur l'opéron *hmq*.

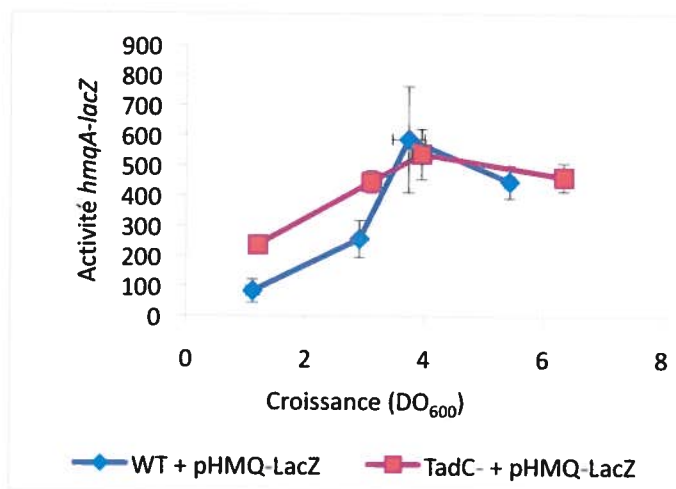


Figure 3.4. Expression de l'opéron *hmq* chez *B. thailandensis*. Comparaison entre la souche sauvage E264 et un transposant dans le gène *tadC*.

La quantification de l'expression de l'opéron *hmq* dans un mutant *tadC*⁻ par rapport à la souche sauvage E264 a été calculée en utilisant des rapporteurs plasmidiques *hmqA-lacZ*. L'activité β -galactosidase est calculée en fonction de la croissance cellulaire de chacune des cultures, en triplicata.

La figure 3.4 indique qu'il n'y a pas de différence significative dans l'expression de *hmqA-lacZ* entre les deux souches, indiquant que l'opéron *tad* n'a pas d'effet sur l'expression de l'opéron *hmq* chez ce transposant. La prochaine étape dans mon cheminement fut de déterminer si le contraire était possible, c'est-à-dire est-ce que la production de HMAQ influence l'expression de l'opéron *tad*? Si cette hypothèse est vraie, alors cela expliquerait le phénotype de

colonies commun. Pour ce faire, j'ai effectué un essai de PCR quantitatif en temps réel (qRT-PCR) sur le gène *tadB* dans la souche sauvage de *B. thailandensis* et le mutant *hmqA*⁻. Premièrement, il a fallu extraire l'ARN total pour chacune des conditions, donc pour la souche sauvage de *B. thailandensis* et le mutant *hmqA*⁻ de la même espèce. Le tableau 3.2 présente les concentrations d'ARN ainsi que les ratios de pureté. Le ratio 260/280 pour un échantillon sans contamination protéique « pur » est de 1.9-2.0, ce qui est de même pour le ratio 260/230 pour un échantillon sans contamination par des solvants (NanoDropTechnologies 2007). On remarque donc que les échantillons ne sont pas contaminés.

Tableau 3.2 Résultats de concentration de l'ARN extrait des bactéries *B. thailandensis* E264 sauvage et *hmqA*⁻.

Les ratios de pureté 260/280 et 260/230 démontrent la contamination par les protéines et les solvants, respectivement.

	Concentration (ng / μ l)	Ratio 260 / 280	Ratio 260 / 230
WT	181.5	2.02	1.82
<i>hmqA</i> ⁻	223.5	2.00	1.87

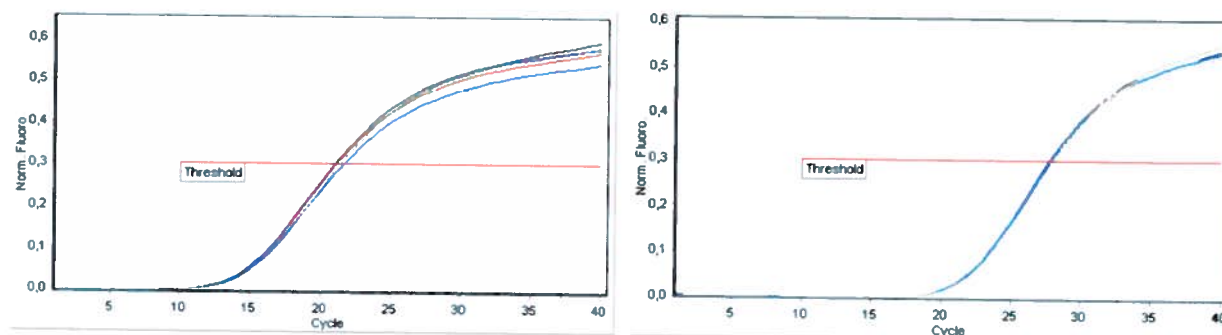


Figure 3.5. Détermination du C_T de la transcription de *rpoB* et *tadB* en fonction du cycle de PCR pour les souches *B. thailandensis* WT et *hmqA*⁻.

L'essai a été effectué en utilisant comme matrice l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN extrait de chacune des bactéries. Chaque culture bactérienne liquide était à une densité optique de 2.7 (DO₆₀₀). La quantification pour *rpoB* (gauche) et *tadB* (droite) a été effectuée en utilisant la fluorescence émise, correspondant au nombre de copies de l'ARN cible dans chaque échantillon.

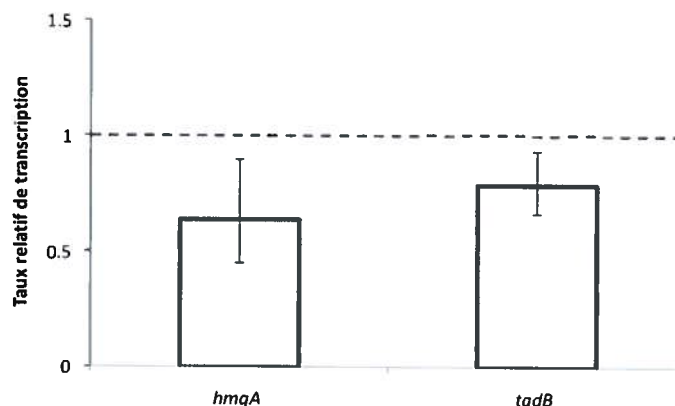


Figure 3.6. Quantification de la transcription de *hmqA* et *tadB* de *B. thailandensis* *hmqA*- par rapport à la souche sauvage.

Les calculs de transcription relative à la souche sauvage (niveau de transcription de 1) ont été effectués en utilisant le calcul de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ et donc représentent un pourcentage de transcription relatif.

On voit suite à l'essai de qRT-PCR que la transcription de *tadB* dans les deux souches est légèrement différente, avec le mutant *hmqA*- ayant une transcription de 78.4% par rapport à la souche sauvage (Fig. 3.6). On peut donc conclure que le phénotype que j'observais pour effectuer mon criblage permettait de sélectionner autant des mutants en production d'HMAQ que des mutants dans l'opéron *tad*. Aussi, l'expression de l'opéron *hmq* pourrait avoir un rôle dans l'expression de l'opéron *tad*. La validité de l'essai de qRT-PCR est aussi confirmée en utilisant les courbes de dénaturation pour chaque essai, démontrant la température à laquelle l'ADN se dénature (Annexe, Fig. 6.2).

3.5. Rapporteurs *hmqA-lacZ* chromosomiques pour les espèces *B. ambifaria* et *B. thailandensis*

Afin d'étudier plus en détail la régulation de l'expression de l'opéron *hmqABCDEFGH*, et effectuer un criblage plus spécifique sur les facteurs ayant une influence sur l'expression de l'opéron *hmq*, j'ai construit des rapporteurs chromosomiques *hmqA-lacZ* pour *B. ambifaria* et *B. thailandensis*. Il existe des variations entre les séquences promotrices dans chaque espèce, et c'est pour cette raison qu'il a fallu construire deux différents rapporteurs. Après que les plasmides contenant les rapporteurs eurent été créés, je les ai transformés dans les souches sauvages des espèces respectives, et aussi dans le mutant *hmqA*⁻ de *B. thailandensis*.

Une fois les souches rapportrices obtenues, la première expérience fut de vérifier si la l'expression de l'opéron *hmq* est affectée par l'activité de cet opéron, et donc par la production de HMAQ. Suite à l'insertion chromosomique de *hmqA-lacZ* dans chacune de ces souches, j'ai déterminé que l'activité d'expression de l'opéron *hmq* ne change pas suite à un ajout exogène de HMAQ-C₉:2 (*m/z* 284), le principal HMAQ produit par *B. thailandensis*, dans la culture cellulaire (Fig. 3.7). Ceci suggère que l'expression de l'opéron *hmq* n'est pas dépendante de la présence d'HMAQ.

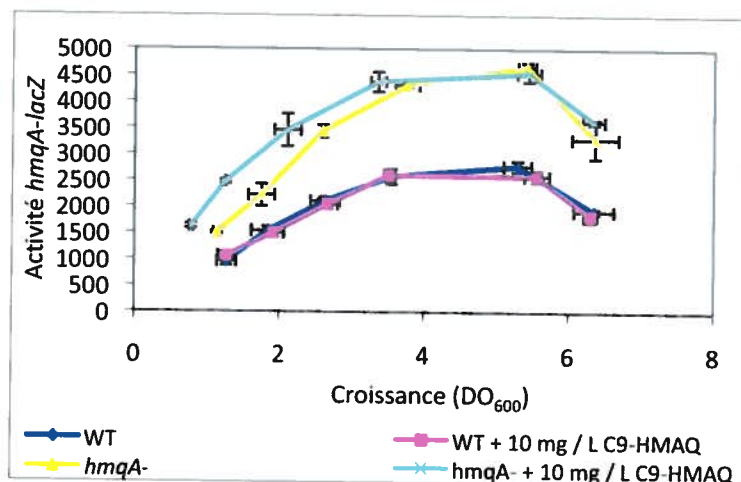


Figure 3.7. Quantification de l'expression de l'opéron *hmq* entre les souches de *B. thailandensis* WT et mutant *hmqA*⁻, avec et sans addition de C_{9,2}-HMAQ.

L'expression a été évaluée par la quantification de β -galactosidase de *hmqA-lacZ* (Unités Miller).

Cependant, on remarque que le mutant *hmqA*⁻ a un niveau d'expression de *hmqA-G* plus élevé que la souche sauvage. Une explication probable pour ce résultat a été obtenue suite à l'expérience suivante : comme décrit dans la section Matériel et méthodes (section 2.5.2), le gène de résistance à la tétracycline est en amont du rapporteur *hmqA-lacZ* sur le génome, lorsque la construction y est insérée. Dans l'expérience précédente, la souche sauvage a subi une excision du gène de résistance à la tétracycline par la flipase, et le mutant *hmqA*⁻ n'a pas subi cette excision. Si le gène de résistance est présent chez la souche sauvage, l'activité β -galactosidase est largement augmentée (Fig. 3.8). Donc, il est possible que la différence observée soit seulement causée par l'expression et l'activité du gène *tetR*.

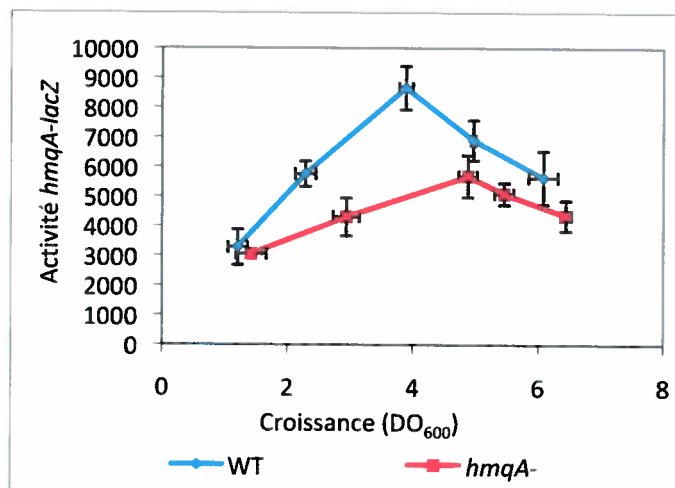


Figure 3.8. Quantification de l'expression de l'opéron *hmq* entre les souches de *B. thailandensis* WT et *hmqA*⁻, sans l'excision de *tetR* par la flipase.

L'expression a été évaluée par la quantification de β -galactosidase de *hmqA-lacZ* (Unités Miller).

La souche sauvage a donc un niveau d'expression de *lacZ* supérieure au mutant *hmqA*⁻ (Fig. 3.8). On note aussi que l'expression du gène rapporteur dans la souche sauvage est beaucoup plus élevée lorsque le gène *tetR* est présent, atteignant un niveau maximal aux environs de 9000 unités Miller (Fig. 3.8), par rapport au niveau quand *tetR* est excisé, qui est d'environ 2500 unités (Fig. 3.7). Afin de confirmer ce dernier résultat, j'ai effectué un essai de PCR quantitatif en temps réel pour observer la transcription réelle de ce gène chez la souche sauvage E264 par rapport au mutant *hmqA*⁻.

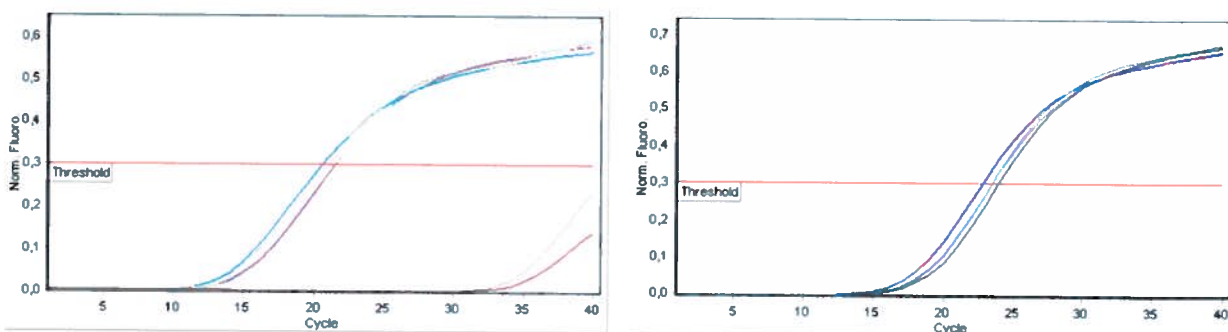


Figure 3.9. Détermination du C_T de la transcription de *rpoB* et *hmqA* en fonction du cycle de PCR pour les souches *B. thailandensis* WT et *hmqA*⁻.

L'essai a été effectué en utilisant comme matrice l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN extrait de chacune des bactéries. La quantification de *rpoB* (gauche) et *hmqA* (droite) a été effectuée en utilisant la fluorescence émise, correspondant au nombre de copies de l'ARN cible dans chaque échantillon, qui dans chaque cas a été prélevé à une densité optique DO₆₀₀ de 2.7.

En ce qui concerne la transcription de *hmqA* entre les deux souches, on remarque que la transcription dans le mutant *hmqA*⁻ est à 63,7% par rapport à la souche sauvage (Figs. 3.6, 3.9).

Ceci confirme donc le résultat que j'ai obtenu avec les rapporteurs *lacZ* chromosomiques (Fig. 3.8). La validité de l'essai de qRT-PCR est aussi confirmée en utilisant les courbes de dénaturation pour chaque essai, démontrant la température à laquelle l'ADN se dénature (Annexe, Fig. 6.1).

3.5.1. Criblage de mutants affectés dans la transcription de l'opéron *hmq* en utilisant *B. thailandensis::hmqA-lacZ*

Suite à la construction et l'insertion du rapporteur *hmqA-lacZ*, et de la mutagenèse aléatoire du génome de *B. thailandensis* grâce au transposon miniTn5-Km, un criblage a été effectué en utilisant un phénotype de β -galactosidase atténué, c'est-à-dire un phénotype blanc ou bleu pâle. Un avantage de ce criblage est que même si les gènes de l'opéron *hmq* sont atteints par le transposon, l'expression de l'opéron se fera quand même de façon normale, puisque les HMAQ ne stimulent pas leur propre production, comme nous avons vu à la figure 3.6. Donc, on peut s'attendre à ce que les mutants qui ressortent de ce criblage ne soient pas dans l'opéron mais dans uniquement dans les gènes reliés à la régulation de cet opéron.

Suite à la sélection d'environ 100 transposants sur 70000 criblés présentant un phénotype visuel atténué, j'ai effectué un essai de quantification de β -galactosidase en cinétique pour évaluer l'activité d'expression du promoteur de l'opéron *hmq* par rapport à la souche sauvage. La majorité des transposants sélectionnés n'avaient pas de différence significative lors de la quantification de β -galactosidase, comme on peut voir quelques exemples à la figure 3.10. Ceci pourrait être dû à la variation de phase de *B. thailandensis*. En effet, cette bactérie produit plusieurs différentes morphologies sur géloses, ce qui rend la sélection de mutants par criblage plus difficile. Aussi, pendant le criblage, certains des transposants sélectionnés avaient des défauts de croissance, ce que j'ai remarqué pendant l'essai de quantification. Les essais de la figure 3.11 démontrent que la croissance de deux transposants s'est arrêtée, empêchant ainsi la quantification de β -galactosidase à une densité cellulaire plus élevée.

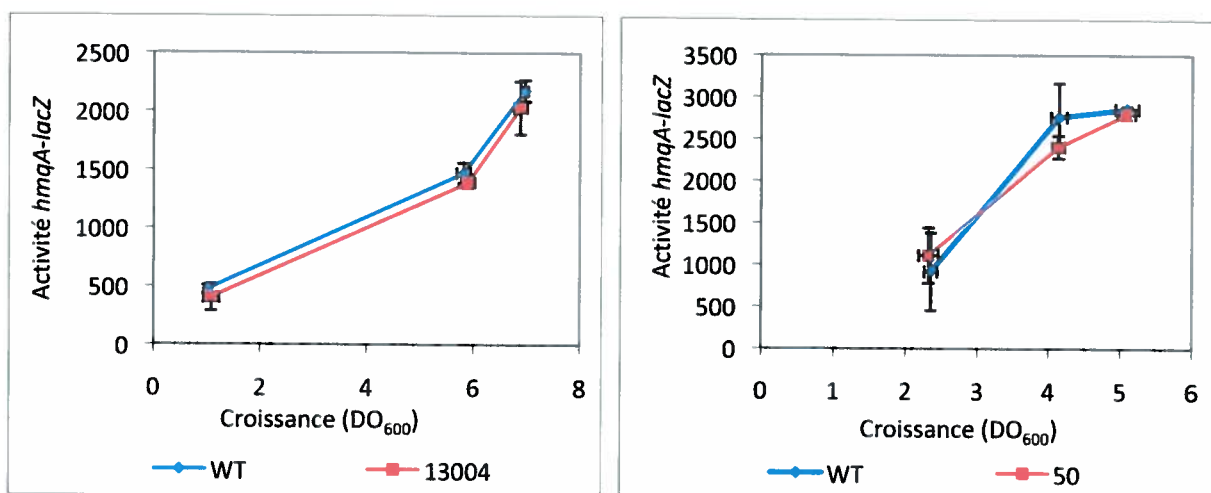


Figure 3.10. Quantification de l'expression de l'opéron *hmq* chez deux mutants par rapport à la souche sauvage de *B. thailandensis*.

