



HAL
open science

Etude des protéines de la famille H-NS : régulation différentielle des opérons LEE par les protéines H-NS et Ler chez les EPEC

Ahmad Khodr

► **To cite this version:**

Ahmad Khodr. Etude des protéines de la famille H-NS : régulation différentielle des opérons LEE par les protéines H-NS et Ler chez les EPEC. Sciences agricoles. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2011. Français. NNT : 2011DENS0072 . tel-00752552

HAL Id: tel-00752552

<https://theses.hal.science/tel-00752552>

Submitted on 16 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Présentée par

Monsieur KHODR Ahmad

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Domaine :

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Sujet de la thèse :

Etude des protéines de la famille H-NS. Régulation différentielle des opérons LEE par les protéines H-NS et Ler chez les EPEC.

Directrice de thèse : Dr. Sylvie Rimsky

Jury

M ^r F. Confalonieri	professeur, Université Paris I I	Président
M ^r E. Cascales	chargé de recherche IMM Marseille	Rapporteur
M ^r O. Espéli	chargé de recherche CGM Gif sur Yvette	Rapporteur
M ^r R. Rahmouni	directeur de recherche CBM Orleans	Examineur
M ^r M. Buckle	directeur de recherche LBPA ENS Cachan	Examineur
M ^{me} S. Rimsky	directrice de recherche LBPA ENS Cachan	Directrice de thèse

Nom du Laboratoire LBPA
ENS CACHAN/CNRS/UMR 8113
61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX (France)

Lorsque l'esprit des hommes te paraîtra étroit, dis-toi que la terre est vaste. N'hésite jamais à t'éloigner, au-delà de toutes les mers, au-delà de toutes les frontières, de toutes les patries, de toutes les croyances. "Amin Maalouf"

A mes parents Nada et Houssam KHODR

I've always believed in numbers; and the equations and logics that lead to reason. But after a lifetime of such pursuits, I ask, "What truly is logic? Who decides reason?" My quest has taken me through the physical, the metaphysical, the delusional -- and back. And I have made the most important discovery of my career, the most important discovery of my life: It is only in the mysterious equations of love that any logic or reasons can be found. "John Forbes Nash"

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie et Pharmacologie appliquée à l'ENS de Cachan.

J'exprime ma reconnaissance à Mr Eric Cascales et Mr Olivier Espéli qui ont accepté d'assumer la tâche de rapporteur de ce manuscrit ainsi qu'à Mr Fabrice Confalonieri qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je remercie aussi Mr Rachid Rahmouni et Mr Malcolm Buckle d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Ce travail a été effectué sous la direction de Sylvie Rimsky. Sylvie, merci de m'avoir accueilli dans ton équipe. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour l'environnement scientifique dont tu m'as permis de bénéficier au cours de ma formation. Cela n'a pas été toujours facile, ces années ont parfois ressemblé à des montagnes russes avec des hauts et des bas. L'essentiel est que l'on soit arrivé au bout de chemin...Un grand Merci à Aïda Boughammoura pour son écoute et son aide tout au long mes travaux de thèse, à Victoria Faireweather pour son aide et ses conseils concernant les purifications des protéines et la mise en page du manuscrit, à Antoine Delacours pour sa bonne humeur tout au long de la dernière année de ma thèse.

Je remercie aussi Malcolm Buckle et Bianca Sclavi qui m'ont largement fait bénéficier de leurs expériences scientifiques.

Un grand merci à Hervé Leh, Anne Olliver, Chiara Saggioro et Claude Nogues, pour l'ensemble de leurs commentaires scientifiques et le soutien qu'ils m'ont toujours manifesté.

Merci à Elisa Brambilla d'avoir écrit le programme d'analyse des données du fluorimètre qui m'a beaucoup facilité la tâche, à Gladys Mbemba, XiaoJu Ni et Yingying Chen pour leur aide et les discussions tard le soir en salle de radioactivité en attente que les gels migrent leurs derniers centimètres.

Ces remerciements seraient incomplets, si j'omettais de remercier le département de Biologie à l'ENS de Cachan au nom de son directeur Mr Christian Auclair et le service des relations internationales de l'ENS qui m'ont offert la bourse pour venir du Liban faire mes études de Master à l'ENS de Cachan. Sans cette bourse je ne serais pas peut être en train de rédiger ces lignes de remerciements pour la fin de mes études doctorales.

Je tiens à remercier mes compatriotes Libanais au LBPA Ali Bazzi et Farah Ammar qui étaient toujours disponibles pour m'écouter et me soutenir. Je tiens à remercier tous les membres de ce laboratoire qui ont partagé avec moi un peu de leur humour, de leur sympathie et de leur savoir-faire.

Merci à mes amis Monzer, Azzam, Mahmoud et Abdullah pour leur soutien et leur présence durant ces deux dernières années. Au cours de ces années passées à Cachan, j'ai côtoyé nombre de personnes qui m'ont aidé à un moment ou un autre. À tous ceux que je ne cite pas ici mais que je n'oublie pas, je tiens également à vous adresser mes remerciements.

Enfin, les dernières lignes sont généralement consacrées à la famille. Je ne vais pas déroger à cette tradition. À mes parents et toute ma famille, ces quelques mots ne suffiront pas pour vous témoigner ma reconnaissance et ma gratitude pour le soutien quotidien et les encouragements que vous m'avez prodigué tout au long de mes études et pendant ces années de thèse. Merci d'avoir supporté mes doutes mes états d'âme et d'avoir toujours été là pour moi. Je vous dédie ce travail, sans vous il n'aurait pas abouti.

INTRODUCTION	11
L'espèce <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	11
LES <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATHOGENES (EPEC) ET ENTEROHEMORRAGIQUES (EHEC)	13
Le « LEE » : un facteur de virulence majeur dans les EPEC	15
Le système de sécrétion de type III (SSTT) des EPEC	16
LES PROTEINES STRUCTURALES DU SSTT	18
Les protéines effectrices du SSTT	21
Tir (Transmembrane Intimin Receptor) et le réarrangement de l'actine de l'hôte	22
LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX : LA PREMIERE MAILLE DANS LA CHAINE DE REGULATION DE LA VIRULENCE CHEZ LES EPEC, LES EHEC ET D'AUTRES ENTEROPATHOGENES.	28
REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE CHEZ LES PROCARYOTES	32
L'ARN polymérase et les promoteurs	32
Les facteurs de transcription	35
La régulation des gènes et le surenroulement de l'ADN	37
ORGANISATION DU CHROMOSOME BACTERIEN	38
Le nucléoïde bactérien	38
LES NAP	39
Description des principales NAP :	42
LA PROTEINE H-NS	46
Structure et reconnaissance de l'ADN	46
Les protéines de la famille H-NS	50
H-NS : un « silencer » de l'expression de l'ADN xénogénique	52
Mécanisme de répression par H-NS:	52
REGULATION DE L'EXPRESSION DU « LEE » PAR H-NS ET LER.	54
La protéine Ler	55

OBJECTIFS ET PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE 58

MATERIELS ET METHODES 60

Les souches bactériennes 60

Conditions de croissance bactérienne 61

Milieu liquide	61
Milieu solide	61
Les antibiotiques	61
Transformation des bactéries	61
Transformation par chocs thermiques	61
Transformation des bactéries par électroporation	62

Techniques de Biologie moléculaire 62

Electrophorèse sur gel	62
Extraction, isolation et purification des fragments d'ADN	63
Maxi-prep	63
Mini-prep	63
Extraction de l'ADN du gel d'agarose	63
Purification de l'ADN sur Colonne G-25 Sephadex (GE health care)	64
Précipitation de l'ADN à l'Ethanol	64
Mutagenèse des sites de haute affinité de H-NS identifiés sur le promoteur LEE5	64
Conditions de la PCR	65

Clonage du fragment *proLEE5* dans le pGEM-T easy 68

Amplification par PCR du fragment <i>proLEE5</i> .	68
Ajout de l'extension polyA au produit PCR purifié	68
Ligation du fragment <i>proLEE5</i> -polyA avec le plasmide pGEM-T Easy.	68
Transformation de la souche JM109 d' <i>E. coli</i> par le mélange de ligation pGEM-Teasy <i>proLEE5</i> :	69

Extraction de l'ADN plasmidique de la souche JM109 d'*E. coli*. 69

Clonage du fragment LEE5 et LEE5.3M dans le pKKgfp 70

Empreintes à la DNaseI 70

Obtention du fragment du promoteur radiomarqué en 5'	70
Marquage de l'amorce :	70
Obtention du fragment du promoteur par PCR radioactive	71
Attaque à la DNaseI	72
Réaction de séquence G+A	73
Les essais de retard sur gel (EMSA)	73
Mesure de l'activité des promoteurs <i>in vivo</i> par fluorescence	74

TECHNIQUES DE BIOCHIMIE 75

Purification de la protéine H-NS 75

Préparation de la colonne de phosphocellulose (selon les indications du fabricant)	75
Préparation de l'extrait bactérien	76
Passage de l'extrait sur la colonne de phosphocellulose.	76
Passage de l'échantillon sur une colonne monoQ	77

Purification de Ler-his6 sur une colonne d'affinité his-trap.	77
Expression de la protéine dans la bactérie compétente BL21-Gold(DE3) pLysS	77
Préparation de l'extrait protéique Ler	78
Purification de StpA sur une colonne d'affinité his-trap	78

RESULTATS 86

CHAPITRE I : ETUDE *IN VITRO* DE L'INTERACTION DES PROTEINES H-NS ET LER AVEC LA REGION PROMOTRICE DE L'OPERON LEE5 DES EPEC 86

EMPREINTE A LA DNASEI SUR LE PROMOTEUR *LEE5* 86

Analyse à 20°C 86

Analyse à 37°C 92

Analyse dans le tampon "stiffening" 94

Analyse de la région de démarrage de la transcription en empreintes 99

Compétition entre Ler et H-NS 103

Les sites de nucléation pour H-NS ont ils un effet sur la fixation et l'activation de Ler? 105

CHAPITRE 2 : LES SITES CONSENSUS DE H-NS ET LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE LEE5 *IN VIVO* 111

Autre répresseur de LEE5 113

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION D'AUTRES REGULATEURS POTENTIELS AGISSANT SUR L'EXPRESSION DE LEE5 114

StpA se fixe et régule la région promotrice de LEE5 114

 Effet in vivo de StpA sur le promoteur LEE5 dans des *E. coli* K12 116

IHF se fixe et régule la région promotrice de LEE5 120

 Résultat annexe 124

DISCUSSION 128

BIBLIOGRAPHIE 136

Tables des illustrations

Tableaux :

Tableau 1 Affections associées aux pathotypes d'*E. coli* responsables de diarrhées chez l'homme

Tableau 2 : liste des effecteurs protéiques des EPEC et des EHEC

Tableau 3: les protéines associées au nucléoïde chez les bactéries Gram (-) et Gram (+)

Figures :

Figure 1: Modélisation des trois principales étapes de l'interaction entre une souche EHEC et un entérocyte aboutissant à la formation d'une lésion d'attachement et d'effacement (A/E)

Figure 2: Organisation schématique du LEE des EHEC/EPEC

Figure 3 : modélisation et représentation schématique du SSTT des EPEC/EHEC de la structure du flagelle et des systèmes de sécrétion de type III de différentes bactéries à Gram négatif.

Figure 4: Régulation de l'assemblage de l'actine par Tir

Figure 5: Structure de l'Intimine des EPEC.

Figure 6 : Variation du nombre d'enlacement Lk avec l'entortillement et la torsion d'un ADN circulaire et démonstration du « Twisting » « writhing » et du « Linking Number » sur un modèle en tube élastique.

Figure 7 : Interaction de l'ARN polymérase sur un promoteur

Figure 8 : L'activation simple

Figure 9 : Les mécanismes de répression

Figure 10 : Représentation schématique des modifications topologiques sur le chromosome d'*E. coli*

Figure 11: L'effet des NAP et du surenroulement de l'ADN sur la structure du nucléoïde.

Figure 12 : Structure du domaine C-terminal et N-terminal de la protéine H-NS et leurs rôles.

Figure 13 : Représentation schématique des principaux régulateurs des gènes de LEE

Figure 14 : Représentation schématique de l'action de Ler sur un promoteur réprimé par H-NS

Figure 15 : Empreintes à la DNaseI des protéines H-NS et Ler sur la région promotrice du promoteur LEE5 (brin codant) à 20 °C

Figure 16 : Etude quantitative à 20°C de la fixation de H-NS sur la région promotrice de LEE5 en 3 positions différentes

Figure 17 : Empreintes à la DNaseI des protéines H-NS et Ler sur la région promotrice du promoteur LEE5 (brin non codant) à 20 °C.

Figure 18 : Empreintes à la DNaseI des protéines H-NS et Ler sur la région promotrice du promoteur LEE5 à 37 °C.

Figure 19 : Empreinte à la DNaseI de la protéine H-NS sur la région promotrice de LEE5 à 20°C dans le tampon de « Stiffening »

Figure 20 : Retard sur gel sur le grand fragment de LEE5 (-250, +270) marqué en présence de H-NS ou de Ler dans le tampon de « Bridging » (en présence de Mg^{2+}) ou bien dans le tampon de « Stiffening » (en absence de Mg^{2+}).

Figure 21 : Quantification des retards sur gel de H-NS et de Ler sur le grand fragment LEE5.

Figure 22 : Retard sur gel sur le petit fragment de LEE5 (-80, +103) marqué en présence de H-NS ou de Ler dans le tampon de « Bridging » (en présence de Mg^{2+}) ou bien dans le tampon de « Stiffening » (en absence de Mg^{2+}).

Figure 23 : Empreintes à la DNaseI des protéines H-NS et Ler sur la région promotrice du petit fragment (-83, +104) du promoteur LEE5 à 20 °C.

Figure 24 : Représentation du profil densitométrique des bandes de la région autour de la position +1.

Figure 25 : Représentation schématique résumant l'interaction de H-NS et Ler avec la séquence promotrice de l'opéron LEE5 sur le brin codant et non codant.

Figure 26 : Essais de compétition pour la fixation sur la région promotrice du promoteur LEE5 à 20 °C et 37 °C entre les protéines H-NS et Ler, en retard sur gel et en empreintes à la DNaseI .

Figure 27 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 wt et LEE5 3M en présence de H-NS à 20°C.

Figure 28 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 wt et LEE5 3M en présence de Ler à 20°C

Figure 29 A : Représentation de la courbure de la région allant du -64 à +116 (180 pb), par rapport au +1 de la transcription, du petit fragment LEE5 *wt* et LEE5 muté. B : empreintes à la DNaseI sur le petit fragment de LEE5 *wt* et muté 1M en présence de H-NS, montrant la perte de l'empreinte de H-NS au niveau de la mutation en position +15 et +17 sur le fragment muté.

Figure 30 : Effet de la mutation des sites de fixation de la protéine H-NS sur la régulation du promoteur LEE5 par H-NS et Ler dans les EPEC.

Figure 31 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 *wt* et LEE5 3M en présence de StpA à 20°C.

Figure 32 : Représentation de la variation de l'activité du promoteur LEE5 *wt* et LEE5 3M en fonction du temps dans la souche *E. coli* BW2513 *wt*.

Figure 33 : Représentation de la variation de l'activité du promoteur LEE5 *wt* et LEE5 3M en fonction du temps dans la souche *E. coli* BW2513 *stpA(-)* (A) et *E. coli* BW2513 *hns(-)* (B).

Figure 34 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 *wt* en présence d'IHF à 25°C.

Figure 35 : Représentation de la variation de l'activité du promoteur LEE5 *wt* en fonction du temps dans la souche *E. coli* W3110 et *E. coli* W3110 *ihfA(-)*

Figure 36 : Représentation de la variation de l'activité du promoteur *proV-gfp* en fonction du temps dans la souche *E. coli* W3110 et *E. coli* W3110 *ihfA(-)*.

Figure 37 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment *proV* en présence d'IHF à 25°C.

Figure 38 : Modèle expliquant le mode de levée de répression de H-NS sur LEE5 par Ler.

Liste des abréviations

µl: microlitre	LB: Lysogeny broth
µm: micromètre	M: Molaire
µM: micromolaire	min: minutes
ADN : acide déoxyribonucléique	N: normal
ARN : acide ribonucléique	nM: nanomolaire
ATP : adénosine tri phosphate	N-ter: amino-terminal
BET : bromure d'éthidium	Pa: Pascal
C-ter : carboxy-terminal	PAGE: poly acrylamide gel electrophoresis
Da: Dalton	Pb : paires de bases
DNaseI: déoxyribonucléaseI	PCR: «Polymerase Chain Reaction»
DO: densité optique	PNK: « polynucleotide kinase »
DTT: dithiothreitol	RPM: rotation per minute
EDTA: ethylene diamino tétra acetate	SDS: «sodium dodecyl sulfate»
EMSA: electrophoretic mobility shift assay	TE: Tris-EDTA
GFP: green fluorescent protein	UV: « ultra violet »
IPTG: isopropyl β-galactoside	W/V: « weight/volume »
kDa: kilodalton	wt: «wild type»
kpb: kilo de paires de bases	X-gal: 5-bromo 4-chloro 3-indolyl-β-D-galactoside

Introduction

L'espèce *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli fait partie de la microflore bactérienne normale du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de la plupart des animaux à sang chaud. Elle colonise de façon asymptomatique le tractus digestif des nouveaux-nés dans les premières heures qui suivent la naissance et constitue dès lors l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin (Kaper et al, 2004). Néanmoins, Theodor Escherich, devant la fréquence des diarrhées néonatales, soupçonnait dès 1885 l'implication des *E. coli* dans l'apparition des entérites. En 1945, Bray a démontré que certaines épidémies de diarrhée chez les enfants, non associées à *Salmonella* ou à *Shigella sp*, avaient pour origine des souches pathogènes d'*E. coli* (Braun, 1974). Développée dès 1947, la technique de sérotypage a permis de distinguer les différentes souches d'*E. coli*, en particulier les souches pathogènes, grâce à leurs antigènes de surface (Kauffmann, 1947). Ainsi, à partir des années 1950, de nombreuses souches d'*E. coli* ont été répertoriées, chez l'homme et chez l'animal, comme souches pathogènes responsables d'affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères voire mortelles (Kaper et al, 2004). Les différents pathovars d'*E. coli* pathogènes sont capables de se multiplier, de persister dans le tractus digestif en contournant les défenses immunitaires de l'hôte, et d'induire des dommages cellulaires. Néanmoins, ces souches ont développé différents modes d'interaction avec leur hôte se traduisant par des signes cliniques variés. Ainsi, en médecine humaine, sur la base de ces modes d'interaction hôte-bactérie et des signes cliniques de l'infection, les souches d'*E. coli* pathogènes sont classées en « pathovars » ou « pathotypes » qui regroupent des souches de sérotypes spécifiques. Actuellement, les souches impliquées dans des infections intestinales chez l'homme sont classées en sept pathotypes : les EPEC pour « Enteropathogenic *E. coli* », premier pathotype décrit historiquement (qui sera décrit en détail plus bas), les EHEC « Enterohaemorrhagic *E. coli* », les ETEC « Enterotoxigenic *E. coli* », les EIEC « Enteroinvasive *E. coli* », les EAEC « Enteroaggregative *E. coli* », les DAEC « Diffusely adherent *E. coli* » et les ATEC « atypical enteropathogenic *E. coli* » (Schmidt, 2010) (**Tableau 1**). Outre ces pathovars responsables d'infections intestinales, d'autres pathovars sont à l'origine d'infections du tractus urinaire, les *E. coli* associés à des

méningites (MNEC pour «Meningitis-associated *E. coli*» ou à des septicémies. Ces souches ont récemment été regroupées sous le terme de ExPEC pour « Extra-intestinal pathogenic *E. coli* » (Russo & Johnson, 2000).

Tableau 1 Affections associées aux pathotypes d'*E. coli* responsables de diarrhées chez l'homme (Kaper et al, 2004).

Pathotypes	Affections associées	Caractéristiques des souches	Sérotypes les plus fréquents a
ETEC Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Diarrhée aqueuse aiguë	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adhésion aux entérocytes grâce à des pili spécifiques (CFAs, CSs,...). ▪ Production des entérotoxines thermostables (ST) et/ou thermolabiles (LT). 	O6:H16, O8:H9, O11:H27, O15:H11, O20:H-, O25:H42, O78:H12, O120:H7, O128:H7.
EIEC Enteroinvasive <i>E. coli</i>	Diarrhée aqueuse, syndrome dysentérique	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Génétiquement et fonctionnellement très proches de <i>Shigella</i> sp. (non mobile, lactose - ; lysine décarboxylase -). ▪ Plasmide de virulence (#140 MDa). ▪ Invasion et prolifération dans les cellules épithéliales <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>. 	Sérotypes appartenant aux sérogroupes : O28ac, O112, O124, O136, O143, O144, O173.
EAEC Enteroadgregative <i>E. coli</i>	Diarrhée persistante	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adhésion typique en « briques empilées » sur cellules <i>in vitro</i>. ▪ Facteurs de virulence hétérogènes : adhésines (AAF), toxines (EAST-1, Pet), PAIs (she PAI, HPI...). 	
DAEC Diffusely adherent <i>E. coli</i>	Diarrhée aqueuse aiguë ou persistante	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adhésion diffuse sur cellules <i>in vitro</i>. ▪ Production d'adhésines afimbriales (Afa). ▪ Pas de production d'entérotoxine ou de Stx. ▪ Aussi associées à des infections urinaires. 	
EPEC Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Diarrhée aqueuse aiguë ou persistante	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adhésion localisée (EPEC « typiques ») sur les entérocytes et les cellules <i>in vitro</i>. ▪ Adhésion « intime » sur les entérocytes et destruction des microvillosités (lésion « d'attachement-effacement »), présence du <i>locus</i> d'effacement des entérocytes (LEE). ▪ Pas de caractère invasif de type <i>Shigella</i> sp. ▪ Pas de production d'entérotoxine ou de toxine Stx. 	EPEC typiques : O55:[H6], O86:H34, O111:[H2], O114:H2, O119:[H6], O127:H6, O142:H6, O142:H34. EPEC atypiques : O26:[H11], O55:[H7], O55:H34, O86:H8, O111ac:[H8], O111:[H9], O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2.
EHEC Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>	Diarrhée aqueuse aiguë, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique, purpura thrombotique et thrombocytopénique	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Production de toxines Stxs (ou vérotoxines). ▪ Lésion « d'attachement-effacement » sur les entérocytes, et présence du <i>locus</i> d'effacement des entérocytes (LEE). ▪ Plasmide de virulence (# 60 MDa). 	O26:H-, O26:H11, O91:H-, O103:H2, O111:H-, O113:H21, O118:H16, O128:H2, O145:H-, O145:H28, O146:H21, O157:H7.

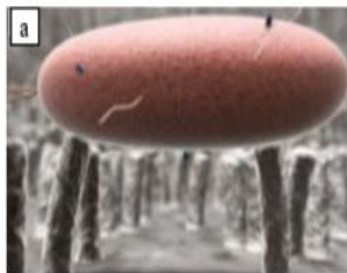
a : [H] indique la présence de souches non mobiles.

AAF : *aggregative adherence fimbriae* ; Afa : *afimbrial adhesin* ; CFA : *colonization factor antigen* ; CS : *coli surface antigen* ; EAST-1 : *enteroadgregative E. coli ST1* ; HPI : *high pathogenicity island* ; LEE : *locus of enterocyte effacement* ; LT : *heat-labile enterotoxin* ; PAI : *pathogenicity island* ; ST : *heat-stable enterotoxin* ; Stx : *shiga-like toxins*.

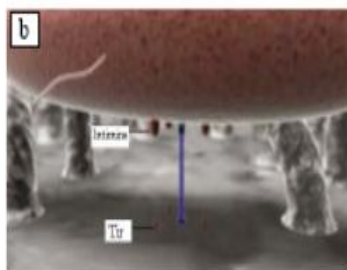
Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC)

Les EPEC sont un facteur mondial de morbidité et de mortalité. Elles provoquent des diarrhées qui peuvent s'avérer mortelles chez les enfants de moins de deux ans, et sévissent surtout dans les pays en voie de développement. Les EPEC et leurs pathovars voisins, les EHEC, partagent des similarités phénotypiques et génétiques. En plus des facteurs classiques de virulence, plusieurs traits communs à ces deux pathovars ont été identifiés, d'une part le « LEE (Locus of Enterocyte Effacement) pathogenicity island (PAI) » identifié en 1995 comme un îlot de pathogénicité acquis par transfert horizontal d'une origine de type non *E. coli*, qui code pour un système de sécrétion de type III. Par ailleurs ces deux pathovars peuvent former des lésions intestinales de type attachement et effacement (A/E) avec une adhésion intime au cytosquelette de la cellule hôte et réarrangement de ses fibres tout en restant extracellulaires (Baldini et al, 1983) (**Figure 1**). Ces deux pathovars voisins ont aussi des caractères spécifiques: les EHEC produisent des Shiga toxines qui provoquent des lésions au

Figure 1 : Modélisation des trois principales étapes de l'interaction entre une souche EHEC et un entérocyte aboutissant à la formation d'une lésion d'attachement et d'effacement (A/E) modifiée d'après (Quantrell et al. 2004)



a- Adhésion initiale d'une souche d'EHEC (représentée en rose) aux microvillosités intestinales (représentées en gris).



b- Mise en place des composants de la seringue moléculaire (représentée en bleu) du SSTT codé par le LEE des EHEC.



c- Adhésion intime de la bactérie à la cellule hôte et lésion d'A/E.

Les microvillosités intestinales sont détruites localement en regard de la zone de contact avec la bactérie laissant la place à un véritable piédestal épousant la bactérie.

SSTT : système de sécrétion de type III ; LEE : « locus of enterocyte effacement »

niveau des cellules rénales (Levine et al, 1987). Ces toxines, décrites pour la première fois en 1977, ont d'abord été nommées vérotoxines en raison de leur toxicité sur les cellules *Véro*, cellules épithéliales rénales du singe vert d'Afrique (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) (Konowalchuk et al, 1977). Quelques années plus tard, O'Brien et al démontrent que l'effet cytotoxique de ces vérotoxines peut être neutralisé par un sérum dirigé contre la Shiga-toxine produite par *Shigella dysenteriae* sérotype 1 et renomment donc ces toxines « Shiga-like toxines » (O'Brien & LaVeck, 1983). Ces toxines particulières sont alors identifiées chez les souches EHEC O157:H7 incriminées lors des épidémies de colites hémorragiques survenues en 1982 aux Etats-Unis (Riley et al, 1983) puis, plus tard, chez les souches EHEC associées à des cas sporadiques du syndrome hémolytique et urémique (SHU) (Karmali et al, 1985). Les toxines Stx sont responsables de lésions de l'endothélium vasculaire, principalement au niveau intestinal, rénal et cérébral (revue par (O'Loughlin & Robins-Browne, 2001)). Les Stx sont codées par des gènes *stx* portés par des bactériophages lambdoïdes et comprennent de nombreux variants. L'ensemble des souches possédant un gène *stx*, indépendamment des signes cliniques observés chez l'hôte, sont dénommées STEC pour « Shiga-like toxin producing *E. coli* ». Les EHEC constituent un sous-groupe des STEC et sont dites EHEC lorsqu'elles ont été isolées chez des patients (Caprioli et al, 2005).

Les EPEC possèdent 14 gènes portés par le plasmide EAF (EPEC Adhesion Factor) dont l'expression produit un pilus de type IV connu sous le nom de Bfp, important pour l'adhésion non intime de la bactérie sur la cellule hôte et pour les interactions bactériennes (Ochoa & Clearly, 2004). Les EHEC ne possèdent pas ce plasmide (Foster & Moreno, 1999), mais portent des gènes codant pour des fimbriaes ressemblant au LPF (Long Polar fimbriae) de *Salmonella*, que les EPEC ne possèdent pas. Enfin, les maladies liées aux EHEC apparaissent principalement dans les pays industrialisés et celles liées aux EPEC dans les pays en voie de développement (Donnenberg et al, 1993).

Un caractère essentiel de ces bactéries pathogènes, est qu'il leur est nécessaire de coordonner l'expression de leurs gènes de virulence en fonction des signaux de stress provenant de l'environnement extérieur. Ce processus implique un mécanisme de régulation des gènes de pathogénicité du LEE impliquant les conditions environnementales, le "quorum sensing", et plusieurs protéines régulatrices spécifiques des EPEC (Per « Plasmid encoded regulator » ,Ler « LEE encoded regulator »,GrlR « global regulator of LEE

repressor », GrlA « global regulator of LEE activator ») et aussi non spécifiques qu'on retrouve par exemple dans la souche K12 d'*E. coli*, les NAP pour « Nucleoid associated proteins » (H-NS, IHF, Fis ...)

Le « LEE » : un facteur de virulence majeur dans les EPEC

Chez les EPEC tous les gènes nécessaires à la formation des lésions de type A/E se trouvent dans le « locus of enterocyte effacement » (LEE) (**Figure 2**). Le LEE (35,4 kb) est organisé en 5 opérons majeurs *LEE1* à *LEE5*. *LEE1* et *LEE3* codent pour les protéines formant le système de sécrétion de type III et pour la protéine régulatrice de la transcription Ler qui sera au cœur de cette étude (Elliott et al, 2000). *LEE4* code pour les protéines sécrétées, EspA qui joue un rôle dans l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte, EspB et EspD qui induisent le réarrangement du cytosquelette dans la cellule au cours de l'effacement et qui forment aussi un pore dans la membrane, permettant la délivrance des autres protéines effectrices. Chez *Citrobacter rodentium*, un pathogène murin lié phylogénétiquement aux EPEC et EHEC, des délétions dans les gènes codant pour EspA, EspB et EspD, indiquent que ces 3 protéines sont importantes pour la virulence (Deng et al, 2004b). *LEE5* code pour les protéines Tir et Intimine, qui sont nécessaires pour l'attachement intime de la bactérie à la cellule hôte, et CstT qui est une chaperonne pour Tir (Elliott et al, 1999).

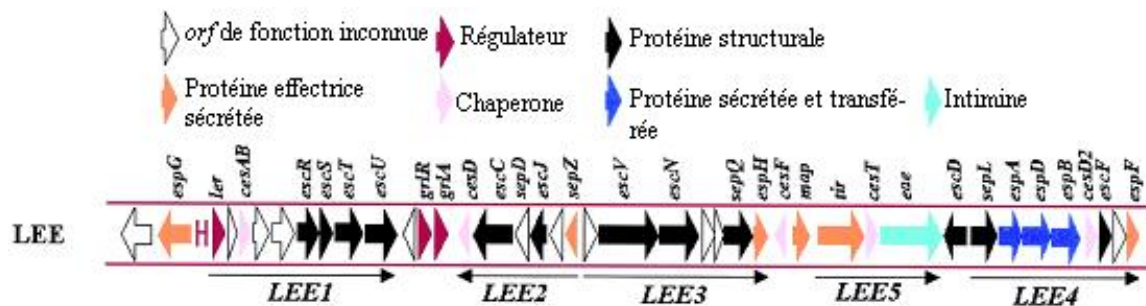


Figure 2: Organisation schématique du LEE des EHEC/EPEC (modifiée d'après (Garmendia et al, 2004))

Les gènes homologues des gènes du système de sécrétion de type trois (SST) de *Yersinia* sp. sont dénommés *esc* (« *E. coli* secretion ») et portent le même suffixe que leur homologue chez *Yersinia* (par exemple *escN* homologue de *yscN*). Les gènes impliqués dans la sécrétion mais ne présentant pas d'homologie avec des gènes du SST de *Yersinia* sont appelés *sep* (« secretion of *E. coli* protein »). Les gènes codant pour des protéines sécrétées par la bactérie sont dénommés *esp* (« *E. coli* secreted protein »). Les gènes codant pour des protéines chaperonnes des protéines sécrétées sont dénommés *ces* (« chaperonne for *E. coli* secreted protein ») et portent un suffixe correspondant à la protéine sécrétée (par exemple *cesD* code pour la protéine chaperonne de EspD et *cesT* pour celle de Tir). Les ORF de fonctions inconnues sont désignées *orf* ou *rorf* en fonction de l'orientation de sens de transcription du gène (Elliott et al, 1998)

Le système de sécrétion de type III (SSTT) des EPEC

Le système de sécrétion de type III est présent dans de nombreux genres de bacilles à Gram négatif dont les EPEC, Yersinia, Shigella et Pseudomonas (Hueck, 1998). Activé par le contact de la cellule eucaryote, ce système est dédié à l'injection d'effecteurs directement du cytoplasme de la bactérie dans le cytosol de la cellule cible sans passage par le milieu extérieur. Ces effecteurs induisent la mort cellulaire ou le dysfonctionnement de la cellule, en détruisant la membrane, en perturbant les cascades de transduction des signaux ou en désorganisant le cytosquelette (Hueck, 1998; Rietsch et al, 2005). Ils permettent aux bactéries pathogènes d'envahir les tissus de l'organisme infecté ou de circonscire ses défenses. Souvent comparé à une aiguille, le SSTT est très conservé au niveau structural entre les bactéries à Gram négatif (Tampakaki et al, 2004). Le SSTT dont la partie basale représente de grandes similitudes avec le corps basal du flagelle est composé de deux structures :

- L'appareil de sécrétion qui est un complexe protéique enchâssé dans les membranes bactériennes. Il permet la sécrétion des effecteurs spécialisés du SSTT du cytoplasme de la bactérie à l'extérieur sans transiter par le périplasma.
- L'appareil de translocation, encore appelé « aiguille », second complexe extra bactérien, en contact avec l'appareil de sécrétion, et qui s'insère dans la membrane de la cellule cible permettant l'injection des effecteurs toxiques spécifiques du SSTT. C'est pourquoi on trouve souvent l'appellation de facteur de virulence pour désigner l'ensemble du SSTT (Kubori et al, 1998).

Bien que la structure des différents SSTT soit similaire, ce facteur de virulence a évolué de façon particulière pour chaque espèce, affectant le mode d'interaction des bactéries avec la cellule cible et permettant différentes stratégies de pathogénicité. La diversité des rôles du SSTT et des environnements dans lesquels il s'exprime met en évidence l'importance qu'il joue dans les mécanismes de virulence de certains pathogènes à Gram négatif, notamment les EPEC.

L'infection bactérienne de la cellule hôte par les EPEC se divise en 3 étapes majeures :

- Expression de la Bfp (Bundle-forming pili), du filament associé à la surface (EspA), l'assemblage des composants de la machinerie du système de sécrétion de type III et la

sécrétion des protéines à transférer qui vont constituer la partie extra bactérienne du SSTT. Cette étape est caractérisée par l'adhésion non intime de la bactérie sur la surface de la cellule hôte.

- la sécrétion de protéines effectrices codées par les différents gènes du LEE (Tir, Map, EspF, EspG, EspH, SepZ et EspB) via la seringue déjà installée. D'autres protéines effectrices codées en dehors du LEE ont été identifiées récemment (NleA, NleB, NleE, NleF, NleH et EspJ), qui jouent un rôle accessoire dans la virulence des EPEC (toutes les marques d'une infection des cellules intestinales par l'EPEC ont été attribuées à des protéines effectrices codées dans le LEE).