Les mutants sont issus du criblage par phénotype bleu/blanc. L'expression a été évaluée par la quantification de β -galactosidase de *hmqA-lacZ* (Unités Miller).

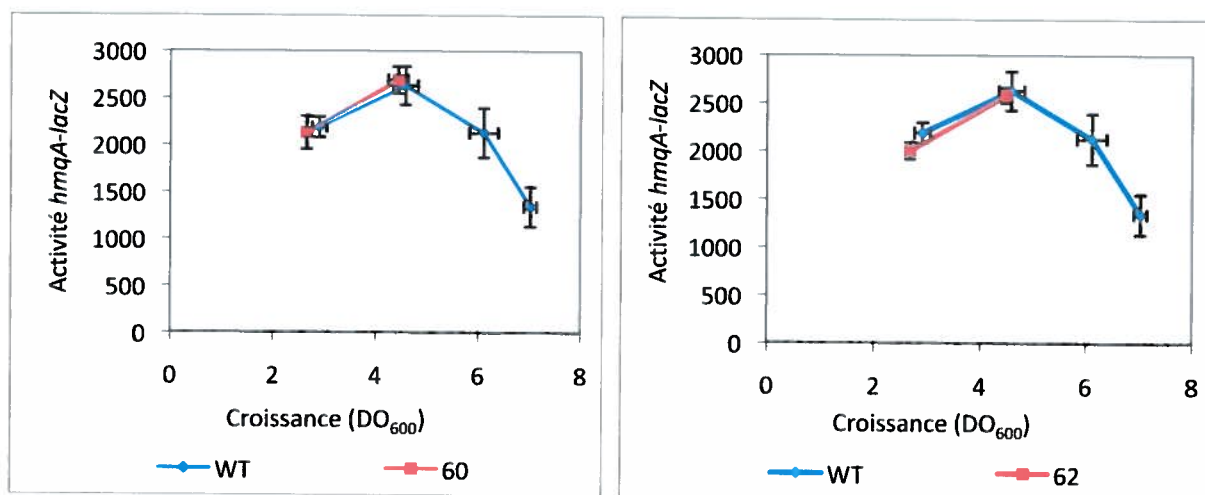


Figure 3.11. Quantification de l'activité β -galactosidase de *hmqA-lacZ* chez deux mutants ayant des défauts de croissance par rapport à la souche sauvage de *B. thailandensis*.

Les mutants sont issus du criblage par phénotype bleu/blanc. L'expression a été évaluée par la quantification de β -galactosidase de *hmqA-lacZ* (Unités Miller).

Après un criblage des cent candidats étudiés en cultures liquides, j'ai identifié sept transposants ayant non seulement une activité β -galactosidase atténuée, mais aussi une production de HMAQ atténuée ou nulle. Les prélèvements d'échantillons pour la quantification d'HMAQ par CL/SM ont été effectués en parallèle avec la quantification de β -galactosidase (Fig 3.12).

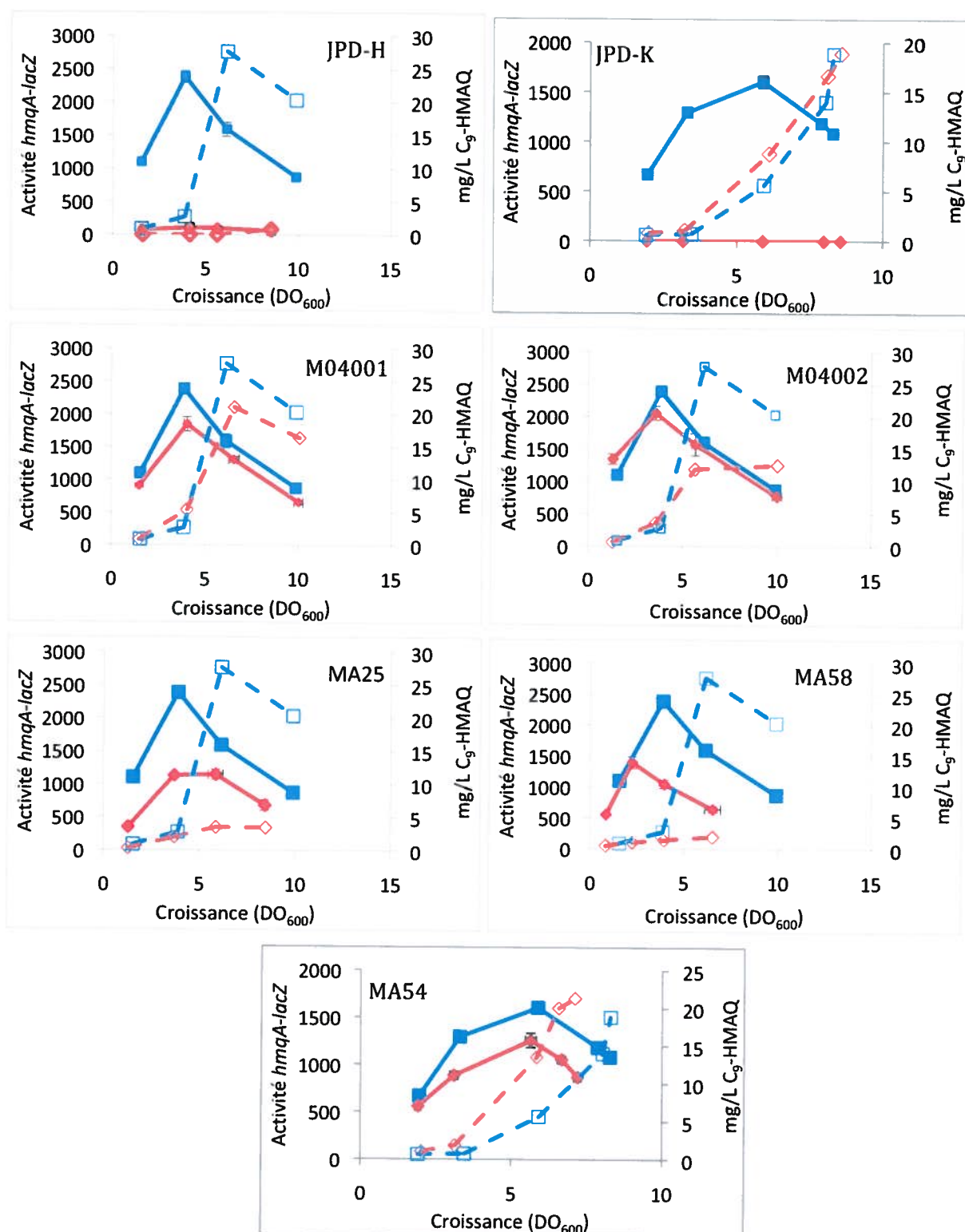


Figure 3.12. Quantification de l'activité β -galactosidase de $hmqA-lacZ$ chez sept transposants par rapport à la souche sauvage de *B. thailandensis*, et quantification réelle de la production d'HMAQ par chaque souche.

La souche sauvage est représentée en bleu, et le mutant à vérifier est présenté en rouge. Les mutants sont issus du criblage par phénotype bleu/blanc. L'expression a été évaluée par la quantification de β -galactosidase de *hmqA-lacZ* (Unités Miller) et est représentée par les lignes continues. La production d'HMAQ par chaque souche a été évaluée par CL/SM et est représentée par les ligne hachurées.

On remarque que les transposants H et K ont presque aucune activité de β -galactosidase. Par contre, le mutant K produit des HMAQ au même niveau que la souche sauvage, ce qui suggérait que le transposon s'est inséré dans le rapporteur *hmqA-lacZ* chromosomique dans ce cas. Il y a aussi des profils d'activité de β -galactosidase atténués pour les autres. Le transposon M04001 a une petite atténuation, mais quand même significative. Les transposants MA25, MA54 et MA58 présentent une activité β -galactosidase moyennement atténuée. Par contre, le profil de production des HMAQ est supérieur à la souche sauvage pour MA54. Aussi, le mutant M04002 présente un profil de β -galactosidase similaire à la souche sauvage, mais décalé par rapport à cette dernière, phénomène confirmé par le profil de production des HMAQ.

Suite à la sélection de ces transposants, il a fallu identifier le gène affecté par le transposon dans chacun des candidats. Le tableau 3.3 montre les résultats d'identification des gènes inactivés par un transposon sélectionnés suite au criblage. Les résultats de chaque essai de séquençage et les alignements avec le génome de *B. thailandensis* se trouvent en Annexe.

Tableau 3.3. Identification des gènes inactivés dans chacun des mutants retenus lors du criblage par phénotype bleu/blanc à l'aide du rapporteur *hmqA-lacZ* chromosomique. Les prédictions de fonctions putatives des gènes sont fournies par burkholderia.com

Transposant	Gène affecté	Longueur du gène affecté	Position de l'insertion du transposon	Fonction annotée
JPD-H	BTH_I1403	980	323	Régulateur transcriptionnel, famille LysR
JPD-K	<i>lacZ</i>	--	949	β -galactosidase
JPD-M04001	BTH_I12321	1541	1402	Protéine de réponse au stress (HSP20)
JPD-M04002	BTH_I12128	755	366	Régulateur transcriptionnel, famille TetR
JPD-MA25	BTH_I2557	1826	38	Protéine GTPase membranaire (TypA)
JPD-MA54	BTH_I0991	764	556	Biosynthèse LPS core glucosyltransférase
JPD-MA58	BTH_I1439*	1571	857	Transposase TnpC

*Exemple d'un gène de ce type parmi les 7 gènes TnpC sur le génome de *B. thailandensis* E264.

Le transposant JPD-H est donc un mutant dans un régulateur transcriptionnel de type LysR, et ne produit aucun HMAQ. Le transposant JPD-K est effectivement affecté dans la construction *hmqA-lacZ*, tel qu'attendu, ce qui concorde avec les résultats de CL/SM. Le transposant M04002 est aussi intéressant, vu que le gène muté a comme fonction prédite un régulateur transcriptionnel, celui-ci de type TetR. Par contre, il est peu probable que ce régulateur soit le régulateur direct de l'opéron, puisque la production des HMAQ et la transcription de l'opéron sont atténués de très peu, et non inhibés. Le transposant MA25, qui a un phénotype β -galactosidase atténué d'environ 50%, est un mutant GTPase membranaire de type *TypA*.

Les courbes de croissance ont aussi été effectuées chez ces transposants afin de noter les défauts potentiels (Fig. 3.13). On remarque que H et MA54 ont un petit défaut de croissance, mais ces défauts n'ont pas interféré avec aucune expérience.

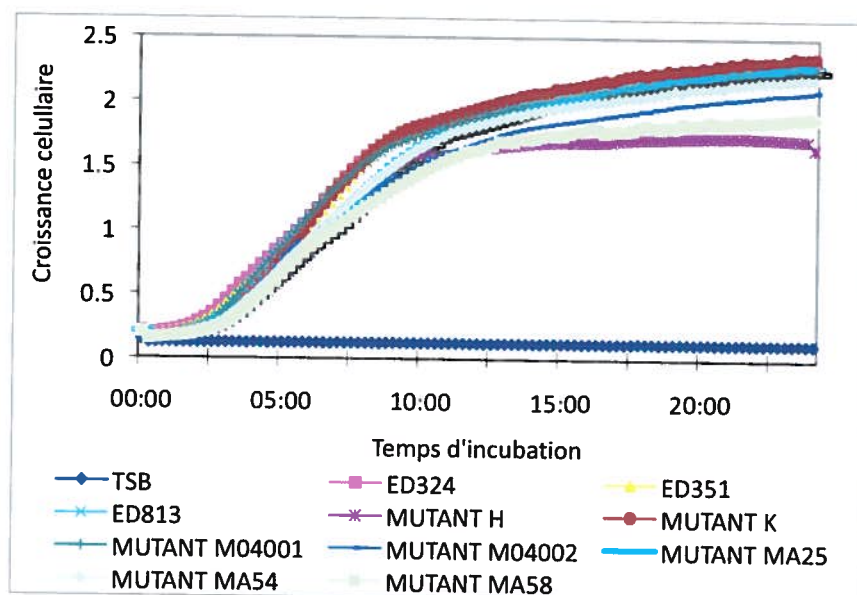


Figure 3.13. Courbe de croissance de mutants obtenus par criblage différentiel phénotypique bleu/blanc.

Les souches contrôles sont la souche sauvage E264 (ED324), le mutant *hmqA*⁻ (ED351) et la souche WT::*hmqA-lacZ* (ED813) de *B. thailandensis*, ainsi que le TSB pour un témoin négatif. Les candidats ont été mis en culture liquide TSB. Les prélèvements de densité optique (wideband 420-580 nm) pour les courbes de croissance ont été effectués par Bioscreen sur une période de 24 heures d'incubation à 37°C.

3.6. Étude de complémentation du mutant JPD-H (BTH_I1403)

Suite à l'obtention du plasmide pJPD3, un vecteur d'expression pour le gène BTH_I1403 (voir tableau 2.2), j'ai effectué l'électroporation de ce plasmide dans le mutant JPD-H de *B. thailandensis*, ainsi que dans la souche sauvage E264. En parallèle, pour voir l'effet de bruit de fond que cause le plasmide sans insert dans ces souches, j'ai aussi électroporé pME6000 pour un total de 4 souches dans cette expérience. Le but de cet essai était de déterminer si l'effet vu dans le mutant JPD-H était causé seulement par l'absence de ce gène dans la bactérie. Pour chacune de ces souches, j'ai effectué une quantification de l'activité β -galactosidase et la quantification de la production des HMAQ en parallèle. On voit à la figure 3.14 que la complémentation du gène BTH_I1403 à l'aide du plasmide a permis de rétablir en partie la production de HMAQ, ainsi que l'expression du gène rapporteur, suggérant fortement que ce gène a un impact direct sur l'expression de l'opéron *hmq*. Des espèces ayant l'opéron *hmq*, seules les espèces *B. oklahomensis* et *B. ubonensis* n'ont pas ce régulateur suite à des recherches informatiques. Je suggère donc de renommer ce gène *hmqR*.

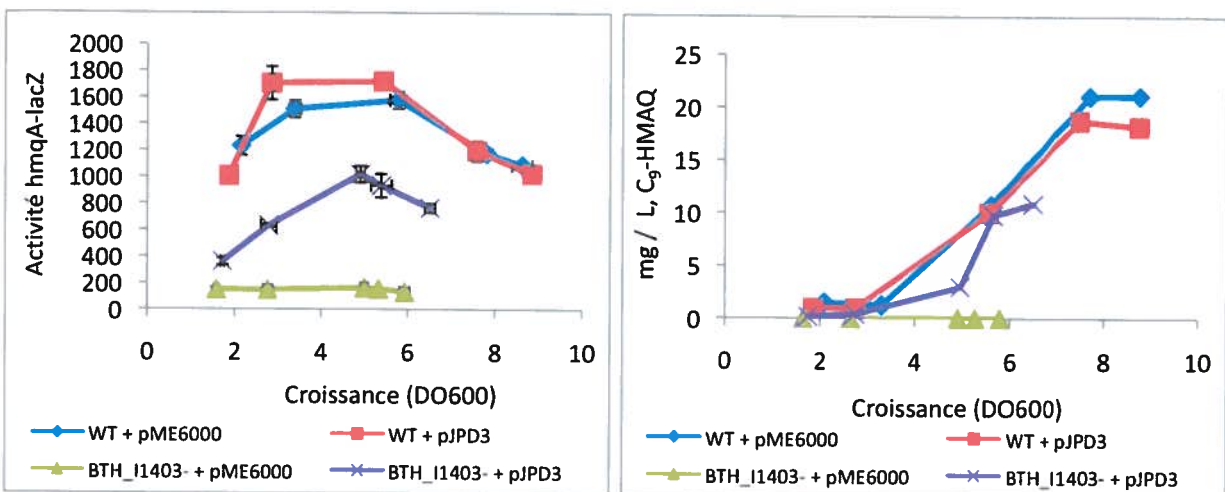


Figure 3.14. Complémentation de la mutation du transposant JPD-H avec le gène BTH_I1403 sur un plasmide. pME6000. (A) Expression du gène rapporteur *hmqA-lacZ* et (B) quantification réelle de la production d'HMAQ par chaque souche.

La souche sauvage est représentée en bleu, et le mutant JPD-H est présenté en rouge. L'expression du gène rapporteur a été évaluée par la quantification de β -galactosidase de *hmqA-lacZ* (Unités Miller) et la production d'HMAQ a été évaluée par CL/SM.

4. Discussion

4.1. Différences morphologiques entre *B. thailandensis* souche sauvage par rapport au mutant *hmqA*⁻

L'objectif principal de ce projet de maîtrise consistait à identifier les éléments régulant la transcription de l'opéron *hmqABCDEFG* et la production de HMAQ chez *B. thailandensis*. L'approche expérimentale initiale fut de trouver des milieux de culture gélosés permettant de distinguer des colonies de *B. thailandensis* produisant des HMAQ de colonies n'en produisant pas. Des milieux de culture essayés, seul le milieu Ashdown's Agar a permis de distinguer des colonies de la souche sauvage par rapport au mutant *hmqA*⁻. Ce milieu avait initialement été choisi puisque la littérature rapportait que le milieu Ashdown's Agar permettait l'identification de *B. pseudomallei* (Ashdown 1979a). Originellement, tel que décrit auparavant, des échantillons environnementaux avaient révélé la présence de plusieurs souches de *B. pseudomallei*, mais certains isolats avaient une différence assez significative par rapport à cette dernière qu'une nouvelle espèce a été proposée (Brett *et al.* 1997; Brett *et al.* 1998). Afin de confirmer que la différence de phénotype était seulement causée par la présence ou absence de HMAQ, j'ai étalé la souche sauvage et le mutant *hmqA*⁻ sur ce milieu et en présence de l'inhibiteur compétitif du précurseur des HMAQ, le 6-FABA (Lesic *et al.* 2007). Ainsi, la souche sauvage en présence de cette molécule ne produira pas de HMAQ, et devrait avoir une morphologie identique au mutant *hmqA*⁻. Ce phénomène a effectivement été observé, et on pouvait donc attribuer la différence morphologique à la présence de HMAQ. Avec la même expérience, on a pu confirmer que l'acide anthranilique est le précurseur des HMAQ, ce qui avait déjà été rapporté (Vial *et al.* 2008).

En ce qui concerne un milieu de culture permettant de distinguer des colonies de la souche sauvage de *B. ambifaria* par rapport au mutant *hmqA*⁻, j'ai observé qu'un milieu de culture, nommé Mueller-Hinton, permettait de distinguer entre ces colonies. Par contre, le même essai en présence de 6-FABA n'a pas permis d'induire le phénotype *hmqA*⁻ chez la souche sauvage, suggérant que la différence observée n'est pas causée directement par la présence ou absence de HMAQ. Je n'ai donc pas pu utiliser ce milieu pour un criblage en utilisant la différence morphologique comme critère de sélection.

4.2. Criblage fonctionnel en utilisant le milieu gélosé Ashdown pour *B. thailandensis*

Suite au criblage de 70 000 colonies sur le milieu gélosé Ashdown, j'ai identifié 14 transposants ayant un phénotype similaire à celui observé avec un mutant *hmqA⁻*. La production de sidérophores pour chacun de ces candidats a été observée en utilisant un test phénotypique sur milieu gélosé CAS, et tous les transposants retenus, sauf un ont une production de sidérophores atténuée, ce qui n'était pas attendu selon les résultats obtenus précédemment (Vial *et al.* 2008). Par contre, afin de pouvoir comparer mes résultats avec ceux de la littérature, j'aurais dû utiliser la même méthode de quantification que décrite dans l'article de Vial et al. 2008 au lieu d'une analyse qualitative. La cinétique de croissance cellulaire effectuée afin de noter quels mutants avait un défaut de croissance pouvant réduire ou inhiber la production des HMAQ indirectement a révélée que seul le mutant T11 a un tel défaut. Ce transposant est un mutant dans un senseur histidine kinase, ayant des homologies avec le senseur nommé BaeS selon les prédictions informatiques. Ce senseur est intéressant vu que le mutant T11 ne produit aucun HMAQ détectable par CL/SM. Celui-ci fait partie d'un système à deux composantes qui peut reconnaître un signal externe au niveau de la membrane, ce qui déclenche une cascade de signalisation dans la bactérie (Nagasawa *et al.* 1993). On pourrait premièrement supposer que ce système a un impact direct sur la production d'HMAQ étant donné qu'il n'en produit pas. Par contre, tel que noté à la figure 3.2, ce mutant a un grand défaut de croissance, et sa croissance n'a jamais atteint un DO₆₀₀ de 4.0. Ceci suggère que cette protéine fasse partie d'une régulation globale, regroupant plusieurs différentes cascades de régulation et affectant plusieurs activités dans la cellule, incluant possiblement des activités vitales. Donc, il se peut qu'une mutation de ce gène affecte le bon fonctionnement de la cellule, et non directement la production des HMAQ, qui sont des métabolites secondaires. L'inhibition de la production des HMAQ pourrait donc être un sous-produit de la dérégulation globale de la bactérie. Plusieurs expériences devront être effectuées pour déterminer si ce système à deux composantes a un impact direct sur la production des HMAQ. Une étude portant sur l'impact de ce système doit être effectuée pour évaluer son rôle dans la bactérie, et donc une mutation de l'effecteur et son impact sur la régulation des HMAQ pourrait répondre à ces questions.

Parmi les quatorze transposants retenus, le transposon s'est inséré à cinq reprises dans l'opéron *hmq*. Ceci est naturellement attendu, et permet de valider la méthode de criblage. J'ai donc atteint les gènes *hmqA*, *hmqD* et *hmqG* une fois, et le gène *hmqF* deux fois. Ceci est intéressant pour une étude plus approfondie de l'opéron, puisque nous avons maintenant des mutants autres que le mutant *hmqA*⁻. Il est intéressant de noter que le mutant *hmqG*⁻ ne produit aucun HMAQ, mais peut produire les HAQ (résultats non montrés), ce qui concorde avec les résultats obtenus auparavant chez *B. ambifaria* démontrant le rôle de *hmqG* en tant que méthyltransférase (Vial *et al.* 2008).

De plus, cinq des transposants issus de mon criblage ont une mutation dans un opéron nommé *tad/cpa*. Le rôle exact de cet opéron est variable entre les espèces bactériennes, mais est généralement relié à une sorte de motilité bactérienne – par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, ces gènes semblent avoir un rôle important dans l'aggrégation et l'adhérence (Tomich *et al.* 2007). Chez *Burkholderia*, par contre, la fonction de cet opéron n'a pas été étudiée. Pourtant, la morphologie des transposants ayant une mutation dans cet opéron est plus étendue et semble avoir moins d'adhérence à la surface. Une si grande fréquence de sélection de mutants de cet opéron suggérerait qu'une telle mutation engendre une déficience dans la production des HMAQ. Donc, afin de vérifier si la transcription de l'opéron *hmq* était affectée dans un mutant *tad*, le rapporteur *hmqA-lacZ* a été employé. La comparaison des taux de transcription de l'opéron *hmqA-G* entre la souche sauvage et le mutant n'a révélée aucune différence significative. Ce résultat concorde avec la production réelle identique de HMAQ de chacune de ces souches dans le cas du mutant utilisé. L'autre mutant *tadC*⁻ obtenu, par contre, a une production d'HMAQ fortement atténuée, donc il est possible que l'emplacement du transposon dans ce gène ait un rôle important.

J'ai ensuite vérifié si une mutation dans l'opéron *hmq* affecte la transcription de l'opéron *tad*. Pour ce faire, j'ai réalisé une expérience de qRT-PCR pour évaluer la transcription du gène *tadB* dans la souche sauvage E264 de *B. thailandensis* par rapport au mutant *hmqA*⁻. L'hypothèse était que les HMAQ auraient un effet de régulation sur l'opéron *tad*, expliquant ainsi pourquoi j'ai eu une telle fréquence de sélection dans mon criblage. J'ai déterminé que la transcription de *tadB* était de 78% dans le mutant *hmqA*⁻ par rapport à la souche sauvage. Il

semble donc que l'inactivation d'*hmqA* ait un effet, quoique minime. Suite à ces deux expériences, il semblerait que l'opéron *tad* n'a pas d'influence importante sur l'expression de l'opéron *hmq*, et le contraire semble aussi être vrai. Pour avoir davantage d'information, on pourrait tenter le même essai de qRT-PCR en utilisant de l'ARN extrait de colonies sur des pétris de milieu Ashdown, vu que c'est sur ce milieu que la différence a été observée. Il est possible que les colonies réagissent différemment sur ce milieu, par rapport à une culture liquide de TSB. Aussi possible serait la culture de ces colonies en culture liquide Ashdown. Ceci nous permettrait donc de voir si la différence de transcription est plus grande dans cette condition.

De façon surprenante, j'ai obtenu deux mutants *tadC* lors de mon criblage, et un de ces mutants (T46) produit 7% de HMAQ par rapport à la souche sauvage, phénomène qui a été confirmé en répétant ces analyses trois fois. Il serait donc intéressant de répéter ces expériences de qRT-PCR en utilisant ce mutant qui est vraisemblablement déficient en production d'HMAQ. La différence de production d'HMAQ entre les deux mutants *tadC* est intéressante et inattendue. Cette grande différence pourrait être attribuée à l'emplacement du transposon dans le gène. En effet, si le transposon s'est inséré dans une partie importante du gène dans le cas du mutant qui ne produit presque plus de HMAQ (T46), et que l'autre mutant est seulement atteint sur une petite partie du gène, alors cela pourrait expliquer la grande différence entre les deux mutants. On remarque, tel que démontré à la figure 3.3, que dans le mutant T19 le transposon s'est inséré plutôt vers la partie C-terminale du gène. Contrairement à cela, le transposon s'est inséré dans la partie N-terminale du gène dans le cas du mutant T46. Ceci indique que cette partie a un impact majeur dans soit la fonctionnalité de la protéine, et/ou dans la régulation de la production des HMAQ. La proximité du transposon aux gènes en aval de *tadC* suggère que ces gènes, en commençant avec *tadD* (BTH_12540), ont un impact sur la production des HMAQ. Ainsi, il se peut que l'opéron *tad* ait un rôle à jouer dans la régulation des HMAQ, mais ce rôle ne serait pas directement des gènes *tadB* et en partie *tadC*. Pourtant, ces deux gènes sont pourtant sensés être essentiels au bon fonctionnement de l'opéron chez d'autres espèces (Tomich *et al.* 2007). Il faudrait donc creuser davantage pour déterminer le rôle spécifique de ces deux gènes, dans le contexte de l'opéron.

Parmi les autres transposants sélectionnés lors du criblage, on note la sélection d'un mutant dont la production d'HMAQ est de 22%, dont la fonction hypothétique est soit la réparation de l'ADN, soit une ATPase. Ces fonctions hypothétiques ne permettent pas d'attribuer un rôle précis à ce gène dans la régulation de la production des HMAQ, mais on peut présumer qu'une ATPase pourrait intervenir dans une étape d'une cascade de régulation qui aurait un impact sur la régulation de l'expression de l'opéron *hmq*. Par contre, le rôle précis de cette enzyme dans la cascade de régulation reste à être élucidé, et plusieurs expériences devront être effectuées avant de déterminer son rôle. Par exemple, s'il advienne une découverte d'un effecteur dans une cascade de régulation, il serait important de déterminer si ce gène codant pour une ATPase est important pour le fonctionnement de cet effecteur. Donc, quoique ce gène semble important, il ne semble pas selon les prédictions informatiques qu'il soit un effecteur direct de l'expression de l'opéron *hmq*.

On note aussi la sélection d'un transposant dont le gène affecté, BTH_II1366, code pour une protéine hypothétique. Par recherche informatique, ce gène a une forte homologie à un gène chez *B. pseudomallei*, et le gène est décrit comme protéine hypothétique de bactériophage. Bien que nous ne puissions pas spéculer sur le rôle de cette protéine, la mutation semble avoir un effet important sur la production des HMAQ, qui est évaluée à 6.4% dans ce cas-ci. On peut donc présumer l'impact direct de ce petit gène de 221 paires de bases, mais on devrait tout de même évaluer l'impact de la mutation engendrée par le transposon sur un gène avoisinant. Ceci est évidemment le cas avec chacun des transposants obtenus.

4.3. Suivi de l'expression de *hmqABCDEFG* à l'aide de rapporteurs chromosomiques *hmqA-lacZ* chez *B. thailandensis*

L'utilisation d'un rapporteur chromosomique *hmqA-lacZ* dans la souche sauvage E264 et le mutant *hmqA*⁻ de *B. thailandensis* a permis d'estimer les niveaux d'expression relatifs de l'opéron *hmq*. Basé sur le mécanisme à l'œuvre chez *P. aeruginosa*, où le HHQ et le PQS, produits grâce à l'opéron *pqsABCDE*, agissent comme ligand activant leur propre production, l'hypothèse initiale était que la souche sauvage E264 aurait un niveau supérieur de l'expression du gène rapporteur que le mutant ne produisant pas de HMAQ. Ceci ne semblait cependant pas être le cas initialement. Par contre, j'ai découvert que la présence du gène de résistance à la

tétracycline associée au rapporteur chromosomique pourrait avoir un impact sur l'activité du rapporteur *lacZ*, faussant possiblement les résultats. Ainsi, en utilisant la souche sauvage sans excision de *tetR*, pour ainsi comparer les deux souches de façon égale, on observe que la souche sauvage a un niveau d'expression de *hmqA-lacZ* supérieur au mutant *hmqA*, ce qui concorde avec l'hypothèse initiale.

Afin de confirmer le résultat obtenu avec le rapporteur chromosomique, j'ai effectué un essai de qRT-PCR sur le gène *hmqA*. J'ai donc voulu vérifier la transcription de ce gène dans la souche sauvage E264 et dans le mutant *hmqA*- pour des fins de comparaison. Le niveau de transcription de *hmqA* dans le mutant *hmqA*- est à 63.7% par rapport à la souche sauvage. Ceci confirme les résultats obtenus avec le rapporteur *hmqA-lacZ* et l'hypothèse concernant l'effet indirect causé par la présence du gène de résistance à la tétracycline dans la construction *hmqA-lacZ*. La conclusion est donc que pour utiliser le système miniCTX-*lacZ* pour la construction de rapporteurs chromosomiques, il est préférable d'exciser le gène de résistance à la tétracycline avant de quantifier l'activité d'expression. Sinon, l'activité calculée ne reflètera peut-être pas le taux réel.

Un autre élément important est que l'ajout exogène de 10 mg/L de C₉-HMAQ n'a aucun effet sur l'activité d'expression de l'opéron dans aucune des deux souches. Ceci suggère donc que les HMAQ n'ont pas d'activité de rétroaction positive sur l'opéron *hmq*. Ceci va à l'encontre de l'hypothèse, puisque les HAQ principaux chez *P. aeruginosa*, le HHQ et le PQS, activent leur propre transcription en se liant au régulateur transcriptionnel MvfR pour l'activer. Ceci représente donc une autre différence entre les systèmes de HAQ chez *Burkholderia* et *Pseudomonas*. Habituellement, une molécule de QS active sa propre transcription en se liant au régulateur transcriptionnel de l'opéron responsable de sa propre production, mais ce n'est pas le cas chez *Burkholderia*. Donc, sous cet angle, les HMAQ ne représentent pas un système de QS typique mais plutôt un nouveau système avec une hiérarchie de régulation différente. Pourtant, la transcription de l'opéron *hmq* dans un mutant *hmqA*- est inférieure à la souche sauvage. Ceci pourrait s'expliquer en presumant qu'un gène de l'opéron est nécessaire à l'activation complète de la transcription. Si on compare à *P. aeruginosa*, où le gène *pqsE* semble avoir plusieurs rôles,

on pourrait présumer que *hmqE* serait similaire. Pour vérifier ceci, on pourrait évaluer l'expression de l'opéron dans un mutant *hmqG*- à l'aide du rapporteur *hmqA-lacZ*.

4.3.1. Criblage fonctionnel de *B. thailandensis*::*hmqA-lacZ* en utilisant le phénotype bleu/blanc

L'insertion des rapporteurs *hmqA-lacZ* chromosomiques dans les souches de *B. thailandensis* a donné lieu à des colonies avec un phénotype bleu caractéristique en présence du substrat chromogène X-Gal. J'ai donc utilisé ce phénotype, en combinaison avec une mutagenèse aléatoire, pour un criblage fonctionnel dans lequel j'ai sélectionné des colonies ayant un phénotype atténué, c'est-à-dire blanc ou bleu pâle, ce qui correspondrait à une expression de *hmqA-lacZ* atténuée. Suite à un criblage d'environ 70 000 colonies, soit une couverture théorique de 10 fois le génome, j'ai sélectionné 100 candidats ayant un phénotype visuel atténué. Suite à cela, j'ai effectué une quantification de l'activité *hmqA-lacZ* pour chacun de ces candidats pour identifier une déficience dans l'expression de l'opéron. De ces 100 transposants, j'en ai retenu sept qui avaient une activité diminuée ou nulle. Nous soupçonnons que la diminution drastique des candidats retenus est partiellement due à la grande variation de phase de *B. thailandensis*. En effet, cette bactérie produit plusieurs sortes de variants ce qui rend donc la sélection plus difficile. En fait, il a été rapporté qu'un mutant déficient en production d'AHL a un phénotype différent d'une souche sauvage, donc le QS pourrait avoir un rôle dans la morphologie de la colonie sur milieu solide (Chandler *et al.* 2009). La variation de phase pourrait donc affecter l'expression de l'opéron *hmq*, mais ceci devrait être étudié plus en détail. Il est aussi intéressant de noter que j'ai retenu 17 candidats ayant un phénotype visuel plus fort que la souche sauvage, c'est-à-dire un bleu plus foncé, ce qui pourrait signifier que le gène muté dans ces candidats serait un répresseur de l'expression de l'opéron *hmq*. Par contre, aucun candidat n'avait une activité *hmqA-lacZ* différente de la souche sauvage lorsque cette activité a été quantifiée en cultures liquides.

Suite à la sélection de ces sept candidats, j'ai de nouveau effectué un essai β -galactosidase sur chacun en cinétique, ainsi qu'une quantification réelle d'HMAQ par CL/SM en parallèle. Deux des transposants obtenus, JPD-H et JPD-K, ont montrés une activité β -galactosidase presque nulle. Pour JPD-H, la production d'HMAQ était également nulle, donc ce

candidat est extrêmement intéressant. Le transposant JPD-K, quant à lui, a une activité *hmqA-lacZ* nulle, mais sa production d'HMAQ est identique à la souche sauvage, ce qui suggère que le transposon s'est inséré dans le rapporteur chromosomique *hmqA-lacZ*. Quant aux autres candidats, en général chacun avait une activité *hmqA-lacZ* atténuée, et une production d'HMAQ concordante à cette atténuation. La seule exception est le mutant MA54, qui a montré une augmentation de production des HMAQ par rapport à la souche sauvage, contredisant la cinétique d'activité *hmqA-lacZ*. Par contre, en tenant compte des données pour la croissance de la bactérie, on a remarqué un ralentissement de la croissance à partir d'une DO₆₀₀ de 6.0. Le candidat a donc suivi une cinétique de production similaire à la souche sauvage, quoique cette cinétique s'est produite plus rapidement. Afin de confirmer que l'atténuation de la production des HMAQ n'était pas causée par un défaut de croissance important, j'ai effectué une cinétique de croissance de chacun des mutants retenus dans ce criblage. Les seuls mutants qui avaient un défaut de croissance étaient JPD-H et MA58. Par contre, ces défauts de croissance n'étaient pas majeurs, et n'ont pas interféré avec aucune expérience.