- la perturbation de la barrière intestinale par effacement des microvillosités, le réarrangement massif des microfilaments d'actine et des microtubules du cytosquelette de la cellule hôte et la formation de la structure en piédestal caractérisent l'infection par les

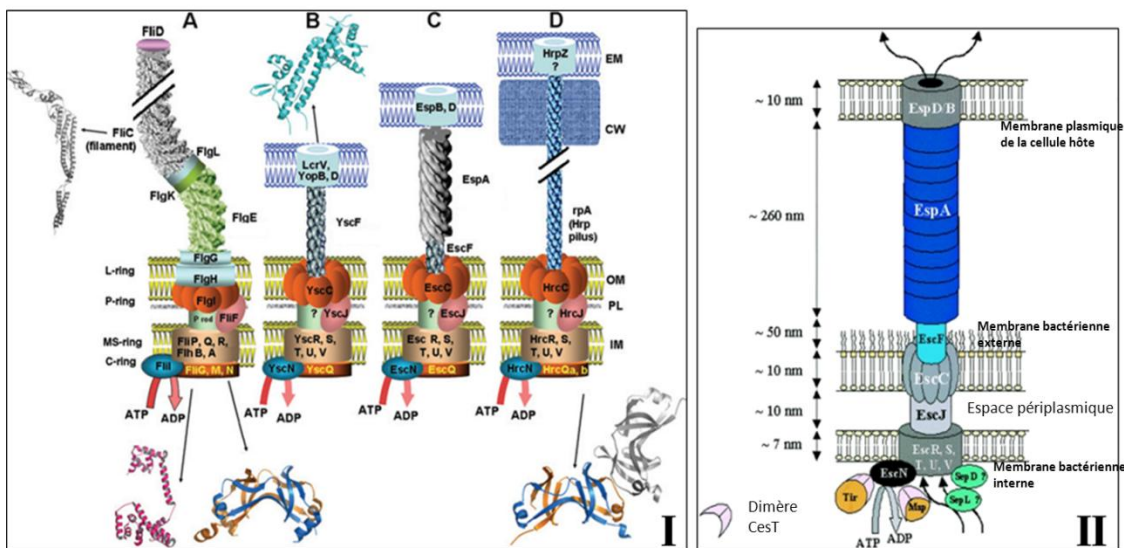


Figure 3 :

I : modélisation de la structure du flagelle et des systèmes de sécrétion de type III de différentes bactéries à Gram négatif. A : structure du flagelle ; B, C, D : SSTT de *Yersinia* ; *E. coli* et de *P. syringae* respectivement. Seules les protéines conservées entre les différents SSTT (et leur homologue chez le flagelle) sont représentées et identifiées par des couleurs et des positions similaires. Le « P rod » du flagelle n'a pas de protéine homologue connue chez les SSTT. Le point d'interrogation signifie qu'une structure de type canal au niveau de la membrane interne n'as pas encore été identifiée. Le constituant majeur de l'aiguille (needle ou Hrp pilus) est YscF chez *Yersinia*, EspA chez *E. coli*, HrpA chez *P. syringae*. Les protéines formant le pore dans la membrane eucaryote (EM) sont LcrV, YopB, YopD chez *Yersinia* et EspB chez *E. coli*. Chez la pathogène des plantes, *P. syringae*, HrpZ est supposée être la protéine translocatrice. Les protéines dont la structure à été caractérisée sont représentées schématiquement. OM : membrane externe de la bactérie, PI : peptidoglycane ; IM : membrane interne de la bactérie ; EM : membrane eucaryote ; CW : paroi cellulaire de la cellule végétale. (D'après Tampakaki et al ; 2004).

II : Représentation schématique du SSTT des EPEC/EHEC.

La sécrétine EscC constitue la base du système. EscR,S,T,U et V sont les protéines de la membrane bactérienne interne. Elles constituent avec la lipoprotéine EscJ la connexion entre la membrane interne et externe. EscF forme la structure de l'aiguille qui se projette à l'extérieur par EspA. Cette dernière polymérise pour former le filament EspA. EspB et D forment le pore de transport reliant la bactérie à la cellule eucaryote via le filament EspA. EscN est la molécule énergisante du système, c'est une ATPase. SepD et L sont considérées comme des composants cytoplasmiques du système.

EPEC. Les protéines effectrices exportées perturbent les processus cellulaires dans la cellule hôte ce qui se traduit par la perte de l'intégrité des jonctions « Tight » et du fonctionnement mitochondrial (Clarke et al, 2003).

L'assemblage de la machinerie du SSTT se fait d'une manière séquentielle : une première phase dépendante de la voie de transduction du signal *sec* où Les composants du SSTT, possédant une séquence signal clivable de type *sec*, sont exportés vers la membrane interne et l'espace périplasmique pour former la base de l'aiguille du SSTT. La deuxième phase de l'assemblage se fait via les composants déjà installés. (Gauthier et al, 2003)

Les composants formant la base de l'aiguille du SSTT, qui s'étend de la membrane bactérienne interne à la membrane externe, sont codés par le LEE1 pour *escR*, *S*, *T* et *U* par le LEE2 pour *escC* et *J* par le LEE3 pour *escV* et *N* et par le LEE4 pour *escF*. L'ensemble de ces protéines forme une structure appelée injectisome. Celui-ci possède une structure basale qui ressemble à celle du flagelle et est constituée de 8 protéines (*EcsN*, *Q*, *J*, *R*, *S*, *T*, *U* et *V*) très conservées au cours de l'évolution (Cornelis, 2006) (**Figure 3**).

Les protéines structurales du SSTT

EscN (51,8 kDa) est la protéine énergisante de la machinerie de sécrétion. Elle possède une homologie de séquence avec la sous unité catalytique beta de la FOF1-ATPase flagellaire et est activée par oligomérisation et est capable d'hydrolyser l'ATP. Cette protéine est essentielle pour la virulence des EPEC, mais le mécanisme liant l'activité ATPase au transport des protéines effectrices reste mal connu (Tristao et al, 2007).

EscV est une préprotéine de 75-kDa, qui, une fois le clivage de sa séquence signal effectué, donne une protéine de la membrane bactérienne interne de 72-kDa. Cette protéine possède probablement 7 domaines transmembranaires.

EscC est une protéine de 54 kDa qui appartient à la famille des sécrétines qu'on trouve dans tous les SSTT (ex : *YscC* chez *Yersinia* spp, *InvG* chez *Salmonella* spp et *MxiD* chez *Shigella*). Elle forme un complexe multimérique en anneau qui sert au transport des molécules à travers la membrane externe (Garmendia et al, 2005). La localisation d'*EscN* et *V* n'est pas dépendante des autres composants du SSTT. Par contre, de grandes quantités d'*EscC* sont retrouvées dans l'espace périplasmique dans des mutants *escV* et *escN*. Par contre la

localisation d'EscC n'est pas perturbée dans un mutant *escF* qui est un composant de l'aiguille du SSTT. Ceci signifie que la localisation d'EscC dans la membrane bactérienne externe est indépendante d'EscF et précède la formation de l'aiguille du SSTT (Gauthier et al, 2003).

La sécrétion des composants distaux du SSTT à travers la membrane interne nécessite un lien connectant la membrane bactérienne interne et externe, soit une structure cylindrique dans l'espace périplasmique avec un ancrage dans les deux membranes. Cette structure est formée par la protéine EscJ (19 kDa), dont la forme mature provient du clivage du signal lipoprotéique de la pré-protéine après le résidu 19 par une peptidase de type II. EscJ présente des similarités avec plusieurs protéines du SSTT d'autres pathogènes (ex : PrgK et SsaJ chez *Salmonella*, MxiJ chez *Shigella*, YscJ chez *Yersinia* et PscJ chez *Pseudomonas*). Elle est constituée de deux domaines structurés reliés par un linker, et s'oligomérisent pour former une structure en anneau de 24 sous unités (Yip et al, 2005). Une fois assemblé, l'ensemble forme une structure dont la taille est proche de l'épaisseur de l'espace périplasmique dans les bactéries Gram(-).

La projection à l'extérieur de la surface bactérienne est assurée par les protéines EscF et EspA. EscF (8 kDa) forme la structure de l'aiguille proprement dit (« needle-like projection »), et joue un rôle important dans la sécrétion des protéines Esp (Kubori et al, 1998). Elle présente un fort degré d'homologie avec les protéines constituant le "Needle Complex" (NC) d'autres pathogènes : PrgI de *Salmonella*, MxiH de *Shigella* et YcsF de *Yersinia enterocolitica*. EspA (20 kDa) constitue une extension du complexe de l'aiguille, et est caractéristique des EPEC et des EHEC. La polymérisation d'EspA, induite par des interactions de type "hélice d'hélices" entre ses différentes sous unités, aboutit à la formation d'un conduit filamenteux tubulaire de 12 nm de diamètre externe et 2,5 nm de diamètre interne (Daniell et al, 2003). La structure du filament EspA et son élongation ressemblent à celles du flagelle : ce filament se forme par addition d'unités EspA sur le sommet du filament naissant. La longueur de ce filament doit être, comme pour le NC (Needle complex), bien définie et le facteur déterminant de cette longueur est la quantité d'EspA produite sous forme monomérique (Crepin et al, 2005). EspA interagit directement avec EscF, qui est essentielle à la fois pour la polymérisation d'EspA et pour la translocation de Tir via le canal central du filament EspA (Wilson et al, 2001). Le filament EspA est un

facteur d'adhésion non intime effectuant le lien entre la bactérie et la cellule hôte ce qui permet la translocation des protéines effectrices. Une fois cette translocation terminée le filament EspA et le NC sont éliminés pour permettre l'adhésion intime de la bactérie sur la cellule hôte via l'interaction de l'Intimine bactérienne avec son récepteur Tir déjà transféré vers la cellule hôte (Frankel et al, 1998).

L'entrée des protéines effectrices dans la cellule hôte nécessite, en plus du canal EspA, la formation d'un pore dans la membrane plasmique de la cellule hôte. La structuration de ce pore est assurée par EspB et D qui sont des protéines hydrophobes contenant des hélices transmembranaires codées dans le LEE. EspB se localise au niveau de la membrane cellulaire de l'hôte et dans le cytoplasme des cellules épithéliales infectées (Wolff et al, 1998). Plus précisément c'est le domaine carboxy terminal d'EspB qui se trouve dans le cytoplasme tandis que le domaine N-terminal est exposé dans le domaine extracellulaire. EspB interagit avec EspD au niveau de régions bien précises (résidus 75 à 78 et 166). Ces régions sont importantes pour une localisation correcte d'EspB dans la membrane cellulaire de l'hôte. Dans un mutant *espD* la longueur du filament EspA est fortement réduite mais pas dans un mutant *espB* suggérant que l'interaction d'EspA avec EspD est plus directe que celle avec EspB (Knutton et al, 1998). Les 20 premiers résidus du domaine N-terminal d'EspB, d'EspD et d'EspA constituent un signal de sécrétion qui une fois exprimé en fusion avec une protéine reportrice peut induire la translocation de cette protéine (Munera et al, 2010). En plus de son rôle dans la translocation des protéines, EspB est l'une des protéines effectrices du SSTT: EspB modifie l'architecture du cytosquelette de l'hôte en se liant à l'alpha caténine, une molécule associée au cytosquelette, d'où le rôle effecteur d'EspB (Kodama, 2002).

EspD semble jouer un rôle majeur dans la formation de ce pore (Hartland & Robins-Browne, 1998). Elle possède un domaine distal, par rapport à son domaine transmembranaire, important pour sa liaison à la myosine (résidus 158 à 219). Une mutation dans ce domaine n'affecte pas la fonction de transfert assurée par le complexe EspD/B mais réduit la capacité du pathogène à induire l'élongation des fibres de myosine de la microvillosité cellulaire et par conséquent l'échappement à la phagocytose par le macrophage (Iizumi et al, 2007; Kodama et al, 2002). Une autre protéine, EspF, protéine effectrice codée par le LEE, joue un rôle dans l'échappement à la phagocytose, car le processus anti phagocytose n'a lieu que dans des souches exprimant EspB et EspF à la fois, et pas dans des souches exprimant EspB

toute seule. EspB n'est pas donc suffisante pour que la bactérie échappe au système phagocytaire de la cellule hôte (Dean et al, 2006).

Les protéines effectrices du SSTT

Des études récentes sur le sécrétome dépendant du SSTT chez l'organisme modèle d'A/E *Citrobacter rodentium* ont montré que le répertoire des protéines effectrices d'*E. coli* de type A/E est plus large qu'on ne pensait et non pas restreint aux protéines codées par le LEE (Schmidt, 2010). La même étude chez les EHEC a montré l'existence de plus de 60 gènes de protéines effectrices (Tobe et al, 2006). Les protéines codées par le LEE ont été les premières à être identifiées (Tir, Map, EspF, EspG, EspZ, EspH, et EspB). Une des caractéristiques principales de ces effecteurs est leur redondance fonctionnelle : par exemple EspF peut se localiser dans plusieurs compartiments cellulaires (cytoplasme, mitochondries, membranes apicales et latérales). Elle peut interagir avec 12 protéines de la cellule hôte pour induire soit un dysfonctionnement des mitochondries, soit une désorganisation des jonctions de type « tight », soit l'apoptose, soit une inhibition du transport épithélial, soit une anti-phagocytose et la formation du piédestal d'actine (Nagai et al, 2005). Récemment EspF a été impliquée dans la désorganisation du nucléole par un mécanisme basé sur la perte de la nucléoline, protéine la plus abondante du nucléole. Il s'agit du premier pathogène non viral qui cible spécifiquement une protéine du nucléole (Dean et al, 2010).

La protéine Map cible les mitochondries de la cellule hôte en perturbant leur potentiel membranaire (Kenny, 2002). Map est aussi responsable de la perturbation de la barrière intestinale et des jonctions de type « tight » (Delahay et al, 2002).

EspZ/SepZ est un effecteur codé dans le LEE chez les EPEC, les EHEC et *C. rodentium* (Kanack et al, 2005). Une étude récente a montré une augmentation dans la cytotoxicité dans les cellules HeLa infectées par des souches espZ(-) en comparaison avec des cellules infectées par des souches wt. Les données de Shames et al ont montré qu'EspZ d'une manière dépendante de CD98, sa partenaire de liaison cellulaire prévient la mort cellulaire précoce durant l'infection par l'EPEC, offrant ainsi aux EPEC le temps nécessaire pour coloniser efficacement avant la dissémination (Shames et al, 2010).

EspG est un autre effecteur du SSTT présentant des fonctions redondantes : EspG se localise au niveau de l'appareil de Golgi quand elle est exprimée d'une manière ectopique dans les cellules HeLa (Clements et al, 2011). Elle est capable de déstabiliser les microtubules (Shaw et al, 2005), d'activer la calpaine, une protéase qui a un site de clivage dans plusieurs protéines de l'hôte impliquées dans la migration et le détachement cellulaire (Dean et al, 2010; Glading et al, 2002), et enfin de perturber le fonctionnement et la structure de l'appareil de Golgi en se liant à la protéine GM130 de la matrice de Golgi (Clements et al, 2011).

Des infections animales par *Citrobacter* et EHEC (l'EPEC n'a pas un animal modèle d'infection) montre que tous les effecteurs du LEE contribuent à la virulence de façon mineure mais additive et que Tir semble être le seul effecteur essentiel pour la virulence de ces pathogènes *in vivo* (Mundy et al, 2005).

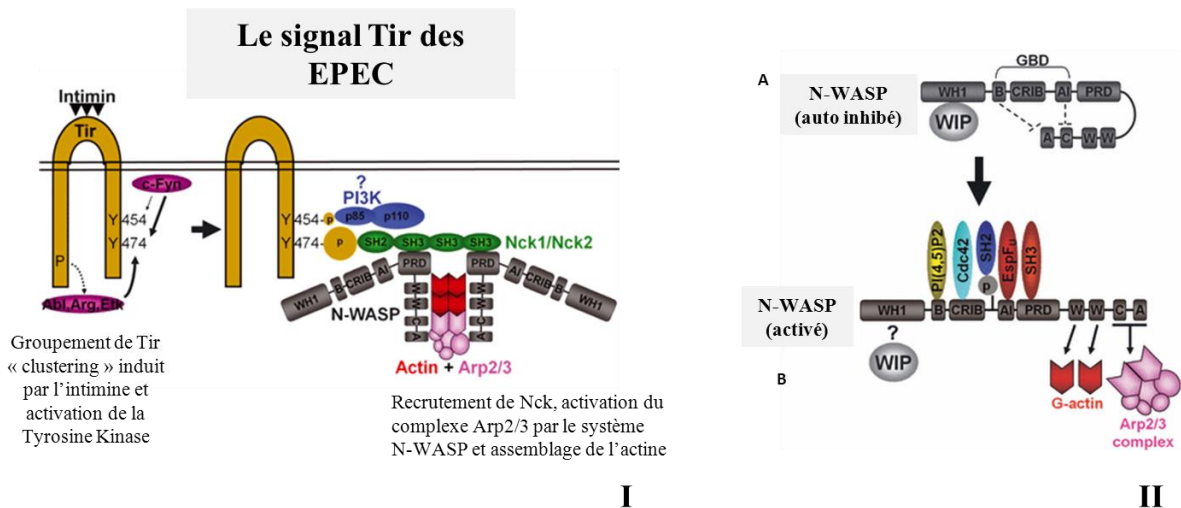
Tir (Transmembrane Intimin Receptor) et le réarrangement de l'actine de l'hôte

La morphologie cellulaire est déterminée par les changements du cytosquelette d'actine en réponse à des stimuli extracellulaires. Plusieurs phénomènes biologiques sont dépendants du cytosquelette d'actine notamment la défense immunitaire contre les pathogènes. Une mauvaise régulation de l'assemblage du réseau d'actine est donc associée à une immunodéficiences chez l'hôte (Pollard & Borisy, 2003). Plusieurs pathogènes ciblent les voies de signalisation de polymérisation de l'actine pour coloniser les cellules infectées et c'est bien le cas de *Vaccinia*, *Shigella*, des EHEC et des EPEC. Les EPEC utilisent principalement la protéine Tir pour induire le réarrangement de l'actine de l'hôte. Tir est le produit du premier gène de l'opéron LEE5. Sa translocation ou son expression dans la cellule hôte n'ont pas d'effet sur le réarrangement et la formation du piédestal d'actine (Hayward et al, 2006). C'est l'interaction de Tir avec son ligand l'Intimine bactérienne qui est cruciale pour le réarrangement de l'actine de l'hôte (Donnenberg et al, 1993).

Contrôle de l'assemblage de l'actine dans la cellule eucaryote

Pour former les filaments d'actine la cellule doit transformer les monomères d'actines en une structure multimérique. Cette étape est catalysée par des facteurs de nucléation ; le complexe Arp2/3 qui interagit avec des facteurs appelés " Nucleation-promoting factors " (Chesarone & Goode, 2009). Un de ces facteurs le N-WASP possède une organisation

modulaire, étant composé du domaine WH1 qui interagit avec une protéine WIP pour stabiliser l'état auto inhibé du complexe N-WASP, du domaine GBD (GTPase Binding Domain) qui contient une région auto-inhibitrice (AIR) responsable du maintien de la conformation auto inhibée en séquestrant la région CA du troisième domaine VCA (Veroprolin-connector-acidic) (Hayward et al, 2006). Seul, le complexe N-WASP/WIP possède une activité de nucléation faible. Plusieurs facteurs cellulaires interagissent avec les différents domaines du complexe N-WASP pour induire l'activation du système, par exemple la GTPase Cdc42 qui se fixe sur le motif Rac-interactive-binding, le phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate [PI(4,5)P₂] qui se fixe sur la région basique B, le domaine SH2 qui se fixe à un résidu phosphotyrosine et/ou le domaine SH3 qui se lie à son domaine riche en proline (proline-rich domain (PRD)). Il existe aussi des protéines adaptatrices (Nck et Grb2) qui jouent un rôle positif dans l'activation de ce système. La liaison simultanée de tous ces facteurs induit la polymérisation de l'actine (Figure 4) (Campellone, 2010).



(Modifié d'après Campellone et al ; 2010)

Figure 4:

I: Régulation de l'assemblage de l'actine par Tir

Le groupage de Tir induit la phosphorylation de la Y474 et de la Y454 (d'une moindre degré) par les Kinases de l'hôte (c-Fyn, Abl, Arg et Etk). Certaines de ces kinases peuvent interagir avec une séquence riche en proline au niveau du N-terminal de Tir (flèche pontillée). Un résidu de 12 acides aminés dont la Y474 interagit avec le domaine SH2 de la protéine adaptatrice Nck. Les domaines SH3 de Nck activent le système N-WASP ce qui améliore la polymérisation de l'actine par le complexe Arp2/3.

II: La régulation de N-WASP exhorde l'assemblage de l'actine

A: Dans son état inhibé le facteur N-WASP interagit via son domaine WH1 (WASP homology 1 domain) avec la protéine WIP. Cette structure est stabilisée par une interaction intramolécule auto inhibitrice entre le domaine de liaison à la GTPase (GBD) et la région WCA (WH2 connector acidic). B: N-WASP est activé par la fixation du phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate [PI(4,5)P₂] à sa région basique B, du Cdc42 à son motif CRIB (Cdc42/Rac-interactive-binding), du domaine SH2 au résidu phosphotyrosine (p)central et/ou du domaine SH3 à son domaine riche en proline PRD.

Les EPEC et les EHEC ont déchiffré le mécanisme de transduction de signal qui contrôle le complexe N-WASP et ont développé plusieurs stratégies pour induire le réarrangement de l'actine chez l'hôte en se servant de l'activation induite par les complexes N-WASP et Arp2/3.

Rôle de l'interaction Intimine/Tir dans le réarrangement de l'actine : Exploitation de la voie de signalisation de la Tyrosine kinase.

L'intimine est une protéine de la membrane externe bactérienne de 94 kDa nécessaire à l'adhésion intime entre la bactérie et l'entérocyte, et est requise pour la pleine virulence des souches EPEC chez l'homme (Donnenberg et al, 1993). Elle est codée par le gène *eae* (pour « *E. coli* attaching and effacing ») au niveau du *LEE5*. Elle possède une homologie au niveau du domaine N-terminal avec l'Invasine de *Yersinia* qui se lie aux Intégrines Beta1 pour permettre son internalisation dans la cellule hôte. La recherche d'un récepteur cellulaire pour l'intimine, durant l'infection des cellules épithéliales par les EPEC, a révélé une protéine de 90 kDa (Hp90) phosphorylée au niveau d'une tyrosine (Rosenshine et al, 1992). Cette protéine est la protéine Tir, d'origine bactérienne, transportée vers la membrane cytoplasmique de la cellule hôte par le système de sécrétion de type III.

L'intimine comprend deux domaines fonctionnels, un domaine N-terminal, très conservé parmi les différentes souches EPEC ou EHEC, correspondant au domaine d'ancrage dans la membrane externe de la bactérie, et un domaine C-terminal, très variable, correspondant au domaine exposé à la surface des bactéries. Ce domaine comprend plusieurs domaines immunoglobuline-like et un domaine lectine-like impliqué dans la reconnaissance des récepteurs de l'intimine à la surface de la membrane plasmique de la cellule hôte. Plusieurs récepteurs cellulaires de l'intimine ont été décrits, dont la protéine Tir et au moins deux autres protéines, une intégrine $\beta 1$ et une nucléoline, dénommées Hir (pour « Host cell-encoded intimin receptors ») (Garmendia et al, 2005).

Tir est une protéine de 78 à 80 kDa, codée par le gène *tir* au niveau du *LEE5*, sécrétée via le SSTT par la bactérie et enchâssée dans la membrane des cellules cibles (Kenny et al, 1997). Une fois insérée dans la membrane cellulaire, les domaines N- et C-terminaux de Tir sont exposés dans le cytoplasme de l'entérocyte et sont impliqués dans les interactions avec les éléments du cytosquelette et de signalisation des cellules. Le domaine N-terminal se fixe

aux protéines d'adhésion focale qui forment classiquement des sites d'attachement des cellules à la matrice extracellulaire. L'interaction binaire du ligand extracellulaire (intimine) avec son récepteur (Tir) au niveau de la cellule est généralement suffisante pour induire une transduction de signal transmembranaire qui permet une réponse cellulaire en faveur de la bactérie. Le signal est aussi amplifié par le groupage réticulaire de Tir grâce à des liaisons multivalentes de l'intimine: chaque sous unité d'un dimère de Tir, via son domaine transmembranaire, interagit avec le domaine C-terminal monomérique et extra bactérien d'un dimère d'intimine distinct (Touze et al, 2004) (**Figure 5**).

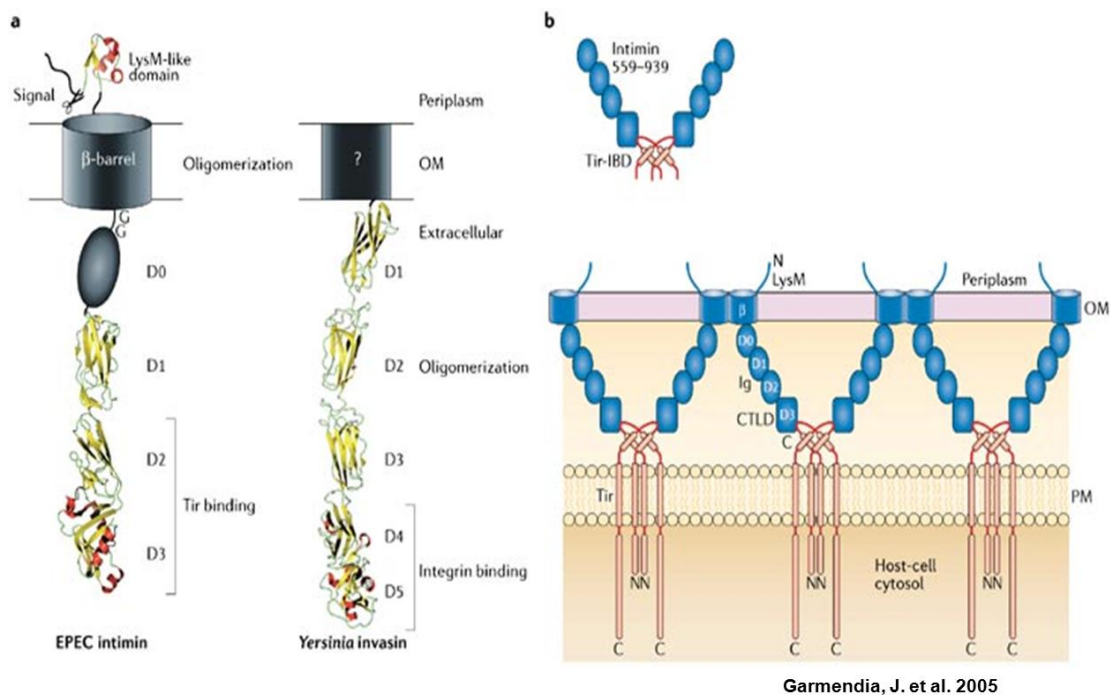


Figure 5:

a: structure de l'Intimine des EPEC. La structure cristallographique du domaine C-terminal exposé à la surface (559-939) de l'intimine des EPEC montre une molécule monomérique contenant 3 domaines immunoglobuline-like D0, D1, D2. Le domaine D0 contient une liaison de type glycine/glycine (GG). La structure du domaine N-terminal (40-188) de l'intimine des EPEC reste encore non caractérisée mais qui présente un domaine LysM flexible et une structure avec 2 feuilletts Beta enchâssés.

b: Représentation schématique de la matrice réticulaire résultant de l'interaction entre l'Intimine dimérique (bleu) localisée dans la membrane bactérienne externe (OM) et un dimère de Tir (rose) enchâssé dans la membrane plasmique (PM). Le domaine lectine-like D3 est représenté par un rectangle et les 3 domaines Ig-like sont représentés par des ovaies.

La capacité de Tir à induire la formation du piédestal d'actine est donc dépendante de son interaction avec l'Intimine (Kenny et al, 1997). La réticulation de Tir par l'intimine dans la membrane plasmique de l'hôte constitue le premier signal de recrutement des kinases de l'hôte (Touze et al, 2004) et met Tir à proximité des kinases c-Fyn de l'hôte (Hayward et al, 2009). Le domaine C-terminal de Tir contient toute l'information nécessaire pour induire le

réarrangement de l'actine (Campellone et al, 2004) dont un site essentiel pour l'induction du réarrangement de l'actine, la tyrosine 474 (Kenny, 1999), phosphorylée essentiellement par une la kinase de l'hôte c-Fyn qui appartient à la famille des SFK kinases (Phillips et al, 2004). Les piédestaux d'actine formés par les EPEC et les EHEC sont morphologiquement similaires, mais plusieurs indices montrent que les mécanismes biochimiques qui régissent leurs formations ne sont pas identiques (Sal-Man et al, 2009). En effet Tir des EHEC n'a pas de Tyrosine en position Y474, l'induction de la polymérisation d'actine chez les EHEC est Nck1 et Nck2 indépendante (Gruenheid et al, 2001) et la protéine Tir des EHEC n'est pas interchangeable avec celle des EPEC (DeVinney et al, 2001). Par contre il existe une certaine homologie mécanistique dans la formation du piédestal d'actine entre ces pathovars voisins (Campellone & Leong, 2005). Les molécules de l'hôte qui relie la Y454 de Tir des EPEC à l'assemblage de l'actine font le lien aussi entre la Y458 de Tir des EHEC, EspF_u et le système N-WASP (Phillips et al, 2004). D'où une certaine homologie entre la réorganisation de l'actine, non Nck dépendante, des EPEC et celle des EHEC.

Les modifications induites par les EPEC sur les réseaux de microfilaments de l'hôte ne sont pas dirigées uniquement vers le réseau d'actine mais aussi vers le réseau de microtubules. C'est la protéine EspG qui déstabilise la structure du microtubule en se fixant sur la tubuline, la sous unité constituant le filament de microtubule (Hardwidge et al, 2005).

Les effecteurs codés en dehors du LEE: " non-LEE" effecteurs

Les gènes qui se trouvent en dehors du LEE et qui codent pour des effecteurs sont regroupés dans 6 îlots de pathogénités distribués dans le génome. Ils présentent un taux faible en G+C. Les gènes des effecteurs "non-LEE" sont entourés par des gènes de prophages ou de transposases qui y sont liés, ce qui indique qu'ils ont été acquis par transfert horizontal, comme pour la plupart des gènes de pathogénité. Le répertoire des effecteurs "non-LEE" est moins conservé que celui du LEE. En effet, la souche E22 (rabbit-EPEC) en possède 40 tandis que la souche prototype en possède 21 (Iguchi et al, 2009). Comme la plupart de ces effecteurs ont été découverts récemment, on sait encore peu de choses sur leur fonction cellulaire mais les fonctions suivantes ont été caractérisées: NleA (EspI) inhibe la sécrétion protéique (Kim J et al ; 2007), EspJ inhibe la phagocytose (Marches et al, 2008), NleE et NleH induisent la réponse inflammatoire de l'hôte bien que l'effet global de l'infection par l'EPEC sur l'hôte soit anti-inflammatoire (dû à l'inhibition de la

sécrétion de l'interleukine 8) (Ruchaud-Sparagano et al, 2007). EspJ, NleA, B, E, F et H jouent un rôle dans la virulence complète.

En conclusion on peut dire que les effecteurs des EPEC (résumé dans le **Tableau 2**) agissent ensemble par des combinaisons différentes pour permettre aux EPEC d'échapper aux réponses de l'hôte (Matsuzawa et al, 2004) et montre la nécessité d'une régulation très contrôlée de l'expression des gènes codant pour ces effecteurs et pour l'ensemble des composant du SSTT impliquant des facteurs variés dont les conditions environnementales.

Tableau 2 : liste des effecteurs protéiques des EPEC et des EHEC

Protéine effectrice	Masse moléculaire estimée (kDa)	Localisation dans le génome	Localisation dans la cellule hôte	Fonction(s)
Tir	56-68*	LEE	Tête du piédestal d'actine	<ul style="list-style-type: none"> • Attachement intime • Lésions A/E • Polymérisation de l'actine
Map	20	LEE	Mitochondries	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbation de la barrière intestinale et des jonctions « Tights » • Perturbation du potentiel membranaire mitochondrial
EspF	20-31*	LEE	<ul style="list-style-type: none"> • Cytoplasme • Mitochondries • Membranes apicales 	Disruption du nucléole (Dean et al ; 2010), des jonctions « Tights » et des mitochondries
EspG	44	LEE	<ul style="list-style-type: none"> • Appareil de Golgi • Co-localisation avec les tubulines 	<ul style="list-style-type: none"> • Destruction du réseau des microtubules • Perturbation du fonctionnement de l'appareil de Golgi (Clemens et al ; 2011)
EspH	21	LEE	Sous la micro colonie	Modification du cytosquelette
EspZ	9.5	LEE	Non connu	Prévenir la mort cellulaire précoce en interagissant avec la protéine CD98 (Schames et al ; 2010)
EspB	32	LEE	Site d'attachement de la bactérie	Modulation du cytosquelette
NleA	54	CP-933P	Appareil de Golgi	Inhibe la sécrétion protéique
EspJ	25	CP-933U	Non connu	Inhibe la phagocytose (Marches et al ; 2008)
NleB	39	Îlot O 122/ CP-933K	Non connu	Non connu
NleC	40	CP-933K	Non connu	Non connu
NleD	28	CP-933K	Non connu	Non connu
NleE	27	Îlot O 122	Non connu	Induction de la réponse inflammatoire de l'hôte (Ruchaud-Sparagano et al ; 2007)
NleF	24	Îlot O 71	Non connu	Non connu
NleH	33	nt2281573/ cp933k	Non connu	Induction de la réponse inflammatoire de l'hôte (Ruchaud-Sparagano et al ; 2007)
Cif	32	Prophage Lambda	Non connu	Activité du cyclomoduline
EspG2	42	EspC PAI	Co localisation avec les Tubulines	Destruction du réseau des microtubules
EspFu	42.4	CP-933U	Tête du piédestal	<ul style="list-style-type: none"> • Lésions A/E • Polymérisation de l'actine

Modifié d'après (Garmendia et al ; 2005)

Les facteurs environnementaux : la première maille dans la chaîne de régulation de la virulence chez les EPEC, les EHEC et d'autres entéropathogènes.

De nombreux exemples montrent que l'expression des facteurs de virulence des pathogènes est régulée par les facteurs environnementaux.