Ensuite, j'ai procédé à l'identification de l'emplacement du transposon dans chacun des sept candidats retenus. Pour le premier transposant, JPD-H, qui avait une activité *hmqA-lacZ* et une production HMAQ presque nulles, le transposon s'est inséré dans un régulateur transcriptionnel de type LysR. Ceci est exactement le type de régulateur transcriptionnel qui contrôle l'opéron *pqs* chez *P. aeruginosa*, MvfR (Cao *et al.* 2001). J'ai donc trouvé un régulateur qui semble avoir un impact non seulement sur la transcription de l'opéron *hmq*, mais aussi sur la production d'HMAQ. Évidemment, tel que décrit auparavant, les régulateurs transcriptionnels de type LysR sont tellement nombreux et divers qu'il est difficile d'associer un mécanisme précis à BTH_11403.

Pour confirmer que ce gène est celui qui est responsable de l'atténuation, j'ai effectué une étude de complémentation en clonant le gène en question sur un vecteur d'expression, et en le transformant dans le transposant JPD-H à l'aide d'un plasmide, j'ai pu rétablir non seulement l'activité *hmqA-lacZ* chez cette bactérie mais aussi sa production d'HMAQ. On peut donc conclure que ce gène a un impact direct sur le système *hmq*/HMAQ. Par contre, ce que nous ne savons pas encore, c'est si ce régulateur est le régulateur direct de l'opéron. Pour ce faire, il

faudrait effectuer des essais visant à vérifier si ce régulateur se lie au promoteur du l'opéron *hmq*, par exemple par une expérience de « electrophoretic mobility shift assay ».

Une telle expérience consiste premièrement en la purification de la protéine. Ceci pourrait se faire en attachant une étiquette hexahistidine à une extrémité de la protéine. Ceci peut se faire en ligant une amplification PCR du gène régulateur dans un site de clonage multiple d'un plasmide qui contient la séquence codant pour cette étiquette. Le résultat, quand le plasmide est exprimé, est un régulateur transcriptionnel avec six histidines sur une extrémité. On peut ensuite purifier cette protéine par chromatographie liquide, en utilisant une colonne de chromatographie se basant sur des ions de nickel. Les histidines de la protéine se lieront donc à ces ions, ce qui permettra de la purifier. Lorsqu'on obtient la protéine pure, on peut procéder à l'expérience de retardement sur gel. Ceci consiste en la migration de deux solutions sur un gel d'électrophorèse non-dénaturant de polyacrylamide (PAGE). La première des deux solutions ne devrait contenir que la protéine pure, et la deuxième devrait contenir la protéine pure avec une amplification PCR pure du promoteur *hmqA* auquel un régulateur transcriptionnel direct devrait se lier. Si la protéine se lie au promoteur, alors la liaison à l'ADN retardera la migration de la protéine régulatrice. S'il n'y a aucune liaison ADN-protéine, alors le profil de migration du régulateur sera comme pour la première solution. Ceci nous dira donc si BTH_11403 est le régulateur direct de l'opéron *hmq*, ou s'il s'agit d'un régulateur contrôlant un signal plus en amont de la cascade.

Le transposant JPD-K, ayant une activité *hmqA-lacZ* nulle mais qui ne présente aucun défaut de production d'HMAQ, a en effet acquis une mutation dans la construction *hmqA-lacZ*. Ceci confirme l'hypothèse qui avait été avancée. Pour le transposant JPD-M04001, le transposon s'est inséré dans une protéine de réponse au stress du groupe HSP20, selon les prédictions informatiques (burkholderia.com). Ce transposant a une faible atténuation dans l'activité *hmqA-lacZ* et la production d'HMAQ. En connaissant le gène affecté, on peut présumer que le manque de cette protéine de stress rend la bactérie moins apte à répondre aux stimuli externes, et les HMAQ, étant des métabolites secondaires, pourraient donc être affectés. Quant au mutant M04002, le transposon s'est inséré dans un gène codant pour un autre régulateur transcriptionnel, cette fois-ci de la famille TetR. C'est donc le deuxième régulateur

transcriptionnel à être sélectionné dans le criblage. Ce régulateur-ci semble avoir un effet d'atténuation dans la production d'HMAQ, surtout à densité optique DO₆₀₀ d'environ 6. Par contre, il est peu probable que ce régulateur ait un effet sur l'expression de l'opéron, puisque son activité β -galactosidase est presque identique à la souche sauvage. Il se peut donc que cette enzyme affecte la production des HMAQ à un niveau post-transcriptionnel, soit à la traduction ou à l'exportation de la molécule. Ainsi, une étude de ce mutant au niveau traductionnel pourrait élucider le rôle exact de ce régulateur par rapport aux HMAQ. En ce qui concerne le transposant MA25, le transposon s'est inséré dans un gène codant pour une GTPase membranaire de type TypA. Des études antérieures sur ce type de protéine démontrent que TypA est impliqué dans la virulence, étant présent dans plusieurs bactéries pathogènes, notamment *E. coli* (Scott *et al.* 2003). Ce transposant, ayant une activité *hmqA-lacZ* atténuée et un profil de production d'HMAQ fortement atténué, pourrait donc représenter un élément du signal en amont, au niveau de la membrane. On peut présumer que cette protéine membranaire est impliquée dans la conversion du signal suite à la captation. Par contre, il faut évidemment prouver l'implication directe de ce gène dans la production d'HMAQ, ce qui peut se faire, comme décrit auparavant, par une complémentation par plasmide.

Le mutant MA58, qui a une activité *hmqA-lacZ* et une production d'HMAQ fortement atténuées, a subi une mutation dans un gène codant pour une transposase de type TnpC. Les transposases sont habituellement impliquées dans la réorganisation génétique. Par contre, l'étude plus approfondie de ce transposant est très difficile compte tenu du fait qu'il existe sept copies identiques de ce gène sur le génome de *B. thailandensis* E264. De plus, lorsqu'on effectue une recherche informatique sur le génome de cette bactérie en utilisant « TnpC », la prédiction offerte par burkholderia.com, il existe quatre gènes de plus qui ont un domaine de similarité avec ces sept gènes. Ainsi, on ne peut savoir exactement quel gène a été affecté par le transposon. Vu que la fonction prédite du gène TnpC est une transposase et fait partie d'un transposon de la famille IS66, on pourrait présumer qu'un gène avoisinant aurait un rôle à jouer dans régulation de la production des HMAQ, et non TnpC lui-même (Gourbeyre *et al.*). Par contre, la répétition de ce gène sur le génome de la bactérie empêche d'étudier les gènes avoisinants et leurs rôles possibles dans la régulation des HMAQ.

4.4. Conclusion et perspectives

L'objectif principal du projet était d'identifier des gènes impliqués dans le contrôle de l'opéron *hmq*, et de caractériser davantage ce nouveau système potentiel de QS. Ces objectifs ont été atteints, surtout en ce qui concerne l'identification d'un régulateur transcriptionnel ayant un impact direct sur la production des HMAQ. Aussi, j'ai réussi à déterminer que les HMAQ ne stimulent pas leur propre production, ce qui suggère qu'ils ne forment pas un système de QS. La suite des travaux serait de caractériser davantage le régulateur transcriptionnel HmqR afin de déterminer si c'est le régulateur direct de l'opéron *hmq*, en utilisant par exemple un essai de retardement sur gel. Il reste notamment à vérifier l'expression de *hmqA-lacZ* dans un mutant *hmqG*- afin de comparer son niveau d'expression à ceux de la souche sauvage et du mutant *hmqA*-. Ceci pourrait nous fournir des informations quant au potentiel de rôles multiples pour les gènes de l'opéron *hmq*. Des expériences sur les autres gènes identifiés comme ayant un impact sur la production des HMAQ devraient aussi être effectuées afin de pouvoir obtenir un modèle préliminaire de la cascade de régulation de la production des HMAQ.

5. Références

- Antoine, R. et C. Loch (1992). Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. Mol Microbiol **6**(13): 1785-1799.
- Applied Biosystems (2008). Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf
- Ashdown, L. R. (1979a). An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. Pathology **11**(2): 293-297.
- Ashdown, L. R. (1979b). Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in the clinical laboratory. J Clin Pathol **32**(5): 500-504.
- Aung, M. K. et T. T. Mar (2008). Re-emergence of melioidosis in Myanmar. Trans R Soc Trop Med Hyg **102 Suppl 1**: S10-11.
- Azegami, K., K. Nishiyama, D. Watanabe, I. Kadota, A. Ohuchi et C. Fukazawa (1987). *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. Int J Syst Bacteriol **37**(2): 9.
- Ballard, R. W., N. J. Palleroni, M. Doudoroff, R. Y. Stanier et M. Mandel (1970). Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliiicola* and *P. caryophylli*. J Gen Microbiol **60**(2): 199-214.
- Becher, A. et H. P. Schweizer (2000). Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. Biotechniques **29**(5): 948-950, 952.
- Brett, P. J., D. Deshazer et D. E. Woods (1997). Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. Epidemiol Infect **118**(2): 137-148.
- Brett, P. J., D. DeShazer et D. E. Woods (1998). *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. Int J Syst Bacteriol **48 Pt 1**: 317-320.
- Britigan, B. E., G. T. Rasmussen et C. D. Cox (1997). Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. Infect Immun **65**(3): 1071-1076.
- Burkholder, W. H. (1950). Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology **40**: 3.
- Cao, H., G. Krishnan, B. Goumnerov, J. Tsongalis, R. Tompkins et L. G. Rahme (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14613-14618.
- Chandler, J. R., B. A. Duerkop, A. Hinz, T. E. West, J. P. Herman, M. E. Churchill, S. J. Skerrett et E. P. Greenberg (2009). A mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation. J Bacteriol **191**(19): 5901-5909.
- Choi, K. H., T. Mima, Y. Casart, D. Rhol, A. Kumar, I. R. Beacham et H. P. Schweizer (2008). Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. Appl Environ Microbiol **74**(4): 1064-1075.

- Coenye, T., E. Mahenthiralingam, D. Henry, J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, D. Speert et P. Vandamme (2001a). *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. Int J Syst Evol Microbiol **51**(4): 1481-1490.
- Coenye, T. et P. Vandamme (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environ Microbiol **5**(9): 719-729.
- Coenye, T., P. Vandamme, J. R. Govan et J. J. LiPuma (2001b). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. J Clin Microbiol **39**(10): 3427-3436.
- Conway, B. A. et E. P. Greenberg (2002). Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. J Bacteriol **184**(4): 1187-1191.
- Cugini, C., M. W. Calfee, J. M. Farrow, 3rd, D. K. Morales, E. C. Pesci et D. A. Hogan (2007). Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol **65**(4): 896-906.
- D'Argenio, D. A., M. W. Calfee, P. B. Rainey et E. C. Pesci (2002). Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. J Bacteriol **184**(23): 6481-6489.
- de Bentzmann, S., M. Aurouze, G. Ball et A. Filloux (2006). FppA, a Novel *Pseudomonas aeruginosa* Prepilin Peptidase Involved in Assembly of Type IVb Pili. J Bacteriol **188**(13): 4851-4860.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik et K. N. Timmis (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J Bacteriol **172**(11): 6568-6572.
- Dennis, J. J. et P. A. Sokol (1995). Electrotransformation of *Pseudomonas*. Methods Mol Biol **47**: 125-133.
- Déziel, E., S. Gopalan, A. P. Tampakaki, F. Lépine, K. E. Padfield, M. Saucier, G. Xiao et L. G. Rahme (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. Mol Microbiol **55**(4): 998-1014.
- Déziel, E., F. Lépine, S. Milot, J. He, M. N. Mindrinos, R. G. Tompkins et L. G. Rahme (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1339-1344.
- Diggle, S. P., P. Lumjiaktase, F. Dipilato, K. Winzer, M. Kunakorn, D. A. Barrett, S. R. Chhabra, M. Camara et P. Williams (2006). Functional genetic analysis reveals a 2-alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. Chem Biol **13**(7): 701-710.
- Dubern, J. F. et S. P. Diggle (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. Mol Biosyst **4**(9): 882-888.

- Duerkop, B. A., J. Varga, J. R. Chandler, S. B. Peterson, J. P. Herman, M. E. Churchill, M. R. Parsek, W. C. Nierman et E. P. Greenberg (2009). Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. J Bacteriol **191**(12): 3909-3918.
- Eberl, L. (2006). Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. Int J Med Microbiol **296**(2-3): 103-110.
- Farrow, J. M., 3rd, Z. M. Sund, M. L. Ellison, D. S. Wade, J. P. Coleman et E. C. Pesci (2008). PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. J Bacteriol **190**(21): 7043-7051.
- Floret, N., X. Bertrand, M. Thouverez et D. Talon (2009). Nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Exogenous or endogenous origin of this bacterium? Pathol Biol (Paris) **57**(1): 9-12.
- Fuqua, C., S. C. Winans et E. P. Greenberg (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol **50**: 727-751.
- Gotschlich, A., B. Huber, O. Geisenberger, A. Togl, A. Steidle, K. Riedel, P. Hill, B. Tummler, P. Vandamme, B. Middleton, M. Camara, P. Williams, A. Hardman et L. Eberl (2001). Synthesis of multiple N-acylhomoserine lactones is widespread among the members of the *Burkholderia cepacia* complex. Syst Appl Microbiol **24**(1): 1-14.
- Gourbeyre, E., P. Siguier et M. Chandler (2010). Route 66: investigations into the organisation and distribution of the IS66 family of prokaryotic insertion sequences. Research in Microbiology In Press, Corrected Proof.
- Haraga, A., T. E. West, M. J. Brittnacher, S. J. Skerrett et S. I. Miller (2008). *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. Infect Immun **76**(11): 5402-5411.
- Harley, V. S., D. A. Dance, B. S. Drasar et G. Tovey (1998). Effects of *Burkholderia pseudomallei* and other *Burkholderia* species on eukaryotic cells in tissue culture. Microbios **96**(384): 71-93.
- Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo et J. C. Wallace (1988). A large family of bacterial activator proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6602-6606.
- Heroven, A. K. et P. Dersch (2006). RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. Mol Microbiol **62**(5): 1469-1483.
- Hoang, T. T., A. J. Kutchma, A. Becher et H. P. Schweizer (2000). Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. Plasmid **43**(1): 59-72.
- Huber, B., K. Riedel, M. Hentzer, A. Heydorn, A. Gotschlich, M. Givskov, S. Molin et L. Eberl (2001). The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. Microbiology **147**(Pt 9): 2517-2528.
- Inglis, T. J., M. Aravena-Roman, S. Ching, K. Croft, V. Wuthiekanun et B. J. Mee (2003). Cellular fatty acid profile distinguishes *Burkholderia pseudomallei* from avirulent *Burkholderia thailandensis*. J Clin Microbiol **41**(10): 4812-4814.

- Inglis, T. J., A. Merritt, G. Chidlow, M. Aravena-Roman et G. Harnett (2005). Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. J Clin Microbiol **43**(5): 2201-2206.
- Inglis, T. J. et J. L. Sagripanti (2006). Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. Appl Environ Microbiol **72**(11): 6865-6875.
- Jacobs, M. A., A. Alwood, I. Thaipisuttikul, D. Spencer, E. Haugen, S. Ernst, O. Will, R. Kaul, C. Raymond, R. Levy, L. Chun-Rong, D. Guenther, D. Bovee, M. V. Olson et C. Manoil (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14339-14344.
- Jones, S., B. Yu, N. J. Bainton, M. Birdsall, B. W. Bycroft, S. R. Chhabra, A. J. Cox, P. Golby, P. J. Reeves, S. Stephens et al. (1993). The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. EMBO J **12**(6): 2477-2482.
- Juhas, M., L. Wiehlmann, P. Salunkhe, J. Lauber, J. Buer et B. Tummeler (2005). GeneChip expression analysis of the VqsR regulon of *Pseudomonas aeruginosa* TB. FEMS Microbiol Lett **242**(2): 287-295.
- Kachlany, S. C., P. J. Planet, M. K. Bhattacharjee, E. Kollia, R. DeSalle, D. H. Fine et D. H. Figurski (2000). Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. J Bacteriol **182**(21): 6169-6176.
- Karlyshev, A. V., P. C. Oyston, K. Williams, G. C. Clark, R. W. Titball, E. A. Winzeler et B. W. Wren (2001). Application of high-density array-based signature-tagged mutagenesis to discover novel *Yersinia* virulence-associated genes. Infect Immun **69**(12): 7810-7819.
- Kespichayawattana, W., P. Intachote, P. Utaisinchaoen et S. Sirisinha (2004). Virulent *Burkholderia pseudomallei* is more efficient than avirulent *Burkholderia thailandensis* in invasion of and adherence to cultured human epithelial cells. Microb Pathog **36**(5): 287-292.
- Kim, H. S., M. A. Schell, Y. Yu, R. L. Ulrich, S. H. Sarria, W. C. Nierman et D. DeShazer (2005). Bacterial genome adaptation to niches: divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. BMC Genomics **6**: 174.
- Kooi, C., B. Subsin, R. Chen, B. Pohorelic et P. A. Sokol (2006). *Burkholderia cenocepacia* ZmpB is a broad-specificity zinc metalloprotease involved in virulence. Infect Immun **74**(7): 4083-4093.
- Kwon, Y. M. et S. C. Rieke (2000). Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences. J Microbiol Methods **41**(3): 195-199.
- Laub, M. T., H. H. McAdams, T. Feldblyum, C. M. Fraser et L. Shapiro (2000). Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. Science **290**(5499): 2144-2148.
- Lee, D. G., J. M. Urbach, G. Wu, N. T. Liberati, R. L. Feinbaum, S. Miyata, L. T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Déziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L. G. Rahme et F. M. Ausubel (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol **7**(10): R90.

- Lee, M. A., D. Wang et E. H. Yap (2005). Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. FEMS Immunol Med Microbiol **43**(3): 413-417.
- Lefebvre, M. D. et M. A. Valvano (2002). Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. Appl Environ Microbiol **68**(12): 5956-5964.
- Lépine, F., S. Milot, E. Déziel, J. He et L. G. Rahme (2004). Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J Am Soc Mass Spectrom **15**(6): 862-869.
- Lesic, B., F. Lépine, E. Déziel, J. Zhang, Q. Zhang, K. Padfield, M. H. Castonguay, S. Milot, S. Stachel, A. A. Tzika, R. G. Tompkins et L. G. Rahme (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. PLoS Pathog **3**(9): 1229-1239.
- Lewenza, S., B. Conway, E. P. Greenberg et P. A. Sokol (1999). Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J Bacteriol **181**(3): 748-756.
- Lewenza, S. et P. A. Sokol (2001). Regulation of ornibactin biosynthesis and N-acyl-L-homoserine-lactone production by CepR in *Burkholderia cepacia*. J Bacteriol **183**(7): 2212-2218.
- Liberati, N. T., J. M. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, E. Drenkard, G. Wu, J. Villanueva, T. Wei et F. M. Ausubel (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2833-2838.
- Maddocks, S. E. et P. C. Oyston (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. Microbiology **154**(Pt 12): 3609-3623.
- Malott, R. J., A. Baldwin, E. Mahenthiralingam et P. A. Sokol (2005). Characterization of the *cciIR* quorum-sensing system in *Burkholderia cenocepacia*. Infect Immun **73**(8): 4982-4992.
- Maurhofer, M., C. Reimann, P. Schmidli-Sacherer, S. Heeb, D. Haas et G. Defago (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.
- McKenney, D., K. E. Brown et D. G. Allison (1995). Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. J Bacteriol **177**(23): 6989-6992.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory: 352-355.
- Miller, M. B. et B. L. Bassler (2001). Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology **55**(1): 165-199.
- Moore, R. A., S. Reckseidler-Zenteno, H. Kim, W. Nierman, Y. Yu, A. Tuanyok, J. Warawa, D. DeShazer et D. E. Woods (2004). Contribution of Gene Loss to the Pathogenic Evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. Infect Immun **72**(7): 4172-4187.

- Muraoka, S., R. Okumura, N. Ogawa, T. Nonaka, K. Miyashita et T. Senda (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.
- Nagasawa, S., K. Ishige et T. Mizuno (1993). Novel Members of the Two-Component Signal Transduction Genes in *Escherichia coli*. J Biochem **114**(3): 350-357.
- NanoDropTechnologies (2007). Technical Support Bulletin: 260/280 and 260/230 ratios.
- Ngaay, V., Y. Lemeshev, L. Sadkowski et G. Crawford (2005). Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. J Clin Microbiol **43**(2): 970-972.
- Parsek, M. R., R. W. Ye, P. Pun et A. M. Chakrabarty (1994). Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region. Journal of Biological Chemistry **269**(15): 11279-11284.
- Pearson, J. P., K. M. Gray, L. Passador, K. D. Tucker, A. Eberhard, B. H. Iglewski et E. P. Greenberg (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 197-201.
- Pearson, J. P., L. Passador, B. H. Iglewski et E. P. Greenberg (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1490-1494.
- Perez-Rueda, E. et J. Collado-Vides (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K12. Nucleic Acids Res **28**(8): 1838-1847.
- Perez-Rueda, E. et J. Collado-Vides (2001). Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. J Mol Evol **53**(3): 172-179.
- Pesci, E. C., J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg et B. H. Iglewski (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11229-11234.
- Pesci, E. C., J. P. Pearson, P. C. Seed et B. H. Iglewski (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **179**(10): 3127-3132.
- Picossi, S., B. R. Belitsky et A. L. Sonenshein (2007). Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* *gltAB* expression by GltC. J Mol Biol **365**(5): 1298-1313.
- Pier, G. B., M. Grout, T. S. Zaidi, J. C. Olsen, L. G. Johnson, J. R. Yankaskas et J. B. Goldberg (1996). Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. Science **271**(5245): 64-67.
- Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins et F. M. Ausubel (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science **268**(5219): 1899-1902.
- Reckseidler, S. L., D. DeShazer, P. A. Sokol et D. E. Woods (2001). Detection of Bacterial Virulence Genes by Subtractive Hybridization: Identification of Capsular Polysaccharide

- of *Burkholderia pseudomallei* as a Major Virulence Determinant. Infect Immun **69**(1): 34-44.
- Rholl, D. A., L. A. Trunck et H. P. Schweizer (2008). In vivo HimarI transposon mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei*. Appl Environ Microbiol **74**(24): 7529-7535.
- Rosenfeld, J. A., I. N. Sarkar, P. J. Planet, D. H. Figurski et R. DeSalle (2004). ORFcurator: molecular curation of genes and gene clusters in prokaryotic organisms. Bioinformatics **20**(18): 3462-3465.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol **47**: 597-626.
- Schmoock, G., R. Ehricht, F. Melzer, A. Rassbach, H. C. Scholz, H. Neubauer, K. Sachse, R. A. Mota, M. Saqib et M. Elschner (2009). DNA microarray-based detection and identification of *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia* spp. Mol Cell Probes **23**(3-4): 178-187.
- Schuster, M., C. P. Lostroh, T. Ogi et E. P. Greenberg (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. J Bacteriol **185**(7): 2066-2079.
- Schwyn, B. et J. B. Neilands (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem **160**(1): 47-56.
- Scott, K., M. A. Diggle et S. C. Clarke (2003). TypA is a virulence regulator and is present in many pathogenic bacteria. Br J Biomed Sci **60**(3): 168-170.
- Seyedsayamdost, M. R., J. R. Chandler, J. A. V. Blodgett, P. S. Lima, B. A. Duerkop, K.-I. Oinuma, E. P. Greenberg et J. Clardy (2010). Quorum-Sensing-Regulated Bactobolin Production by *Burkholderia thailandensis* E264. Organic Letters **12**(4): 716-719.
- Simon, R., U. Priefer et A. Puhler (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nat Biotech **1**(9): 784-791.
- Sitnikov, D. M., J. B. Schineller et T. O. Baldwin (1995). Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. Molecular Microbiology **17**(5): 801-812.
- Skerker, J. M. et L. Shapiro (2000). Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. EMBO J **19**(13): 3223-3234.
- Sokol, P. A., U. Sajjan, M. B. Visser, S. Ginges, J. Forstner et C. Kooi (2003). The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections. Microbiology **149**(Pt 12): 3649-3658.
- Song, Y., C. Xie, Y. M. Ong, Y. H. Gan et K. L. Chua (2005). The BpsIR quorum-sensing system of *Burkholderia pseudomallei*. J Bacteriol **187**(2): 785-790.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory et M. V. Olson (2000). Complete genome

- sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature **406**(6799): 959-964.
- Thongdee, M., L. A. Gallagher, M. Schell, T. Dharakul, S. Songsivilai et C. Manoil (2008). Targeted mutagenesis of *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia pseudomallei* through natural transformation of PCR fragments. Appl Environ Microbiol **74**(10): 2985-2989.
- Tomich, M., P. J. Planet et D. H. Figurski (2007). The tad locus: postcards from the widespread colonization island. Nat Rev Microbiol **5**(5): 363-375.
- Tremblay, J. (2007). Caractérisation de la motilité de type "swarming" de *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de maîtrise.
- Tropel, D. et J. R. van der Meer (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 474-500.
- Ulrich, R. L., D. Deshazer, E. E. Brueggemann, H. B. Hines, P. C. Oyston et J. A. Jeddloh (2004a). Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. J Med Microbiol **53**(Pt 11): 1053-1064.
- Ulrich, R. L., H. B. Hines, N. Parthasarathy et J. A. Jeddloh (2004b). Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. J Bacteriol **186**(13): 4350-4360.
- van Keulen, G., L. Girbal, E. R. van den Bergh, L. Dijkhuizen et W. G. Meijer (1998). The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO₂ fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. J Bacteriol **180**(6): 1411-1417.
- van Keulen, G., A. N. Ridder, L. Dijkhuizen et W. G. Meijer (2003). Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. J Bacteriol **185**(4): 1245-1252.
- Vanlaere, E., J. J. Lipuma, A. Baldwin, D. Henry, E. De Brandt, E. Mahenthiralingam, D. Speert, C. Dowson et P. Vandamme (2008). *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. Int J Syst Evol Microbiol **58**(Pt 7): 1580-1590.
- Vial, L., F. Lépine, S. Milot, M. C. Groleau, V. Dekimpe, D. E. Woods et E. Déziel (2008). *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. J Bacteriol **190**(15): 5339-5352.
- Viollier, P. H., N. Sternheim et L. Shapiro (2002a). A dynamically localized histidine kinase controls the asymmetric distribution of polar pili proteins. EMBO J **21**(17): 4420-4428.
- Viollier, P. H., N. Sternheim et L. Shapiro (2002b). Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13831-13836.
- Viswanathan, P., T. Ueki, S. Inouye et L. Kroos (2007). Combinatorial regulation of genes essential for *Myxococcus xanthus* development involves a response regulator and a LysR-type regulator. Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7969-7974.

- Wade, D. S., M. W. Calfee, E. R. Rocha, E. A. Ling, E. Engstrom, J. P. Coleman et E. C. Pesci (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **187**(13): 4372-4380.
- Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks et B. H. Iglewski (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. J Bacteriol **185**(7): 2080-2095.
- Wilson, R. L., M. L. Urbanowski et G. V. Stauffer (1995). DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the *gcv* and *gcvA* control regions of *Escherichia coli*. J Bacteriol **177**(17): 4940-4946.
- Winstanley, C. et C. A. Hart (2000). Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara(-) phenotypes. J Clin Microbiol **38**(2): 883-885.
- Wongprompitak, P., S. Sirisinha et S. C. Chaiyaroj (2009). Differential gene expression profiles of lung epithelial cells exposed to *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* during the initial phase of infection. Asian Pac J Allergy Immunol **27**(1): 59-70.
- Xiao, G., E. Déziel, J. He, F. Lépine, B. Lesic, M. H. Castonguay, S. Milot, A. P. Tampakaki, S. E. Stachel et L. G. Rahme (2006a). MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. Mol Microbiol **62**(6): 1689-1699.
- Xiao, G., J. He et L. G. Rahme (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., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki et M. Arakawa (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol Immunol **36**(12): 1251-1275.

6. Annexe

6.1 Résultats de séquençage et alignements avec le génome de *B. thailandensis*

6.1.1. Criblage de mutants sur milieu Ashdown's Agar

Mutant T6

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|4678049 T6_AM21_087.ab1

```
aagaccgtggtggggatccccggttacgataacttcgtatagcatatacgaagtt
atcagatccccctggatggaaaacgggaaaggttccgtccaggacgctacttgtgtataa
gagtcaggctctggggtgtccggcctattccgcccccatgcccctagacatgtgtgtact
aattcatcggtggtccctccgcccacgaatcacctcgcgtacacaggcttcttacc
agggtgtcggatctcctgggtactttccttccccgggcccagggttagcccaccattcaa
cttcagcgtcttctacgggtgcagggaagaaaccacccgaattcaaccggaacttcac
gcgtagctcatcagccccaggagctgacacgagaattccgacaactcgaccaaagtgcc
tttcgcttgctcgcgaaggccgagcattgcgtctcgtcggacacaaactgggcgcggtta
gtccttaatcgtcatggcggtccccccccccgtagtgcgacgcgtggccatcctttttt
tgttttcgtcccttttgcgcgtgtcttttttcttctcttctcttctctcttctctct
tctgtttttctcccccttccgttcttccgtttgttcccgctctccgctcctccttctct
ctttctcttctccctcctcctcgttccgttcccttctcttaattcctccccctcttttatc
atttttccccctcctcttccccctcccttttctcttgcctccatacctaaccctctataccct
tctttctcaccgcccctctactctccttccctacttttcccccttttctccttccctcct
ctccttttctactccccctcttctgctccccctcttctatcacctatttctcttctcctcct
tttcccccttcttctaccttctctgacgatcttcccttcccttttttttccacgcactta
ctgttcttctctccctcccccttactcctctgttccacctcaactttccatcttatacgt
tcgcatactccctcccccttcttactttatcccccggttttttctgtacatatatctctcat
atcgcgctaatacttttttacactctccattatacacgtacaccgattacgcttttagttac
tccttagacttcacttttctcctcctccc
```

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: [putative DNA mismatch repair protein](#)

Query	170	ATGTGTGTACTAATTCATCGGGCTGGCTCCCTCCGCCAACGAATCACCT-CGCGTACAC	228
Sbjct	3146715	ATATGTGTACGACTTCTCCGAAGTCTCTCGTCCCAGCGGATCACCTGCACGT-CAA	
	3146773		
Query	229	AGGCTT-CTTACCAGGGTGTGCGATCTCCTGGGTACTTTCCTTCCCCGGGCCAGGGATTA	287
Sbjct	3146774	ATGCATACTTACCAGGGGTAAGGATCTGCTGGGTAATTCGTTGCTCGGGACAGGGATTA	
	3146833		
Query	288	GCCCACCATTCAACTTCAGCGTCTTCTACGGGTGCAGGGCAAGAAACCACCCGAATTCAA	347
Sbjct	3146834	GCCCACCATTCAACTTCAGCGTCTTCTACGGGTGCAGGGCAAGAAACCACCCGAATTCAA	
	3146893		
Query	348	CCGCGAACTTCAGCGTAGCTCATCAGCCCCAGGGAGCTGACACGAGAATTCCGACAACT	407
Sbjct	3146894	CCGCGAACTTCAGCGTAGCTCATCAGCCCCAGGGAGCTGACACGAGAATTCCGACAACT	
	3146953		

```

Query   408          CGACCAAAGTGCCTTTTCGCTTGCTCGCGCAAGGCCGAGCATTGCGTCTCGTCGGACACAA 467
      |||
Sbjct   3146954      CGACCAAAGTGCCTTTTCGCTTGCTCGCGCAAGGCCGAGCATTGCGTCTCGTCGGACACAA
      3147013

Query   468          ACTGGGCGCGGTAGTCCTTAATCGTCATGGCGT 501
      |||
Sbjct   3147014      ACTGGGCGCGGTAGTCCTTAATCGTCATGGCGT 3147047

```

Pour le mutant T6, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_I2739.

Mutant T11

Séquence obtenue de Génome Québec :

```

>ID|4677852 T11_AM21_088.ab1
agaccgtggtggggatccccggttaacgataacttcgtatagcatacattatacgaagtt
atcagatccccctggatggaaaacgggaaaggtccgtccaggacgctacttgtgtataa
gagtcaggcacgagcgcgcccgcacgcgagcagcgcgagatcgctcgcgac
gcgtagcgcacggttgccgatcaggttcagcagcgcgctgcgacgaggttcacgtcg
cacacgtggcacggcgcgggcggggtgtaatgctcgtcggtggtcagaagtggcactt
acggtgttagtgctttgatcgggtatcgagtgagatgttttctctgccgtctgcggtg
atgtcctatctcgctaataatgttcttcgcgcgtgttgggtctctacacgtcattatgttc
tcctgctgtgacatctctgtgtccagaatacaacttaccttgttttgtctttcatctact
tctcttatttggatgttttttacttttaggttacgtcgtgggattcgattttctcgttt
ttatttgttgaccgcatttctcctaataatgttttttcggttgacacatatttctcttgatg
gatctctttaaaggttctaacttgtgaccccatctttcataccatcctatttcttgggtc
tctcctactatcggtcctttgctttgttaaccctctgccaccttacatatgtcttactc
gtctctacattagtttgtcacgactcatctccttctcctattctttctaccctggccatt
ttgtccttccctccctctcttttttctactctcttctcctccctaacccttagttttgca
ctgcgcctttgtttcgttttctgtaacttctaatactttgcggcggttactaattcgtctct
tttcttctgtccacactcgatgttaccgactctattctactgtcgtttcatccctttttt
tgttttcctactcctatcttctatcttccctgtttcttctctgttgacgtccgggactc
tcatgatttattgtacgtaattgtaagccttattatttacccttagtggtgccccttatac
agacattacttttttagtgctggttctttatacccttcccttcttgttatacgcctgtat
tcttcgttttatttttctgctgacgacttaatactctgcttcttctcgcagtgctctttt
ttcccatattattgtctactgctacttacgttagttgcttctccttattctggcgattc
tttctcgatcacacgactcgtgctcatttggctatttttctatggtgccagcatatta
atcgataacctatcttgcggtatagctattttcgtactatattggtcttacctcttctga

```

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: [sensor histidine kinase](#)

```

Query   122          AGTCAGGCACGAGCGCGCCCGCATCGCCGAGCGACGCCCGCAGCGAGATCGTCGTCGACG 181
      |||
Sbjct   2103393      AGTCAG-CACGAGCGCGCCCGCATCGCCGAGCGACGCCCGCAGCGAGATCGTCGTCGACG
      2103335

Query   182          CGTAGCGCATGCCGTTGCGGATCAGGTTACGACGCGCGCTGCGACGAGGTTACGTCGCG 241
      |||
Sbjct   2103334      CGTAGCGCATGCCGTTGCGGATCAGGTTACGACGCGCGCTGCGACGAGCTTCGCGTCGCG
      2103275

Query   242          ACACGTGGCACGGCGCGGCGCG 263
      |||
Sbjct   2103274      ACACGTGGCAC-GCG-GGCGCG 2103255

```

Pour le mutant T11, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_III740.