Milieu de croissance

Pour les EPEC, *in vitro*, des conditions de cultures spécifiques sont nécessaires pour leur adhérence et leur pathogénicité (Dorman & Ni Bhriain, 1993). On trouve à travers la littérature un catalogue de conditions de croissance qui affectent les facteurs de virulence:

- l'expression du SSTT chez les EPEC dépend de la température. Des bactéries cultivées à 28°C ne présentent pas le phénotype de sécrétion.
- la virulence maximale est observée à 37°C en début de phase exponentielle de croissance (Umanski et al, 2002).
- *In vitro*, la croissance en milieu de culture eucaryote (DMEM) est nécessaire à la sécrétion des protéines Esp (Kenny et al, 1997).
- L'adhérence des EHEC sur les cellules Caco-2 infectées *in vitro* est stimulée par la présence de NaHCO₃ dans le milieu DMEM ce qui induit l'expression des gènes du LEE via l'expression du gène *ler*, principal régulateur du LEE.
- L'efficacité d'adhérence de ces bactéries est augmentée 5 fois lorsqu'elles sont cultivées en LB supplémentée de NaHCO₃ au lieu du DMEM. L'effet sur l'adhérence des EHEC d'autres composés comme le Ca²⁺, le Mn²⁺ et l'HEPES, ajoutés en supplément dans le LB, est moins appréciable que celui du NaHCO₃. L'hypothèse expliquant cet effet stimulant de l'ion HCO₃⁻ est que les bactéries cultivées dans un milieu riche complété en NaHCO₃ se trouvent dans conditions de croissance plus proches de celles trouvées dans l'intestin humain (Abe et al, 2002).
- Des souches d'EPEC cultivées dans du DMEM contenant du glucose adhèrent aux cellules Hep-2 tandis que l'attachement des bactéries cultivées dans un milieu contenant du galactose est réduit à un niveau égal à celui d'une souche non adhérente (JPN15). Cette réduction dans l'adhérence est accompagnée d'une chute dans les niveaux d'expression de l'Intimine et du BfpA qui sont essentielles pour l'adhérence des EPEC (Vanmaele & Armstrong, 1997). La

source du carbone joue donc aussi un rôle dans l'adhérence des EPEC sur les cellules intestinales et donc leur virulence.

Quorum sensing

Face à une modification de leur environnement, les bactéries ont besoin de coordonner la réponse dans l'ensemble de la population en modifiant un grand nombre de gènes. Cette régulation est notamment permise par une communication intercellulaire. Les bactéries produisent en effet des molécules de signalisation diffusibles qui s'accumulent dans l'environnement au cours de la croissance. Ces phéromones bactériennes permettent à chaque cellule de « sentir » lorsqu'une densité de population ou quorum bactérien est atteinte, et d'initier un comportement concerté de toute la population. Ce mécanisme de régulation globale, défini par le terme de « quorum sensing », permet aux bactéries de coordonner rapidement au sein de la population, l'expression de gènes spécifiques (de Kievit & Iglewski, 2000).

Il s'avère que les gènes liés au Quorum sensing sont importants pour la régulation de l'expression du LEE chez les EHEC et les EPEC, *ler*, le premier gène de l'opéron LEE1 étant stimulé par le régulateur QseA, qui est activé via une cascade de transductions impliquant les signaux AI2 et AI3 (Auto Inducers impliqués dans la transition de la phase exponentielle tardive à la phase stationnaire). *ler* à son tour induit l'expression des autres gènes de LEE (Habdas et al, 2010; Sharp & Sperandio, 2007; Sperandio et al, 2003)

RpoS

La capacité d'un pathogène à s'adapter au changement de conditions environnementales est une étape clef pour sa survie et pour son pouvoir infectieux. Un des facteurs d'adaptation le plus important dans *E. coli* est RpoS (Dong et al, 2008), un facteur sigma alternatif de l'ARN polymérase (Dong & Schellhorn, 2009a). La participation de RpoS à la régulation de la virulence est soit, directe en régulant l'expression des gènes de virulence, soit indirecte en améliorant la survie des pathogènes contre les défenses de l'hôte et les conditions de stress (Kazmierczak et al, 2005). RpoS régule l'expression de plusieurs gènes

de pathogénicité dans des entérobactéries pathogènes, des pathogènes des voies respiratoires et des pathogènes d'insectes (revue (Dong & Schellhorn, 2010)).

Chez *E. coli* RpoS contrôle l'expression de 10% des gènes et joue un rôle primordial dans la survie dans des conditions aussi différentes que le stress acide ou oxydatif, le manque de nutriments et l'exposition aux UV (revue (Dong & Schellhorn, 2010)). RpoS est un facteur important pour la survie des EHEC et des EPEC au cours du passage dans le tractus intestinal acide (Price et al, 2000). Il régule positivement l'expression de Ler dans des conditions de non induction de l'expression de LEE, et négativement (ainsi que celle des autres gènes de LEE) dans les conditions d'induction de l'expression de LEE (Dong & Schellhorn, 2009b).

Surenroulement de l'ADN

Il est bien établi que le stress induit par les conditions environnementales influence le mécanisme homéostatique qui détermine le degré de surenroulement de l'ADN dans la bactérie (Karem & Foster, 1993; van Workum et al, 1996). Le surenroulement de l'ADN est donc un autre senseur des conditions environnementales et régulateur de l'expression des gènes chez *E. coli*. Le surenroulement est le résultat du changement dans le nombre d'enlacements ou nombre de liens topologiques d'une molécule d'ADN double brin et relâchée. Il est modulé par les topoisomérases (revue (Dorman, 2006)). Le nombre d'enlacement ou le nombre de liens topologiques noté Lk pour « linking number » est un entier égal au nombre de fois qu'un brin de la double hélice tourne autour de l'autre. Ce nombre est lié à la torsion de l'hélice ou « twist » Tw = nombre de paires de bases / (nombre de paire de bases/ tour d'hélice) et à l'entortillement Wr ou « writhe » par la relation $Lk=Tw+Wr$. (Figure 6)

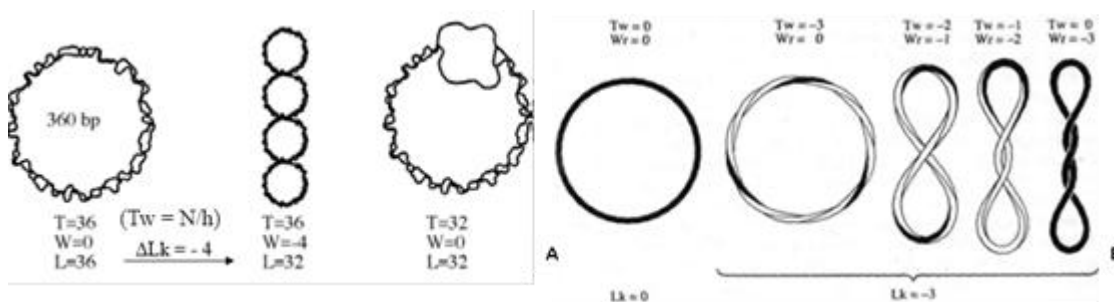


Figure 6 : A : variation du nombre d'enlacement Lk avec l'entortillement et la torsion d'un ADN circulaire, B : démonstration du « Twisting » « writhing » et du « Linking Number » sur un modèle en tube élastique

Tous les organismes sauf quelques espèces thermophiles maintiennent leur ADN dans une forme surenroulée négativement ce qui est un des facteurs permettant à *E. coli* de compacter son ADN qui mesure 1,5 mm dans une cellule qui mesure 1 µm de diamètre.

La composition ionique de la solution et la température sont les deux facteurs, dont les effets sur le surenroulement sont les plus étudiés. La répulsion entre les charges négatives des ions phosphates contenus dans l'ADN a tendance à défaire la double hélice d'ADN, l'augmentation de la concentration des contre ions réduit cette tendance et l'hélice devient plus rigide : le nombre T_w augmente. Le nombre d'enlacement L_k change aussi avec l'osmolarité, le pH et l'aérobie (Dorman & Porter, 1998). Les premiers travaux qui ont relié le surenroulement à la régulation de l'expression des gènes sont ceux de Higgins et al. En effet, l'osmoadaptation d'*E. coli* est dépendante de l'état de déroulement de l'ADN (Higgins et al, 1988). Le rôle de l'état d'enroulement de l'ADN a été mis en évidence dans l'adaptation à d'autres conditions physiologiques comme l'anaérobiose, et il a été proposé qu'il agisse comme un mécanisme global de l'adaptation bactérienne (Dorman et al, 1990). L'apparition des méthodes d'analyse globale de l'expression génique a confirmé le rôle régulateur de l'état d'enroulement de l'ADN (Dorman, 2006). De plus, le surenroulement négatif agit sur l'expression du génome entier. Une relaxation rapide de l'ADN chez *E. coli* provoque une chute de l'expression de 30% des gènes alors que celle des autres gènes augmente (Travers & Muskhelishvili, 2005).

L'effet du surenroulement sur l'expression de virulence des bactéries pathogène a tout d'abord été montré chez *S. flexneri*, où il affecte les promoteurs *virF* et *virB* (Dorman et al, 1990). Le surenroulement favorise la formation d'un complexe de répression impliquant des protéines de la chromatine bactérienne, dont H-NS, et la séquence promotrice de *virF* (Falconi et al, 1998). Sur *virB*, L'augmentation de la température provoque une diminution de L_k conduisant à une activation du promoteur dépendante de VirF (Tobe et al, 1995). Si cette diminution du nombre d'enlacement L_k est accomplie d'une manière artificielle, l'activation de la transcription de *virB* dépendante de VirF peut avoir lieu même à 30°C (Dorman et al, 2001). L'expression de ces gènes de virulence en cascade est fortement affectée par des mutations touchant les gènes codant l'ADN topoisomérases I ou IV (qui

relâchent l'ADN) ou par des inhibiteurs de la gyrase (qui introduit des supertours négatifs) (Dorman et al, 1990; McNairn et al, 1995; Tobe et al, 1995). Toutes ces observations corroborent l'hypothèse que l'expression de ces gènes de virulence est sensible au surenroulement de l'ADN.

Régulation de l'expression génique chez les procaryotes

Dans cette thèse nous allons nous intéresser à la régulation de l'expression des gènes du LEE au niveau transcriptionnel, et pour nous permettre de percevoir la particularité de cette régulation je vais ici décrire les différents éléments largement décrits dans la littérature qui interviennent dans ce processus hautement régulé et complexe qu'est la transcription. L'expression des gènes peut être régulée à différentes étapes, de l'initiation de la transcription, en passant par la stabilité du transcrit, l'initiation de la traduction et la stabilité de la protéine. Mais il s'avère que l'initiation de la transcription est l'une des étapes clef de la régulation d'un gène. Plusieurs facteurs y sont liés: l'ARN polymérase, les facteurs sigma, la séquence des ADN promoteurs, les ligands et les facteurs de transcription (Browning & Busby, 2004).

L'ARN polymérase et les promoteurs

Chez *E. coli* il existe 4000 gènes qui sont transcrits par un nombre limité de molécules d'ARN polymérase. La majorité de ces ARN polymérase sont engagés dans la transcription des ARN stables comme les ARNr et les ARNt, d'où un nombre très limité restant disponible pour la transcription du reste des gènes (Ishihama, 2000). Comme l'ARN polymérase est un facteur limitant, une régulation précise de l'initiation de la transcription est nécessaire pour qu'un gène donné ne soit exprimé qu'à un moment précis sous les conditions environnementales adaptées (Browning et al, 2010). Différents mécanismes assurent la distribution de l'ensemble des ARN polymérase, impliquant les promoteurs, les facteurs sigma, les petits ligands, les facteurs de transcription et la structure du chromosome bactérien modulé par les « NAP » (Browning & Busby, 2004).

L'ARN polymérase (ARNP) est constituée de deux parties : l'enzyme cœur et le facteur sigma. Ensemble ils forment l'holoenzyme. L'enzyme cœur est responsable de la transcription mais non de la reconnaissance du promoteur. Il possède la composition suivante en sous-unités : $\alpha\beta\beta'\omega$ avec une masse moléculaire de 400 kDa (Ebright, 2000). Il

a une structure en pince de crabes, similaire à celle de l'ARN polymérase II des eucaryotes (Browning & Busby, 2004; Zhang et al, 1999). Le site actif de l'ARN polymérase est formé des sous unités β et β' , il peut fixer un ADN double brin et a besoin de l'ion Mg^{2+} pour son fonctionnement. Une sous unité α interagit avec β et elle est nommée αI et l'autre interagit avec β' et elle est nommée αII . Chaque sous unité α a un domaine N-terminal (résidus 1 à 235) responsable de l'interaction avec β ou β' et un domaine C-terminal (résidus 250 à 329) qui fixe l'ADN et est responsable de l'interaction avec certains promoteurs (Gourse et al, 2000). Ces deux domaines sont liés par une région flexible qui permet au domaine C-terminal d'occuper différentes positions par rapport au reste de l'ARNP selon le contexte promoteur (Ebright, 2000). La sous unité ω est une chaperone qui permet à la sous unité β' de rester dans une conformation correcte et d'être recruté à $\alpha_2\beta$ pour former l'enzyme cœur (Mathew et al, 2006). L'initiation de la transcription nécessite l'holoenzyme qui contient en plus de l'enzyme cœur le facteur spécifique sigma de l'initiation de la transcription (Murakami et al, 2002). La sous unité σ permet la reconnaissance spécifique des séquences promotrices, le positionnement de l'ARNP holoenzyme sur le promoteur et le déroulement de la double hélice l'ADN pour former la bulle de transcription (**Figure 7**)

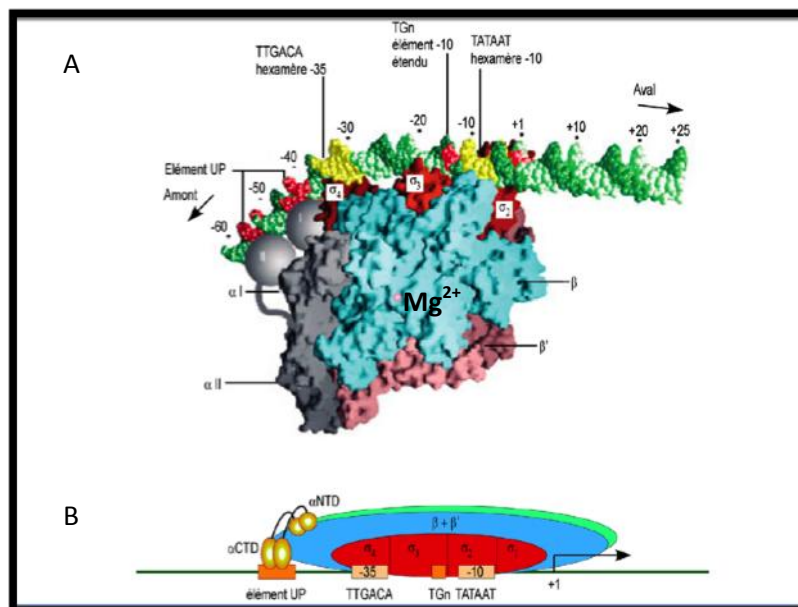


Figure 7 : Interaction de l'ARN polymérase sur un promoteur

A : le brin d'ADN est représenté en vert, les éléments -35 et -10 en jaune, les sous unités β et β' sont en bleu et rose respectivement. Le domaine N-terminal de la sous unité α est en gris et le domaine C-terminal est représenté par les sphères noté I et II. Le site actif de l'enzyme est dénoté par Mg^{2+} (en rouge).

B : diagramme représentant les interactions entre l'ARN polymérase holoenzyme et les éléments du promoteur (modifiée d'après Browning et Busby ; 2004).

La transcription est initiée au niveau de segments d'ADN connu sous le nom de promoteurs. Deux éléments dont la séquence est conservée constituent le cœur du promoteur : il s'agit de l'hexamère -10 (5'-TATAAT-3') et de l'hexamère -35 (5'-TTGACA-3') qui sont localisés 10 et 35 pb en amont du site d'initiation de la transcription (McClure 1985). L'espacement idéal entre l'hexamère -10 et -35 est de 17 ± 1 et le changement dans cet espacement affecte d'une manière drastique l'activité du promoteur (deHaseth & Helmann, 1995). D'autres éléments à l'extérieur du cœur ont un rôle assez important dans l'activité du promoteur : une extension 5'-TG-3' du -10 en position -15/-14 peut augmenter considérablement la transcription (Mitchell JE, 2003 Aug). Il peut exister une séquence 20 pb en amont du -35 et qui améliore l'efficacité du promoteur d'un facteur 30. Cette séquence est nommée élément « UP » (Ross et al, 1993). Elle est reconnue par le domaine C-terminal de la sous unité α . Les promoteurs qui ont les éléments cœur (-10 et -35) proches du consensus sont généralement plus forts (la force d'un promoteur est définie par le nombre de transcrits qu'il peut initier à un moment donné) (Miroslavova & Busby, 2006). Le facteur sigma qui est formé de 4 domaines conservés (σ_1 , σ_2 , σ_3 et σ_4) (Browning & Busby, 2004; Helmann JD, 1987) reconnaît via son deuxième domaine le plus conservé (σ_2) l'élément -10 du promoteur et interagit avec le -10 du brin d'ADN non matrice pour stabiliser l'état dénaturé, La sous unité σ_4 détermine l'interaction spécifique avec l'élément -35 (Feklistov & Darst, 2009; Siegele et al, 1989). L'interaction des sous unités σ_2 et σ_4 de l'ARN polymérase holoenzyme avec l'ADN double brin conduit à la formation du complexe fermé (RPc) (Borukhov & Nudler, 2008). Une étape d'isomérisation est ensuite nécessaire, où les brins d'ADN de la position -10 jusqu'à +2 sont déroulés pour former une bulle et générer le complexe ouvert (RPo) (Tsujikawa et al, 2002). Après la formation du complexe ouvert (RPo) le site actif de l'ARN polymérase est approvisionné en NTP et commence la synthèse de la chaîne d'ARN. La boucle $\sigma_{3.2}$ de la sous unité σ_3 bloque le canal de sortie. L'ARN naissant entre en compétition avec la région $\sigma_{3.2}$. Si l'ARN naissant ne réussit pas à dépasser l'obstacle imposé par $\sigma_{3.2}$ il est éjecté sous forme de transcrits abortifs. Sinon $\sigma_{3.2}$ est éjecté et la transcription peut continuer (Murakami & Darst, 2003). La liaison initiale de l'ARN polymérase à l'ADN pour former le complexe fermé, l'isomérisation vers le complexe ouvert et les premières étapes de synthèse de l'ARN constituent les étapes majeures de régulation dans la voie de formation du transcrit (Browning & Busby, 2004).

Les facteurs de transcription

Un facteur de transcription est une protéine modulant l'activation de l'expression d'un gène. Les facteurs de transcription contrôlent l'expression des gènes en fonction des facteurs environnementaux et une régulation de leur action est nécessaire, soit en contrôlant leur activité soit leur expression. Cette régulation peut être assurée soit par les petits ligands dont la concentration varie en fonction de la disponibilité du nutriment et des facteurs de stress, soit par une modification covalente du facteur de transcription (ex : NarL ne se lie à son ADN cible que s'il est phosphorylé), soit par la concentration du facteur de transcription lui-même, qui dépend à son tour de la régulation de sa propre expression ou de sa protéolyse (Browning & Busby, 2004; Demple, 1996). Ces facteurs sont classés en familles sur la base de similitude de leurs séquences. Une douzaine de familles ont été identifiées, dont les mieux caractérisés sont les familles LacI, AraC, LysR, CRP, ompR.

Ces facteurs régulent spécifiquement la transcription de gènes en se fixant sur des séquences régulatrices situées au niveau des promoteurs de ces gènes. Lorsqu'ils se lient à un promoteur, ils peuvent soit activer soit réprimer l'initiation de la transcription (Barnard et al, 2004). Un facteur de transcription peut donc être activateur, répresseur ou remplir les deux rôles en fonction du promoteur cible. Il est estimé que le génome d'*E. coli* K12 contient 314 facteurs de transcription dont 35% sont activateurs, 43 % répresseurs et 22% peuvent exercer les deux fonctions (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000). Dans le cas d'une activation simple, impliquant un seul facteur, il existe 3 modes d'activation : l'activation de classe I dans laquelle l'activateur se fixe sur son site en amont du -35 et interagit avec le domaine C-terminal de la sous unité α (α CTD) pour recruter l'ARN polymérase (ex : la protéine CRP et le promoteur *lac*) (Ebright, 1993) ; l'activation de type II dans laquelle le recrutement de l'ARN polymérase au promoteur est facilité par l'interaction entre l'activateur et le domaine 4 de la sous unité sigma (Dove et al, 2003) ; et enfin l'activation de type III au cours de laquelle l'activateur se fixe sur la séquence entre le -10 et le -35 et induit un changement de la conformation permettant la fixation de l'ARN polymérase (Ansari AZ, 1995 ; Browning & Busby, 2004) (**Figure 8**).

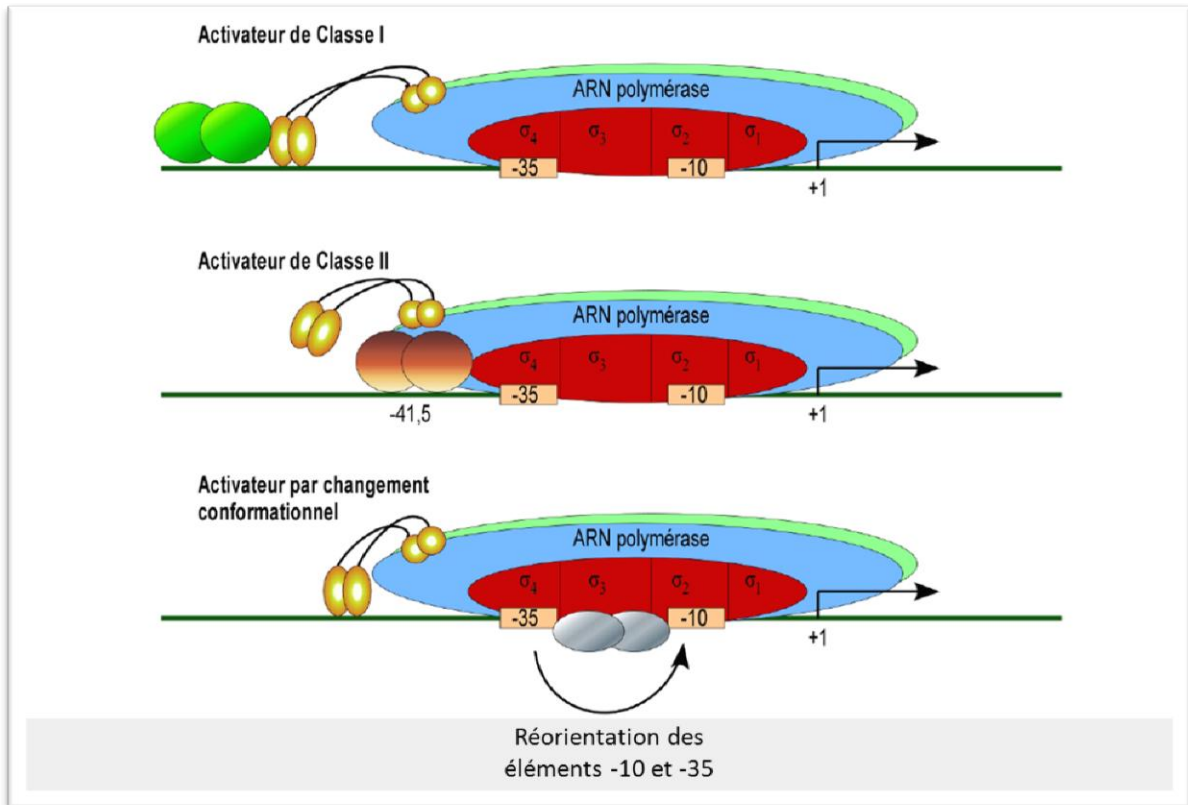


Figure 8 : les trois mécanismes d'activation simple (modifiée d'après Browning et Busby 2004)

Dans le cas d'une répression, comme pour l'activation, le mécanisme est souvent simple impliquant un seul facteur. Trois mécanismes sont observés : la gêne stérique, cas dans lequel la fixation du facteur empêche l'ARN polymérase de se lier au promoteur (Müller et al, 2006) ou bien interfère dans des étapes ultérieures au recrutement de l'ARN polymérase ; la répression peut aussi résulter de la formation d'une boucle par plusieurs molécules de répresseur qui se fixent sur des sites distaux du promoteur, ce qui piège l'ARN polymérase au début de la transcription ; enfin la répression peut résulter de l'inhibition de l'activité d'un facteur de transcription activateur, comme par exemple CytR qui interagit avec CRP, l'empêchant de se fixer sur le promoteur et de jouer son rôle d'activateur (Shin et al, 2001) (Figure 9).

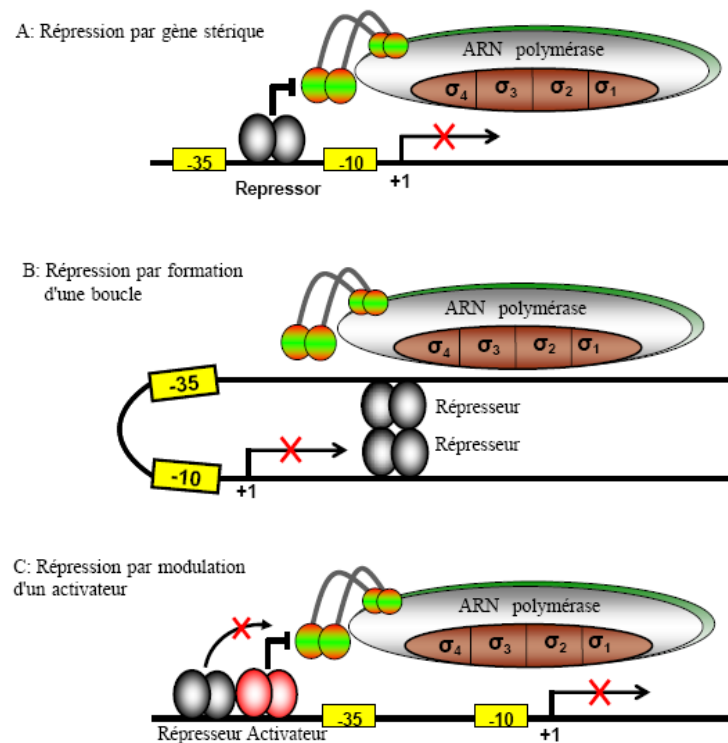


Figure 9 : les mécanismes de répression (modifiée d'après Browning et Busby, 2004)

Parmi les facteurs de transcription, certains ont une action sur un grand nombre de gènes. Sept d'entre eux contrôlent 50 % des gènes d'*E. coli*. Il s'agit de CRP, ArcA, NarL, FNR, FIS, IHF, et Lrp (Martinez-Antonio et al, 2003). Ces trois derniers font partie des protéines de la chromatine bactérienne et sont connus pour changer le taux de surenroulement de l'ADN. Je vais développer ci-dessous cet aspect particulier de la régulation de la transcription.

La régulation des gènes et le surenroulement de l'ADN

Le surenroulement de l'ADN peut influencer la transcription à différents niveaux (Travers & Muskhelishvili, 2005). L'une des étapes sensibles au surenroulement est l'isomérisation au cours du passage du complexe fermé vers le complexe ouvert. Les supertours négatifs facilitent l'ouverture de la double hélice d'ADN (Dorman, 2006).

La réponse des promoteurs au surenroulement est très variable. Par exemple le promoteur *fis* est activé, *in vitro* et *in vivo*, par un taux de surenroulement négatif plus élevé que celui nécessaire à l'activation du promoteur tyrosyl tRNA (*tyrT*) (Auner et al, 2003). Le surenroulement peut également avoir un effet sur l'étape de recrutement de plusieurs

façons. En particulier, le taux d'enroulement de la double hélice influence l'espacement et la topologie des éléments -10 et -35 ce qui contrôle la fixation du facteur sigma et donc la reconnaissance du promoteur. L'effet du surenroulement de l'ADN sur le recrutement de l'ARNP peut aussi se faire d'une manière indirecte. En effet, la topologie de l'ADN peut interférer dans la fixation d'un facteur de transcription dont la liaison est nécessaire au recrutement de l'ARNP (Dorman, 2006).

On voit comment des protéines qui vont affecter le surenroulement pourront jouer un rôle particulier dans la régulation de la transcription sans pour autant correspondre aux descriptions d'activateurs ou de répresseurs dont le mécanisme est détaillé plus haut. C'est le cas de certaines protéines associées au nucléoïde, structure qui comprend le chromosome bactérien associé à d'autres molécules et qui constitue donc la chromatine bactérienne, dans le cas d'*E coli*, Fis, H-NS et LRP.

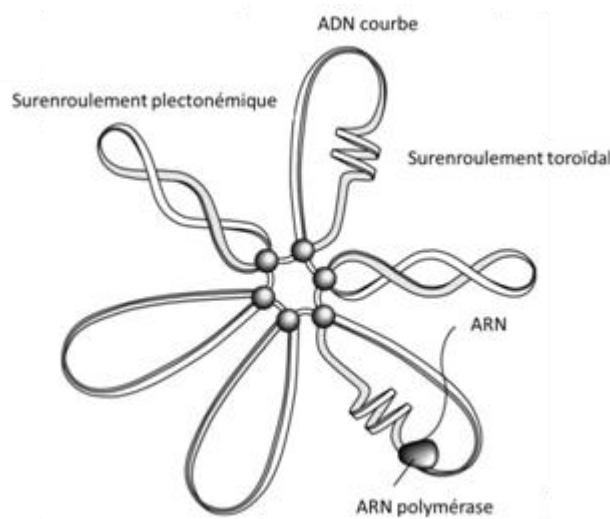


Figure 10 : représentation schématique des modifications topologiques sur le chromosome d'*E. coli*. Ce schéma représente des domaines topologiques et deux types d'enroulement des boucles sont représentés : toroïdal et plectonémique. A la base de ces boucles des barrières topologiques qui empêchent la diffusion de la superhélicité sont représentées par des boules (modifiée d'après (Willenbrock & Ussery, 2004))

Organisation du chromosome bactérien

Le nucléoïde bactérien

Le chromosome d'*E coli*, ADN circulaire de 4639 kb, est surenroulé négativement et compacté 1000 fois dans une structure appelée le nucléoïde (Worcel & Burgi, 1972). Il est organisé en boucles formant des domaines topologiquement indépendants, dont le nombre est estimé aux alentours de 400 (Deng et al, 2005). Ce modèle, a été proposé il y a de nombreuses années, sur la base de perturbation physiques ou chimiques des cellules

(Sinden & Pettijohn, 1981; Stonington & Pettijohn, 1971), et confirmé par un test génétique fondé sur le système de recombinaison du transposon $\gamma\delta$, dépendante du surenroulement de l'ADN. Les travaux de Higgins ont confirmé, que des domaines (boucles) de surenroulement topologiquement indépendants existent mais que leur taille est variable, et ont suggéré que si les barrières de diffusion du surenroulement existent, elles sont variables d'une cellule à une autre et dans une même cellule en fonction du temps (Higgins et al, 1996). D'après les travaux sur des mutants du gène de la gyrase et de la topoIV, les auteurs ont proposé que les nœuds et les caténanes peuvent jouer ce rôle (Moulin et al, 2005). D'autres auteurs ont pu montrer, en utilisant le même système de recombinaison *res*, que l'activation de la transcription créait une barrière topologique empêchant la recombinaison entre les sites *res* (Deng et al, 2004a). Stein et al ont proposé plus tard un modèle chez *E. coli* prédisant l'existence de 450 boucles topologiques de 10 kb chacun. La nature des frontières entre ces domaines n'est pas encore connue mais il existe une famille de protéines appelée NAP pour « Nucleoid associated proteins » qui est candidate pour être un facteur délimitant ces domaines (**Figure 10**) (Postow et al, 2004). De nombreux travaux mettent en évidence le rôle de ces protéines dans la structuration du chromosome et donc dans la régulation de l'expression génique (Luijsterburg et al, 2008).

Il existe un niveau d'organisation global du chromosome en larges domaines appelés macrodomaines. Niki et al ont proposé que des régions de 920 Kb et 900 Kb contenant l'origine de la réplication et le terminateur respectivement sont organisés en deux unités structurales compactes appelées macrodomaine Ori et macrodomaine Ter (Niki et al, 2000). De plus deux autres macrodomaines (Left et Right) situés de part et d'autre du macrodomaine Ter et deux autres régions non structurées situées de part et d'autre du macrodomaine Ori ont été identifiés. Ces macrodomaines doivent jouer un rôle privilégié dans la ségrégation du chromosome au cours du cycle cellulaire puisqu'une ségrégation correcte du chromosome nécessite un niveau de compaction élevé. Le fait de séparer le chromosome en différentes sous unités (macrodomaines) faciliterait son mouvement lors de la ségrégation (Revue (Espeli & Boccard, 2006)).

LES NAP

Les NAP sont un groupe de petites protéines abondantes se liant à l'ADN (Azam & Ishihama, 1999; McLeod & Johnson, 2001). Les NAP structurent le chromosome et exercent un

contrôle sur la transcription, la recombinaison et la réplication de l'ADN. Elles modifient la géométrie de l'ADN en créant ou en accentuant les courbures de la molécule et en modifiant le niveau de surenroulement local de l'ADN (McLeod & Johnson, 2001). Ces modifications locales dans la structure et de la superhélicité de l'ADN participent avec le surenroulement de l'ADN à la compaction locale du nucléoïde bactérien. Il existe une très grande variabilité des NAPs entre les bactéries. Par exemple, Fis est caractéristique des Gamma protéobactéries, bien que AbrB semble jouer un rôle similaire chez *Bacillus subtilis* (O'Reilly & Devine, 1997; Ohniwa et al, 2006). La liste des NAP ne cesse de s'allonger et récemment deux protéines y ont été ajoutées : la protéine Noc de *B. subtilis* (Wu et al, 2009) et la protéine Dan d'*E. coli* (Teramoto et al, 2010). La découverte de la protéine MatP dont la liaison à l'ADN est spécifique du macrodomaine *ter* (région de terminaison de la réplication) montre que certaines protéines pourraient être considérées comme des NAP agissant sur la localisation des domaines du chromosome dans la cellule (Mercier et al, 2008).

Les NAP les mieux caractérisées chez *E. coli* sont HU (Heat stable nucleoid protein), IHF (Integration Host Factor), H-NS (Histone-like nucleoid structuring protein) et Fis (Factor for Inversion Stimulation). Elles contrôlent, directement ou indirectement, l'activité d'une grande variété de gènes dont la plupart sont impliqués dans la survie cellulaire (McLeod & Johnson, 2001). Les NAP sont abondantes dans la cellule et leurs sites d'interactions avec l'ADN se trouvent dans des régions intergéniques et régulatrices (Grainger et al, 2006b), il n'est alors pas étonnant qu'elles affectent aussi la transcription d'une façon globale. Des séquences consensus de fixation de H-NS (Bouffartigues et al, 2007; Lang et al, 2007), IHF (Ussery et al, 2001) et de Fis (Pan et al, 1996b) ont été identifiées. Dans le cas de HU, il n'a pas été mis en évidence de séquence consensus et la fixation est préférentielle sur des structures particulières comme les jonctions de Holliday (Grove & Saavedra, 2002). Le **tableau 3** résume les différentes NAP qui ont été identifiées jusqu'aujourd'hui chez les bactéries Gram(-) et Gram (+). Le rôle des NAP est profondément influencé par la variation de leurs concentrations dans la cellule en fonction de la phase de croissance. Ainsi, Fis est produite massivement en début de phase exponentielle puis sa concentration chute brutalement (Azam & Ishihama, 1999; Muskhelishvili, 2010). Au contraire IHF est à haute concentration dans les cellules entrant en phase stationnaire tandis que la concentration de

H-NS est à peu près constante au cours de la croissance (Free & Dorman, 1995; Muskhelishvili, 2010) avec une diminution dans la phase stationnaire quand la croissance se fait sur une semaine (Shimada et al, 2011). La composition relative des deux sous unités de HU dans le dimère de la protéine varie en fonction de la croissance et la quantité totale de la protéine diminue en phase stationnaire (Balandina et al, 2001; Muskhelishvili, 2010). Toutes ces variations de la présence des différentes NAP introduisent une sorte de dynamique dans la composition du nucléoïde et influence la régulation de l'expression des gènes.