Mutant T13

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|4677863 T13 AM21 005.ab1

nnaaggggagggggatcgctaataatcatggacatagttgtttcctgtgtgataaagaagaagt
 aaaatgccgcgccctacctacctaggatctcgatcccggtcgtattaaccggaagaagt
 tcaatcataaaggccactcttgcgaatgaccttgagtttgtccctctatagtgagtcggg
 atcgctatttagttaggatccgttcttcgactgcgggatccggcagcgcgtcggcgcaat
 tgagaaacggcggaactgcatccccggcaactcaaagacaaacgtcggccaatcttcgg
 cagggggcaagttcgcgcggcaaaagtcattccatcgctcagcgtcgcgaagaggggtgagtt
 tgaagttcgcgatagcgggtgcggcagcgggcccgggtcagatgatcgggcccgccgccc
 gtattgaaccgcgatgcctaagagacgggtgtccacgcacacgtactattcgacgcgtggg
 acaacttgtttatcatggtactttcattcattacctcgcataattttatatatctctct
 tgtcttcacctatagtagttgtaattatgtaactcccctctgttaaaatttaacatttt
 atctacctcttaataactccatatttctgttcttataagatctcttagactatattcaatat
 tagaaaagttgcctaacttattttttgtaatttcattcttttaatcgttacttttagcaat
 ctatctctttccctttttttattttttccctttactcttcattttttcgttatttttatcc
 aaacccttattatttttgcggtgtaactattattagttattatcctaaacttattctattc
 tatcttttatcactcttctttgactttactattctttccctcctgggtttttcttccacaa
 tatattatactataatagtatcttacttattatagttttcttaacttgttcttgtcttgt
 ttctataaaacattctttacttattccctattttatccctttccaactttatcttagaactt
 tttacttctatacactgtgctatatccgctttttcttccataaattcgctcttatccac
 gattttcataattacatctatgattttccctccctttaaccattattcactcgcgatttct
 agctatatgattattttttagcgttgatcctgtctcgtctcaggtttacatatctcgttac
 tattctttctagattcctc

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: **AMP-dependent synthetase and ligase**

Query	201	CGTTCTTCGACTGCGGTATCCGGCAGCGCGTCGGCGCAATTGAGAAACGGCGGAAACTGC	260
Sbjct	227349	CGTTCTTCGACTGCGGTATCCAGCAGCGCGGGCGCAATTGAGAAACGGCGGAAACTGC	227290
Query	261	ATCCCCGGCAACTCAAAGACAAACGTCGGCCAATCTTCGGCAGGGGGCAAGTTCGCGCGG	320
Sbjct	227289	AGCCCCGGCAACTCAAAGACAAACGTCGGCCAATCTTCGGCAGGGGGCAAGTTCGCGCGG	227230
Query	321	CAAAAGTCATCCATCGTCAGCGCTCGCAAGAGGGTGAGTTTGAAGTTCGCGATAGCGGTG	380
Sbjct	227229	CAAAAGTCATCCATCGTCAGCGCTCGCAAGAGGGTGAGTTTGAAGTTCGCGATAGCGGTG	227170
Query	381	CGGCAGCGGGCCGGGTGAGATGATCGGGCCCGGCCCGCCGATATGAACCGCATGCCTA	440
Sbjct	227169	CGGC-GCGGGCCGGGCCAGATGATCGGGCCCGGCCCGCCGACCTGAATCGCGATGCCAA	227111
Query	441	AGAGACGGTGTC	452
Sbjct	227110	AGAGACGGCGTC	227099

Pour le mutant T13, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH II1935.

Mutant T18

>ID|4677865 T18_AM21_006.ab1

```
taagaccgtggtggggatccccgttacgataacttcgtatagcatacattatacgaagt
tatcagatccccctggatggaaaacgggaaagggtccgtccaggacgctacttgtgtata
agagtcaggccggcggtcggtgccgcaggcgagcgcgacgctcacgttcaacggcggtg
ccccccccctactagtcgacgctggccaaattcnaacgcggtgggctcgggtgatctcg
aacgcgctgtcgggcccgcgcaatcgctgacggggccgaacggcctcacgctctacgtg
ctcggcatttcgggtgccggtcggcacgggtgctcaatccgggtggtctccgtgctgctgaac
ctgcttggccccctgctgagctcgctcgaccagggtcgctgctgcccgtggtgaacctgctc
ggcgtgccccccccggtaactagtcgacgctggccatnttggaaaccttacgtgcctcttt
acacgcgtattccatggtaactttctctcatgaccacaatgacattcttgatgtctcttg
ctctcacccatatggcagctgctggtgtgtcccccatctcatcaattgtcgactgttct
tctctcctttcgtcttctcgttttccaatctcactttcacttattcgacttctctaca
ctactcatccttcttattttcattcaacttttactctttcctaccctcctttccctatct
ttttttcttctctacctttttttctcattcttattcccttctcttctaccctcccttttc
tttccccgcagtttcttctcgttttttcccttattctttcactcgctcctccatttccct
cttctcttactattccgttttcttctcgtctcctccctctccttcttcttcttcttctc
tccctctttcttttaattcctattttcctctattcatctcctctcctttcttctatcttc
cctcacttatttcccttttttttctctttctcctttttctgttccctctctccgcgtttt
ttttaccttctctccctttttataacctgcttacgttcctttctacctcctttttcttaac
acctttactctttttgctccctcttcccccttttttttcatcccccttatatccccctt
cctgtcccttatcttattgcttttttccctcccccttccct
```

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence:

conserved hypothetical protein

Query	129	GCCGGCGGTGCTGCCGAGCGAGCGCGGCGACGCTCACGTTCAACGGCGTGcc---ccc	185
Sbjct	2892685	GCCGGCGGTGCTGCCGAGCGAGCGCGGCGACGCTCACGTTCAACGGCGTGGCGGGCGA	
	2892626		
Query	186	ccccGT--ACTAGTCGACGCGTGGCCAAATTCNAACGCGGTGGGCTCGGTGATCTCGAAC	243
Sbjct	2892625	CGCCGACGACTATCAGACGA-----CGAATTCGAACGCGGTGGGCTCGGTGATCTCGAAC	
	2892571		
Query	244	GCGCTGTCGGGCGCCGCGCAATCGCTGACGGGGCCGAACGGCCTCACGCTCTACGTGCTC	303
Sbjct	2892570	GCGCTGTCGGGCGCCGCGCAATCGCTGACGGGGCCGAACGGCCTCACGCTCTACGTGCTC	
	2892511		
Query	304	GGCATTTCGGTGCCGGTCGGCACGGTGCTCAATCCGGTGGTCTCCGTGCTGCTGAACCTG	363
Sbjct	2892510	GGCATTTCGGTGCCGGTCGGCACGGTGCTCAATCCGGTGGTCTCCGTGCTGCTGAACCTG	
	2892451		
Query	364	CTTGGCCCCGTGCTGAGCTCGCTCGACCAGGTGCTCGTGCCGCTGTTGAACCTGCTCGGC	423
Sbjct	2892450	CTTGGCCCCGTGCTGAGCTCGCTCGACCAGGTGCTCGTGCCGCTGTTGAACCTGCTCGGC	
	2892391		
Query	424	GTGc 427	
Sbjct	2892390	GTGC 2892387	

Pour le mutant T18, le transposon s'est donc inséré dans le gene BTH_I2535.

Mutant T19

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|4677866 T19_AM21_021.ab1

```
naagaccgtggtggggatcccccggttacgataacttcgtatagcatacattatacgaagt
tatcagatccccctggatggaaaacgggaaagggtccgtccaggacgctacttgtgtata
agagtcagtagccgcaactgctcgagcagcatccggctcctctcggcgtccatctgcttgt
actactcgacgcgtggccagcgtccccctccccggtagtcgacgcgtggccattntn
nntnttcctcttttttttgggctcctttctctctgttttctgctgctttcgtggctcgt
cgggtggctcctttgtgtgttttcttttgtctctttgtgcccttttccccctcctgtgtccc
tccgttttttcttccctcctcccccttgttcttttccgtttctggcgcccttttgtcgcc
tcgtttttggctccttttcttccgcctccttccgtgttctgtctcctccctctctgctct
tcttctcttcttttctggtggctgtcctctccgggtcctctccgctcttttgtcggtttttt
ttgtcttcgccccgcttcttcttggcctctttgtgctctgccccttcttctcttccgc
gctctcgtctcttgttgctctctctcgcggttcttctcgtctccttttttccctgtct
ttccctgtcttcttccctgtttttcttctccttcttctcctgtttctctgctttttt
ttttctctcttcttctcctcgtcccttcttctccttttttccgcttcttgcctccctc
gcctcctccgcttctcgtgttttttgtgttccctcgttttcccttcccttcc
cttccctcttctgctcgtcggttgccctcttctcctcctcgttctcctcctctctcgtt
ttcgctccctcgtctcctctctcttcttctcttcttcccttcttttcccttctttt
gctttgcttcttcttctgctgctgctgcggttccctctctgtttgtcttctctctctcg
ccttctcttcttcttcttctgctgtgtgttctccttttctgctcgcggttttctctctgt
cttctcctgctccgctcctccttgttctctgtgccttgtttcccccttctcctctctt
ccctccccctgttttctcgccctcttctgctccttcttgccttttttctgctctgcgcc
cctctgtgtttcgtcctctgcgcttctgtctctgctcttccctccttct
```

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: [membrane protein, putative](#)

Query	128	GTAGCCGCACTGCTCGAGCAGCATCCGGTCCTCTTCGGCGTCCATCTGCTTG	179
Sbjct	2896136	GTAGCCGCACTGCTCGAGCAGCATCCGGTCCTCTTCGGCGACGATCTGCTTG	2896187

Pour le mutant T19, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_I2538.

Mutant T30

Séquence obtenue de Génome Québec:

>ID|4677870 T30_AM21_053.ab1

```
aagaccgtggtggggatcccccggttaacgataacttcgtatagcatacattatacgaagtt
atcagatccccctggatggaaaacgggaaagggtccgtccaggacgctacttgtgtataa
gagtcagctcgtggtcttctggctcgcgtcgcggatgcagaagcggcggtgcggatcgt
tcgccagttgccgctcgtttctcgacggcatcgtgcgcctcgtcacgctcggcaacagcgt
gcccgcgcggttccaggcgacgctgcagacgaccgacgcgcgcgtgcgcggctgcctcga
tcacgtgtcgcggatgctgcgctcgggcgtccacccccccggactagtcgactcgtggcc
agcgttataccggatctgcgagttcacaggctcgcgggctcgggtgctgcggatgcccgact
ctctcggcgtgcccccccccgtagtcgacgcgtggccatctaataatgttatgaatca
gtatctttttaatgttatagctattcccatgaaactatgtgttctctcatatctcacaat
tgaattactccctattatagttcgactgtgcggttttaatggttcttagactgacaccc
cgctcctctgtaatcgtctcttatgactttgaacctttatctgcgggtgctccgatcataat
gggattctttccagggttctgtttcctttttgattctgaatgtaattaatccggtttaca
tttccctaagttactcgataatttttttctaccgtgccgtattttttacctcgacttat
cgttctttcttgtccagatcgataatctctaaagtaacctgctaactctctgtgcttatgcct
tgcataataagaccgcggtgtacctgtatttgcataattctcgggttttctgctcgttata
atgttacttctaatacagggcgggtgccatcgacacatcattttcgaatgacatattaagt
ctatcgttaacattgggtaagataaacctgttaatcagctctacctacctccggtctgca
```

Alignement avec le programme informatique BLAST:

Query	127	GCTCGTGGTCTTTCTGGCTCGCGTCGCGGATGCAGAAGCGGCGGCTGCGGATCGTTCGCCA 	186
Sbjct	2897080 2897021	GCTCGTGGTCTTTCTGGCTCGCGTCGCGGATGCAGAAGCGGCGGCTGCGGATCGTTCGCCA	
Query	187	GTTGCCGTGCTTTTCTCGACGGCATCGTGCGCCTCGTCACGCTCGGCAACAGCGTGCCCGC 	246
Sbjct	2897020 2896961	GTTGCCGTGCTTTTCTCGACGGCATCGTGCGCCTCGTCACGCTCGGCAACAGCGTGCCCGC	
Query	247	CGCGTTCCAGGCGACGCTGCAGACGACCGACGCGCCGCTGCGCGGCTGCCTCGATCACGT 	306
Sbjct	2896960 2896901	CGCGTTCCAGGCGACGCTGCAGACGACCGACGCGCCGCTGCGCGGCTGCCTCGATCACGT	
Query	307	GTCGCGGATGCTGCGCTCGGGCGTCCA--ccccccGGACTAGTCGACTCGTGGCCAGC 	363
Sbjct	2896900 2896844	GTCGCGGATGCTGCGCTCGGGCGTTCGAGATCGACCGCGGATGGTCTA--CGTCGCC-GC	
Query	364	GTTATACCGGATCTGCGAGTTCACAGGTCGCGGGCTCGGTGCTGCGGATGCCCG 	417
Sbjct	2896843	GCTCTACCGGATCAAGGAGTTC-GAGCTCGTGGGCTCGGTGCTGCGGCTGTCCG	2896791

Mutant T31

```
>ID|4950627 T31 AM68 038.ab1
```

114

gcctgttgtctgcgctctgtccttttctgttgctccctgccctctttgctgccggtctgt
gtgtcgtggggccctgctgttggctgctggttgctggtgtgctgccgtgcgcgtc

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: [3-oxoacyl-](#)

Query	112	GTGCCGGCAGATGCTCGACAAGCATCGGCTCGCGCTCGGCGATATCGGGCTCGTCGTGCC	171
Sbjct	2351348	GTGCCGGCAGATGCTCGACAAGCATCGGCTCGCGCTCGGCGATATCGGGCTCGTCGTGCC	
	2351289		
Query	172	GCATCAGCGGAACTGAGGATCAGCGAAGCGGTGATCGAGCAGCTCGGCCTGCCGCGCGA	231
Sbjct	2351288	GCATCAGCCGAACCTGCGGATCATCGACGCGGTGATCGAGCAGCTCGGCCTGCCGCGCGA	
	2351229		
Query	232	GCGCTGCATGATTTCGTCGAGGACCTCGGCAACATGGCGAGCGCCGCGTTTCCGGTCGC	291
Sbjct	2351228	GCGCTGCATGATTTCGTCGAGGACCTCGGCAACATGGCGAGCGCCGCGTTTCCGGTCGC	
	2351169		
Query	292	ACTCGCGCTCGCGCACGAGCAGGGGCGGATGCCGGCCGGCCAGTTGAACCTGCTCGTGAC	351
Sbjct	2351168	ACTCGCGCTCGCGCACGAGCAGGGGCGGATGCCGGCCGGCCAGTTGAACCTGCTCGTGAC	
	2351109		
Query	352	CTACGGCGCGGGCGCGACCTGGGCGTG	379
Sbjct	2351108	CTACGGCGCGGGCGCGACCTGGGCGTGC	2351081

Pour le mutant T31, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_II1932.

Mutant T32

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|4950629 T32_AM68_053.ab1

gagaccggttacgatacttcgtatagcatacattatacgaagttatcagatccccctgga
tggaacacgggaaagggtccggtccaggacgctacttgtgtataagagtcagggtcggaaa
ccgtcagttgccccggaagtaacggttcggcgacgctgcgcagatgctcgcgatcgaccg
gccacaaatagcgctcgaggatcgcgctcggcggttccctcggcgcatgccgagacggg
ggttgtgcacgaggaacatgaacgtgtgcagcagatcgctcaggcgcgccgcgcgatgac
tgccgccccggcccttcacggtcagggcgctcgcggccaccgcttcggcgtaacccgggc
ggtattagtcgacgcgtggcaaacgttccagggactcgagaatctttcagcgccgggac
catagtggctcttctgcggcgagaaataataaagggggggccataccttctccagatacct
tcttgtgtttgttgcatgtagctaggggtggcggggtacaattattataggggagat
agagtagaggggtaggtgcttgattcacggcaaggcgagcagacaaataaaatttgatt
ttcatgtaatcatctatatctgatagaaagaatattgaaccgtcttctttctgaatggta
gaaccaatatatttgagggtgcatgggtcgcagtaactactcttttgctatcatagagt
acaattagtatgtcgaagcatagatagtaatatattatgctggctatcatactctctcct
aactgtagatcttaagatctacggtcagttaatgatgataccacgtgaatatatgaagca
ttttgaatgcaattgttatctgttcatattatatgtcgcgtattcgctttcggatataga
ttagcttgtagttctctggtttatgtagaagaatgggcattgatgagaatgcatgatgg
tgatactttttatgacatgattttataacctcgaatgcaagcgatgtagtccgggtatg
cgggtgtttaaattgataagaggccgtgatcaataaaaaagtcagtacctccgtgttaac
tcgtgctatgatttgtcataggattgacatagagacgccttaataataaaaagatgacaaa
gtaaatacaatgatcatctgtctcagaagagatggatctcagtcaggctgatcaagataa
ttctctgaaaagaagcctacagttgacatacgtatgtgattctatatgtgaacgcacgacg
ttattaggcttacactattgttcctagcgaatgatgagtttg

Features in this part of subject sequence: conserved hypothetical protein

Pour le mutant T32, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH II1929.

Séquence obtenue de Génome Québec :

116

Features in this part of subject sequence: [AMP-binding domain protein](#)

Pour le mutant T39, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH II1930.

Séquence obtenue de Génome Québec :

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: AMP-binding domain protein

Pour le mutant T43, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH II1930.

Mutant T45

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|5581171 T45_EY0063_033.ab1

```
naatgtgggtcccgttagatacttcgtatgcatacattatacgaagttatcagatcccc
tggatggaaaacgggaaaggttcggtccaggacgctacttgtgtataagagtcagatctg
gagcaggccgagcgcgagctcgtcgcgatgtcggcggagacgcggctgtcggcgtcccc
cgtgcgtactagtcgacgcgtggccagccccttgctggccctttcccttttagaccctct
tctcgggggggtccatctgctctcctagcgcagactcgtccgacgccgcgctagcttctcg
agtagtggtcgcaattccttcacgcattggccgcccgtcgcgcgcgcgcgcgtacgc
ggtgggggtgtacacaacgaaagccggcacgcatacggccgcgcctatcccaatttccgcg
aggtcttcgaacagcgttctcgcggttcaacgaccccgcgctcgttcgattgctccatg
ccctaccaccgatgcaaagcaagctgtaacgcttcacgcgcgctcatcatgaccgtcgtg
tcgctcgcgtccggctgctcgcaccagtgatattcccggttaaccgacggcggtttctcca
tgtgtaaaccgaagcgttgatacacttccattaaagggtacacttctgacaccctgagaa
cattgcgcttctacatccaatattgtccaactcctgctcgtcttttctattaaccctaaat
gctcatttcccaattctatctattacggaggtcactaagatttaatacaaaaattatc
ttttctttcgcgttggtgcaatcttgataattttatctttgaattaccttaacatccgagg
ctacacgcttgatttggttgatgtcttctactagtttcataatttgagatgtatcttc
tcttattcattcctcgcaccgtatttcttattccatcctatcattcactcaccctaataca
tttttagataaaagttctgctcttctattgactgcgttttcccttctaataatgttggg
tttcattgtacgcatttcttggtcaattttattgtatgatagtttacattagataaccag
attgcacacttgacccgtgatcttataatcttgatataattgatcgattctatgttcatat
ttaatatagccatgaattactattctgcaagccgttgctctgcatgtttagaagtatta
caggagttcgtttacttctgagtgatttctatacatttt
```

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: [hypothetical protein](#)

Query	253	CATCTGCTCTCCTAGCGCAGACTCGTCCGACGCCGCGCTAGCTTCTCGAGTAGTGGTCGC	312
Sbjct	1612638	CATCTGCTCTCCTATCGCAGAATCAACCGACGCCGCGCAAGCTTCGCGAGCAGTGGTCGC	
	1612697		
Query	313	AATTCCTTCATCGCATTGGCCGCCGCTCGATCGCCGCGCGCCGTACGCGGTGGGGTGTAC	372
Sbjct	1612698	AATTCCTTCATCGCATTGGCCGCCGCTCGATCGCCGCGCGCCGTACGCGGTGGGGTGTAC	
	1612757		
Query	373	ACAACGAAAGCCGGCAGGCATACGCCCGCGCCTATCCCAATTTCCGCGAGGTCTTCGAAC	432
Sbjct	1612758	ACAACGAAAGCCGGCAGGCATAACGCCCGCGCCTATCCCAAGTTCCGCGAGGTCTTCGAAC	
	1612817		
Query	433	AGCGCTTCTCGCCGTTCAACGACCCCGCGCTCGTTTCGATTGCTCCATGCCCTACCACCGA	492
Sbjct	1612818	AGCGCTTCTCGCCGTTTCAGCGACCCCGCGCTCGTTTCGATTGCTCCATGCCCTACCACCGA	
	1612877		
Query	493	TGCAAAGCAAGCTGTAACGCTTCATCGCGGTCATCATGACCGTCGTGTCGCTCGCGTCC	552
Sbjct	1612878	TGCGAAGCAAGCTGTAACGCTTCATCGCGGTCATCATGACCGTCGTGTCGCTCGCGTCC	
	1612937		
Query	553	GGCTGCTCGCACCAAGTGATATTCCCGGTAACCCGACGGCGTTT	595
Sbjct	1612938	GGCTGCTCGCACCAAGTGATATTCCCGGTAACCCGACGGCGTTT	1612980

Pour le mutant T45, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_II1366.