Parmi ces NAPs, deux paraissent avoir un rôle important dans la structure et la compaction du nucléoïde, Fis et H-NS. Fis possède des sites distribués le long du génome d'*E. coli*, et semble intervenir dans la maintenance des boucles topologiques. Le profil d'expression de Fis est coordonné avec le nombre et la stabilité des domaines. Fis est très abondante dans la cellule durant la phase exponentielle de croissance, phase dans laquelle les domaines (boucles) topologiques sont très nombreux et stables. Fis est quasi absente en phase stationnaire où le nombre de boucles est considérablement diminué (Dillon & Dorman, 2010) (**Figure 11**). H-NS est capable de ponter des doubles brins d'ADN et pourrait ainsi former les frontières entre les différents boucles topologiques du nucléoïde ; L'espacement de 11 kb des sites (« patches ») de liaison de H-NS dans les régions riches en AT du génome est en concordance avec les estimations de la taille de ces domaines topologiques. En plus, une corrélation existe entre le taux de H-NS dans la cellule et la taille de ces domaines. L'ensemble de ces données laisse suggérer que H-NS est l'un des facteurs prépondérant dans l'installation des barrières de ces domaines (boucles) topologiques (Noom et al, 2007). Takeyasu et ses collègues, en utilisant la technique de microscopie électronique et des pinces optiques, ont observé un changement dans la structure de la fibre d'*E. coli* en fonction des conditions de culture et ont attribué ceci à des changements dans les niveaux de transcription des différents NAP (Ohniwa et al, 2007). La fixation de H-NS entraîne la modification de la superhélicité de plasmide *in vitro*, en contraignant des supertours négatifs (Spassky et al, 1984). La formation de ponts entre duplex d'ADN, la modification de la superhélicité de l'ADN et la formation de barrières topologiques sont toutes des activités ayant un rôle direct dans la structuration et la compaction de l'ADN. En accord avec cette

idée, la surexpression de la protéine H-NS dans la cellule provoque une létalité cellulaire due à une forte compaction du nucléoïde (Spurio et al, 1992).

Description des principales NAP :

Fis: c'est un homodimère de 22 kDa contenant 4 hélices alpha avec un domaine C-terminal de reconnaissance de l'ADN organisé en hélice tour hélice. La reconnaissance de l'ADN par Fis se fait par interaction entre le domaine C-terminal et le grand sillon de l'ADN. Les sites de liaison de Fis à l'ADN contiennent généralement un motif dégénéré et palindromique (Pan et al, 1994). La fixation spécifique de Fis sur l'ADN induit une courbure variant entre 50° et 90° (Pan et al, 1996a) et à des concentrations élevées elle se fixe d'une manière non spécifique à l'ADN (Skoko et al, 2006). Comme H-NS, Fis interagit avec plus de 10,000 sites présents dans des régions intergéniques dans le génome d'*E.coli* et qui ont la caractéristique d'être riche en AT (Cho et al, 2008; Grainger et al, 2006b). Parmi toutes les NAP, Fis est la mieux caractérisée au vu de son rôle régulateur de la transcription. En effet, sur les promoteurs des ARN ribosomiaux Fis se fixe et agit comme un activateur de type I. Elle interagit spécifiquement avec α CTD pour faciliter le recrutement de l'ARN polymérase (Aiyar et al, 2002). Elle peut influencer l'activité transcriptionnelle en introduisant des supertours négatifs facilitant ainsi le déroulement de la double hélice d'ADN (Muskhelishvili et al, 1997). D'une façon similaire, Fis se fixe proche des éléments -10 et -35 du promoteur *proP* P2 et agit comme un activateur de type II (McLeod & Johnson, 2001). Au niveau d'autres promoteurs Fis régule la transcription par d'autres mécanismes. FIS agit également comme répresseur sur certains promoteurs (Grainger et al, 2008).

HU: est composée de deux sous unités de 9,5 kDa qui présentent 70 % d'homologie de séquence entre elles (Swinger et al, 2003). HU peut induire la formation de supertours négatifs *in vitro* (Tanaka et al, 1995). Dans les souches où HU est présente l'augmentation de la superhélicité se fait d'une manière directe par torsion de l'ADN ou indirecte par stimulation de l'activité de l'ADN gyrase (Swinger & Rice, 2004). HU a un rôle dans la compaction du nucléoïde en modifiant la superhélicité de l'ADN (Malik et al, 1996). Elle est parmi les NAP celle qui a la plus grande contribution dans l'introduction des supertours négatifs (30 à 40%).

IHF : IHF (Integration Host Factor) est un hétérodimère constitué de 2 sous unités alpha et bêta de 10 kDa chacune, codées par les gènes *ihfA* et *ihfB* (Weisberg et al, 1996). IHF reconnaît d'une manière spécifique le petit sillon de l'ADN et se lie sur une séquence consensus (A/T)ATCAANNNTT(G/A). L'interaction de IHF avec l'ADN est suivie par une courbure de l'ADN qui peut aller jusqu'à introduction d'une forme en « U » ou «U-turn » (Rice et al, 1996). La transcription de plusieurs gènes dépendant du facteur sigma 54 est contrôlée par IHF (Abril & Ramos, 1993), c'est le cas des gènes codant pour des facteurs impliqués dans la fixation du nitrogène chez *Klebsiella pneumoniae*, la régulation de la synthèse du flagelle chez *Caulobacter crescentus* (de Lorenzo et al, 1991).

Protéine ou groupe de protéines	Enrobage de l'ADN « Wrapping »	Pontage de l'ADN « Bridging »	Courbure de l'ADN « bending »	Motif de liaison	Masse moléculaire (kDa)	Protomère natif
Bactéries à Gram négatif						
HU	oui	ND	Oui	Légère préférence pour l'ADN courbe ou riche en AT	~9	Hétérodimère
Lrp	oui	oui	ND	(T/C)AG(A/T/C)A(A/T)ATT(A/T)T(A/T/G)CT(A/G)	~18	homodimère
MukB	ND	Oui	ND	ND	~175	homodimère
Fis	Oui	Oui	Oui	Succession de type A ₆ ou AT	~11	homodimère
H-NS	ND	Oui	ND	TCGATAAATT	~15	Homodimère ou Hétérodimère (H-NS-StpA)
IHF	ND	ND	oui	(A/T)ATCAANNNTT (A/G)	~11	Hétérodimère
Dps	ND	ND	ND	ND	~19	Monomère ou dodécamère
StpA	ND	Oui	ND	ADN riche en AT	~15	Homodimère ou hétérodimère (StpA H-NS-)
CbpA	ND	ND	ND	ADN courbe	~33	Homodimère ou hétérodimère (CbpA-CbpM)
CbpB	ND	ND	ND	ADN courbe	~33	monomère
EbfC	ND	suggéré	ND	GTNAC	~11	homodimère
MvaT	ND	oui	ND	ADN riche en AT		homodimère
Bactéries à Gram positif						
Lrp	oui	Oui	ND	ND	~17	homodimère
HU	ND	ND	Oui	ND	~10	homodimère
Lsr2	ND	Oui	ND	ADN riche en AT	~12	homodimère
Hlp	ND	ND	ND	ND	~21	monomère
MrgA	ND	ND	ND	ND	~17	Monomère ou dodécamère

Tableau 3: les protéines associées au nucléoïde chez les bactéries Gram (-) et Gram (+) (Modifié d'après Dillon et Dorman 2010).

Alba, acetylation lowers binding affinity; CbpA, curved-DNA-binding protein A; CbpB, curved-DNA-binding protein B (connu aussi sous le nom de Rob); CbpM, chaperone modulatory protein; Dps, DNA protection from starvation; dsDNA, double-stranded DNA; Fis, factor for inversion stimulation; Hlp, histone-like protein; Hmg, high mobility group; H-NS, histone-like nucleoid-structuring; IHF, integration host factor; Lrp, leucine-responsive regulatory

protein; MrgA, metalloregulation DNA-binding stress protein; ND, non défini; Smc, structural maintenance of chromosome

Mais IHF régule positivement ou négativement aussi l'expression de plusieurs gènes dont l'expression est dépendante du facteur classique sigma 70 (Goosen & van de Putte, 1995). L'activation par IHF a lieu par la courbure de l'ADN du promoteur. IHF et HU sont interchangeable, du point de vue fonctionnel, et parfois des organismes ne possèdent qu'une seule de ces protéines. Cependant, des souches d'*E. coli* (possédant les deux) mutantes pour *ihfAB* sont parfaitement viables indiquant que le rôle joué par IHF peut être assuré par HU. Par contre les mutants HU sont instables et les cellules doubles mutantes pour *ihfAB* et *hu $\alpha\beta$* ne sont pas viables (munoz, 2010).

IHF est un régulateur des facteurs de virulence chez différents pathogènes: elle est importante pour une expression appropriée de l'opéron *virB* de *Brucella abortus* produisant un système de sécrétion de type IV (Sieira et al, 2004). Chez *Shigella flexneri* IHF régule positivement l'expression de plusieurs gènes de virulence en agissant sur différents promoteurs comme *virB*, *virF* et *icsA* (Porter & Dorman, 1997). Chez *Vibrio cholerae* IHF affecte positivement l'expression de certains gènes de virulence et l'inactivation de *ihfA* et *ihfB*, les gènes codant pour les sous unités IHF, provoque une diminution dans la production des deux facteurs de virulence *tcpA* et *ctx* et dans la production des toxines (Stonehouse et al, 2008). IHF active d'une manière directe l'expression de l'opéron LEE1 codant pour la protéine Ler qui à son tour active l'expression du reste des gènes de la région LEE (Friedberg et al, 1999). La régulation de la production du flagelle chez les EPEC et les EHEC est réprimée par IHF (Yona-Nadler et al, 2003). IHF s'oppose à la répression imposée par H-NS sur plusieurs promoteurs. C'est le cas du promoteur (Pe) du bactériophage Mu qui est réprimé spécifiquement par fixation de H-NS sur la région promotrice. Par sa fixation, IHF induit son expression et s'oppose à la répression induite par H-NS en perturbant le complexe qu'elle forme avec le promoteur (Porter & Dorman, 1997). Sur le promoteur *VirB* de *S. flexneri*, les sites de fixation d'IHF et de H-NS ne superposent pas comme c'est le cas du promoteur Pe de Mu, mais la fixation de IHF induit un changement conformationnel dans la région en amont du +1 de la transcription ce qui facilite la fixation de l'activateur de la famille AraC, VirF qui lui s'oppose à la répression induite par H-NS (Stonehouse et al, 2008).

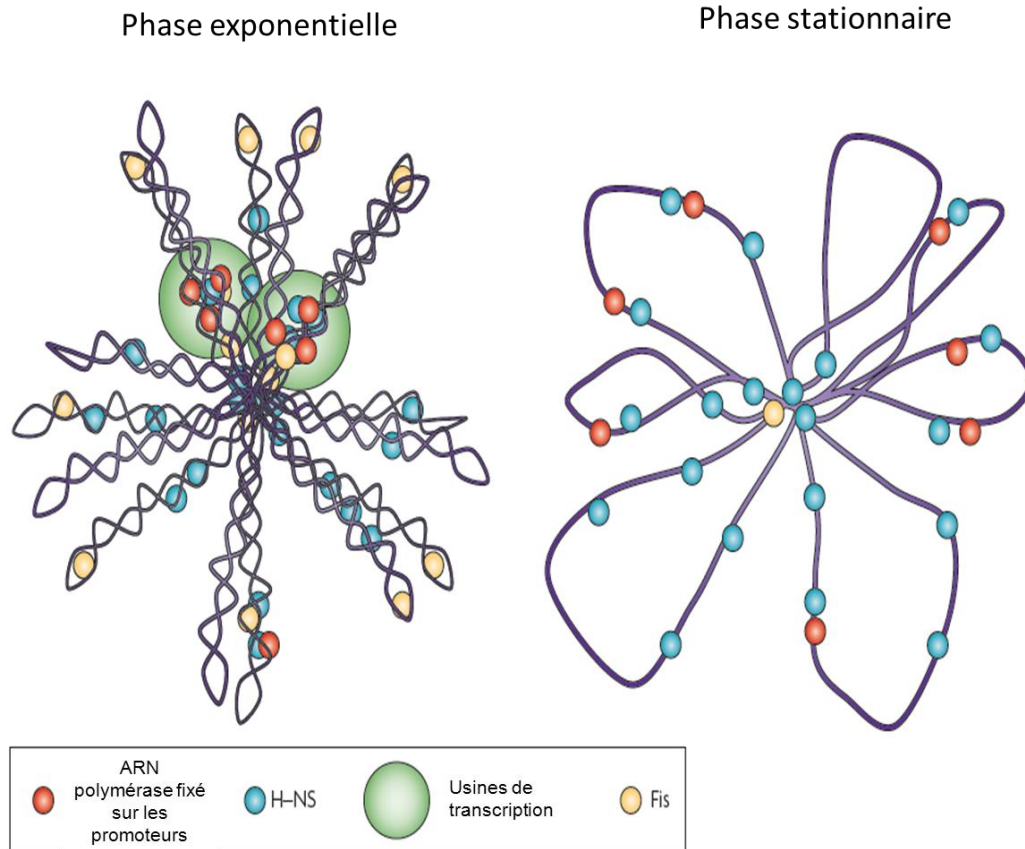


Figure 11: l'effet des NAP et du surenroulement de l'ADN sur la structure du nucléoïde.

Le chromosome est organisé en domaines qui sont surenroulés négativement en phase exponentielle de croissance. Durant cette phase la protéine H-NS et Fis sont fixées sur l'ADN et sont associées aux 7 opérons codant pour l'ARN ribosomal. En phase stationnaire Fis n'est plus détectable. Le chromosome a moins de domaines circulaires et ceux qui sont visibles correspondent à de l'ADN relâché. (Modifiée d'après Dillon et Dorman 2010)

En conclusion les NAP forment un groupe de protéines qui possède un rôle dans l'architecture du génome et la régulation génique. La combinaison entre la structure de l'ADN, les NAP, et les 7 facteurs de transcription conventionnels dont les deux NAP Fis et IHF font partie, constituent la base du réseau de régulation de l'expression des gènes dans la bactérie en réponse à des stimuli environnementaux, dans lequel s'établit un lien étroit entre structure topologique et surenroulement de l'ADN, protéines NAP, et régulation de l'expression des gènes dans les bactéries. La suite de ce manuscrit sera consacrée à la protéine H-NS, et à la protéine Ler, son paralogue. Plus de détails seront consacrés à la régulation du LEE par ces deux protéines, l'une le réprimant (H-NS) et l'autre s'opposant à cette répression (Ler). Je m'intéresserai plus particulièrement à comprendre comment ces deux protéines similaires peuvent réguler un même gène ou opéron d'une manière diamétralement opposée.

La protéine H-NS

Structure et reconnaissance de l'ADN

H-NS est une petite protéine neutre (15,5 kDa, 137 acides aminés) très abondante chez *E. coli* (20 000 copies/ cellules) (Falconi et al, 1988). Elle a été initialement identifiée comme un contaminant dans une purification de l'ARN polymérase d'*E. coli* (Jacquet et al ; 1971). H-NS pour « Heat-stable Nucleoid Structuring protein » peut rester biologiquement active même après avoir été exposée à une température de 100°C (Falconi et al, 1988). Elle a également été purifiée en utilisant les mêmes conditions que pour extraire les histones eucaryotes (Bakaev, 1981), d'où son appellation fréquente d' "histone-like protein". Cette nomenclature donne l'illusion que H-NS est un équivalent fonctionnel des histones et qu'elle est présente chez toutes les espèces bactériennes. Or ce n'est pas le cas. La séquence primaire de H-NS ne contient pas d'homologie significative avec celle des histones, et cette protéine n'est pas présente chez toutes les espèces bactériennes.

La forme prédominante de H-NS en solution varie. Des expériences de pontages ont montré que H-NS est majoritairement sous forme dimérique (Falconi et al 1988). Des expériences de chromatographie en filtration suggèrent une protéine H-NS sous forme dimérique en équilibre avec un tétramère l'un ou l'autre étant prédominant suivant les conditions expérimentales (Ceschini et al, 2000; Ueguchi & Mizuno, 1996; Ueguchi et al, 1996). Cependant des études en réalisant des chromatographies à plus haute température (45°C) donnent un profil où dominent des formes oligomériques de plus haut poids moléculaire (Esposito et al, 2002). La protéine entière peut former des 20mers à des concentrations élevées (0,34 mM) (Smyth et al, 2000). Les résultats des expériences de ChIP-on-chip faites sur l'ensemble du génome (Oshima et al, 2006) montrent que les régions de liaison de H-NS s'étendent sur des régions très larges, de plusieurs centaines ou milliers de paires de bases. Ceci indique que H-NS est capable de générer des complexes multimériques une fois fixée sur l'ADN (Nagarajavel et al, 2007).

La structure moléculaire de la protéine entière n'a pas encore été résolue. L'organisation en 2 domaines fonctionnels d'H-NS a été montrée d'une part par la présence d'un mutant négatif dominant ne comportant que les acides aminés 1 à 64 (Williams et al, 1996) et d'autre part par la structure à basse résolution d'un domaine qui peut se fixer à l'ADN (91 à

136) (Shindo et al, 1995). La protéine est donc constituée de deux domaines structuraux et fonctionnels (1-64) et (90-136) séparés par une région flexible non structurée. Le domaine N-terminal et la région flexible sont impliqués dans la dimérisation et l'oligomérisation de la protéine. Le domaine C-terminal est impliqué dans la liaison à l'ADN (Rimsky, 2004).

La partie N-terminale (résidus 1-64) d'H-NS forme un dimère très stable du dimère (K_d de 5 nM), qui peut se former à partir des 46 premiers acides aminés. Ce dimère présente une structure originale en "poignée de main", formée de 3 hélices alpha (α_1 , α_2 et α_3). Les hélices α_3 (la plus longue) de chacun des monomères, permettent la formation d'une hélice d'hélice (Bloch et al, 2003) (Figure 12, C). Il a existé dans la littérature une polémique quand à la structure de l'hélice d'hélice de ce dimère, proposée sous forme antiparallèle (arrangement en « handshake ») pour *Vibrio cholerae* et *E. coli* (Roe et al, 2003), et sous forme parallèle pour *Salmonella* (Esposito et al, 2002; Renzoni et al, 2001). Cependant les mêmes auteurs ont récemment publié une structure cristallographique de la région 1 à 89 de cette même protéine de *Salmonella* où la formation du dimère se fait par un arrangement antiparallèle des hélices.

L'oligomérisation de la protéine est encore mal caractérisée. Le fragment H-NS₁₋₈₃ de *S. typhimurium*, portant une mutation C12S qui empêche l'auto-association par ponts disulfure, semble contenir un site de dimérisation secondaire allant des résidus 67 jusqu'à 83. Ce site pourrait être impliqué dans l'oligomérisation de la structure dimérique du domaine N-terminal. La structure obtenue montre l'existence d'une hélice étendue α_3 (Résidus 23-67) suivi d'un entortillement et puis d'une hélice α_4 . Le deuxième site de contact protéines/protéines est formé par les hélices α_3 et α_4 formant un motif en hélice-tour-hélice (résidus 57-83) qui associe les deux protomères dans une orientation antiparallèle (Arold et al, 2010). Cette même équipe avait montré que les résidus 1-77 sont nécessaires et suffisants pour la formation des oligomères (Leonard et al, 2009). Dans le modèle qu'ils proposent, L'interaction de type « tête à tête » au niveau du site 1 (site de dimérisation) et de type « queue à queue » au niveau du site 2 (site d'oligomérisation) crée une chaîne de molécules H-NS. L'ensemble forme une super-hélice contenant 6 molécules d'H-NS/tour d'hélice. Sur le site 2 l'hélice α_4 et donc la région flexible sont orientées vers l'extérieur de la super-hélice. Si le domaine de liaison de l'ADN est lui aussi orienté vers l'extérieur de cette structure ceci suggère que l'ADN se fixe sur cette surface exposée à

l'extérieur (Arold et al, 2010) (Figure 12, D). Selon les auteurs qui l'ont élaboré il est cohérent structurellement avec une condensation en plectonème de l'ADN. Or, il est difficile de discerner la différence entre la structure plectonémique du complexe H-NS/ADN qu'ils proposent et la structure toroïdale du noyau nucléosome auquel ils comparent leur structure. Stella et al propose une orientation parallèle des domaines de liaisons à l'ADN à l'extérieur de la super-hélice protéique. Ils peuvent alors se fixer sur un seul duplex d'ADN et le plectonème peut être formé par l'interaction de 2 super-hélices de H-NS enroulées l'une autour de l'autre via une association tétramérique (Rimsky & Travers, 2011; Stella et al, 2005).

La structure du domaine C-terminal (résidus 91-137) a été résolue par Shindo et al en 1995. Ce domaine est plus conservé que le reste de la protéine, à travers les différentes espèces bactériennes qui possèdent H-NS (essentiellement des Gram-). Il est formé de deux feuillets β , une hélice α et une hélice 3_{10} séparés par des boucles de tailles variées. La première et la deuxième boucle contiennent respectivement les résidus A80-K96 et T110-A117 qui interagissent directement avec l'ADN (Shindo et al, 1999) (Figure 12, B). Il existe chez *mycobacterium tuberculosis* une protéine Lsr2 qui peut compléter le phénotype *hns(-)* chez *E. coli*, Lsr2 reconnaît et réprime des régions riches en AT, comme H-NS. Bien qu'il n'y ait pas d'homologie dans la séquence de ces protéines, les structures du domaine C-terminal de ces deux protéines sont très similaires (Gordon et al, 2011). Une étude récente a mieux précisé la structure du domaine C-terminal de H-NS de *Salmonella*. Elle a montré que la région conservée forme une boucle ordonnée. Elle a permis de définir dans cette région conservée un motif QGR pour H-NS et XGR pour des homologues de H-NS (ex : RGR pour la protéine Lsr2 de *mycobacterium tuberculosis* et Bv3F de *Burkholderia vietnamiensis*) qui est essentiel pour la reconnaissance de l'ADN par H-NS, Lsr2 et Bv3F. Le remplacement du motif QGR par AGA chez H-NS détruit complètement la capacité de H-NS à reconnaître la séquence CGCATATATGCG. Cette mutation n'a pas d'effet sur la structure globale de la protéine. Des résultats similaires ont été obtenus pour Lsr2 et Bv3F. La topologie du petit sillon de l'ADN, dictée par sa composition en bases AT et sa richesse en répétition de A serait importante pour la reconnaissance par H-NS via l'insertion de son motif Q112-G113-R114 dans ce petit sillon (Figure 12, A) (Gordon et al, 2011).

Pendant des années, H-NS a été décrite comme une protéine non spécifique vis-à-vis de sa reconnaissance des séquences d'ADN, présentant cependant une affinité particulière pour les régions riches en AT, séquences intrinsèquement courbes. Cependant des sites de séquence spécifique qui, sur un promoteur sont présents à un ou plusieurs exemplaires parallèlement avec des sites de moindre affinité sont en fait reconnus par H-NS. La séquence de ce site a été identifiée sur le promoteur de l'opéron *proU* d'*E. coli* ; avec un K_d d'environ 15 nM pour la fixation de H-NS (Bouffartigues et al, 2007). Par ailleurs le groupe de C. Gualerzi a montré que le domaine carboxyterminal, isolé (incapable d'oligomérisation), fait des empreintes de 10 paires de bases sur des régions promotrices régulées par H-NS. La compilation de ces résultats a permis de définir un motif consensus de 10 paires de bases (représenté ci-dessous) comme élément de reconnaissance spécifique de H-NS. Ce motif présente en position centrale un pas T-A dans tous les cas recensés (Bouffartigues et al, 2007; Lang et al, 2007). L'organisation sur les promoteurs des sites de haute et basse affinité pourrait définir le taux de régulation du gène.



Logo de la séquence d'ADN du site de liaison de H-NS déterminé expérimentalement (Bouffartigues et al, Lang et al ; 2007)

Une recherche extensive sur le chromosome montre que: les sites identifiés *in vivo* (par expérience de pontage de la chromatine par H-NS correspondent à ceux prédits par le site consensus (Grainger et al, 2006a). Ainsi, H-NS se fixe d'abord sur son site de haute affinité qui va servir comme site de nucléation. D'autres molécules de H-NS sont alors recrutées pour former un complexe le long des régions riches AT et de moindre affinité pour H-NS. Dans ce modèle H-NS est capable de ponter deux hélices d'ADN adjacentes, chaque dimère de H-NS interagissant simultanément avec 2 duplex d'ADN. Ceci est démontré par les expériences sur une molécule d'ADN unique réalisées par des pinces optiques. (Dame et al, 2006). D'autres données obtenues par le même genre d'expérience montrent que le pontage n'est pas le seul mode de liaison de H-NS à l'ADN. Il est possible que H-NS peut aussi raidir l'ADN sans le ponter (Amit et al, 2004). Cette observation est corroborée par les travaux récents de Liu et al qui prouvent qu'il existe deux modes de liaisons de H-NS à l'ADN le « bridging » ou pontage et le « stiffening » ou raidissement. Il est possible pour H-NS de

passer d'un mode à un autre tout en restant liée à l'ADN. Cette transition est assurée par la concentration du magnésium ou du calcium. Dans certaines conditions ioniques les deux modes de liaison peuvent coexister (Liu et al, 2010). La question qui se pose est de savoir si cette transition à un sens physiologique.

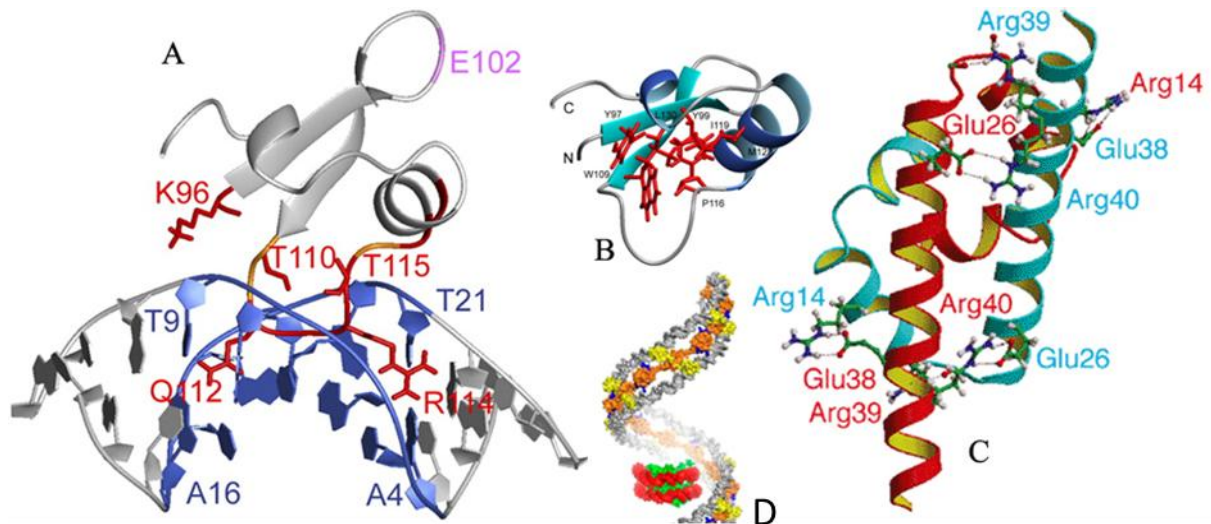


Figure 12 : structure du domaine C-terminal et N-terminal de la protéine H-NS et leurs rôles.

A : modèle représentant la structure du complexe H-NS_{Ctd}/ADN. Les résidus de la protéine impliqués dans la liaison avec l'ADN sont indiqués en rouge. L'interface de liaison de l'ADN est montrée en bleu (modifié d'après Gordon et al ; 2011)

B : représentation en rubans du domaine C-terminal de H-NS de *Salmonella* (modifié d'après Gordon et al ; 2011)

C : structure anti parallèle du dimère H-NS (1-46) d'*E. coli* (repliement en « handshake »). Les liaisons hydrogènes et les ponts salins impliqués dans la stabilisation de cette structure sont indiqués par les lignes en pointillés. Les résidus importants sont indiqués en rouge ou en bleu en fonction du monomère auquel ils appartiennent (Bloch et al ; 2003)

D : modèle de la super-hélice H-NS (en orange c'est l'oligomère H-NS₁₋₈₃, en jaune le domaine C-terminal) pontant 2 doubles hélices d'ADN (en gris). Pour comparaison une compaction en toroïde de l'ADN (rouge) autour du nucléosome (vert) (modifiée d'après Arold et al ; 2010).

Il est à noter qu'un rôle du domaine C-terminal dans l'interaction protéine/ protéine a été identifié. En plus, une mutation particulière touchant le résidu P115 pourrait affecter l'oligomérisation de H-NS et donc détruire sa capacité à réprimer la transcription (Goodsell & Dickerson, 1994). Si la forme active de la protéine a été définie comme le tétramère (Stella et al ; 2005), la formation des oligomères est nécessaire à la répression de la transcription comme le montre les études sur les mutants formant des dimères mais ne pouvant plus réprimer la transcription (Goodsell & Dickerson, 1994).

Les protéines de la famille H-NS

Des protéines de la famille H-NS a été décrite à travers les protéines présentes chez *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Erwinia chrysanthemi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Photobacterium luminescens* etc. Certaines expriment parfois jusqu'à cinq paralogues. (*S. flexneri* ou *P. putida*). Chez *E. coli*, il y a 2

gènes *stpA* et *hns*. Le rôle exact joué par ces différentes protéines n'est pas toujours élucidé (Tendeng & Bertin, 2003). Cependant si H-NS est abondante, les paralogues présents dans la cellule le sont souvent en quantité très faible. Ces protéines ne sont donc pas des secours pour le rôle structural de H-NS, mais interviennent plutôt pour moduler la régulation par H-NS de certains promoteurs. Par exemple H-NST est une H-NS qui a perdu son domaine de fixation à l'ADN. Elle se comporte de façon négative dominante pour la répression des gènes du LEE et aide à leur activation (Williamson & Free, 2005). Hha n'est pas exactement une protéine de la famille car c'est une protéine qui est monomérique, constituée d'un seul domaine, mais qui mimique la structure du dimère du domaine amino terminal de H-NS. Elle peut alors s'associer avec H-NS pour former des complexes nucléoprotéiques qui augmentent l'activité répressive de H-NS sur la transcription de certains promoteurs. Certaines de ces protéines peuvent aussi avoir des activités différentes comme StpA qui fait de l'épissage de l'ARN de phage. H-NS, existe dans les cellules non seulement sous forme homodimérique, mais aussi sous forme hétérodimérique, quand elle interagit par exemple avec StpA. *In vivo*, la forme homodimérique de StpA est de plus digérée par une protéase ne laissant que les hétérodimères dans la cellule.

StpA existe chez *Salmonella*, *Escherichia*, et *Shigella* mais pas chez *Yersinia*. Elle possède 58 % d'identité avec H-NS, une organisation en domaines similaire (Zhang & Belfort, 1992), et interagit avec H-NS *via* son domaine de dimérisation (Deighan et al, 2003). Les données de CHIP-chip chez *E. coli* montrent que les sites de H-NS et de StpA se superposent dans une souche *hns wt* et que la délétion de *stpA* n'a pas d'effet sur le profil de fixation de H-NS tandis que la délétion de H-NS réduit fortement le nombre de régions fixées par StpA. Ceci suggère qu'StpA est donc recrutée vers ces régions sous forme hétérodimérique (StpA/H-NS), mais il est aussi possible qu'H-NS change la topologie de l'ADN et réduit l'affinité de StpA pour certaines régions de l'ADN (Uyar et al, 2009). Chez *E. coli* on ne peut pas attribuer une fonction propre à StpA (Zhang et al, 1996), car en présence de H-NS l'expression de l'ARNm de StpA est très basse. Cette expression est toutefois augmentée 20 fois dans la souche mutante pour *hns* (Sonnenfield et al, 2001), et, sous le contrôle de son propre promoteur, StpA est capable de compenser un phénotype dépendant de H-NS sur un jeu de promoteurs (Wolf et al, 2006). Dans une souche *hns*, StpA s'accumule seulement à un taux égal à 10 % de celui de H-NS dans une souche *wt*, car elle est instable en l'absence d'H-NS.

Elle se fixe alors au tiers des sites qu'occupe H-NS quand elle est présente (Uyar et al, 2009). Comme *stpA* est réprimé par H-NS et comme elle complémente certains phénotypes dus à une mutation de *hns*, Il est proposé que sa fonction essentielle de StpA soit d'agir comme un « backup » de H-NS (Sonnenfield et al, 2001). Ceci n'est pas vrai pour toutes les espèces. En effet, chez *Salmonella Typhimurium*, StpA possède un régulon spécifique où elle influence l'expression de 5 % des gènes. Cette régulation ne passe pas par une modulation des taux de H-NS (Lucchini et al, 2009)

L'expression de StpA est augmentée durant la réponse SOS. Elle est modulée par le surenroulement de l'ADN, la température, l'osmolarité, et LrP ce qui suggère qu'elle joue un rôle dans la régulation de la résistance au stress. La voie par laquelle StpA agit n'est pas encore connue (Deighan et al, 2003) et la particularité de StpA est dans sa reconnaissance de l'ARN: H-NS et StpA peuvent se lier à l'ARN *in vitro* mais StpA a une affinité plus élevée. Elle remplit un rôle de chaperon pour l'intron *td* (Brescia et al ; 2004). H-NS et StpA sont impliquées aussi dans la stabilité de l'ARN pour contrôler l'expression des gènes impliqués dans l'adaptation aux différents facteurs de stress (Brescia et al, 2004).

H-NS : un « silencer » de l'expression de l'ADN xénogénique

Chez toutes les bactéries exprimant H-NS, cette protéine a un effet négatif sur l'expression des gènes. Les données des expériences de ChIP-on-chip réalisées chez *Salmonella Typhimurium* et *E. coli* montrent que H-NS agit essentiellement comme un répresseur de la transcription. L'expression de plus de 400 gènes augmente dans un mutant *hns*. La plupart de ces gènes réprimés par H-NS présentent une séquence riche en AT (Lucchini et al, 2006; Navarre et al, 2006; Oshima et al, 2006), ce qui est aussi le signe des gènes acquis au cours de l'évolution par transfert horizontal. Cependant il n'y a pas de corrélation stricte entre la répression par H-NS et l'origine étrangère de l'ADN. Récemment il a été montré que H-NS fonctionne comme un régulateur global de la virulence chez les souches *E. coli UPEC*. En effet tous les locus de virulence de la souche *UPEC* sont régulés négativement par H-NS (Müller et al, 2006).

Mécanisme de répression par H-NS:

Une classification simple des mécanismes de répression par H-NS est difficile à réaliser, en raison des nombreux facteurs influençant l'expression de chaque promoteur (l'osmolarité,

la température et les différentes protéines de liaison à l'ADN). Ces mécanismes semblent varier d'un promoteur à l'autre. Par exemple, sur le promoteur *hdeAB*, la répression par H-NS n'est pas due directement à l'occlusion du site de fixation de $\sigma 70$ car la formation d'un complexe ouvert de transcription n'est pas affectée par la protéine (Shin et al, 2005). H-NS stabiliserait dans ce cas une boucle qui piègerait l'ARN polymérase inhibant ainsi la transcription, dans le cas où c'est le facteur $\sigma 70$ qui reconnaît l'ADN. Le facteur $\sigma 70$, une fois fixé sur l'ADN, impose une structure où l'ADN sort avec un angle étroit (du fait que l'ADN enrobe $\sigma 70$). Ceci permettrait à H-NS de ponter les séquences débordantes des deux côtés et former ainsi une boucle répressive.

Plusieurs promoteurs contiennent 2 régions de fixation de H-NS séparées par une centaine de paires de bases. L'interaction entre les molécules de H-NS fixées sur ces sites semble être une clef dans le mécanisme de régulation par cette protéine (Grainger et al, 2008). Sur les promoteurs *proV* et *bgl*, H-NS bloque ou réduit fortement la fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN (Nagarajavel et al, 2007). Sur ces deux promoteurs H-NS bloque la transcription par l'ARNP, une étape avant la formation du complexe ouvert (Jordi & Higgins, 2000; Nagarajavel et al, 2007). Comme des expériences de compétition *in vitro* entre H-NS et l'ARNP n'ont pas été faites, il est possible que l'ARNP se fixe sur ses promoteurs mais n'arrive pas à initier la transcription, comme sur le promoteur galactose (Banos et al, 2008; Navarre, 2010). Les données de CHIP-on-chip obtenues chez *E. coli* montrent que la moitié des promoteurs fixés par H-NS co-précipitent avec l'ARNP (Grainger et al, 2006a; Oshima et al, 2006). Ce constat n'est cependant pas vrai chez *Salmonella* malgré la proximité phylogénétique des deux espèces (Lucchini et al, 2006).

La fixation d'H-NS d'une manière coopérative et la génération d'un complexe nucléoprotéique filamenteux sont importantes pour la répression induite par H-NS selon tous les mécanismes proposés (Rimsky, 2004).

Parmi les protéines appartenant à la famille de H-NS, il en est une qui s'oppose à son rôle répresseur. C'est la protéine Ler qui est codée par le premier gène de l'opéron LEE1 chez les EPEC. Dans ce qui suit, je vais décrire la protéine Ler et la régulation différentielle de l'opéron LEE5 par ces deux protéines paralogues que sont H-NS et Ler.

Régulation de l'expression du « LEE » par H-NS et Ler.

Comme décrit plus haut, l'expression des gènes du LEE est régulée par un réseau de signaux et de facteurs de transcription en réponse à des stimuli extérieurs. Le premier gène de l'opéron LEE1 code pour la protéine Ler qui fonctionne comme un activateur de l'ensemble des gènes du LEE (Mellies et al, 2007; Tree et al, 2009). La régulation de *ler* et du reste des opérons de la région LEE, est soumise à l'effet de plusieurs autres régulateurs qui vont moduler l'ensemble (Figure 13).

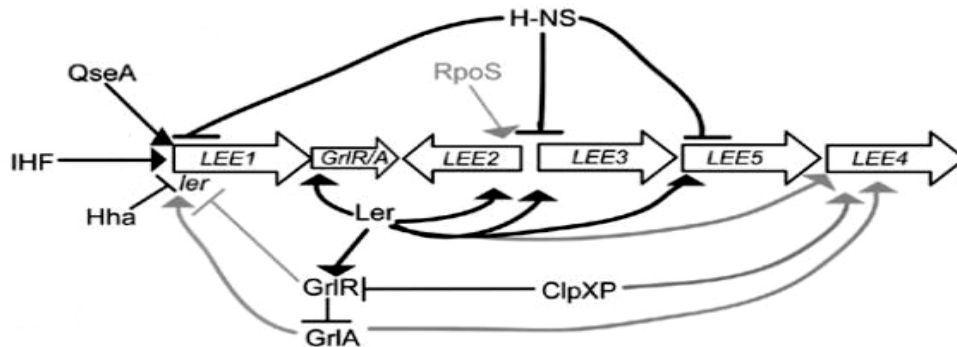


Figure 13 : représentation schématique des principaux régulateurs des gènes de LEE

Les flèches représentent les régulateurs qui interagissent directement avec leurs cibles. Les flèches grises représentent ceux qui interagissent d'une façon indirecte où ceux dont la fixation *in vitro* à leurs cibles n'a pas été observée (Modifiée d'après (Kendall et al, 2010)).

H-NS, Hha, Fis et IHF sont impliquées dans cette régulation. Hha se fixe sur H-NS dans la région régulatrice de LEE1 et renforce la répression par H-NS de l'expression de *ler* (Sharma & Zuerner, 2004). IHF active l'expression de *ler* en se fixant d'une manière directe sur la région régulatrice de LEE1. Cette activation pourrait impliquer une interaction d'IHF avec l'ARNP (Friedberg et al, 1999). Le même rôle d'activateur a été attribué à Fis (Goldberg et al, 2001). Chez les EPEC des régulateurs spécifiques peuvent aussi influencer l'expression des gènes du LEE. La souche E2348/69 possède un plasmide EAF qui code une protéine PerC qui active l'expression de *ler* (Cardinale et al, 2008). Cette activation par PerC est dépendante des conditions de culture. Des taux plus élevés de PerC sont détectés en phase exponentielle de croissance des EPEC cultivées sans agitation+CO₂ et son expression diminue 6 fois dans les cultures avec agitation (Bustamante et al, 2011). PerC assure l'expression de LEE en favorisant l'expression de Ler et d'une autre protéine codée dans le LEE, GrIA, qui active l'expression de *ler* en formant avec cette dernière une boucle de régulation positive (Deng et al, 2004b; Jimenez et al, 2010). GrIA possède une protéine

homologue codée avec elle dans l'opéron bisstronique *grlRA*, il s'agit de GrIR. GrIR interagit avec elle-même et avec GrIA pour assurer un rôle régulateur négatif et donc empêcher l'accumulation de Ler (Creasey et al, 2003).

H-NS réprime LEE1 et donc ainsi l'ensemble de l'expression du LEE. Cette régulation est modulée par la température, H-NS réprimant l'expression de *ler* à 27°C et non à 37°C. Elle réprime aussi directement *LEE2-5* à ces deux températures. Cependant, après induction de l'expression de Ler à 37°C, elle active l'expression des opérons du LEE (Umanski et al, 2002). Les données provenant des expériences d'empreintes et de gel retard affirment que H-NS se fixe sur des régions étendues de *LEE2* ; *LEE3*, et *LEE5* et qu'elle réprime donc d'une manière directe leur transcription (Bustamante et al, 2001; Haack et al, 2003a).

La protéine Ler

L'originalité que possède Ler par rapport aux autres membres de la famille H-NS est qu'elle active la transcription tandis que les autres protéines de la famille sont généralement des répresseurs. Cette protéine, d'une masse moléculaire de 15,1 kDa (Mellies et al, 2007), possède 24% d'identité et 44 % de similarité avec H-NS de *S. enterica Typhimurium* (Sperandio et al ; 2000). Comme H-NS elle possède une structure en domaines avec un domaine C-terminal de liaison à l'ADN et un domaine N-terminal d'oligomérisation, les deux liés par une région sans doute flexible (Mellies et al, 2011; Yerushalmi et al, 2008). La longueur de l'hélice du domaine amino-terminal de Ler est plus courte que celle de H-NS. Par ailleurs, dans ce même domaine il existe chez Ler deux hélices α tandis que H-NS en possède quatre. Les résidus essentiels dans le site secondaire de dimérisation (Gln59-Asp68) sont conservés chez StpA, SfH et VicH ce qui suggère que ces protéines forment des oligomères de la même façon que H-NS. Cette conservation est perdue chez Ler (Arold et al, 2010).

Une étude très récente a résolu la structure du domaine C-terminal de Ler en complexe avec un ADN de 15 pb (GCGATAATTGATAGG). Les auteurs de cette étude montrent que l'existence de la présence successive d'un petit sillon étroit suivi d'un autre large, par rapport à la forme B canonique, est observée et ils proposent que ceci constitue le signal spécifique de reconnaissance de l'ADN par le domaine C-terminal de Ler. Cependant il faut noter que la constante d'affinité entre cette protéine tronquée et ce petit oligomère est de

l'ordre du (μM), loin de celle observée pour la protéine entière (nM). Dans cette structure il y a insertion de l'Arginine R90 (conservée entre les différentes protéines de la famille H-NS) dans le petit sillon élargi. Le remplacement de cette Arginine par d'autres acides aminés réduit fortement ou abolit la reconnaissance de l'ADN et ceci est retrouvé dans le cas de mutation équivalente dans le domaine de fixation à l'ADN de H-NS c'est à dire quand on remplace l'Arginine 114. Ces auteurs montrent des paramètres structuraux équivalents pour les domaines carboxy terminaux de reconnaissance de l'ADN des deux protéines ce qui est en accord avec le fait que H-NS et Ler peuvent se lier aux mêmes sites sur l'ADN (Cordeiro et al, 2011).

Des modifications dans le domaine N-terminal, ont pour résultat une incapacité de Ler à se lier à l'ADN et d'activer l'expression d'une fusion transcriptionnelle *LEE2-lacZ*. Ceci suggère que, comme H-NS, Ler a besoin d'oligomériser pour être fonctionnellement active (Sperandio et al, 2000). En solution, Ler oligomériser plus facilement qu'H-NS. La microscopie AFM suggère que Ler complexée sur l'ADN forme une structure toroïdale différente de celle d'H-NS (pas de pontage de l'ADN). Cette structure semble avoir un effet sur l'activation par Ler (Mellies et al, 2011).

Des essais biochimiques montrent que Ler protège des régions étendues sur les promoteurs *LEE1*, *LEE2* et *LEE5* supportant ainsi l'idée d'une liaison à l'ADN sous forme multimérique (Haack et al, 2003a). Dans tous les cas recensés, Ler interagit avec une région régulatrice des opérons LEE, étendue et riche en AT, comme c'est le cas pour H-NS.

Ler exerce un contrôle puissant sur les gènes de LEE, et agit comme régulateur global de la virulence. La capacité d'une souche EPEC mutante pour *ler* pour former des lésions A/E est très diminuée par rapport à la souche *wt* (Elliott et al, 2000). Ler régule des gènes qui se trouvent en dehors de LEE dont la plupart sont impliqués dans le phénotype d'attachement et d'effacement (A/E). Par exemple, elle induit l'expression de *espC* qui est une entérotoxine codées dans un îlot de pathogénicité différent du LEE (Deng et al, 2004a; Elliott et al, 2000), ou sur l'expression d'EspFu/TccP qui est une protéine nécessaire pour la polymérisation de l'actine chez les EHEC (Campellone et al, 2004). Le mécanisme de régulation proposé est un déplacement de H-NS par Ler comme celui de SlyA sur l'hémolysine, *hlyE* chez *E. coli* (Stoebel et al, 2008). (Figure 14).

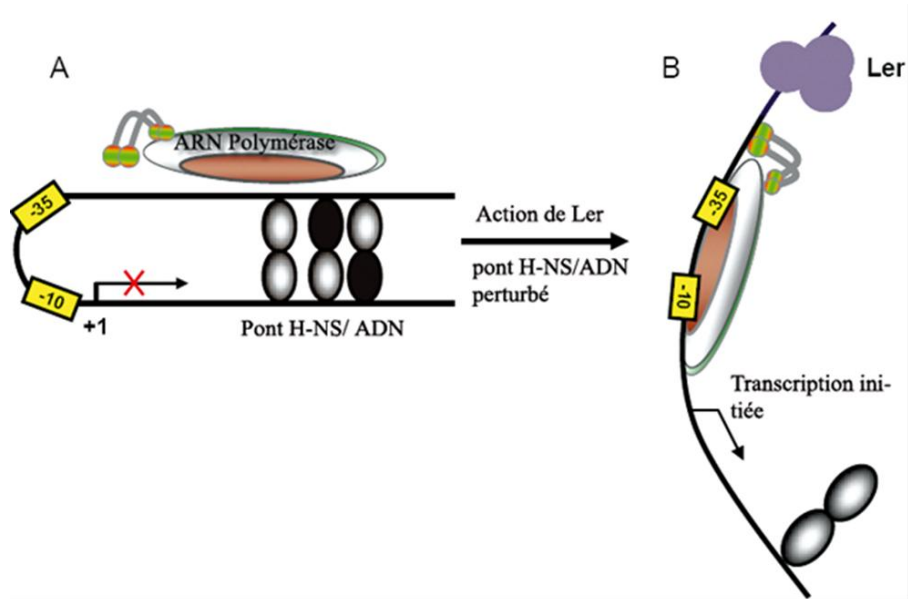


Figure 14 : représentation schématique de l'action de Ler sur un promoteur réprimé par H-NS

A : H-NS se fixe en amont et en aval du promoteur cible, elle forme un pont qui empêche l'initiation de la transcription. B : Ler s'oppose à la répression de H-NS en la déplaçant du promoteur (Modifiée d'après Stoebel et al ; 2008)

Objectifs et présentation du projet de recherche

L'objectif général de cette étude était d'essayer de comprendre à l'échelle mécanistique et moléculaire l'implication des deux protéines paralogues H-NS et Ler dans la régulation de l'opéron de pathogénicité *LEE5*, caractéristique des souches entéropathogènes et entérohémorragiques d'*E. coli* (*EPEC*) et (*EHEC*). Le génome des bactéries vivantes est une entité non pas statique mais au contraire très dynamique évoluant avec le temps. Les bactéries évoluent en effet en acquérant par transfert horizontal du matériel génétique. H-NS joue un rôle important dans la reconnaissance de cet ADN étranger et dans la répression de son expression quand celle-ci n'améliore pas le « fitness » de la bactérie. Les *EPEC*, par exemple, ont acquis l'îlot *LEE* par ce processus. En conséquence, H-NS régule la majorité des gènes associés à la virulence chez les entérobactéries *Salmonella*, *Yersinia* et les *EPEC* (Navarre, 2010).

Chez les *EPEC*, le premier gène de l'opéron *LEE1* code pour une protéine paralogue à H-NS, la protéine Ler. Une fois exprimée Ler induit l'expression des 4 opérons restant de la région parmi lesquels *LEE5* (Bustamante et al, 2001). Ler partage une grande homologie avec H-NS et, malgré cette homologie, elle active *LEE5* tandis qu'H-NS le réprime. De plus si H-NS est un régulateur global agissant sur plus de 500 gènes chez *E. coli*, Ler est une protéine spécifique qui ne va agir que sur un petit nombre de promoteurs tous impliqués dans la virulence (Kaper et al, 2004). L'approche utilisée consiste en une étude *in vitro* et *in vivo* dans un contexte génétique des *EPEC* pour construire étape par étape l'image de cette régulation opposée.

Dans un premier temps, en utilisant la technique des empreintes à la DNaseI et du retard sur gel nous avons déterminé les sites de fixation d'H-NS et Ler, *in vitro*, sur des séquences étendues de la région promotrice de *LEE5* en amont et en aval du site d'initiation de la transcription du premier gène *tir* de l'opéron *LEE5*. Ces expériences ont été effectuées à différentes températures et dans des conditions ioniques variées, pour vérifier l'effet de ces

différentes conditions sur la liaison de l'une ou de l'autre des ces deux protéines sur l'ADN du promoteur *LEE5*.

Nous avons effectué des expériences de compétition de liaison à *LEE5* entre H-NS et Ler pour tester si Ler peut effectivement déplacer H-NS a ce locus. Nous avons par ailleurs testé si Ler reconnaît les mêmes sites avec haute affinité et si elle polymérise sur l'ADN à partir de ces sites comme c'est le cas pour H-NS.

Nous avons substitué les bases AT centrales communes à tous les sites de haute affinité de H-NS et suivi l'effet des ces mutations sur la fixation de H-NS et de Ler, *in vitro*, dans la séquence promotrice de *LEE5*. Enfin, nous avons réalisé des fusions transcriptionnelles de la région promotrice de *LEE5 wt* et *LEE5* muté avec la *gfp* pour suivre *in vivo* l'expression de promoteur dans des EPEC sauvage, *ler*, *hns* ou pour *ler-hns*.

Matériels et Méthodes

Les souches bactériennes

Tableau 4 : les souches *d'E. coli* utilisées dans cette étude

Souche	Génotype/Description	Référence
JM109	Souche déficiente pour la recombinaison de l'insert et pour sa dégradation par les endonucléases.	Promega
BL21 DE3 <i>pLysS</i>	Souche déficiente pour les protéases Lon et OmpT	Stratagene
<i>E. coli</i> Tuner DE3 <i>placI</i>	Utilisée pour la purification de la protéine StpA dont le gène est cloné dans le plasmide <i>pbsK</i> .	Novagene
<i>E. coli</i> MRE600	Souche sauvage utilisée pour la purification de H-NS native	Laboratoire
EPEC E2348/69	EPEC <i>wt</i> , Streptomycine résistante	Umanski et al ; 2002
EPEC DF2^a	E2348/69 <i>ler::kan</i>	Friedberg et al ; 1999
EPEC DF3^b	E2348/69 <i>hns::kan</i>	Umanski et al ; 2002
EPEC TU1^c	E2348/69 <i>ler::kan hns::cat</i>	Umanski et al ; 2002
<i>E. coli</i> BW25113	BW25113 (<i>lacIq rrnBT14 ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78</i>)	Collection keio, Japon
<i>E. coli</i> JW1225	BW25113Δ <i>hns</i> ^{km}	Collection keio, Japon
<i>E. coli</i> 2644	BW25113Δ <i>stpa</i> ^{km}	Collection keio, Japon
<i>E. coli</i> w3110 <i>wt</i>	<i>E. coli</i> K12 sauvage	Frédéric Boccard
<i>E. coli</i> w3110 <i>ihf-</i>	W3110 <i>ihfA::cat</i>	Frédéric Boccard

a,b : mutation créée par échange allélique en utilisant la technique de sélection sur sucrose (Donnenberg et al ; 1991).

c : méthode d'inactivation en une seule étape de Datsenko et Wanner 2000 adaptée pour générer un double mutant *hns* et *ler* dans les EPEC. Umanski et al sont partis de la souche EPEC *ler::kan* de Friedberg et al,1999 et ils ont inséré une cassette chloramphénicol pour muter le gène de *hns* et obtenir à la fin le double mutant EPEC *ler::kan hns::cat*.

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le tableau 4. Pour chaque utilisation ces souches ont été striées sur des boîtes LB+ agar avec l'antibiotique approprié et incubées à 37 °C toute la nuit. Des stocks de ces souches dans 40% glycérol ont été faits à partir des cultures puis conservés à – 80 °C. Les cultures sur la nuit sont faites en inoculant une colonie isolée dans 5 ml LB supplémenté avec l'antibiotique approprié quand

c'est nécessaire, puis incubé à 37°C sous agitation à 175 RPM. Le suivi de la croissance des cultures est fait en mesurant la densité optique à 650 nm en utilisant un spectrophotomètre BiowaveDNA (Biochrom).

Conditions de croissance bactérienne

Milieu liquide

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont le LB (20 g/L tryptone, 10 g/L NaCl, 10 g/L d'extrait de levures), le DMEM GlutaMax GIBCO et le M9. Le milieu M9 est préparé par l'addition de : 8 ml de la solution saline M9 5x concentrée (44,5g/L Na₂HPO₄, 15g/L KH₂PO₄, 2,5 g/L NaCl, 5g/L NH₄Cl) à 8 ml de la solution saline complémentaire 5x concentrée (MgSO₄ 10 mM, 20 mg/L tryptophane, 25 mg/L thymidine, CaCl₂ 0,5 mM), 0,1 g de glucose et 0,25 g de casaminoacides sont additionnés et le volume est complété jusqu'à 40 ml avec de l'eau distillée stérile. Les antibiotiques, l'IPTG et le X-Gal sont ajoutés si nécessaire, Tous les milieux liquides utilisés sont filtrés avec des filtres 0,22 µm et autoclavés.

Milieu solide

Tous les milieux solides utilisés sont préparés dans de l'eau distillée puis stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 120°C et 15 psi. Les milieux sont laissés refroidir jusqu'à ~50°C avant l'ajout des antibiotiques. Les boîtes sont coulées dans des conditions stériles (20ml agar par boîte) puis conservées à 4°C sous parafilm. Le caractère *hns*- des bactéries est vérifié sur une gélose McConkey salicine [base MacConkey agar (Difco), 1% salicine].

Les antibiotiques

Antibiotique	Concentration finale dans le milieu
Ampicilline	100 µg/ml
Chloramphénicol	35 µg/ml
Streptomycine	50 µg/ml
Kanamycine	50 µg/ml

Transformation des bactéries

Transformation par chocs thermiques

Pour le protocole détaillé ce type de transformation voir l'exemple dans le paragraphe qui suit « Transformation de la souche JM109 d'*E. coli* par le mélange de ligation pGEM-T*proLEE5* »

Transformation des bactéries par électroporation

Préparation des bactéries compétentes

500 µl d'une culture de nuit sont inoculés dans 100 ml de milieu LB supplémentés par l'antibiotique approprié si nécessaire. Quand les bactéries sont en milieu de la phase exponentielle ($OD_{650\text{ nm}} = 0,5$) elles sont collectées dans un pot de centrifugation de 100 ml et centrifugées à 4000g à 4°C pendant 15 min. le culot est lavé avec 25 ml eau stérile froide et centrifugé dans les mêmes conditions qu'auparavant (répété 2 fois). Le culot est repris dans 5 ml 10 % glycérol stérile et aliquotés (250 µl) dans des tubes de 1,5 ml et conservés à - 80 °C si la transformation n'est pas à faire directement après.

Electroporation

Avant l'électroporation les cuvettes stériles (Sigma Aldrich, 1mm de fente) à utiliser sont mises sur la glace. L'électroporateur (Eppendorf 2510) est ajusté sur 1,5 kvolts. 2 µl du plasmide à utiliser dans la transformation sont transférés dans un tube déjà placé sur la glace. 50 µl de cellules compétentes sont ajoutées à l'ADN, l'ensemble est mélangé en pipetant et refoulant doucement. Le mélange est immédiatement transféré dans la cuvette où il subit une pulsation électrique suivie par l'ajout de 950 µl de LB. Le contenu est transféré dans un tube de 5 ml stérile puis incubé à 37°C pendant 45 min sous agitation à 175 RPM. 100 µl et 500 µl sont étalés par des billes de verre stériles sur des boîtes LB-agar avec l'antibiotique approprié. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

Techniques de Biologie moléculaire

Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 5 et les plasmides dans le tableau 6

Electrophorèse sur gel

Des gels d'agarose ont été utilisés pour purifier les fragments d'ADN qui sont plus grands que 500 pb. Une solution d'agarose (VWR) à 1% est préparée dans du TBE 1X. Cette solution est laissée refroidir jusqu'à ~ 50°C puis versée dans un système de coulage de gel. Les échantillons d'ADN sont mélangés dans un ratio 1:1 avec le bleu de charge (0,025% bleu de Bromophénole, 0,025 % bleu de xylène cyanole, 20 % glycérol, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA). Les échantillons sont migrés dans une cuve d'électrophorèse horizontale à 10 V/cm pour 30 à 45 min. les gels sont colorés dans une solution de Bromure d'éthidium 0,5 µg/ ml pendant 5 min (cette étape de coloration n'est plus nécessaire dans certains cas où le Bromure d'éthidium (Invitrogen) est ajouté dans la solution d'agarose à 0,5 µg/ml). Une fois colorée les gels sont visualisés sous UV en utilisant un système (Vilber Lourmat).

Pour les fragments d'ADN plus petits que 400 pb, des gels de polyacrylamide sont utilisés. Une dilution de 5 à 7% d'une solution d'acrylamide mère (stock à 20%, acry/bis 29::1, Merck) dans du TBE 1X est réalisée, puis 0,01 volume d'une solution d'ammonium persulfate 10 % (W/V) (UBS) et 0,001 volumes de TEMED (Sigma Aldrich) sont ajoutés pour faire polymériser la solution après l'avoir coulée entre 2 plaques de verres d'épaisseur de 1 mm. Les puits sont formés par insertion d'un peigne. Le gel formé est mis dans un système d'électrophorèse vertical et les échantillons sont migrés à 150 V pendant 45 min. le gel est ensuite coloré de la même façon que pour le gel d'agarose.

Extraction, isolation et purification des fragments d'ADN

Maxi-prep

Le kit de maxi-prep de Machery Nagel a été utilisé pour préparer de l'ADN plasmidique bactérien. En bref les 500 ml de culture bactérienne sont centrifugés à 5000g à 4 °C pendant 25 min pour culoter les bactéries. Le culot bactérien est resuspendu dans le tampon de resuspension RES supplémenté de RNaseA. La suspension obtenue est lysée avec le tampon de lyse à base de NaOH/SDS puis neutralisée avec le tampon NEU. Les débris cellulaires et le SDS sont éliminés par filtration et le lysat est passé sur une colonne échangeuse d'anions, déjà équilibrée avec le tampon EQU, par gravité. L'ADN fixé sur la résine est lavé pour éliminer les contaminants (protéines, ARN) puis élué dans le tampon ELU (conditions salines élevées), précipité, dessalé par lavages à l'Ethanol 70%, séché et repris dans le volume approprié d'eau ou de tampon TE.

Mini-prep

Pour le protocole en détail voir l'exemple dans le paragraphe qui suit « Clonage du fragment *proLEE5* dans le pGEM-T »

Extraction de l'ADN du gel d'agarose

Pour minimiser l'exposition des fragments d'ADN à purifier sur gel aux UV, Un échantillon représentant le 1/10^{ème} de la quantité d'ADN à purifier est déposé dans un puits à côté de la quantité d'ADN totale. Le gel est laissé migrer dans les conditions usuelles puis quand la migration est terminée le gel est coupé en deux parties verticalement, une contenant l'échantillon représentant le 1/10^{ème} de l'ADN à purifier et l'autre contenant le reste de l'ADN. On révèle sur la partie 1 aux UV la bande correspondante à la taille de l'ADN à purifier et ensuite on coupe cette bande du gel. On remet la partie 1 avec la partie 2 comme si elle formait de nouveau un seul gel et on coupe sur la partie 2 au même niveau que dans la partie 1. Ce fragment coupé du gel est élué en utilisant le kit d'extraction QIAquick de Qiagen, en suivant les instructions du fournisseur. L'ADN extrait est élué de la colonne dans 50 µl d'eau stérile.

Purification de l'ADN sur Colonne G-25 Sephadex (GE health care)

Ces colonnes ont été utilisées pour éliminer les ATP- γ -³²P non incorporés au cours du marquage des amorces ou bien pour dessaler l'ADN marqué avant l'utiliser en expériences d'empreinte à la DNaseI. Le liquide contenant les particules de Sephadex est éliminé par centrifugation à 2000 g pendant 5 min, ensuite les colonnes sont lavées 2 fois à l'eau distillée. L'amorce ou le fragment d'ADN marqué sont récupérés dans des tubes de 1,5 ml « low binding » (Eppendorf), par centrifugation à 2000g pendant 5 min.

Précipitation de l'ADN à l'Éthanol

La précipitation à l'éthanol permet de concentrer la solution d'ADN et de changer de tampon quand c'est nécessaire. 2,5 volumes d'éthanol 100% froid et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) sont ajoutés à la solution d'ADN. Les échantillons sont laissés à -20°C pendant 1h 30 min puis centrifugés 18 min à 15000g à 4°C. Le surnageant est enlevé délicatement. Le culot est ensuite lavé avec 400 μ l d'éthanol 70 % froid puis centrifugé 3 min à 15000g à température ambiante. Le surnageant est enlevé et le culot est séché pendant 20 min sous vide. Le culot est resuspendu après dans le volume et le tampon approprié selon les besoins de l'expérience. Dans le cas des précipitations pour les expériences d'empreinte à la DNaseI le protocole est légèrement modifié : du glycogène est présent dans le tampon d'arrêt de la digestion par la DNaseI. La concentration du glycogène est de 75 μ g/ml.

Mutagenèse des sites de haute affinité de H-NS identifiés sur le promoteur LEE5

Une stratégie en étapes a été adoptée où les mutations sont introduites successivement sur chacun des 3 sites. Le premier site à modifier était proche de la position -110 (par rapport au site d'initiation de la transcription). Cette stratégie consistait à introduire les mutations par PCR avec des amorces chevauchantes en sens et en reverse (amorce proLEE5Smutation en rouge et proLEE5Rmutation en vert. La mutation introduite indiquée en lettres majuscules vertes). L'extension est laissée se faire sur tout le plasmide matrice contenant le fragment du promoteur LEE5 à muter (il s'agit du pKKLEE5gfp). Une enzyme de haute fidélité a été utilisée il s'agit de la Pfu polymérase (Stratgene).

-110

```
...pKK.....ataattatttttttttcgATAAttatataatgattttgattatgtgatttttag.....pKK... LEE5 wt
...pKK.....tattaataaaaaaaagcGCGCaataatattactaaactaatacactaaaaaaatc.....pKK... LEE5 muté
```

Cette figure montre la région promotrice de LEE5 autour de -110 avec la séquence des amorces proLEE5Smutation et proLEE5Rmutation et leur localisation l'une par rapport à l'autre. Les bases mutées sont indiquées en majuscules.

Conditions de la PCR

Quick solution	2,5 µl	
Tampon 10x PfU stratagene	5 µl	95 °C 1 min
Amorce LEE5Smutation 20 µM	1 µl	95 °C 50 s
Amorce LEE5Rmutation 20 µM	1 µl	40 °C 50 s
dNTP 25 mM (Invitrogen)	0,5 µl	72°C 6 min
pkkproLEE5gfp (10 ng/µl)	1 µl	72°C 10 min
H2O	40 µl	
PfU stratagene	1 µl	

L'ADN matrice est digéré par restriction par DpnI. Les produits PCR sont ensuite phosphorylés en utilisant le tampon de la T4 DNA ligase qui contient de l'ATP nécessaire à la phosphorylation et dont la composition est proche de celle la T4 PNK ce qui évite le changement de tampon entre la phosphorylation et la ligation qui suit après. 45 µl de produits PCR sont ajoutés à 5 µl du tampon de T4 DNA ligase 5X (Biolabs) et 1 µl de T4 PNK (Biolabs). Le mélange est incubé 30 min à 37 °C puis l'enzyme est inhibée en incubant 5 min à 65°C. 1 µl de de la T4 DNA ligase (Biolabs) est ajouté et le mélange est laissé incubé 30 min à 16°C. Une extraction au phénol et une précipitation à l'éthanol sont ensuite réalisées.

L'ADN resuspendu dans de l'eau est utilisé pour transformer par chocs thermiques des bactéries XL10 gold (stratagene). Après sélection des transformants sur LB+ agar+ ampicilline+ chloramphénicol. Une "miniprep" est ensuite faite et l'ADN est vérifié par séquençage. Des essais multiples ont été réalisés mais il y a toujours eu une délétion d'une partie la région promotrice de LEE5 entre -130 et -220. Les diverses conditions de PCR testées n'ont pas résolu ce problème c'est pourquoi la région promotrice de LEE5 avec les 3 sites mutés a été synthétisés dans une entreprise privée "Genearth". Le fragment LEE5 contenant les 3 sites mutés est appelé LEE5 3M. Ce fragment a été livré cloné dans le plasmide PMRQ.

Tableau 5 : les amorces utilisées dans cette étude

Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'	Utilisation
proLEE5S*	CG <u>CCCCGGG</u> CTGTAGGGGGAACTTAC	Clonage du fragment du promoteur LEE5 (-250, +270) dans les plasmides pGEM-T et pKK
proLEE5R*	TCTCTAG <u>AATCGACAG</u> AATTCAGCC	<ul style="list-style-type: none"> • Clonage du fragment du promoteur LEE5 (-250, +270) dans les plasmides pGEM-T et pKK • Génération du fragment ProLEE5S4/R radiomarqué au ³²P.
proLEE5S4	GCGCTGTTATTTTTTTTCTTG	Génération du fragment ProLEE5S4*/R (- 230/+270) marqué au ³² P.
proLEE5SVI	TTTAGTTGGAAATACAGACATGCAT	Génération du petit fragment proLEE5SVI*/RII (-80, +103) radiomarqué au ³² P.
proLEE5RII	CAAGGTTACCAATAGGCATAC	Génération du petit fragment proLEE5SVI/RII* (-80, +103) marqué au ³² P.
proLEE5mutationS	ATAATGATTTTGGATTATGTGATTT	Mutagenèse du premier site de haute affinité de H-NS
proLEE5mutationR	ATAATTATCGAAAAAAATAA	Mutagenèse du premier site de haute affinité de H-NS
FPF	GCATCAATATTCATGCC	Génération du fragment <i>proU</i> radiomarqué au ³² P
FPR	GGTGGGTTCAATCAGGCG	Génération du fragment <i>proU</i> radiomarqué au ³² P

* : La séquence soulignée dans l'amorce proLEE5S correspond au site de restriction de l'enzyme XmaI et celle dans l'amorce LEE5R correspond au site de XbaI. Ces deux sites ont été utilisés pour le clonage du fragment LEE5 dans le plasmide pKK.

Tableau 6 : les plasmides utilisés dans cette étude

Plasmide	Description	Référence
pbsK <i>stpA his6</i>	Vecteur d'expression de la protéine StpA avec une queue histidine (figure S7)	Laboratoire
pET <i>ler his6</i>	Vecteur d'expression de la protéine Ler avec une queue histidine en C-terminal (figure S4)	Cette étude
pGEM-Teasy <i>LEE5</i>	Dérivé du pGEM-T contenant le grand fragment <i>LEE5S/R</i> (-250, +270) de la région promotrice de l'opéron <i>LEE5</i> (figure S2)	Cette étude
pKK <i>LEE5 gfp</i>	Dérivé du pKK contenant le grand fragment du promoteur <i>LEE5</i> fusionné à la <i>gfp</i> pour l'étude de l'expression <i>in vivo</i> au fluorimètre (figure S3)	Cette étude
pMK-RQ <i>LEE5-3M</i>	Dérivé du pMK-RQ contenant le grand fragment du promoteur <i>LEE5</i> avec 3 mutations dans les sites de haute affinité, identifiés pour H-NS (figure S6)	Geneart
pKK <i>LEE5-3M gfp</i>	Dérivé du pKK contenant le grand fragment du promoteur <i>LEE5</i> , avec les sites de H-NS mutés, fusionné à la <i>gfp</i> pour l'étude de l'expression <i>in vivo</i>	Cette étude
pKK <i>gfp</i>	Dérivé du pKK contenant le gène de la <i>gfp</i> sans promoteur devant (figure S1)	Bouffartigues et al ; 2007
pKK <i>proU</i>	Dérivé du pKK contenant un fragment de 372 pb de la région promotrice de l'opéron <i>proU</i> allant du -68, +301)	Bouffartigues et al ; 2007
pKK<i>proV gfp</i>	Dérivé du pKK portant le fragment <i>proV</i> de 1348 pb qui contient l'ensemble de la séquence régulatrice du promoteur <i>proU</i> (figure S5)	Bouffartigues et al ; 2007

Clonage du fragment *proLEE5* dans le pGEM-T easy

Amplification par PCR du fragment *proLEE5*.