Mutant T46

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|5581173 T46 EY0063 034.ab1

ncatgtgggtcgggttagatacttcgtatgcatacattatacgaagttatcagatcccc
tggatggaaaacgggaaagggttcggtccaggacgctacttgtgtataagagtcagggtgca
ggaccgcgtcaagcgggttcggcaagcggctgcgcaagggtgcgccacgcgatgctgggcaa
gcggatcggccgcctcacgggtgaagatgacggggcgtccccccccccgtagtgcacgc
gtggccagttgcttttctttgcccgcctcttccctctttcttttctcctggggtcgggc
ctggggcccttgtgggtttctcgcgggggtgtcccggtccgccccttgggtccctccgggtgg
gtcgtgtcggccttctgttccgctttgcctccggttcgggttctgtttcttctgtgtctcc
tcccttcccgctgtggttgccttctcctcgcgtttcctcttggctcttttctcttctcc
ttttcttttctccttggcctgtcctctccttccctctcccccttgggtccctcttgtctcc
cgtctctcttccctttctgcctcctcttcttccccctcttttccccctgtctcttctgc
cctcttgggtcccttcttttttggctcctcgttcttcttctctctcctccctt
cctcttggcttcccttttccccgcctccctcgcctctcctccccctcttcccttgggt
cgcttccctgtcctttcttcttcttccctctcctcttccctctcttccctccttgcctttt
gtttctcccttctcctcttgcctcctttcttccctccctcttttttttgttttccctcc
ctccgttccctgtttttctcttctgcctccccccccctctcttctgccttccctcgcgtccc
ccccctccctctctcgccttccctccctcttcttgcgtcccgctgggtccctcccgctcgggt
ccttcttctttcttccggtcctctctgtcttctcctctctctgtctccttctcttccctcgt
gttgttgccttcttgtctctccttgccttcccttgggtgcccttttccccctcctct
tcagatccctattttctcaatcttccattaataacttctcagttaacacaatatctacca
acacctcaaatcaacattcgttcattttttatctcaatacacgccattactgtctttta
acaaaatgcattcttaatactatgacgcgcataatcatcctgatctgtattccaaagaa
taccggacttcgcgtcaactctctcttacta

Alignement avec le programme informatique BLAST:

Features in this part of subject sequence: [membrane protein, putative](#)

```
Query    115      GGTGCAGGACCCGCTCAAGCGGTTTCGGCAAGCGGCTGCGCAAGGTGCGCCACGCGATGCT   174
          |||||
Sbjct    2895674   GGTGCAGGAGCCGCTCAAGCAGTTCGGCGACC GGCTGCGCGAGGTGCGCCGCGCGATGCT   2895615

Query    175      GGGCAAGCGGATCGGCCGCCTCACGGTGAAGATGACGGGCGT   216
          |||||
Sbjct    2895614   GCGCGAGCGGATCGGCCGCCTCACGGTGAAGATGACGGGCGT   2895573
```

Pour le mutant T46, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH I2538.

Mutant T55

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|5581180 T55 EY0063 050.ab1

aagggggtccggtacgatacttcgtatagcatacattatatacgaagttatcagatccccct
ggatggaaaacgggaaaggttcggtccaggacgctaacttgtgtataagagtcagatctgg
agcaggccgagcgcgagctcgtctcgatgtcggcggatacgcggctgtcggcgtggacag
cggcgaactaccaactcgtgcccacagttgtaaaacgtcctgtcgtgcttcccatctt
gcggcatacctccgcgcgacgggcgtcccccccccgtagtgcagcgtggccagt
tctttgcgacccgcgcccacggcctttgcacttaagcggggccagccccgggggaata
acaaatgggacaggtcacttgctgtctcgtcggaatttcgggagagggtctaaaacttgt
tcaagcctaatagaacttcttgggaaaaactaagtgaagataggatcaggatcacaaagta
tgtggataccaccactatagatttccaattcgttgatttagcacacatacaaaacct
tcttcagatagtcctattaacagaaggctgcgcaactccttcttcacaagtaaaatgtc
gacattgtatcattttatgaccgggtatagctacattgcgtttctctactgcacttaa
tattctcaattacttctacagaggatatgcacttattatgatactatcgatcatgcgaaa

atccacccccatctctgcgaccagaaacgggacaggtccactgctacttcaccgtaaaa
 atctgccattaatgaaaaactacgccgcacgatcctcaacgttttgatcacgcagcatca
 taaactccgcttcacaactacgtgcgaccacttatttactctaaactgataatcagtcga
 accttaaacagtactattgctgctataacgcactctcgcgcgataaatatccaccttttc
 tcttctgtcctgccaaccataatccgatcttatccctcatccatacatataactgtcac
 tacgagccctctcaattacgaaccgtcgtcacgtgaatgataatgaaggacccgactccg
 acgccgcgtaaggatggataataccgtcacctatctttctcacggacctataaacagcgt
 gtgcgtacctctcttgatgaaactcaataacagt

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features flanking this part of subject sequence:

[1961 bp at 5' side: L0013 protein](#)

[2540 bp at 3' side: hypothetical protein](#)

Query	206	CAGTTGTAAAACGTCCTGTCGCTGCTTCCCATCTTGCGGCATACCTCCGCGCGACGGGCG	265
Sbjct	3074695	CAGTTGTAAAACGTCCTGTCGCTGCTTCCCATCTTGCGGCATACCTCCGCGCGACGGGCG	
	3074754		
Query	266	Tcccc	270
Sbjct	3074755	TGCCC	3074759

Pour le mutant T55, le transposon s'est donc inséré entre BTH_I2690 et 91.

Mutant T57

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|5581185 T57_EY0063_065.ab1

naagtgggtccggtagcacttcgtatgcatacattatacgaagttatcagatccccct
 ggatggaaaacgggaaaggttccgtccaggacgctacttgtgtataagagtcagatctgg
 agcaggccgagcgcgagctcgtcgcgatgtcggcggagacgcggctgtcggcgtcccccc
 gtgggtactagtcgacgcgtggccagtttttgcctgttgcctttctggcgtttttccg
 cctagtcacgtctctagccgtggccccgtcagttaatgcactactgtactaatctcccg
 cattgctctgaacctggcgattagcatttcttttacccttctgatgtggtctggatcct
 ggaaaattggctcgtacaacccttgcgcctagtctccgacttggctcaaagtcttctcca
 ctctgcctatttgccttcccatggaaatgtgatactcgatccgtgaccacgagtgcca
 tatgtatgtcctatatctcttataaccgagatttctgaaacatgtattatgcctaccctt
 ctctccgctgtacagacttcaaactactgataaattttcttaccttactacctctcttg
 tcgcatactccggtgctactgtacattttcctgtctgctattctgtagtgctacgctct
 cattcaccattttcaccgtctacatttctgataaattaactattttcatcattcctgtct
 actcttgccacagacggagcactttcaggaacgttccggactgagatagttactttattt
 gcaactcttagctttgttggttgcgcgcaggcagcttcggcccttatgcgtgctccccct
 ctttaacttttttagagttgccactgacttccctccacttgtggaattacccttattctcc
 tacatcggttctgtagcgtagaagctactacgacttatctcaaactatcggttctattctgt
 tcctccaactttatttcttatcactctcatcttgtaccctcgcgaacccatctttcttcg
 tattccacgctgacccccgtcgacttttatgtgatacaccctcgggtctttgcgtatac
 tactctctacgattgcttgcgctttgtgtcttattgacggcaaactcttgatggctgtct
 cctttgccatactattccacaacgtcttgtatcgattacagaaagtcagttcgcaacct
 tctatcttctcatcatagccatctacggtattgttggtttgtgtaattgtgtat

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: [membrane protein, putative](#)

```

Query 114      GATCTGGAGCAGGCCGAGCGCGAGCTCGTCGCGATGTCGGCGGAGACGCGGCTGTCGGCG 173
               |||
Sbjct 2896734  GATCTGGAGCAGGCCGAGCGCGAGCTCGTCGCGATGTCGGCGGAGACGCGGCTGTCGGCG
2896675
Query 174      T 174
               |
Sbjct 2896674  T 2896674

```

Pour le mutant T57, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_I2538.

6.1.2. Criblage de mutants en utilisant le rapporteur *hmqA-lacZ* chromosomique

Mutant H

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|6882214 MUTH_P0900641_001.ab1

```

naacgcggacccgctcncgacgctaccggcgccagtcgccgaaggtgcgcgtgcagttgac
gctgaccgaggggagctcgacgtgatcgaagccggctacgacgcgggctcgtcacggg
cgccgcctcgacggcaacccggcgctcatcggtcatccgctgatgccgaacacgctcgc
gctctgcgcggcgccctcgatcgagcggcacggcgccgcacccgccccgacgatct
catccgccacgcgtgcatcgctgcccggcgccagcatgtgtccccgtacatcgtag
aagcttgaattcgagcagaa

```

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: [transcriptional regulator, LysR family](#)

```

Query 10      CCCGCTCN-CGAC-GCTACCGGCGCCAGT-CCCGAAGGTGCGCGTGCAGTTGACGCTGAC 66
               |||
Sbjct 1579827  CCCGCTCGTCGACAGCTACCGGCGCCAGTACCCGAAGGTGCGCGTGCAGTTGACGCTGAC
1579768

Query 67      CGAGGGGCAGCTCGACGTGATCGAAGCCGGCTACGACGCGGGCCTCGTCACGGGCGGCCG 126
               |||
Sbjct 1579767  CGAGGGGCAGCTCGACGTGATCGAAGCCGGCTACGACGCGGGCCTCGTCACGGGCGGCCG
1579708

Query 127     CCTCGACGGCAACCCGGCGCTCATCGGTCATCCGCTGATGCCGAACACGCTCGCGCTCTG 186
               |||
Sbjct 1579707  CCTCGACGGCAACCCGGCGCTCATCGGTCATCCGCTGATGCCGAACACGCTCGCGCTCTG
1579648

Query 187     CGCGGCGCCCTCGTACATCGAGCGGCACGGCGCGCCGCACCGCCCCGACGATCTCATCCG 246
               |||
Sbjct 1579647  CGCGGCGCCCTCGTACATCGAGCGGCACGGCGCGCCGCACCGCCCCGACGATCTCATCCG
1579588

Query 247     CCACGCGTGTCATCGCGCTGCCGGCCGGCCAGCATG 281
               |||
Sbjct 1579587  CCACGCGTGTCATCGCGCTGCCGGCCGGCCAGCATG 1579553

```

Pour le mutant H, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_I1403.

Mutant K

Séquence obtenue de Génome Québec :

>ID|6882215 MUTK_P0900641_002.ab1

```

aaaaggcgcgatcttgcatcgccccgcgatgggtacagtcttggcggtttcgctaatac
tggcaggcggtttcgatcagatccccggttacaggcggttcgctctgggactgggtggat
cagtcgctgattaaatatgatgaaaacggcaaccggtggtcggttacggcggtgatttt
ggcgatacgccgaacgatcgccagttctgtatgaacggctctggtctttgcccagcgacg
ccgcatccagcgctgacggaagcaaaacaccagcagcagttttccagttccggttatcc
gggcaaaccatcgaagtaccagcgaataacctgttccgctcatagcgataacgagctcctg
cactggatggtggcgctggatggtgaagccgctggcaagcggtgaagtgcctctggatgtc
gctccacaaggtaaacagttgattgaactgcctgaactaccgcagccggagagcgccggg
caactctggctcacagtacgcgtagtgaaccgaacgcgaccgcatgtgtccccgtacat
cgtagaagccttgattctcgagcagaa

```

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Mycoplasma mycoides subsp. *capri* str. GM12 transgenic clone tetM-lacZ, complete genome

Query	21	CGCCC-CGCGATGGGTA-CAGTCTTGGCGGTTTCGCTAA-TACTGGCAGGCGTTTCGTCA	77
Sbjct	1086940	CGCCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCA	1086881
Query	78	GTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATA	137
Sbjct	1086880	GTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATA	1086821
Query	138	TGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGA	197
Sbjct	1086820	TGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGA	1086761
Query	198	TCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGAC	257
Sbjct	1086760	TCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGAC	1086701
Query	258	GGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTCCAGTTCGTTTATCCGGGCAAACCATCGAAGT	317
Sbjct	1086700	GGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTCCAGTTCGTTTATCCGGGCAAACCATCGAAGT	1086641
Query	318	GACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCT	377
Sbjct	1086640	GACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCT	1086581
Query	378	GGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAAACA	437
Sbjct	1086580	GGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAAACA	1086521
Query	438	GTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGT	497
Sbjct	1086520	GTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGT	1086461
Query	498	ACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATG	527
Sbjct	1086460	ACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATG	1086431

Si on veut regarder quelle partie de cette séquence correspond à notre recherche (pour voir quel gène est atteint), on prend les coordonnées du « Subject » (1086940-1086431) :

```
gene      complement(1085482..1088565)
/gene="lacZ"
/locus tag="MMCAP1_0915"
```

Donc le mutant K est un mutant dans ma construction, ce qui concorde avec mes observations.

Mutant M04001

Séquence obtenue de Génome Québec :

[illegible]

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence: [stress response protein](#)
Score = 241 bits (266), Expect = 3e-64 Identities = 137/141 (97%), Gaps = 0/141 (0%)

Query	31	GCGCGAATCGGCNNGCGAAACGGCTTCNNCGCGTTGTCGCTCGCCGACGGAAACCGCGCG	90
Sbjct	2845925	GCGCGAATCGGCACGCGAAACGGCTTCGCCGCGTTGTCGCTCGCCGACGGAAACCGCGCG	2845984
Query	91	CCGCGCATTTCGTGCCTGGCGCGCGAGCGTGACGAGCGTGACGTATGGGGCGCGTGCGGTG	150
Sbjct	2845985	CCGCGCATTTCGTGCCTGGCGCGCGAGCGTGACGAGCGTGACGTATGGGGCGCGTGCGGTG	2846044
Query	151	CCGGGGTACGCGGGGCGCATG	171
Sbjct	2846045	CCGGGGTACGCGGGGCGCATG	2846065

Pour le mutant M04001, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH II2320.

Mutant M04002

Séquence obtenue de Génome Québec :

```
>ID|6882200 MUT02_P0900641_018.ab1
NNNNNNNNNNNcgNNNcgCNNNgcgccatcttcgcgcNNNgtagccgccgagcgcggcga
ccggatcgtcgcgcgacgtcgaagctgtcggcggcggcggtgccagtcctcgagcaggtcgt
cgagcacgcgcgggtacagcgcgcgagcttcgtcgggaagtaaatagtgcaggttcgccttcg
gcagcccggcgcgcgtcggcgatcagcgcgggtgctcgcgccctcgaagccgcgctcggcga
acaccgcttcgcgcacgcgcgagcaggtgcgcctcgttcagctcgcggatgtgcgccttgc
gcgcgcggctcggcgcgcgcgcgccttctcgtccggggcgcgcggcgcgggcgcgctcggggg
gcgctcgtcgtcggatcgtcgtgtggcatgtgtccccgtacatcgttagaagcttgaattc
gaacgAN
```


Features in this part of subject sequence: [transcriptional regulator, TetR family](#)
Score = 645 bits (714), Expect = 0.0 Identities = 364/368 (98%), Gaps = 1/368 (0%)
Strand=Plus/Minus

Pour le mutant M04002, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH II2128.

Séquence obtenue de Génome Québec :

Alignement avec le programme informatique BLAST :

```

Query    29      CGACGAGCTCGTCGAGGTGACGCCGAGTCGATCCGCCTGCGCAAGCGTCACCTGAAGGA  88
          |||
Sbjct    2918100 CGACGAGCTCGTCGAGGTGACGCCGAGTCGATCCGCCTGCGCAAGCGTCACCTGAAGGA  2918041

Query    89      GCATG    93
          ||||
Sbjct    2918040 GCATG    2918036

```


Pour le mutant MA25, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_I2557.