Dans un premier temps par PCR un fragment d'ADN comportant la région promotrice de l'opéron LEE5 a été amplifié. Pour faire cette PCR une enzyme qui se caractérise par une très grande fidélité a été utilisée il s'agit de la Phusion polymérase (New England Biolabs). Le taux d'erreur de cette enzyme est de $4,4 \times 10^{-7}$ ce qui est 50 fois inférieur à celui de la Taq polymérase.

Tampon GC 1X de la Phusion polymérase

dNTP : 0,25 mM

Amorce *proLEE5S* : 0,5 μ M

Amorce *proLEE5R* : 0,5 μ M

Phusion polymérase : 5 unités

Programme de la PCR :

30 " à 98°C

10" à 98°C

30 " à 54°C

30" à 72°C

10' à 72°C

} 25 cycles

49 μ l du mélange sont ajoutés à 1 μ l d'ADN génomique (Souche E2348/69 *d'Escherichia coli*) matrice, dilué 1/10^{ème} et 1/100^{ème} puis dépôts des produits de PCR sur gel agarose 0,8% (2 μ l du produit de PCR+1 μ l bleu de charge 6X+3 μ l H₂O). La composition du bleu de charge est la suivante (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bleu de Bromophénol, 0,03% xylene cyanol, 60% glycérol, 60 mM EDTA)

Le produit de PCR obtenu à partir de l'amplification sur l'ADN matrice est purifié avec le kit (High Pure PCR Product Purification, Roche) en suivant les instructions du fournisseur.

Ajout de l'extension polyA au produit PCR purifié

Le produit PCR obtenu possède des extrémités franches. Nous avons ajouté une extension polyA en 3' grâce à l'ADN polymérase Taq Platinum (Invitrogen) pour permettre le clonage dans le vecteur linéaire pGEM-T Easy. La composition du mélange est la suivante : dans un tube de 0,5 ml, produit de PCR (300 ng), tampon de la Taq polymérase 1X, dATP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, et la Taq polymérase de chez Invitrogen 5 unités. On incube le mélange à 70°C pendant 30 min.

Ligation du fragment *proLEE5*-polyA avec le plasmide pGEM-T Easy.

Pour lier le fragment *proLEE5*-polyA au pGEM-T Easy le protocole fourni avec le kit de Promega a été suivi :

proLEE5-polyA: 300 ng

pGEM-T Easy : 50ng

Tampon de ligation 1X

T4 DNA ligase (Promega) :1 unité

incubation toute la nuit à 4°C.

Transformation de la souche JM109 d'*E. coli* par le mélange de ligation pGEM-TeasyproLEE5 :

Les bactéries compétentes commerciales JM109 (Promega) compatibles avec le crible de couleur bleu/blanc et la sélection sur ampicilline ont été utilisées. La souche JM109 est *endA* (-), déficiente pour l'endonuclease ce qui facilitera l'extraction de l'ADN plasmidique. Elle est *recA*(-) déficiente pour la recombinaison ce qui augmentera la stabilité de l'insert. En plus la délétion *lacIqZΔM15* est nécessaire pour le criblage bleu/ blanc des recombinants. Le génotype complet de la JM109 est : *recA1*(-), *endA1*(-), *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rK-, mK+), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacIqZΔM15*].

Le protocole de la transformation est le suivant : 50 µl de bactéries compétentes JM109 sont mélangées avec 2 µl du mélange de ligation pGEM-T*proLEE5*, incubation 20 minutes dans la glace, puis choc thermique de 45 secondes à 42°C suivi par une deuxième incubation dans la glace pendant 10 minutes. On complète à 1 ml avec du milieu LB et on transfère dans des tubes de 10 ml pour incuber à 37°C pendant 2 heures. Le mélange est étalé sur des boîtes LB-agar + Ampicilline (100 µg/ml) + IPTG (0,5 mM) + X-gal (80 µg/ml).

Extraction de l'ADN plasmidique de la souche JM109 d'*E. coli*.

A partir des clones blancs supposés avoir la construction plasmidique pGEM-T*proLEE5*, on a fait des précultures de 5 ml en milieu LB+ ampicilline (100 µg/ml) sur la nuit. On extrait l'ADN plasmidique selon le protocole du kit (mini-Prep Nucleobond, MACHEREY-NAGEL). En résumé à partir d'une culture de nuit de 5 ml à 37°C sous agitation à 175 RPM. Un aliquote de 1,5 ml est pris, les bactéries sont culotées par centrifugation à 11000g pendant 1 min. 250 µl du tampon A1 sont ajoutés, puis 250 µl du tampon A2 et 350 µl du tampon A3. Après l'ajout du tampon A3 les tubes sont inversés 5 fois. Le mélange est laissé incubé 5 min à température ambiante puis centrifugés pendant une minute à 11000g. Le surnageant est chargé sur une colonne Nucleospin à base de silice. Des contaminants comme les sels et macromolécules sont éliminés par lavage avec le tampon à base d'éthanol A4 et un lavage avec le tampon AW est nécessaire pour enlever les endonucléases résiduelles et pour améliorer les réactions enzymatiques sur l'ADN obtenu à la fin. L'élution se fait par centrifugation à 11000g dans le tampon AE 5 mM Tris/HCl, pH 8,5 légèrement alcalin ou bien dans de l'eau pure. (2 µl de l'ADN plasmidique obtenu sont déposés sur un gel d'agarose 1%. L'ADN plasmidique extrait est séquencé par le service de Genome Express, Grenoble).

Clonage du fragment LEE5 et LEE5.3M dans le pKKgfp

Dans le fragment LEE5.3M synthétisé par Geneart des sites de restriction pour les enzymes XmaI et XbaI ont été introduites pour permettre après le clonage dans le plasmide pKKgfp disponible dans le laboratoire et qui contient des sites pour ces enzymes.

Une transformation de la souche XL10gold par le PMRQLEE5.3M a été faite suivie d'une extraction de l'ADN plasmidique par maxiprep. L'ADN plasmidique PMRQ.LEE53M, pGEM-T_{easy}LEE5 et pKK*proVgfp* sont ensuite digérés par le couple d'enzyme XmaI et XbaI selon le protocole suivant :

Tampon 4 (Biolabs) 10X concentré : 1 µl
BSA 10mg/ml: 0,2 µl
PMRQLEE5.3M ou pKK*proVgfp* ou pGEM-T_{easy}LEE5 : 1 µg
H₂O: 15 µL
XbaI (Biolabs): 1 µl
XmaI (Biolabs): 1 µl

La réaction est faite dans un volume total de 20 µl à 37°C pendant 3 h. Les produits de la digestion sont déposés sur gel d'agarose 1 %. Les fragments LEE5.3M, LEE5 et le plasmide pKKgfp sont extraits du gel avec le kit d'extraction QIAquick de Qiagen.

Ensuite une ligation entre le pKKgfp et le fragment LEE5 ou LEE5.3M est réalisée. Le produit de ligation est utilisé pour transformer des souches XL10 gold compétentes (stratagene). Une miniprep de la construction pKKLEE5*gfp* et pKKLEE5.3M*gfp* est ensuite faite. Cette construction est vérifiée après par PCR et par séquençage.

Empreintes à la DNaseI

La technique d'empreinte à la déoxyribonucléaseI (DnaseI) est une technique de grande valeur pour localiser la fixation spécifique d'une protéine sur l'ADN. Le principe est que la protéine fixée sur l'ADN protège les liaisons phosphodiester de l'ADN de l'hydrolyse par la DnaseI. Les sites de fixation sont révélés par autoradiographie de l'ADN résultant de l'hydrolyse après séparation par électrophorèse sur gel de séquence en conditions dénaturantes (Brenowitz et al ; 1997).

Obtention du fragment du promoteur radiomarqué en 5'

Marquage de l'amorce :

On marque l'amorce avec du ³²P.

Mélange pour la réaction de marquage dans un volume final de 20 µl :

Tampon pour la PNK (polynucléotide kinase) 1X

Amorce froide à marquer : 4 μ M

ATP γ^{32} P (perkin Elmer) : 750 Ci/mmol

PNK (New England Biolabs): 10 unités

La réaction enzymatique est faite pendant 30 minutes puis l'enzyme est inactivée par chauffage à 65°C (10 min). La quantité de radioactivité incorporée est vérifiée par chromatographie sur PEI-cellulose (Merck). 0,3 μ l de la réaction est déposée sur la PEI cellulose et la migration se fait par capillarité avec du HCl 1 N. Le chromatogramme est ensuite exposé dans une cassette avec un écran de phosphore pour quantifier la radioactivité à l'aide d'un Storm (GE Healthcare). L'ATP γ^{32} P non incorporé dans l'amorce migre en haut du chromatogramme alors que l'amorce marquée sur son phosphate en 5' reste en bas. Environ 80% de la radioactivité doit être incorporée dans l'amorce suite à la réaction de la kinase. L'amorce marquée est alors séparée de l'ATP γ^{32} P non incorporée sur colonne de filtration (Sephadex TM G25 Amersham biotech).

Obtention du fragment du promoteur par PCR radioactive

Ce fragment est obtenu par PCR en réalisant le mélange suivant (Vf= 50 μ l) :

ADN matrice 5 ng

Tampon 1X de l'ADN polymérase Taq Platinum (Promega)

dNTP : 0,25 mM

MgCl₂ : 1,5 mM

Amorce froide non marquée : 0,3 μ M

Amorce chaude marquée : 0,2 μ M

ADN polymérase Taq Platinum ou Dream Taq (Fermentas) : 5 unités

<u>Programme de la PCR :</u> Dans un Thermocycler™ stratagene	
3' à 94°C	
30'' à 94°C	} 30 cycles
30'' à Tm°C	
45'' à 72°C	
10' à 72°C	

Au volume du produit de PCR 10 μ l d'un tampon de charge 6X (New England Biolabs) sont ajoutés, puis le mélange est déposé sur gel de polyacrylamide (5%, 0,75 mm, migré à 14 volts/cm). La bande correspondant au fragment désiré double brin est révélée sur un film autoradiographique, découpée et éluée du gel par incubation dans 200 μ l de tampon "Guilbert" (1 mM EDTA pH 8 ; 10 mM acétate de magnésium ; 500 mM acétate d'ammonium) à 37°C. L'ADN est précipité à l'éthanol 100%, dessalé par lavage à l'éthanol 70%, séché au speedvac et resuspendu dans 50 μ l d'eau pure. La quantité de radioactivité finale est évaluée par comptage au compteur β (Beckman) (CPM/ μ L).

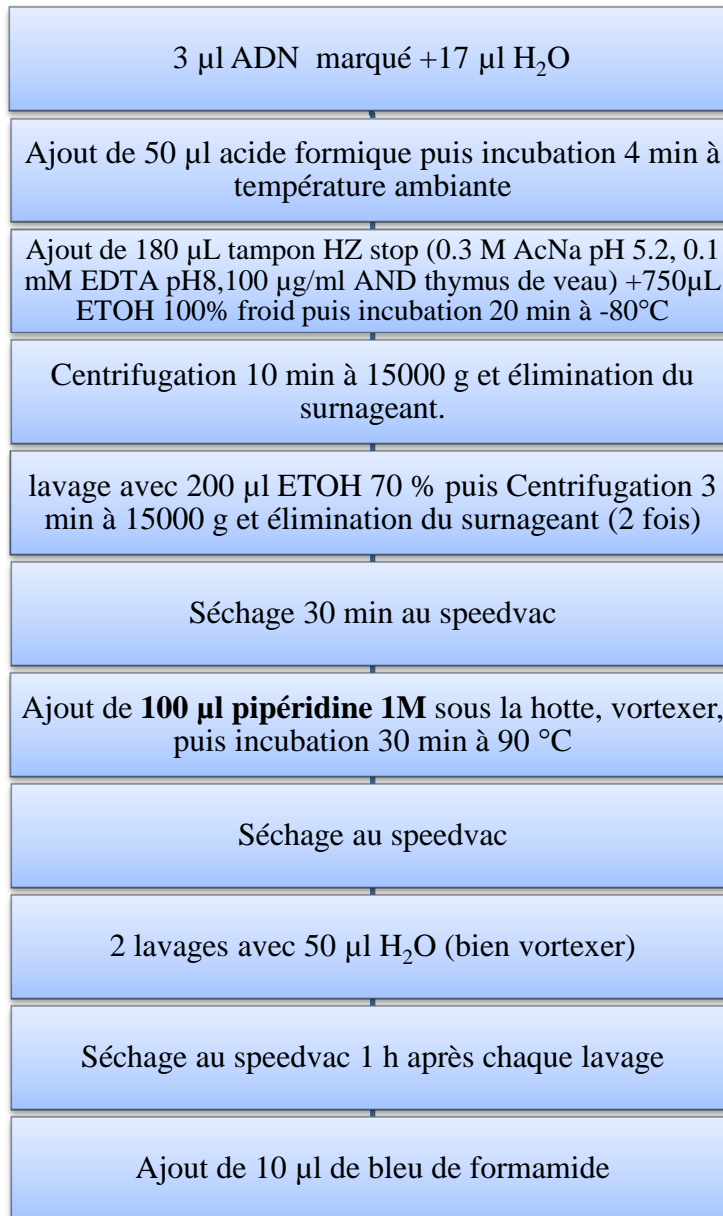
Attaque à la DNaseI

Le fragment marqué (1 à 3 nM) est incubé (30 min), à la température choisie avec la protéine (dans une gamme de concentration allant de 0 à 1000 nM) dans 18 µL de tampon de fixation H-NS (20 mM Hepes pH8, 60 mM glutamate de potassium, 8 mM aspartate de magnésium, 5 mM DTT, 0,05% NP₄O, 0,3 mg/ml BSA). Les complexes nucléoprotéiques sont attaqués par de la DNaseI (0,25 µg/ml) (Worthington Biochemical). Les temps d'attaque sont ajustés de manière à avoir une coupure partielle comparable d'un échantillon à l'autre (soit 15 et 20 secondes pour les témoins : ADN en absence de la protéine et 30 secondes pour les échantillons d'ADN en présence de la protéine). La digestion enzymatique est arrêtée par l'ajout successif de 180 µL de phénol-chloroforme (pH8, Invitrogen) et de 180 µL de tampon DNase Stop (0,2 M Acétate de sodium pH 5, 100 µg/ml ADN thymus de veau, 200 mM EDTA, 100 µg/ml glycogène) et une agitation vigoureuse après l'addition de chaque réactif. Les phases aqueuses, dans lesquelles les fragments d'ADN sont solubilisés, sont récupérées après une centrifugation de 3 minutes à 15000 g à température ambiante. Les échantillons sont précipités à l'éthanol 100% à froid, dessalés par lavage à l'éthanol 70%, séchés au speedvac.

La quantité de fragments est évaluée par comptage Cerenkov. Les culots sont resuspendus dans 5 µl de bleu formamide (formamide 90%(V/V), TBE 1X, 0,01% bleu de Xylène Cyanol (W/V)) et déposés sur gel dénaturant (40cm x 30cm x 0,4cm) 7% acrylamide/ Urée 8 M, avec une réaction de séquence (G+A) dans le premier puits. Une pré migration de 1 h est effectuée avant le chargement des échantillons. Ces derniers sont chauffés à 90 °C pendant 4 min avant le dépôt. Le gel est migré à 1400 V (37 V/cm) avec du TBE 1X ou bien avec un gradient en sel (TBE 0,5X [cuve du haut] + TBE 0,5X /1,5 M acétate de sodium [cuve du bas]): une fois la migration terminée le gel est fixé dans une solution d'EtOH 20%, acide acétique 10 % puis pris sur papier Whatman 3MM et séché sous vide pendant 1 h. La quantité relative de radioactivité présente dans chaque bande est évaluée à l'aide d'un "Storm" ou d'un « typhoon » et en utilisant le logiciel "Image Quant" de densitométrie par phosphorimagerie (GE Healthcare).

Réaction de séquence G+A

Un puits G+A sur gel de séquence permet d'identifier les purines dans l'ADN testé ; Ce qui permet de déterminer les séquences où la protéine fait les empreintes.



Les essais de retard sur gel (EMSA)

Un mélange du fragment radiomarqué au ³²P en 5', dont l'interaction avec la protéine choisie est à analyser, est réalisé dans 100 µl dans du tampon H-NS 1X. 9 µl du mélange d'ADN marqué est ensuite distribué dans des 10 de tubes de 0,5 ml (Eppendorf low binding). 1 µl de

la solution protéique 10X concentrée préparée dans le tampon H-NS est ajoutée aux 9 μ l d'ADN. Le mélange est laissé incubé à la température choisie pendant 25 min. Durant ce temps la pré-migration des gels d'acrylamide 5%, TBE 1x, 1 mm d'épaisseur (acrylamide 29 ::1, Merck) est lancée à 15 Volts/cm. Une fois l'incubation terminée 1,5 μ l de bleu de sucrose 6X (50% sucrose, 0,025 % bleu de Bromophénol, 0,025% Xylène cyanol) est ajouté dans chaque tube. L'ensemble est mélangé délicatement et rapidement pour ne pas perturber le complexe protéine/ADN formé. Le chargement sur le gel se fait sous une tension de 1 Volt/cm, une fois tous les échantillons déposés le voltage est monté jusqu'à 100 Volts et les échantillons sont laissés migrer en fonction de la taille du fragment d'ADN libre utilisé. Les gels sont ensuite fixés dans 20 % EtOH ; 10 % Acide acétique et séchés. Une fois secs les gels sont exposés sur un écran phosphore puis l'image révélée au typhoon (GE health care).

Mesure de l'activité des promoteurs *in vivo* par fluorescence

La GFP est utilisée intensivement comme gène rapporteur pour étudier l'expression des gènes. Son utilité réside dans la possibilité de mesure de l'expression génique en temps réel dans les cellules vivantes. Comme il n'y a pas besoin d'un substrat exogène le taux d'expression génique peut être quantifié en mesurant la fluorescence dans la cellule en culture. La fluorescence de la GFP est dépendante de l'oxygénation de la culture. En effet la formation du chromophore nécessite l'oxygène. Les changements dans le pH intracellulaire peuvent aussi avoir un effet sur la fluorescence de la GFP (Revue dans Tsien et al ; 1998).

Le gène de la GFP a été utilisé comme rapporteur pour évaluer l'activité des promoteurs LEE5 wt, LEE5 3M et *proU* dans les différentes souches EPEC wt, Δ ler, Δ hns, Δ hns Δ ler et E. coli K12 wt Δ ihfA, Δ hns et Δ stpA dans différentes conditions de culture à 37°C.

Une culture dans 5 ml LB avec l'antibiotique approprié si nécessaire est lancée sur la nuit à partir d'une colonie isolée. Le lendemain des dilutions dans du LB, DMEM ou M9 sont faites. Dans le LB et le DMEM la dilution est de 1/5000 et dans le M9 la dilution est de 1/500. Les dilutions sont faites avec du milieu tamponné à pH 7,5 avec de l'Hepes 20 mM (Sigma Aldrich) et contenant l'antibiotique(s) nécessaire(s). La mesure de la fluorescence et de la densité optique se fait dans une plaque 96 puits à bord noir et fond transparent à l'aide d'un fluorimètre Victor3 ou 5 (Perkin Elmer) sous agitation à 37°C. Dans chaque puits 150 μ l de la culture diluée est pipetée stérilement puis la culture bactérienne est couverte par une couche d'huile pour éviter l'évaporation. Chaque plaque de mesure contient des puits témoins avec le milieu utilisé seul sans culture bactérienne (données utilisées pour la normalisation de la DO), des puits où la souche utilisée est transformée avec le *pKKgfp* sans promoteur (données utilisées pour la normalisation de la fluorescence et donc de l'activité de chaque promoteur étudié).

L'activité du promoteur est mesurée par la dérivée de la courbe d'accumulation de la fluorescence en fonction du temps divisé par l'OD selon relation suivante :

$$\text{Activité}_{\text{promoteur}} = \frac{dGFP/dt}{OD_{\text{normalisé}}}$$

$$\frac{dGFP}{dt} = \frac{\left[(GFP_{pKK+\text{promoteur}})_{t_2} - (GFP_{pKK})_{t_2} \right] - \left[(GFP_{pKK+\text{promoteur}})_{t_1} - (GFP_{pKK})_{t_1} \right]}{t_2 - t_1}$$

Techniques de Biochimie

Purification de la protéine H-NS

Préparation de la colonne de phosphocellulose (selon les indications du fabricant)

Pesée de 20 g de P11 "phosphate cellulose cation exchanger Whatman" (volume occupé 50 mL)

- Lavage avec 1250 ml de NaOH 0,5 M (25 volumes) dans un becher pendant 5 min
- Filtration sur verre frité relié à la pompe à vide et lavage avec de l'eau milliQ jusqu'à ce que le pH soit en dessous de 11
- lavage avec 1250 ml de HCl 0,5 M (25 volumes) dans un becher pendant 5 min
- Filtration sur verre frité relié à la pompe à vide et lavage avec de l'eau milliQ jusqu'à ce que le pH soit au dessus de 3
- Transfert de la phosphocellulose sur colonne
- Equilibration de la colonne de phosphocellulose avec 20 volumes sachant que le volume de la colonne est de 200 ml ; soit 4 litres de tampon de la colonne de phosphocellulose concentré 10 X (400 mM NaHPO₄ pH 8, 1 mM EDTA, 1 M NaCl)
- Passage de 2 l de tampon de la colonne de phosphocellulose concentré 1 X (40 mM NaHPO₄ pH 8, 0,1 mM EDTA, 0,1 M NaCl) sur la colonne de phosphocellulose
- Passage de 2 l de tampon phosphocellulose concentré 1 X (40 mM NaHPO₄ pH 8, 0,1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 5% glycérol, 2 mM DTT) sur la colonne de phosphocellulose
- Equilibration de la colonne avec le tampon de la colonne de phosphocellulose concentré 1 X (40 mM NaHPO₄ pH 8, 0,1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 5% glycérol, 2 mM

DTT) en chambre froide, jusqu'à l'équilibre du pH et de la conductivité et détermination du volume mort.

Préparation de l'extrait bactérien

On utilise le stock d'*E. coli* MRE600, présent au laboratoire sous forme congelée pour purifier H-NS. On décongèle 60 g de bactéries et on les resuspend dans 60 ml de tampon de broyage (20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 150 mM de sucrose, 2 mM DTT, 2 pastilles anti-protéase [Roche]). Après homogénéisation, on casse la suspension à la presse de French (3 passages successifs à 1500 Psi (pound per square inch, 1Psi=6894 Pa). On centrifuge les 60 ml de suspension dans 4 tubes pendant 3h30 à 35000 g à 4°C. On récupère le surnageant (75 ml) et on augmente le volume à 375 ml avec du tampon (20 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 2 pastilles anti-protéase). On ajoute 10,95 g de NaCl pour être à 0,5 M. On fait une deuxième étape de purification par précipitation à 40% de sulfate d'ammonium sous agitation à 4°C en contrôlant le pH aux alentours de 8. On centrifuge pendant 20 minutes à 12300 g à 4°C pour récupérer un volume de surnageant équivalent à 400 ml. Dans le but de précipiter la protéine H-NS (avec d'autres protéines) on passe à un pourcentage de 60% en sulfate d'ammonium. On centrifuge de nouveau à 12300 g à 4°C pour éliminer cette fois le surnageant et re-suspendre le culot dans 50 ml de tampon de la colonne de phosphocellulose (40 mM NaHPO₄, 0,1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 5% glycérol, 2 mM DTT). La préparation est dialysée sur la nuit contre 2 litres de tampon de la colonne de phosphocellulose et deux fois une 1h contre 1 litre à 4°C. On centrifuge ensuite pour éliminer les éventuels précipités à 7840 g pendant 20 min, à 4°C.

Passage de l'extrait sur la colonne de phosphocellulose.

On charge l'extrait sur la colonne via une superboucle en utilisant l'AKTA-PRIME comme système de chromatographie liquide. On récupère ce qui est passé sans s'accrocher sur la colonne (le flow through). La colonne est ensuite lavée sur la nuit avec du tampon 1X (40 mM NaHPO₄, 0,1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 5% glycérol) à un débit de 0,5 ml/min avec un volume égal à 10 fois le volume mort de la colonne. Le lendemain on fait un gradient de NaCl (0,1 à 0,8 M) sur un volume de 550 ml et avec un débit proche de 1,8 ml/min, pour éluer les protéines. On suit l'évolution du gradient et l'élution en mesurant la variation de la densité optique et de la conductimétrie en fonction du volume sorti de la colonne. On dépose les fractions d'intérêt sur gel SDS PAGE 13%. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le PageRuler prestained protein ladder plus (Fermentas). Les fractions correspondantes à H-NS sont regroupées.

Passage de l'échantillon sur une colonne monoQ

Pour pouvoir passer l'échantillon sur la colonne monoQ (Tricorn GE Healthcare) on fait une dialyse à l'équilibre dans du tampon monoQ (50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 5% glycérol, 0,1 M NaCl). On centrifuge le dialysat pendant 20 minutes à 7840 g à 4°C. L'extrait est déposé sur la colonne via une superboucle, on récupère ce qui ne s'accroche pas (le flow through) et on élue les protéines fixées grâce à un gradient de NaCl allant de 0,05 M à 0,4 M dans du tampon monoQ, à un débit de 0,7 ml/min. le volume de fraction est de 1 ml. On dépose les fractions qui contiennent la protéine sur gel SDS PAGE 13%. Les fractions contenant H-NS pure sont rassemblées.

Pour tous les dépôts des fractions de H-NS sur gel acrylamide bis acrylamide 13% le volume déposé était de 3 µl+ 3 µl de bleu de charge des protéine 2X (2 g SDS, 20 ml glycérol, 5 mg bleu de Bromophénol

La protéine obtenue a été dialysée à l'équilibre contre du tampon monoQ (50 mM Tris-HCl pH8, 0,05 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5% glycérol) puis contre le tampon de stockage (20 mM Tris pH8, 0,1 M NaCl, 5 mM DTT, 50% glycérol) et gardée à -20°C.

Purification de Ler-his6 sur une colonne d'affinité his-trap.

Expression de la protéine dans la bactérie compétente BL21-Gold(DE3) pLysS

La bactérie BL21-Gold(DE3) pLysS est une bactérie compétente de chez Stratagene. Cette bactérie permet la production des protéines dont l'expression est sous le contrôle du promoteur de la T7 ARN polymérase. Cette souche est déficiente pour la protéase Lon qui peut dégrader les protéines recombinantes. En plus elle est modifiée pour être déficiente pour une autre protéase OmpT. On transforme la bactérie BL21-Gold (DE3) pLysS par le vecteur d'expression PCII (pET+ler_{his6}).

A partir des clones obtenus on lance des précultures de cette bactérie en inoculant plusieurs clones dans 5 ml de milieu LB+ ampicilline+ chloramphénicol (0,1 mg/ml ampicilline, 50 µg/ml chloramphénicol) puis on laisse pousser sous agitation 170 RPM à 37°C. On utilise 20 ml de préculture pour lancer une culture de BL21-Gold(DE3) pLysS exprimant la protéine Ler dans un litre de milieu LB+ ampicilline (0,1 mg/ml). On suit l'évolution de la DO de cette culture toutes les heures et on induit avec de l'IPTG 1mM lorsqu'on est à DO 0,7. On laisse 2 heures à 37°C sous agitation pour l'expression de la protéine.

Préparation de l'extrait protéique Ler

On centrifuge à 3080 g à 4°C et on resuspend le culot dans 15 ml de tampon phosphate 1X (20 mM tampon phosphate, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazole) après avoir ajouté des anti-protéases (deux pastilles, Roche). Ensuite on casse les bactéries par 4 passages successifs à la presse de French à 1500 Psi (pound per square inch, 1Psi=6894 Pa). On centrifuge à 26581 g, à 4°C et on prend le surnageant pour le faire passer sur la colonne d'affinité (His-Trap GE Healthcare). On lave au préalable la colonne avec 5 ml d'eau distillée puis on l'équilibre avec 10 ml de tampon phosphate 1X, 20 mM imidazole. On récupère le flow-through. On lave après la colonne avec 10 ml de tampon phosphate 1X, 20 mM imidazole puis avec 30 fois le volume de la colonne soit 30 ml de tampon phosphate 1X, 70 mM imidazole. L'élution est faite avec un petit gradient de 2 ml de tampon phosphate 1X (70mM imidazole → 400 mM imidazole) suivi du passage du tampon phosphate à 400 mM imidazole jusqu'à l'élution de la protéine. La pureté de la protéine est évaluée sur des gels SDS-PAGE 12 %.

Purification de StpA sur une colonne d'affinité his-trap

Le protocole de purification de StpA_{his6} est similaire à celui de Ler_{his6} avec certaines différences : les bactéries utilisées pour produire StpA sont les Tuner DE3 placI compatible avec le plasmide pBSK_{StpA} dans lequel le gène de StpA est cloné. L'induction se fait pendant 4 h à 1 mM IPTG. L'équilibration de la colonne se fait avec le même tampon que pour Ler mais à 10 mM imidazole.

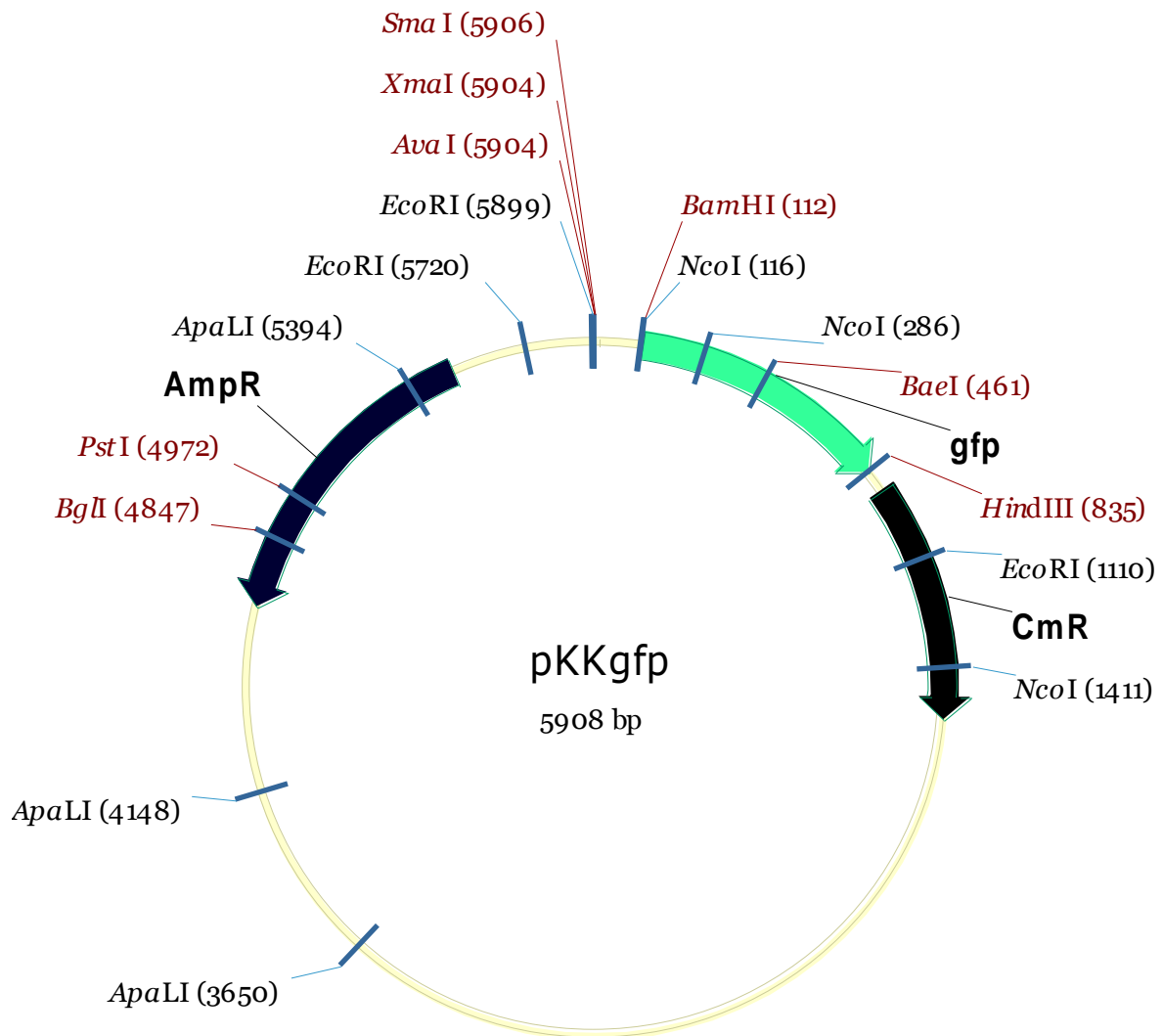


Figure S1 : Représentation du plasmide pKKgfp. Le gène de la GFP a été obtenu par digestion du plasmide pQBIT7GFP(QBIOGENE) par les enzymes BglII et HindIII. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pKK232-8 (Amersham Biosciences, GE Healthcare) qui contient des sites de restriction HindIII et BamHI (dont l'extrémité sortante est compatible avec celle de BglII). Le plasmide résultant est ainsi appelé pKKgfp.

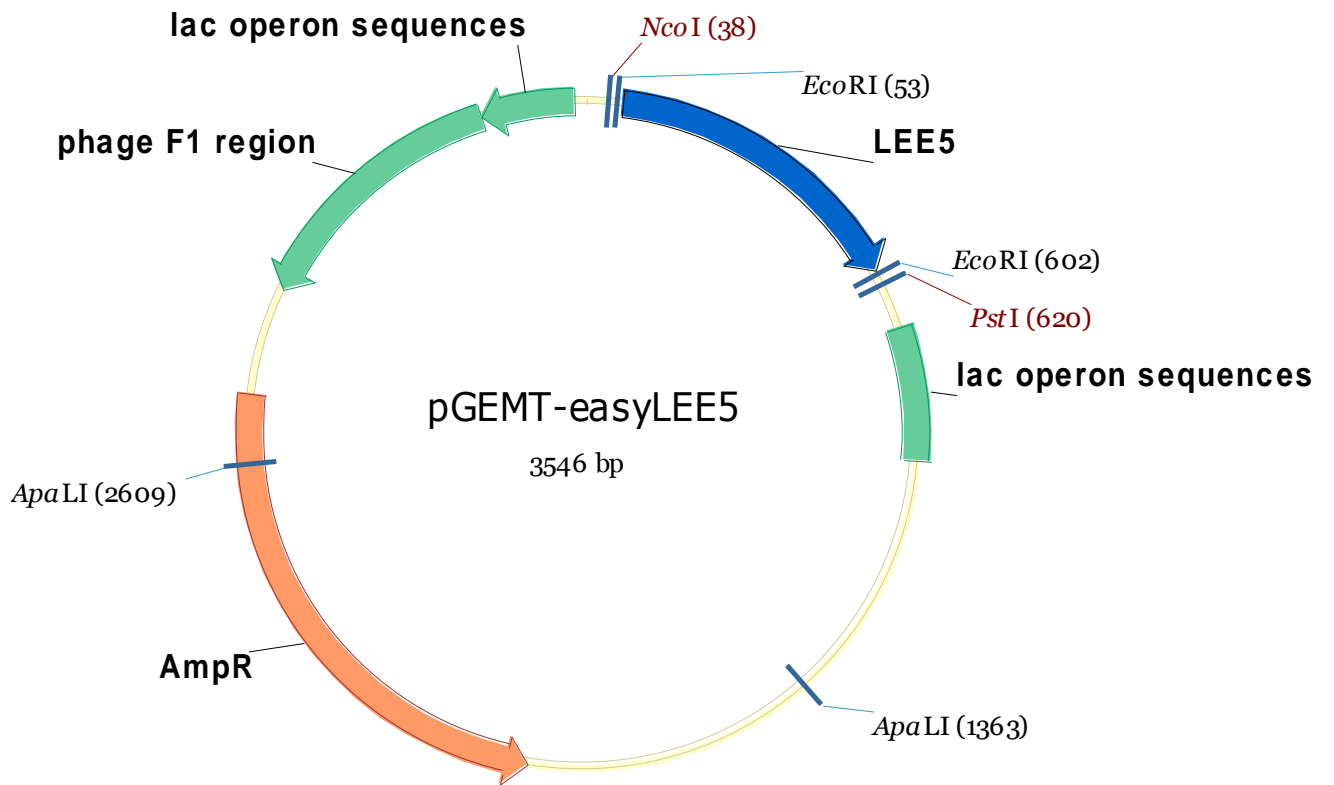


Figure S2 : représentation du plasmide pGEM-Teasy LEE5. Après l'ajout d'une queue polyA au fragment LEE5 obtenu par PCR sur l'ADN génomique de la souche EPEC E2348/69. Ce fragment a été cloné dans le site de clonage multiple du plasmide linéaire pGEM-T Easy.

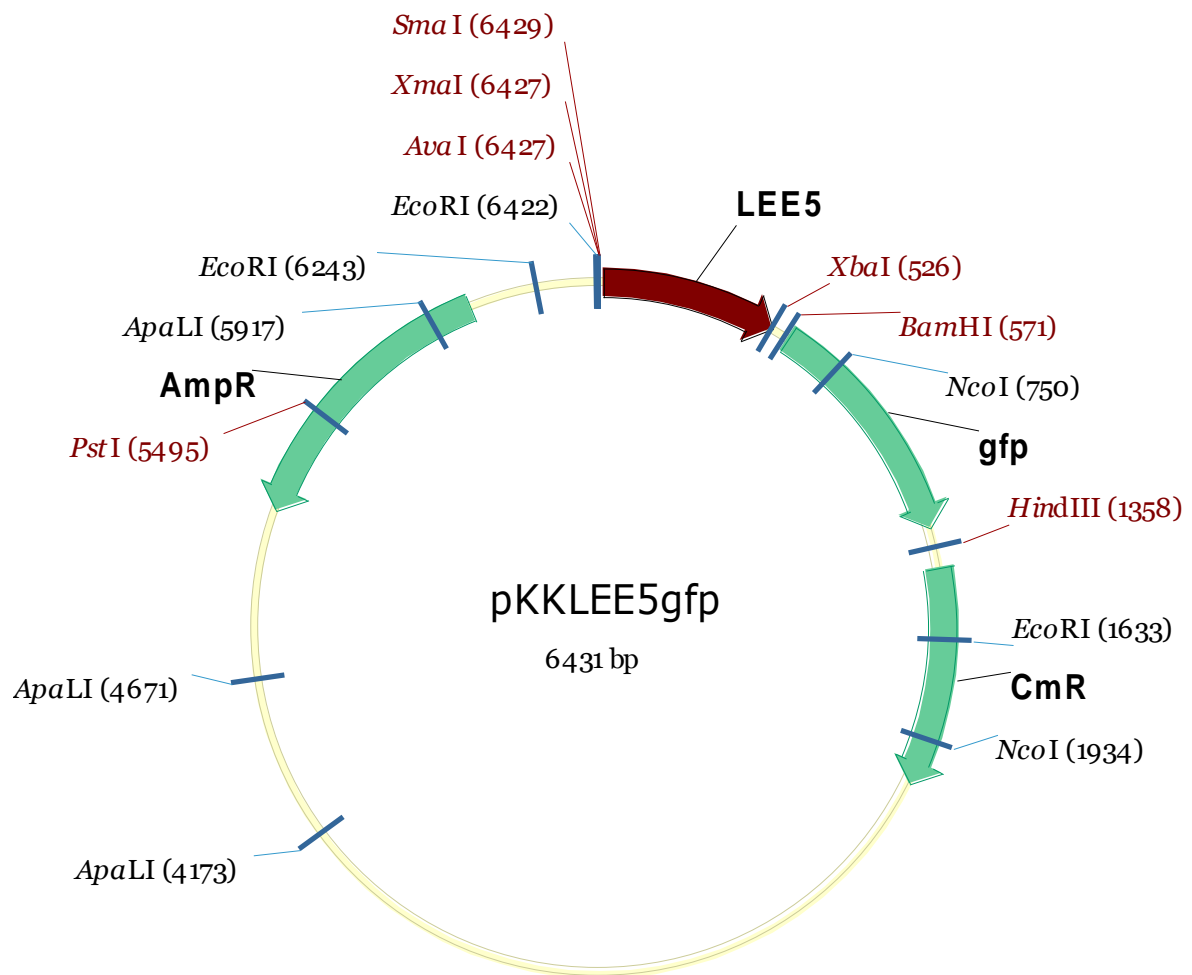


Figure S3 : Représentation du plasmide *pkkLEE5gfp*. Ce plasmide a été obtenu par clonage du fragment LEE5 dans le plasmide *pKKgfp* au niveau des sites *Xma*I et *Xba*I.

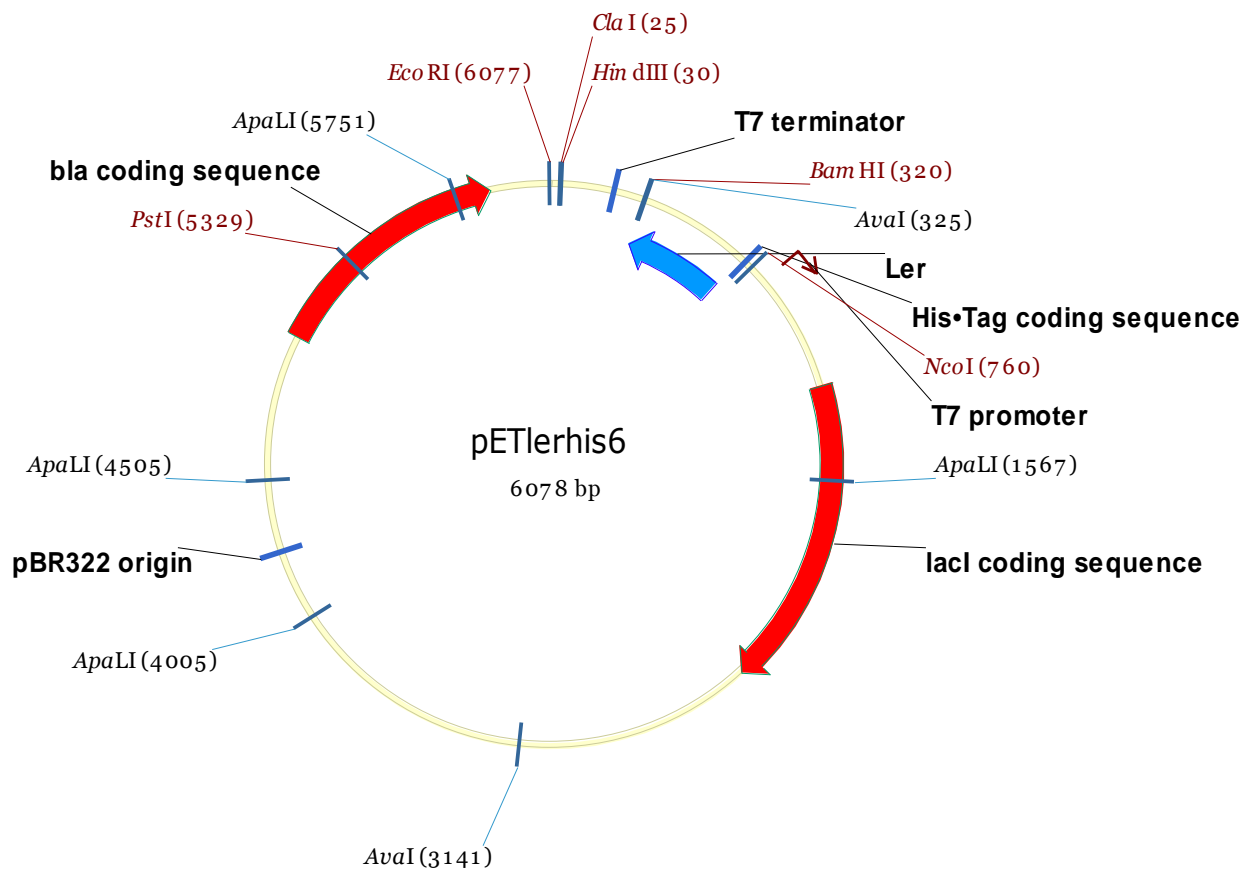


Figure S4 : Représentation de la structure du plasmide pETlerhis₆

Le site de clonage multiple du pET, contenant une séquence codante pour un His-tag, a été utilisé pour cloner le gène de la protéine Ler (représenté en bleu) à produire avec la queue histidine. La production est sous le contrôle du promoteur viral du phage T7.

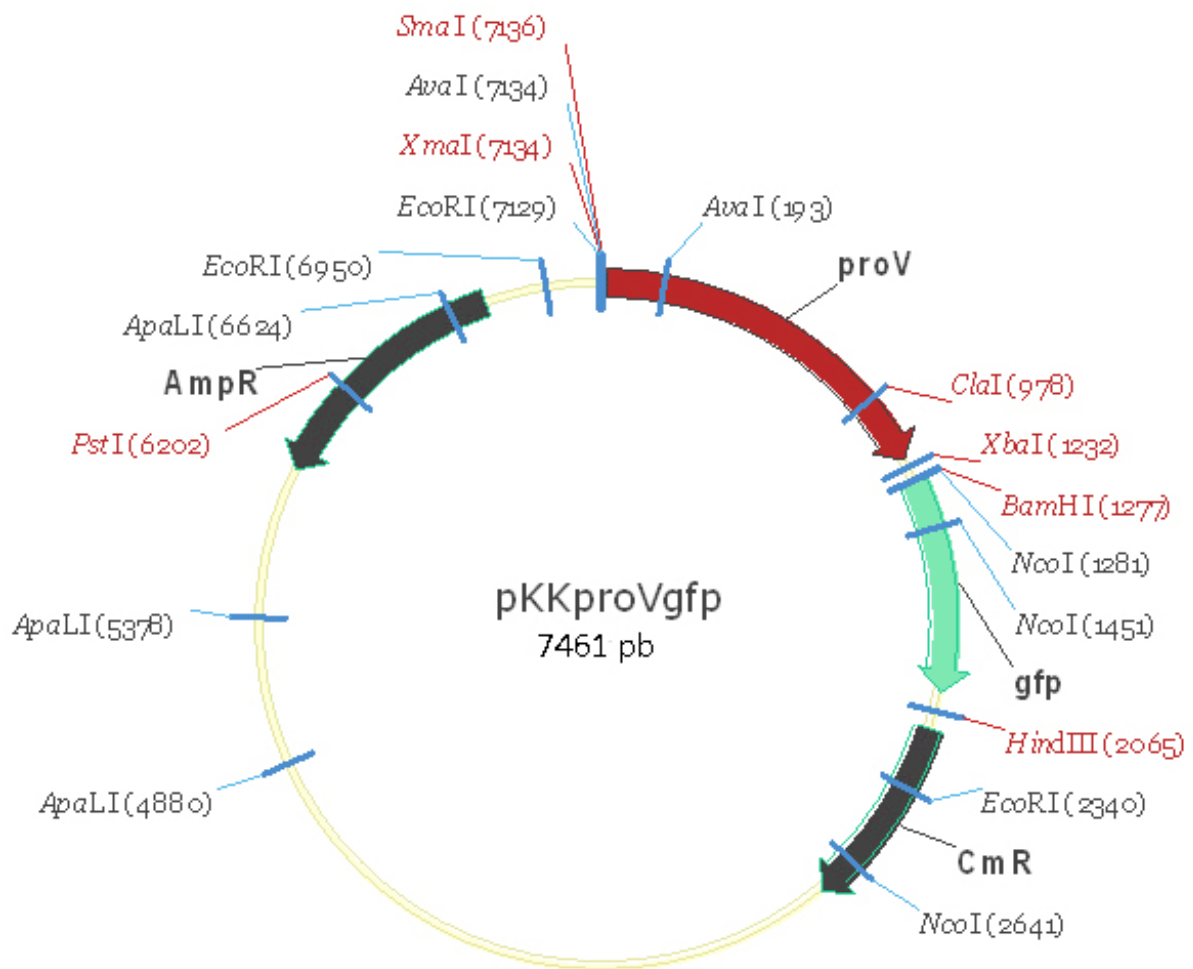


Figure S5 : Représentation de la structure du plasmide pKK*proVgfp*

Le fragment *proV* de 1348 pb qui contient l'ensemble de la séquence régulatrice du promoteur *proU*, est représenté en marron. Il est cloné aux sites de restriction *Xma*I et *Xba*I du vecteur pKK*gfp* pour obtenir le plasmide pKK*proVgfp*. Le gène de la *gfp* est représenté en vert. Ce plasmide contient un codon stop entre *proV* et la *gfp* pour éviter la fusion des deux protéines.

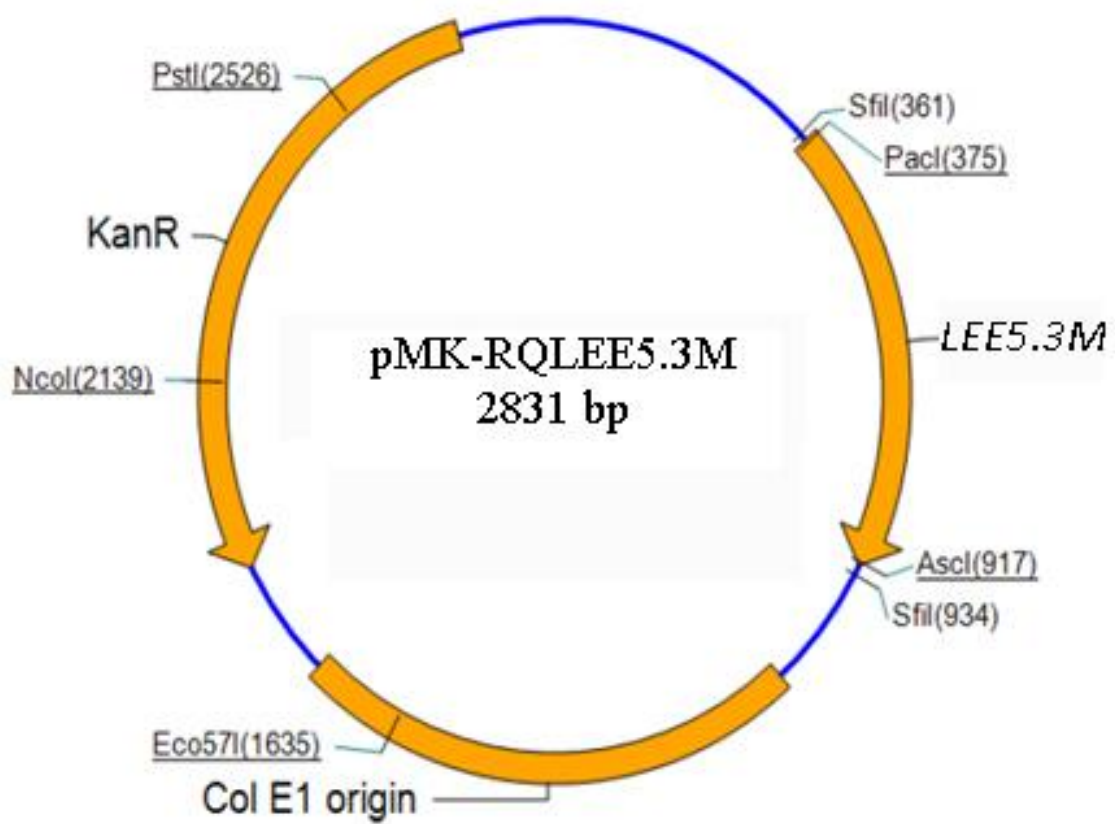


Figure S6 : Représentation du plasmide pMK-RQLEE5.3M. Le fragment *LEE5.3M* est cloné au niveau des deux sites SfiI 361 et 934.

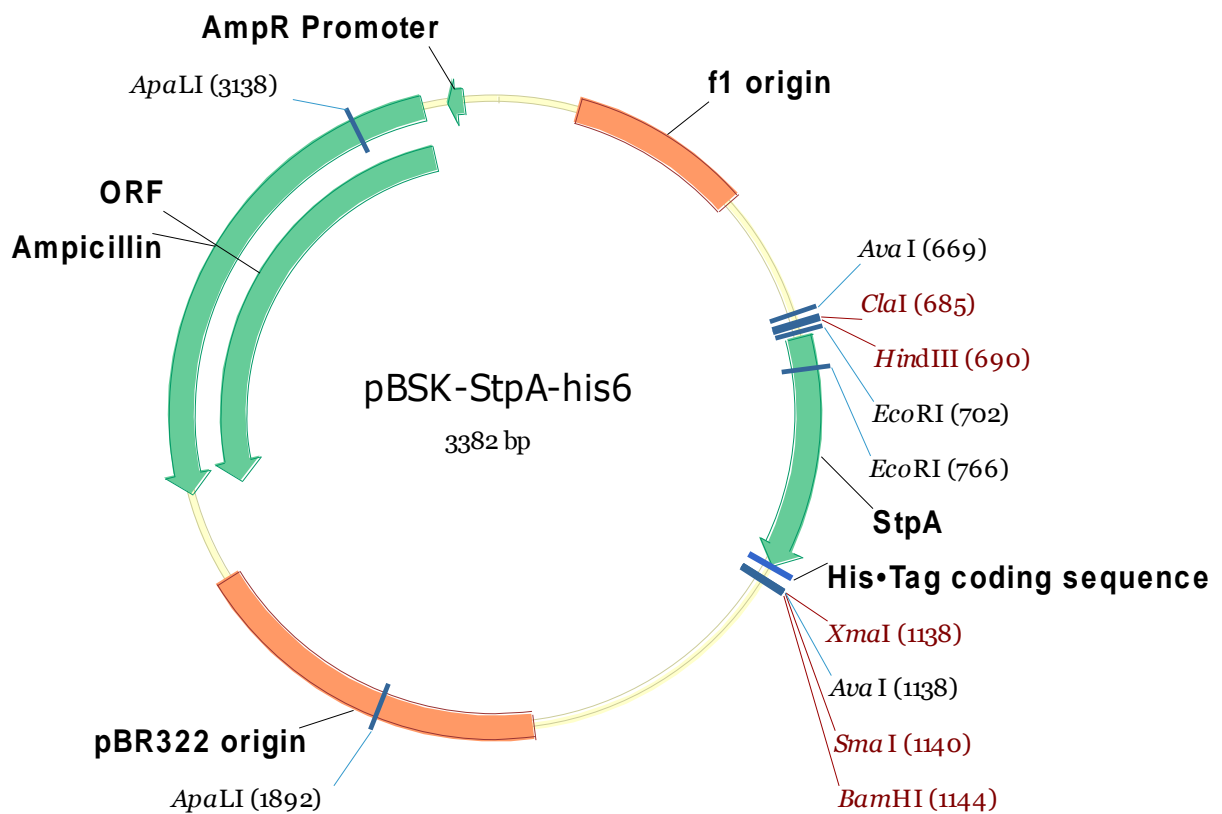


Figure S7 : Représentation du plasmide pBSK*StpAhis*₆. Le site de clonage multiple du pBSK, contenant une séquence codante pour un His-tag, a été utilisé pour cloner le gène de la protéine StpA à produire avec la queue histidine.

Résultats

Chapitre I : étude *in vitro* de l'interaction des protéines H-NS et Ler avec la région promotrice de l'opéron *LEE5* des EPEC

Dans le but de comparer l'interaction de Ler et de H-NS avec l'ADN, nous avons choisi le promoteur *LEE5* qui, parmi les promoteurs du LEE, est celui qui semblait le plus adapté à cette étude : en effet *LEE1* est le promoteur de Ler elle-même, *LEE2* et *LEE3* sont divergents et leurs régions régulatrices sont superposées, *LEE4* est régulé par un mécanisme post-transcriptionnel agissant sur l'ARNm de *LEE4-EspABD* (Roe et al, 2003). Dans un premier temps, nous avons souhaité caractériser si Ler reconnaissait des séquences spécifiques, comme H-NS, et si ces séquences étaient ou non différentes de celles reconnues par H-NS.

Empreinte à la DNaseI sur le promoteur *LEE5*

Analyse à 20°C

Une analyse qualitative de la fixation des protéines H-NS et Ler à 20°C sur le brin codant de la région promotrice de *LEE5* a été réalisée en incubant chacune des protéines à des concentrations croissantes avec un fragment comprenant la région allant de -20 à -199 du promoteur *LEE5* (figure 15). Pour H-NS, les empreintes sont d'abord observées comme des sites discrets, et finissent par se rejoindre lorsque la concentration augmente, induisant une protection quasi totale du fragment. C'est ce que l'on voit dans les voies k et l du gel. Pour caractériser les sites il faut analyser la voie e qui correspond à 30 nM de protéine incubée avec le fragment. H-NS occupe des sites qui sont quasiment contigus tout au long du fragment: la séquence du promoteur *LEE5* est particulièrement riche en AT et permet une fixation d'un nombre élevé de H-NS. Si on compare cette empreinte avec celle obtenue pour Ler, on voit que cette dernière occupe globalement les mêmes positions qu'H-NS dans la partie du fragment comprise entre -180 et -100. En amont de -180, H-NS continue à se fixer à l'ADN alors que Ler s'arrête.

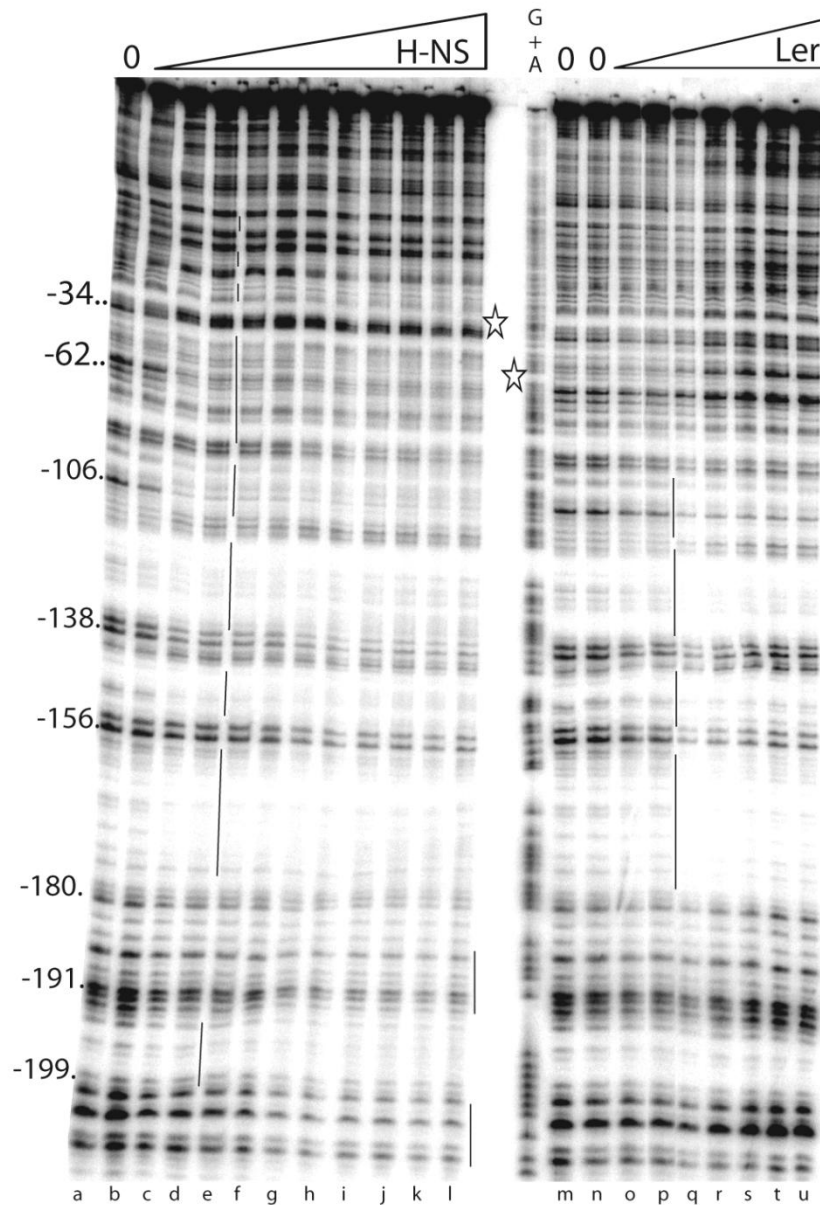


Figure 15 : Empreintes à la DNaseI des protéines H-NS et Ler sur la région promotrice du promoteur LEE5 à 20 °C. le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 20°C en absence de protéines (piste a, m et n) ou en présence de concentrations croissantes de protéines H-NS (piste b à l, respectivement 5, 15, 25, 30, 50, 100, 125, 150, 200, 250 et 300 nM) ou Ler (piste o à u, respectivement 5, 30, 50, 125, 150, 200 et 300 nM). Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont été migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). La piste notée G+A correspond aux produits de séquençage des A et des G du brin analysé selon le protocole de Maxam-Gilbert. Les sites de fixation de la protéine H-NS ou Ler protégés de l'attaque à la DNaseI sont indiqués par les barres noires et les hyperactivités dues à H-NS ou Ler par des étoiles

Par contre des différences dans la fixation des deux protéines sont observées lorsqu'on s'approche de la région promotrice proprement dite (-35, -10) où les interactions de Ler et

de H-NS avec l'ADN induisent des profils d'attaque par la DNaseI qui sont différents. En effet dans la région qui s'étend de -62 à -53 H-NS protège l'ADN de la coupure par la DNaseI tandis que Ler favorise cette coupure, ce qui se traduit par l'apparition de bandes hyperréactives à la DNaseI au fur et à mesure que la concentration de Ler augmente. Plus proche de la boîte -35, H-NS, crée une hyperréactivité en position -34 qui n'est pas observée en présence de Ler (les hyperréactivités sont indiquées par une étoile sur la figure). La DNaseI étant sensible à la taille du petit sillon ces hyperréactivités correspondent généralement à des courbures de l'hélice d'ADN qui sont le résultat d'un changement dans la structure locale due à la fixation des protéines.

On observe également une différence dans l'affinité des deux protéines pour l'ADN. Si on prend le site centré sur -106 on observe une empreinte avec H-NS à partir d'une concentration de 15 nM (piste b). Cette empreinte n'est observée qu'à partir de 50 nM de Ler (piste q), donc à une concentration 3,5 fois plus grande que celle de H-NS. H-NS semble donc avoir globalement une affinité meilleure que Ler mais nous avons noté que si l'affinité de H-NS pour l'ADN est très reproductible, celle de Ler dépend du lot de protéine utilisée. Ler s'est avérée être une protéine plus difficile que H-NS à manipuler quand à la fiabilité de sa production et de son activité. N'ayant pas de mesure de l'activité spécifique de chaque protéine, nous en déduisons simplement que l'ordre de grandeur de leurs affinité n'est pas différent.

H-NS possède une séquence consensus de reconnaissance de l'ADN. Nous avons identifié les sites présentant cette séquence sur le promoteur *LEE5* à l'aide du logiciel "virtual footprint" où la matrice du logo d'H-NS est présente. Le site le plus proche de ce consensus est situé à une position centrée à +15, soit sur la boîte de Pribnow du promoteur (qui est difficilement observable sur ce gel), et le deuxième site plus affin est centré à -110. L'empreinte de H-NS y est observée entre 5 et 15 nM, tandis qu'aux positions centrées sur -138 et -158 l'empreinte est visible dans la voie à 100 nM (piste f). Une étude quantitative de la fixation de H-NS au niveau de ces 3 sites a été réalisée (Figure 16). Les constantes de dissociation mesurées sont de 5 nM, 25 nM et 50 nM pour les sites -106, -138 et -158 respectivement. Ceci suggère, que dans ces conditions expérimentales, H-NS se sert de la position -106 (et sans doute de la position +15) comme sites de nucléation pour ensuite se fixer sur des sites à plus basses affinités afin d'occuper la région promotrice de *LEE5*.

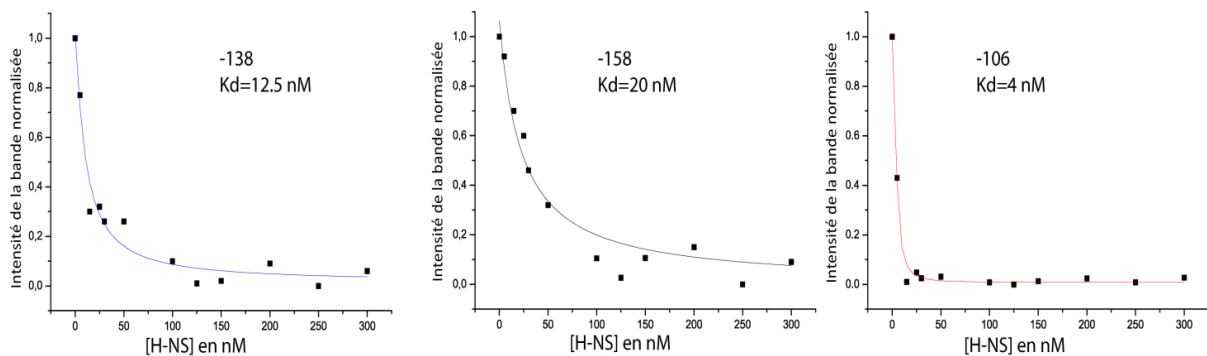


Figure 16 : Etude quantitative à 20°C de la fixation de H-NS sur la région promotrice de *LEE5* en 3 positions différentes. Les positions des bandes quantifiées sont indiquées en haut de la figure à droite avec la valeur de la constante de dissociation. Les bandes sont quantifiées par densitométrie avec le logiciel Image Quant, sur le gel représenté dans la figure 15 ainsi que sur une expérience similaire non présentée. L'intensité normalisée de chaque bande est rapportée en fonction de la concentration de H-NS en (nM). L'extinction progressive d'une bande, en fonction de l'augmentation de la concentration en protéine, témoigne de la disparition du fragment correspondant de la population des produits de digestion de la DNaseI, et donc de l'occupation du site par la protéine. Les bandes -106, -138 et -158 toutes protégées de l'attaque à la DNaseI sont quantifiées. Une première approximation de la courbe est obtenue de l'équation 1 :

$$\text{Intensité brute (résultats d'ImageQuant)} = U + (L - U) * \frac{(k_a^n * x^n)}{(1 + k_a^n * [H-NS]^n)}$$

Avec n : indice de Hill, $k_a = 1/k_d$ la constante d'équilibre d'association, U : l'intensité la plus élevée d'une bande sur la courbe de fit et L : l'intensité la plus faible d'une bande sur la courbe de fit. Cette équation permet la détermination des valeurs de U et L ce qui permet de normaliser les données entre 0 et 1. Les valeurs normalisées sont introduites dans l'équation ci-dessous qui décrit une courbe de saturation par une fixation coopérative :

$$\text{Intensité normalisée} = \frac{n(k_a^n * [H-NS]^n)}{1 + n(k_a^n * [H-NS]^n)}$$

Pour observer ce qui se passe à l'autre extrémité du promoteur, j'ai réalisé des attaques sur le brin non codant à 20°C (Figure 17). A nouveau on observe des sites distincts pour H-NS qui sont très proches les uns des autres de +30 à +135 (comparer voie e avec la voie f). Au delà d'une concentration à 100 nM, H-NS commence à protéger de façon globale le fragment. Si on regarde Ler (voies m à y) on observe que de ce côté du promoteur H-NS et Ler partage aussi les mêmes sites d'empreintes (comparer les voies r et s avec e et f). Au delà de 250 nM, Ler, comme H-NS, protège progressivement et globalement le fragment. L'empreinte des deux protéines s'arrête en position +135.

Par contre, vers la région promotrice, entre +53 et le haut du gel on retrouve l'hyperréactivité de H-NS autour de la position -34 sur ce brin ainsi que d'autres aux positions +1, +30 et +53. En effet si on compare les voies q et r ou s avec f et g, ou h on voit que les hyperréactivités en positions +1, +30 et +53 sont communes aux deux protéines mais que Ler a des positions hyperactives différentes de celles de H-NS en amont de -32. On retrouve donc des différences entre les hyperréactivités créées par Ler et celles créées par H-NS. La figure 25 (page 101) résume l'interaction de H-NS et Ler avec la séquence promotrice de l'opéron LEE5 sur le brin codant et non codant.

Nous notons aussi qu'à partir de la voie u (300 nM de Ler) l'ensemble du fragment est très protégé avec une atténuation notable des hyperréactivités et que ceci est plus marqué pour Ler que pour H-NS (comparer u et l).