Mutant MA54

Séquence obtenue de Génome Québec :

```
>ID|6882202 MUT54_P0900641_034.ab1
NNNNNNNNNNNNNNNNgcgcgatttttctgcgccccNNNccccggccagtcggcgccgacc
atcacgcgcgcgcgcgtgcgcttttcgcatgctcgaccgtcgcgctcggtgctgcccgcgtcg
acgacgacgatatcgctcgccgaacgccagtcgctcgaggcattcgccagccggggccgcg
gcgttgtagcaatgagggcgacgccgagagtgggttctgccatgtgtccccgtacatcg
ttagaagcttgaattcgagca
```

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence:

[lipopolysaccharide core biosynthesis glycosyltransferase](#)

Query	17	GCGCGATTTTCTGCGGCCNNN-CCCGGCCAGTCGGCGGCGACCATCACGCGCGCGCCG	75
Sbjct	1129846	GCGCGATTTTCTGCGGCCGAAGCCCGGCCAGTCGGCGGCGACCATCACGCGCGCGCCG	1129905
Query	76	TGCGCTTTCGCGATGTCGACCGTCGCGTCGGTGCTGCCGCCGTCGACGACGACGATATCG	135
Sbjct	1129906	TGCGCTTTCGCGATGTCGACCGTCGCGTCGGTGCTGCCGCCGTCGACGACGACGATATCG	1129965
Query	136	TCGGCGAACGCCAGTCGCGTCGAGGCATTTCGGCCAGCCGGGCCGCGGCGTTGTGAGCAATG	195
Sbjct	1129966	TCGGCGAACGCCAGTCGCGTCGAGGCATTTCGGCCAGCCGGGCCGCGGCGTTGTGAGCAATG	1130025
Query	196	AGGGCGACGCCGAGAGTGGGTTCTGCCATG	225
Sbjct	1130026	AGGGCGACGCCGAGAGTGGGTTCTGCCATG	1130055

Pour le mutant MA54, le transposon s'est donc inséré dans le gène BTH_I0991.

Mutant MA58

Séquence obtenue de Génome Québec :

```
>ID|6794041 MUT58_EY0218_038.ab1
gggagcgcctggggcagttttgctcgccagatggttgtaaagcgtcacgccgtggccgacc
tacttcgcgagcaacgagcggtcgagttcgacgccttcacgcgcatacatgaccgactgc
cgatacagcgggatgtggtctgcgaacttcgagaccagcacgtgcgcgagtagtccaggg
cccgccaggccgcgctcgatgggacgactcggcgctgctgcttgccgcgatgtgatcgag
cacgcgcaggcgaacttggggccgcacatgacggattacgcggaagctcgcaggtacatat
tcaagttgttcggagacgtcttcgcctagcagcttgagcttgccgcgcattccgagcac
gtctcggtcgatttcgggcaagtgcgttttgccttcacgaggcagacctcaatccaaagct
gctcttcgccagatcaaagctattgcccggccaacgccaccgccttataccgctctaacg
cctggtgatcttcgaaaagtgtttcacgaatatgatactccaccgtaaatattttagcac
caacttatcacatgtcaaaggagcctcaatgtatgaaacttacatgtgtaacattgctcg
aaatacaaaaaatcaccttcaatacgaactgttattagagatctacactactatcagccatc
catatgatggttatctgtcccactttctgttaacaatacgaacatctaccttcacgccaat
gctaatacaagcttttagacgctaatttttaaggctctcttttgacgacttcatttccact
taacttgccctacgagcggctcgtggtgtgaacagtgatgcagctcctcaatcacttaca
ttatgcccttgctcgtttgcaactagttctttcacctatatatgcaacttatgttgaa
acactccatactctcatgacgtcgacttaactaagcataacctcggtctccattaaaatgc
```

tggtcacaatccaacgccacgcaataagcgcgtatgaaccgctgtgtaacttgtgttttaa
 ctttctcacttcgccaaataagatacatgttggttatgccaaatcaaccatatacaaaccgc
 atatatgtcatttcatttactcaccttccgacatctgccgtttcgtactctacataattc
 atcacttcttaatagtcgacgcgcaccggttggcgacactatcgatagaatcacgcccct
 cgttcgctggccgacagtttccggccgcgttaccgatttactgttgccagacgtgccctc
 taatgcatagcgttcgtgttacca

Alignement avec le programme informatique BLAST :

Features in this part of subject sequence:
 TnpC protein

Query	26	CCAGATGGTTGTAAA-GCGTCACGCCGTGGCCGACCTACTTCGCGAGCAACGAGCGGTCG	84
Sbjct	1626313	CCAG-TGGTTGTAAAAGCGTCGCGCCGTGGCCGACCCACTTCGCGAGCAACGAGCGGTCG	1626371
Query	85	AGTTCGACGCCTTCACGCGCATACATGACCGACTGCCGATACAGCGGGATGTGGTCTGCG	144
Sbjct	1626372	AGTTCGACGCCTTCACGCGCATACATGACCGACTGCCGATACAGCGGGATGTGGTCTGCG	1626431
Query	145	AACTTCGAGACCAGCACGTGCGCGAGTAGTCCAGGGCCCGCCAGGCCGCGCTCGATGGGA	204
Sbjct	1626432	AACTTCGAGACCAGCACGTGCGCGAGTAGTCCAGGGCCCGCCAGGCCGCGCTCGATGGGA	1626491
Query	205	CGACTCGGCGCTGCTGCTTGCGCGATGTGATCGCAGCACGCGCAGGCGAACTTGGGCCGC	264
Sbjct	1626492	CGACTCGGCGCTGCTGCTTGCGCGATGTGATCGCAGCACGCGCAGGCGAACTTGGGCCGC	1626551
Query	265	ACATGACGGATTACGCGGAAGCTCGCAGGTACATATTCAAGTTGTTTCGGAGACGTCTTCG	324
Sbjct	1626552	ACATGACGGATTACGCGGAAGCTCGCAGGTACATATTCAAGTTGTTTCGGAGACGTCTTCG	1626611
Query	325	CCTAGCAGCTTGAGCTTGCCGCCGCATTCCGAGCACGTCTCGGTCGATTGCGGCAAGTGC	384
Sbjct	1626612	CCTAGCAGCTTGAGCTTGCCGCCGCATTCCGAGCACGTCTCGGTCGATTGCGGCAAGTGC	1626671
Query	385	GTTTGCTCTTCACGAGGCAGA	405
Sbjct	1626672	GTTTGCTCTTCACGTGGCAGA	1626692

Pour le mutant MA58, le transposon s'est donc inséré dans le gène *tnpC*, et il y a 7 copies de ce gène sur le génome de *B. thailandensis*, donc il est impossible de savoir lequel.

6.2. Résultats de « melt curve » pour essais de qRT-PCR :

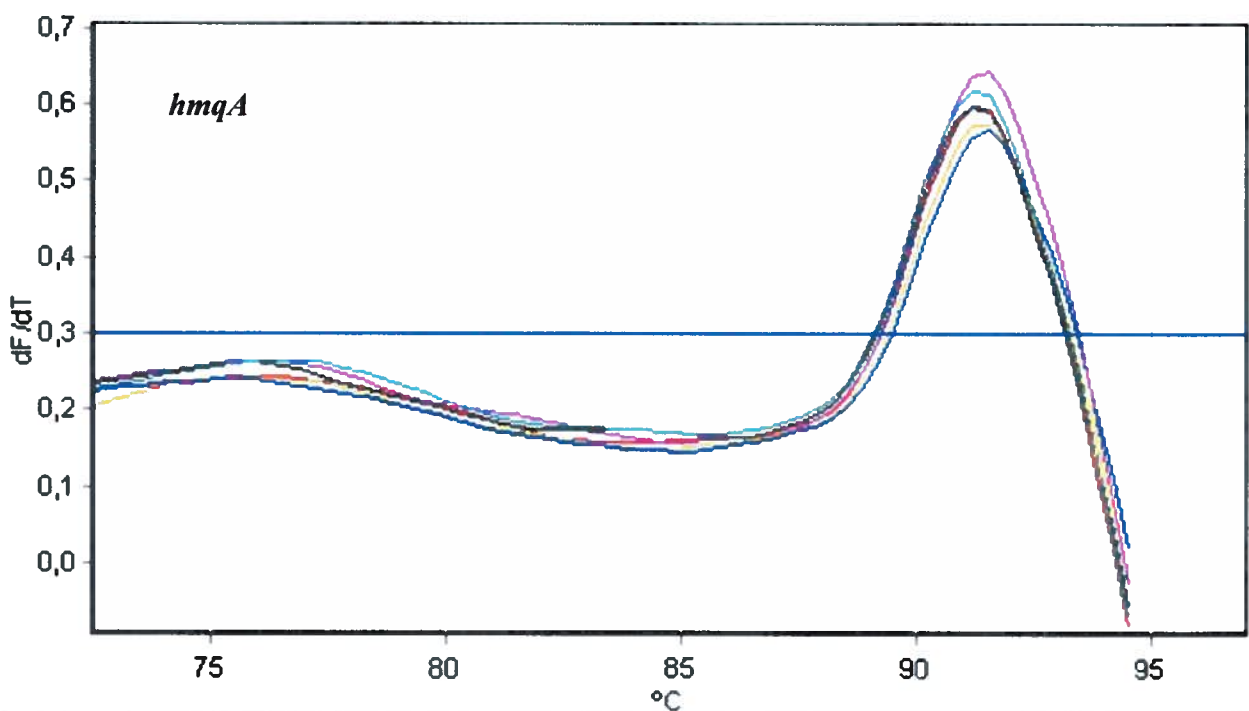
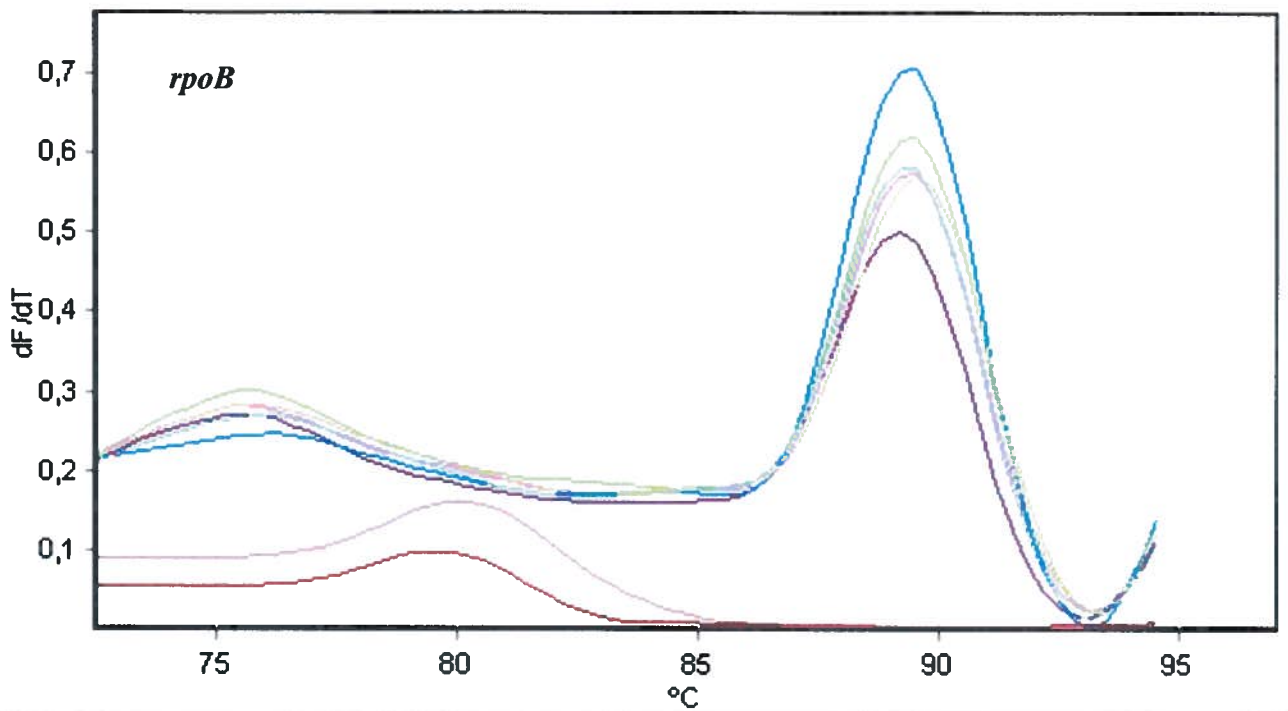


Figure 6.1. Représentation graphique des « melt curves » pour *rpoB* et *hmqA*, démontrant des fragments spécifiques aux amorces lorsque les températures sont élevées (>85°C).

À des températures inférieures à 85°C, l'ADN hybridé représente des dimères d'amorces, mais lorsque la température est supérieure, l'ADN dénaturé est une amplification PCR de plusieurs centaines de nucléotides.

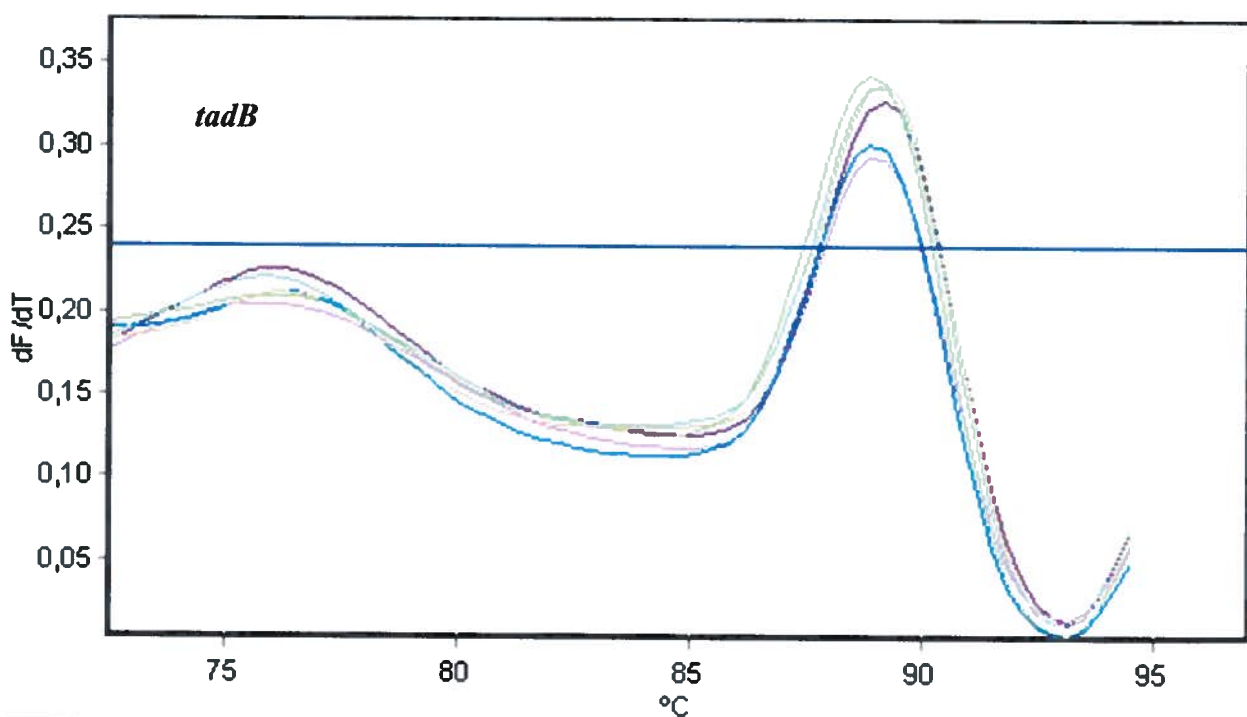
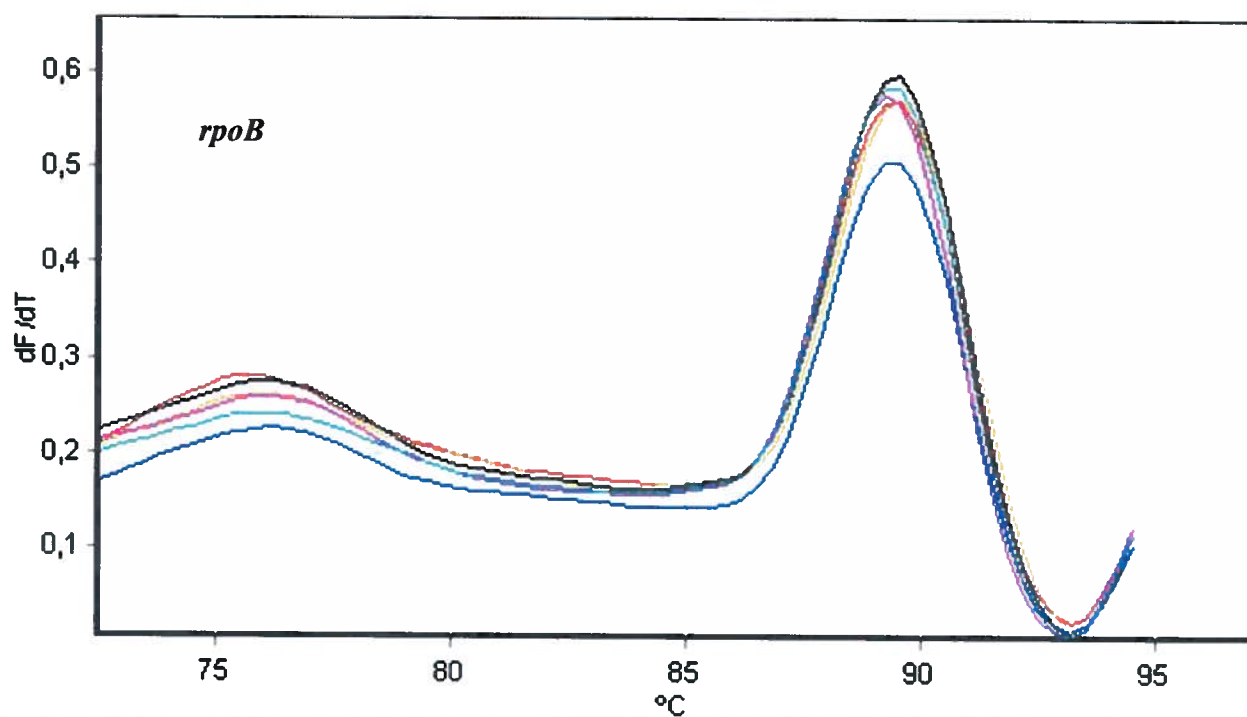


Figure 6.2. Représentation graphique des « melt curves » pour *rpoB* et *tadB*, démontrant des fragments spécifiques aux amorces lorsque les températures sont élevées ($>85^{\circ}C$). À des températures inférieures à $85^{\circ}C$, l'ADN hybridé représente des dimères d'amorces, mais lorsque la température est supérieure, l'ADN dénaturé est une amplification PCR de plusieurs centaines de nucléotides.