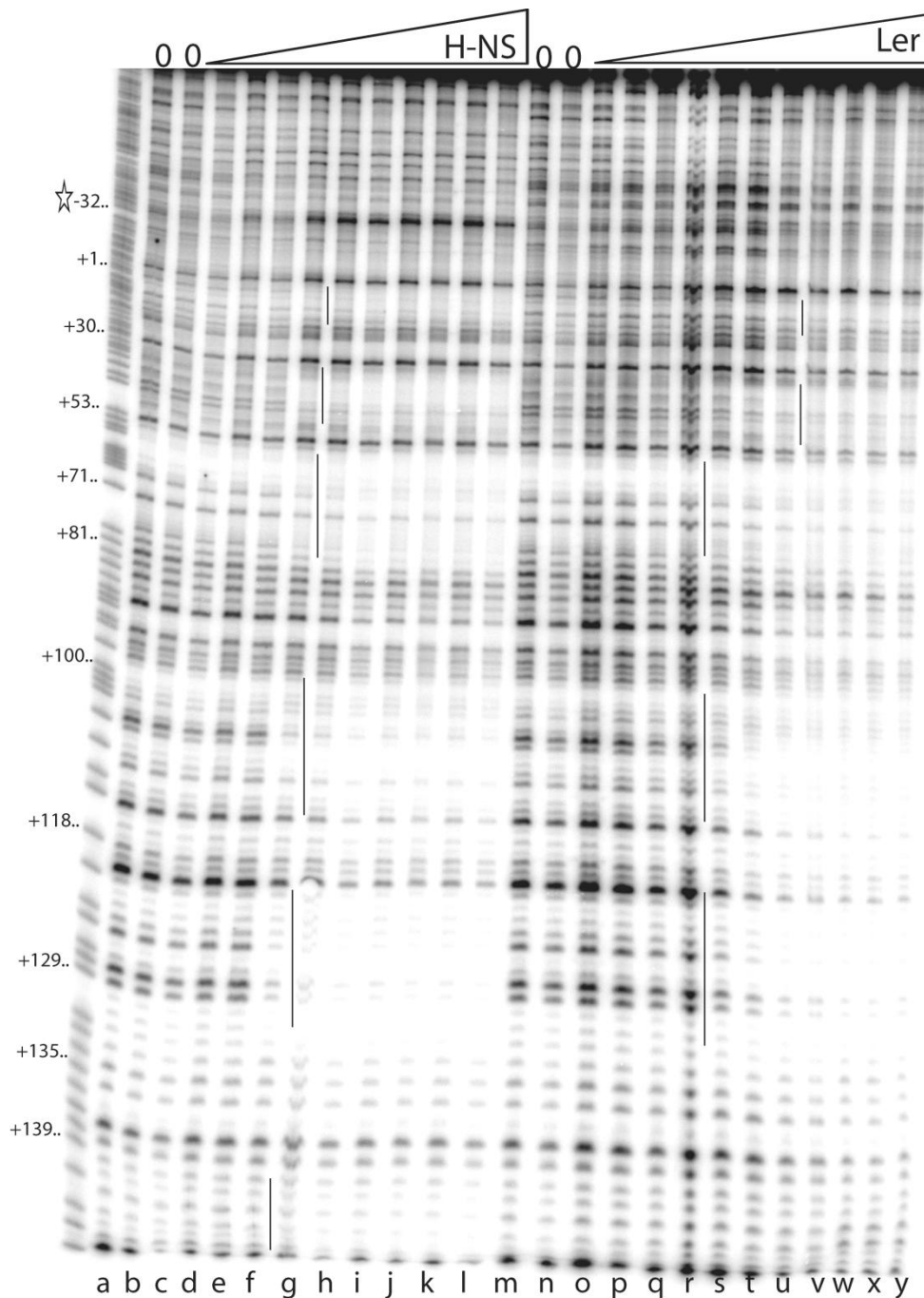


Figure 17: Empreintes à la DNaseI des protéines H-NS et Ler sur la région promotrice du promoteur LEE5 à 20 °C. le fragment radiomarqué en 5' du brin non codant a été incubé à 20°C en absence de protéines (piste a, b, m et n) ou en présence de concentrations croissantes de protéines H-NS (piste c à l, respectivement 5, 15, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 et 400 nM) ou Ler (piste o à y, respectivement 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 1000 et 2000 nM). Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). La piste notée G+A correspond aux produits de séquençage des A et des G (réaction de Maxam-Gilbert). Les sites de fixation de la protéine H-NS ou Ler protégés de l'attaque à la DNaseI sont indiqués par des barres noires et les hyperréactivités par des étoiles.

Analyse à 37°C

Nous avons entrepris ensuite l'étude de la fixation de ces deux protéines à 37 °C, température à laquelle la fixation de H-NS est moins coopérative (Bouffartigues et al, 2007) et température à laquelle l'activation du promoteur *LEE5* par Ler a lieu en conditions physiologiques d'infections de cellules intestinales par les EPEC. Les résultats expérimentaux sont représentés dans la figure 18. Nous observons que l'empreinte de H-NS à 37°C sur les régions allant du -180 jusqu'à -138 sont quasiment invisibles des voies d-m. A 20°C les sites de fixation distincts étaient décelables entre 50 et 75 nM de H-NS. Par contre le site à -106 continue à être reconnu même à cette température ce qui confirme son rôle de site de nucléation pour H-NS. Nous observons aussi que l'hyperréactivité en position -34 est très peu affectée par le changement de température. En ce qui concerne la fixation de Ler, bien que nous observions une affinité apparemment meilleure (protection dès 25 nM voie p au lieu de 50 nM à 20°C), la protection de Ler s'avère être globalement non spécifique et on ne distingue pas des sites séparés. Cette affinité apparemment meilleure est dans ce cas certainement attribuable aux variations que nous avons observées dans les différentes préparations de protéines.

Ces résultats confirment l'effet de la température sur la fixation d'H-NS. Sur le promoteur *proU* (Bouffartigues et al, 2007), à 37°C, une fixation seulement au site consensus avec perte de la coopérativité a été observée. Dans le cas de *proU*, il faut noter que cet effet *in vitro* ne correspond pas à une régulation *in vivo* du promoteur par la température.

En résumé nous concluons que les changements observés ici entre les fixations de Ler et de H-NS à 20 et à 37°C sont en faveur d'une moins bonne fixation de H-NS mais aussi d'une apparente perte de spécificité de Ler. La régulation ne se fait sans doute pas par le seul effet du changement de température sur la fixation de deux protéines.

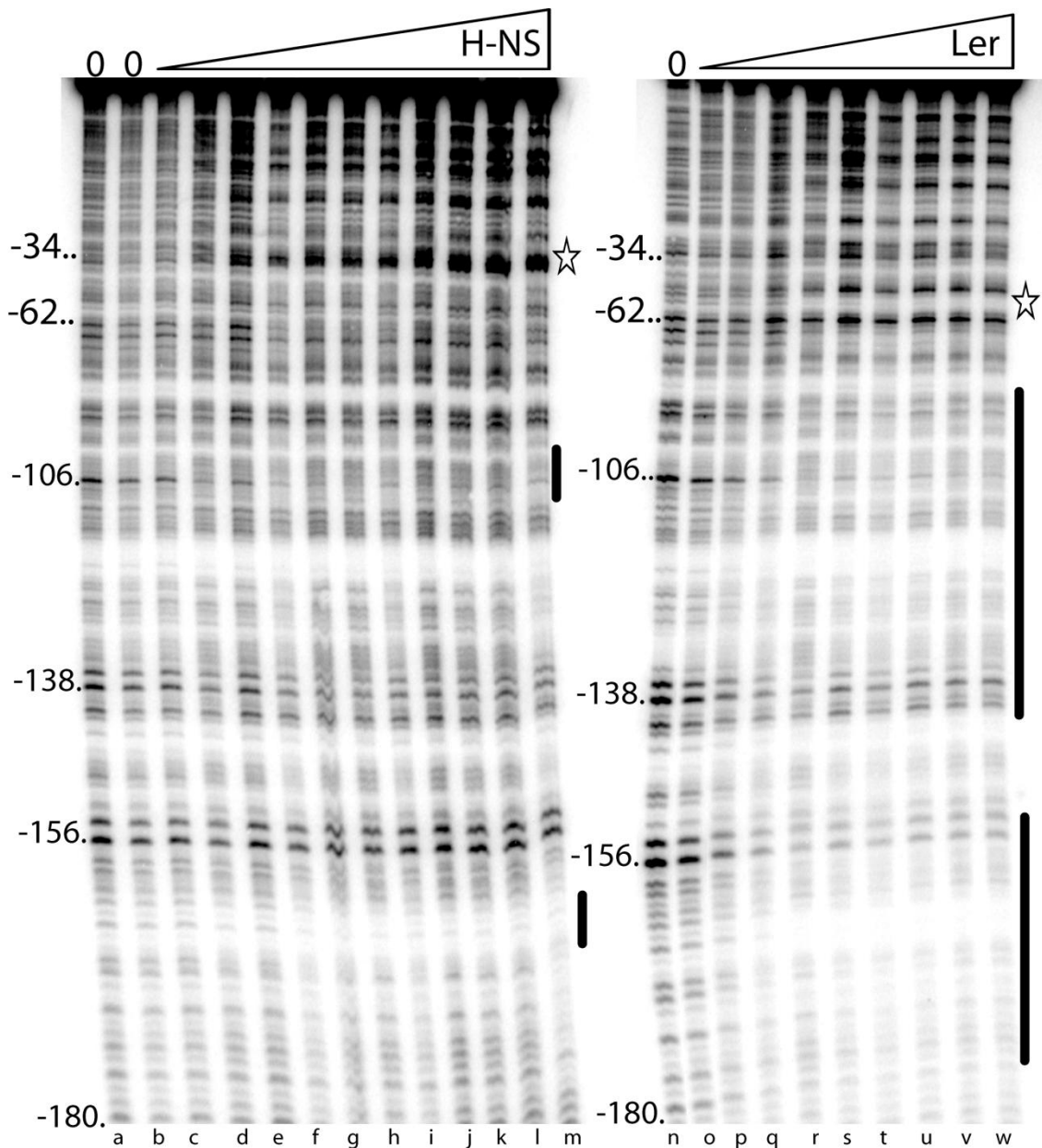


Figure 18 : Empreintes à la DNaseI des protéines H-NS et Ler sur la région promotrice du promoteur LEE5 à 37 °C.

le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 37°C en absence de protéines (piste a, b et n) ou en présence de concentrations croissantes de protéines H-NS (piste c à m, respectivement 5, 15, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 et 500 nM) ou Ler (piste o à w, respectivement 5, 25, 75, 100, 125, 150, 200, 300 et 500 nM). Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont été migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine H-NS ou Ler protégés de l'attaque à la DNaseI sont indiqués par les barres noires et les hyperréactivités dues à H-NS ou Ler par des étoiles.

Analyse dans le tampon "stiffening"

Nous avons donc observé de sites de fixations identiques pour les deux protéines mais une différence dans la structure du complexe nucléoprotéique formé à travers les empreintes à la DNaseI. Une des particularités des complexes de H-NS avec l'ADN est la formation de structure où la protéine pontait des doubles brins. La composition du tampon que nous utilisons pour incuber H-NS avec le fragment LEE5 marqué contient 60 mM de K^+ et 8 mM de Mg^{2+} . Selon Liu et al ces conditions favorisent le mode de pontage de l'ADN par fixation de H-NS en « Bridging mode », c'est à dire que H-NS se positionnerait pour assembler deux doubles hélices d'ADN. Nous avons décidé de tester la fixation de H-NS sur LEE5 dans des conditions différentes, avec le tampon nommé par les mêmes auteurs « stiffening » qui permettrait à la protéine de rigidifier l'ADN sans faire les pontages. L'effet du changement du mode de fixation de H-NS sur les empreintes et les hyperréactivités déjà caractérisées pour H-NS sur LEE5 est illustré dans la figure 19. L'analyse de ce gel indique que le changement du tampon de H-NS sur LEE5 n'a pas un effet significatif sur les sites d'empreintes ou sur l'hyperréactivité de H-NS en position -34. On distingue toujours la différence d'affinité entre les sites (comparer la disparition à -62 et à -106).

En conclusion si le mode de fixation est modifié par le type de tampon et que l'on induit plus de pontage inter hélice dans un cas que dans l'autre, cette différence n'a pas d'effet significatif sur les premières étapes de fixation de la protéine sur la séquence, et donc sur le mécanisme de reconnaissance qui procède à partir d'un site de nucléation. Pour tester ces conditions par une technique qui va prendre en compte la forme globale du complexe ADN/protéine, j'ai réalisé des retards sur gel sur des fragments de LEE5 de tailles différentes en présence de H-NS ou de Ler dans l'un ou l'autre des tampons (figure 20).

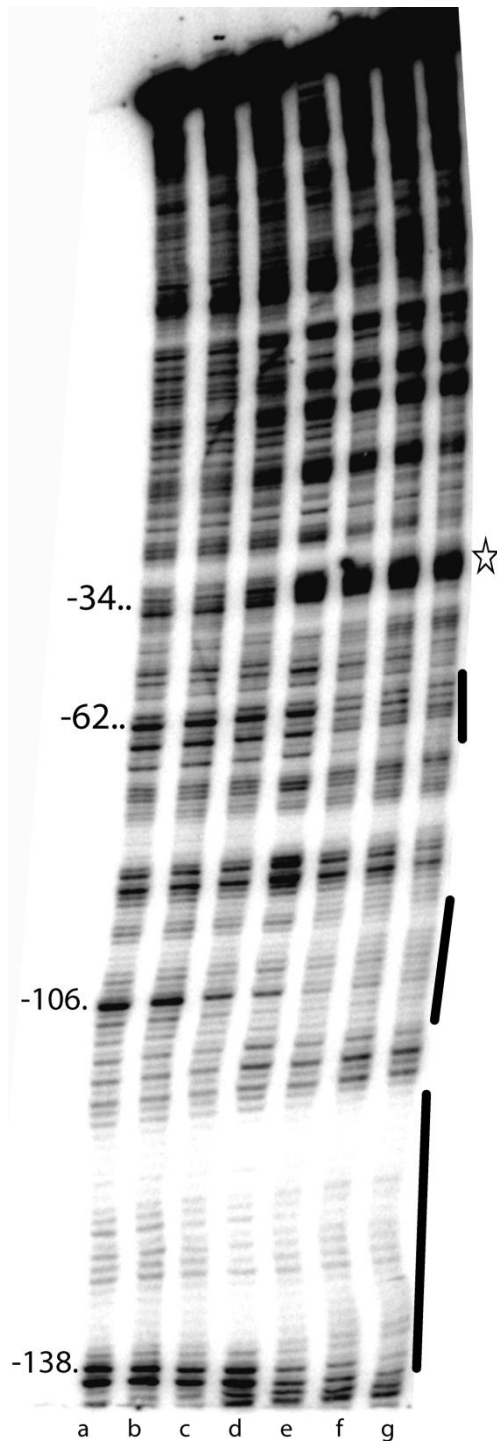


Figure 19 : Empreinte à la DNaseI de la protéine H-NS sur la région promotrice de *LEE5* à 20°C dans le tampon de « Stiffening » (Liu et al ; 2010)

Le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 20°C en absence de protéines (piste a, b) ou en présence de concentrations croissantes de protéines H-NS (piste c à g, respectivement 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 300 nM). Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine H-NS protégés sont indiqués par des barres noires et les hyperréactivités par une étoile.

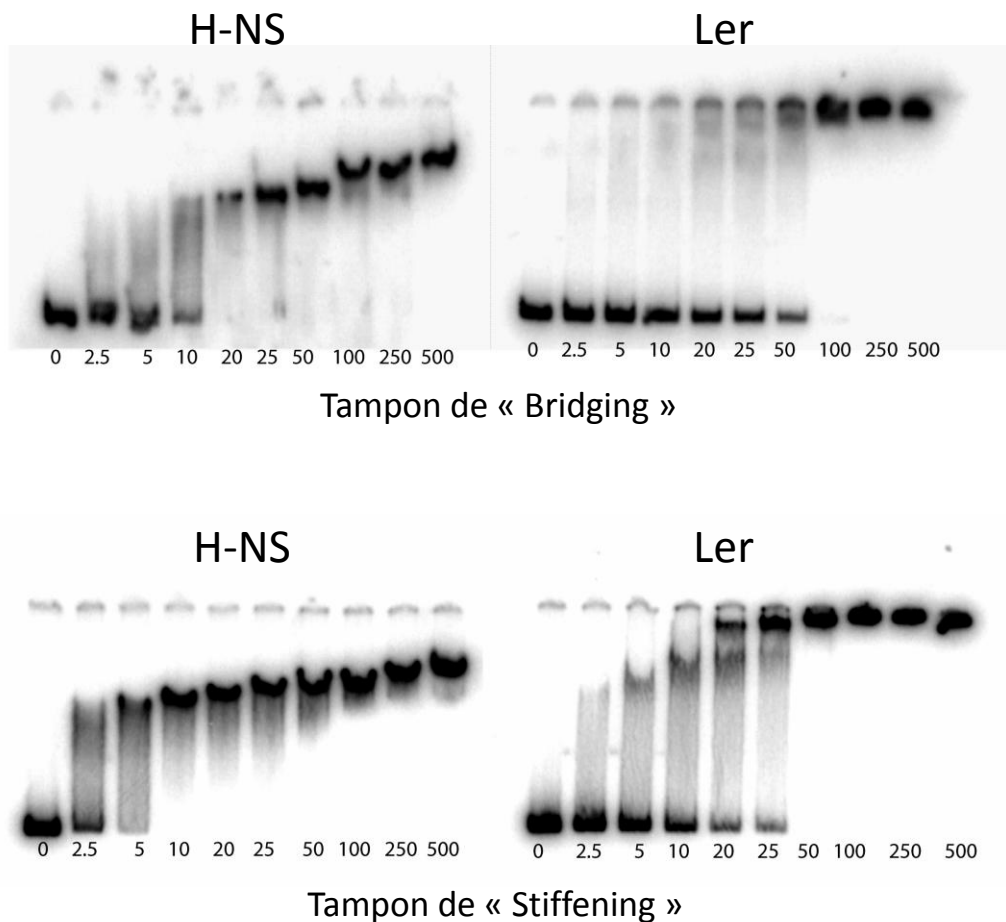


Figure 20 : retard sur gel sur le grand fragment de LEE5 (-250, +270) marqué en présence de H-NS ou de Ler dans le tampon de « Bridging » (en présence de Mg^{2+}) ou bien dans le tampon de « Stiffening » (en absence de Mg^{2+}). Les chiffres au dessous de la figure indiquent la concentration de H-NS ou de Ler en nM. Le tampon utilisé est indiqué sous chaque figure.

En comparant tout d'abord la fixation de H-NS et de Ler sur *LEE5* dans le tampon classique de « Bridging » (le même que celui utilisé pour les expériences d'empreintes) on remarque que la nature des complexes formés entre H-NS/*LEE5* et Ler/*LEE5* n'est pas la même. En effet, les complexes formés avec Ler sont retardés d'une manière plus accentuée que ceux formés avec H-NS à la même concentration (ex : concentration à 25 nM). De plus à partir de 50 nM de Ler les complexes sont très agrégés et n'entrent plus dans le gel ce qui n'est pas le cas avec H-NS. En comparant l'affinité de ces deux protéines pour le fragment *LEE5* entier on retrouve le même facteur (~ 4 entre H-NS et Ler) déjà calculé par les expériences

d'empreinte (la constante de dissociation de H-NS est de l'ordre de 5 nM, celle de Ler de l'ordre de 20 nM). Ces quantifications sont présentées dans la figure 21.

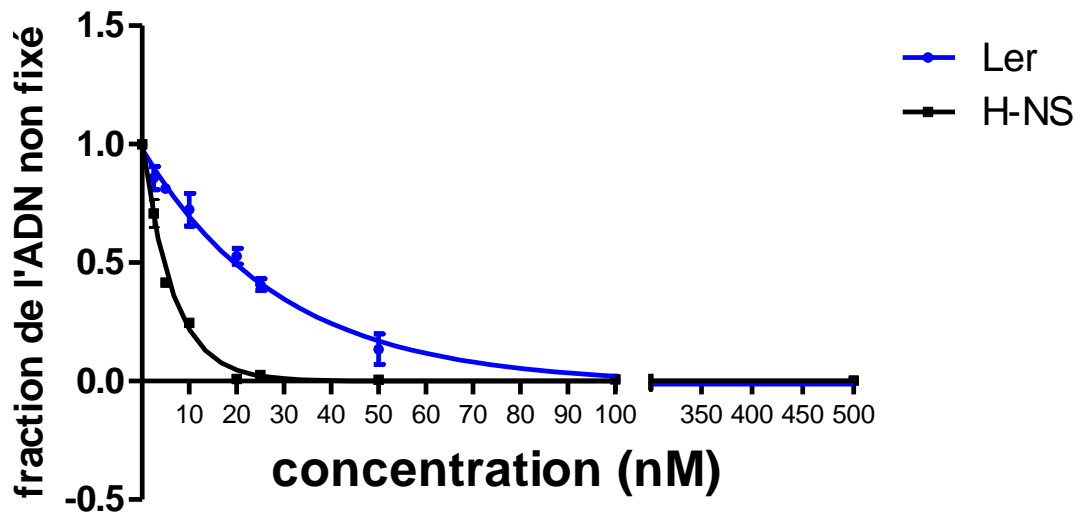


Figure 21 : Quantification des retards sur gel de H-NS et de Ler sur le grand fragment *LEE5*. L'intensité brute de la bande non retardée est normalisée par rapport à l'intensité de la bande correspondante dans la voie où il n'y a pas de protéines. Les barres d'erreurs représentent la variation entre 3 expériences indépendantes.

Le changement du tampon de « Bridging » en tampon de « Stiffening » n'a pas d'effet sur le temps de migration (donc la compaction globale) des complexes formés avec H-NS ou avec Ler. On peut cependant noter une stabilisation (moins de trainées, signe que les complexes se réorganisent pendant le temps de migration) et une apparente augmentation de l'affinité pour les deux protéines. Cependant ce tampon contient beaucoup moins de sel et ce phénomène n'est donc pas inattendu. Les complexes formés avec Ler sont toujours plus retardés (Figure 20).

Les complexes formés avec Ler à haute concentration (au-delà de 50 nM) sont très agrégés et n'entrent plus dans le gel. Nous avons décidé de vérifier si ceci est dû à la protéine ou bien si la région choisie du promoteur est elle-même importante. Pour ceci des retards sur gels sur un fragment plus court de *LEE5* et contenant moins de sites consensus pour H-NS

ont été réalisés en présence de H-NS et de Ler dans les tampons de "Bridging" et de "Stiffening". Il s'agit du fragment *LEE5* allant du -80 jusqu'à +103 (Figure 22).

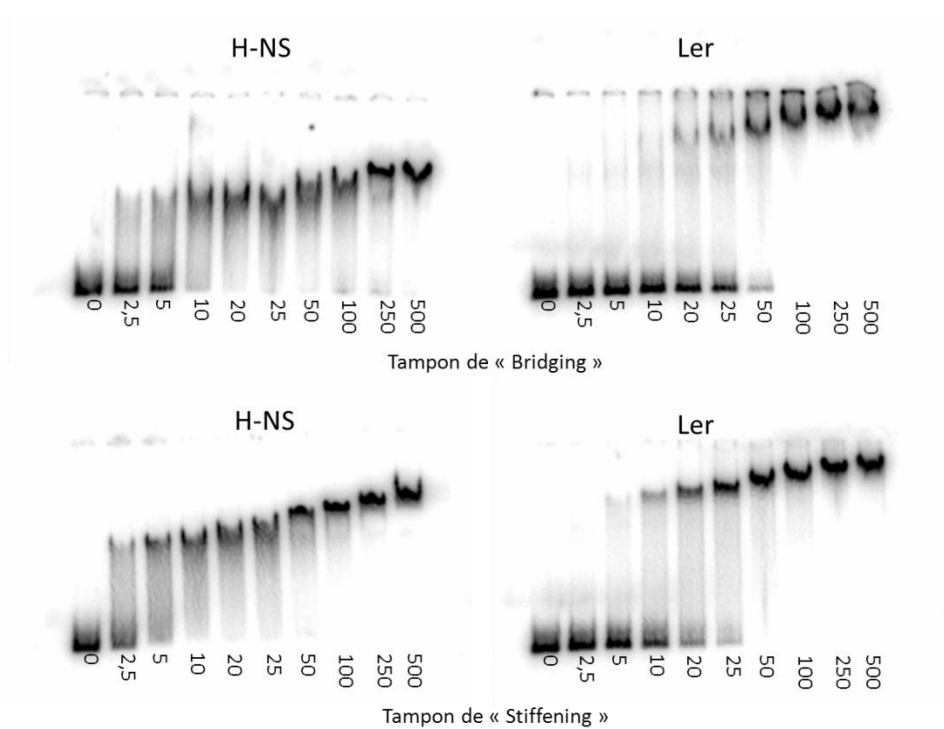


Figure 22 : retard sur gel sur le petit fragment de *LEE5* (-80, +103) marqué en présence de H-NS ou de Ler dans le tampon de « Bridging » (en présence de Mg^{2+}) ou bien le tampon de « Stiffening » (en absence de Mg^{2+}). Les chiffres au dessous de la figure indiquent la concentration de H-NS ou de Ler en nM. Le tampon utilisé est indiqué sous chaque figure.

Comme on peut le voir sur la figure 22, de même que pour le grand fragment, les complexes formés avec Ler sont aussi plus retardés dans le gel que ceux formés avec H-NS, mais entrent cette fois-ci dans le gel jusqu'à la plus haute concentration de Ler. Ceci montre que la taille du complexe nucléoprotéique dépend de la taille du fragment et non pas seulement de la taille des agrégats de protéine. Nous pouvons ainsi écarter le fait que les complexes n'entrent pas dans le gel juste parce que la préparation de protéine est agrégée. Cette observation suggère que la migration lente des complexes avec Ler n'est pas un artéfact. L'affinité de H-NS pour ce petit fragment de *LEE5* est toujours plus élevée que celle de Ler.

L'effet du changement du tampon est le même que sur le grand fragment de LEE5, c'est-à-dire une légère augmentation de l'affinité des deux protéines. En conclusion nous ne voyons pas de différence nette entre les aspects en gel de retard des complexes dans l'un ou l'autre de ces tampons, seulement une différence d'affinité qui est sans doute due au changement de concentration en sel. Le fait que H-NS fasse ou non des pontages n'est donc pas sensible dans ce type d'expérience ou alors, ces tampons ne permettent pas de favoriser suffisamment l'une ou l'autre forme pour que nous l'observions sur ce type de fragment linéaire.

Analyse de la région de démarrage de la transcription en empreintes

D'après les empreintes à la DNaseI sur le grand fragment de LEE5, les différences existant pour l'interaction de H-NS et de Ler avec LEE5 résident surtout dans la région de reconnaissance de l'ARN polymérase proche du +1 d'initiation de la transcription. Pour avoir une meilleure résolution dans cette région promotrice, nous avons décidé de refaire les attaques à la DNaseI sur le petit fragment LEE5 (184pb), centré sur le site de nucléation en position +15. Les résultats sont montrés dans la figure 23. On voit qu'H-NS et Ler induisent la formation d'une bande hyperréactive à la DNaseI en position +60, suivi d'une empreinte centrée à +46. En position +35 Ler fait une empreinte tandis que H-NS provoque une hyperréactivité. Entre +34 et +27 H-NS et Ler font des empreintes. En position +15 là où est centré le site de haute affinité de H-NS les deux protéines font une empreinte.

Nous avons noté que dans la région entourant le +1, et seulement là, le profil de la coupure à la DNaseI du fragment LEE5 bien qu'atténué, diffère selon la protéine qui est présente, H-NS ou Ler. Cette différence est visible entre +35 et -16 et a été analysée plus finement en faisant un profil densitométrique de cette région du gel (Figure 24). La DNaseI est sensible à la taille du petit sillon et ces différences doivent traduire des différences de structure fine de l'ADN, induites par chacune de ces protéines: la différence entre les des deux profils est plus importante à +35, +5 et -16 mais est présente sur toute la région. On peut en déduire que les deux protéines induisent une différence de contrainte structurale sur la partie du promoteur qui est soumise à l'ouverture par la polymérase et qui correspond aux régions

contactées par les sous unité β et β' dans le processus d'isomérisation du complexe fermé vers le complexe ouvert.

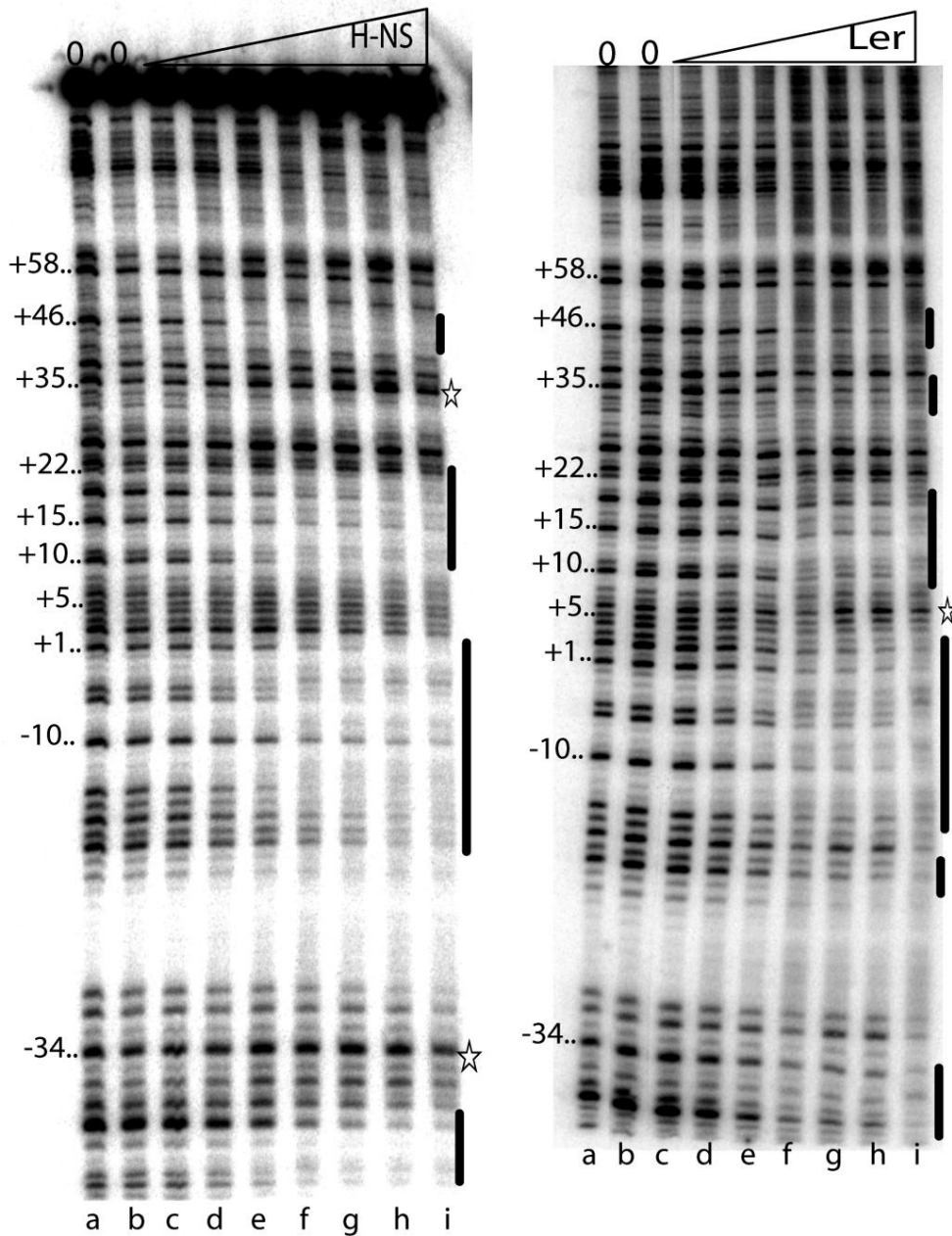


Figure 23 : Empreintes à la DNaseI des protéines H-NS et Ler sur la région promotrice du petit fragment (-83, +104) du promoteur LEE5 à 20 °C. Le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 20°C en absence de protéines (piste a, b) ou en présence de concentrations croissantes de protéines H-NS (piste c à i, respectivement 5, 25, 50, 100, 200, 300 et 500 nM) ou Ler (piste c à i, respectivement 25, 50, 100, 125, 200, 300 et 500 nM). Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine H-NS ou Ler sont indiqués par des barres noires et les hyperréactivités dues à H-NS ou Ler par des étoiles.

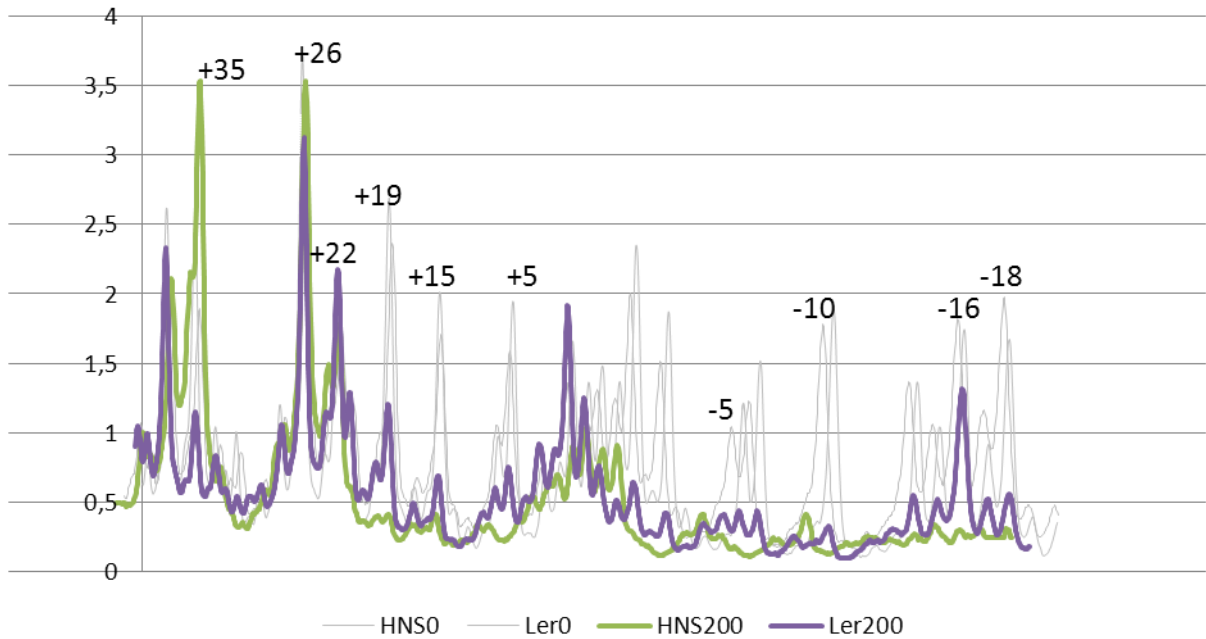


Figure 24 : Représentation du profil densitométrique des bandes de la région autour de la position +1, en absence de protéines (en gris clair), en présence de Ler à 200 nM (violet) et en présence de H-NS à 200 nM (vert). Les positions des bandes sont indiquées au dessus. La quantification est réalisée avec le logiciel Image Quant de GE Healthcare. Les valeurs des intensités sont normalisées par rapport à la valeur de la bande en position +39 qui est une bande dont l'intensité est constante.

En conclusion H-NS et Ler partagent globalement les mêmes sites de fixation sur la région promotrice de *LEE5*, H-NS induisant des empreintes plus étendues des deux côtés du promoteur (en amont du -180 et en aval du +139). Nous avons identifié des différences dans les sites hyperréactifs, dans la région cœur du promoteur (-62, +35). Ces variations, bien que couvertes par des empreintes sont aussi présentes autour du +1, site de démarrage de la transcription par l'ARN polymérase. Les contraintes sur l'ADN imposées par les deux protéines (sans doute d'ordre topologique) sont donc différentes et suggèrent que celles imposées par Ler induisent ou restaurent une contrainte topologique favorable au démarrage de la transcription et à l'expression des gènes de l'opéron *LEE5*.

La figure 25 résume les résultats des empreintes sur la région promotrice de *LEE5* avec les sites consensus de fixation de H-NS identifiés par analyse bioinformatique surlignés et leurs scores indiqués à côté. Cette figure résume les points communs et les différences observés dans l'interaction de H-NS et de Ler avec *LEE5*

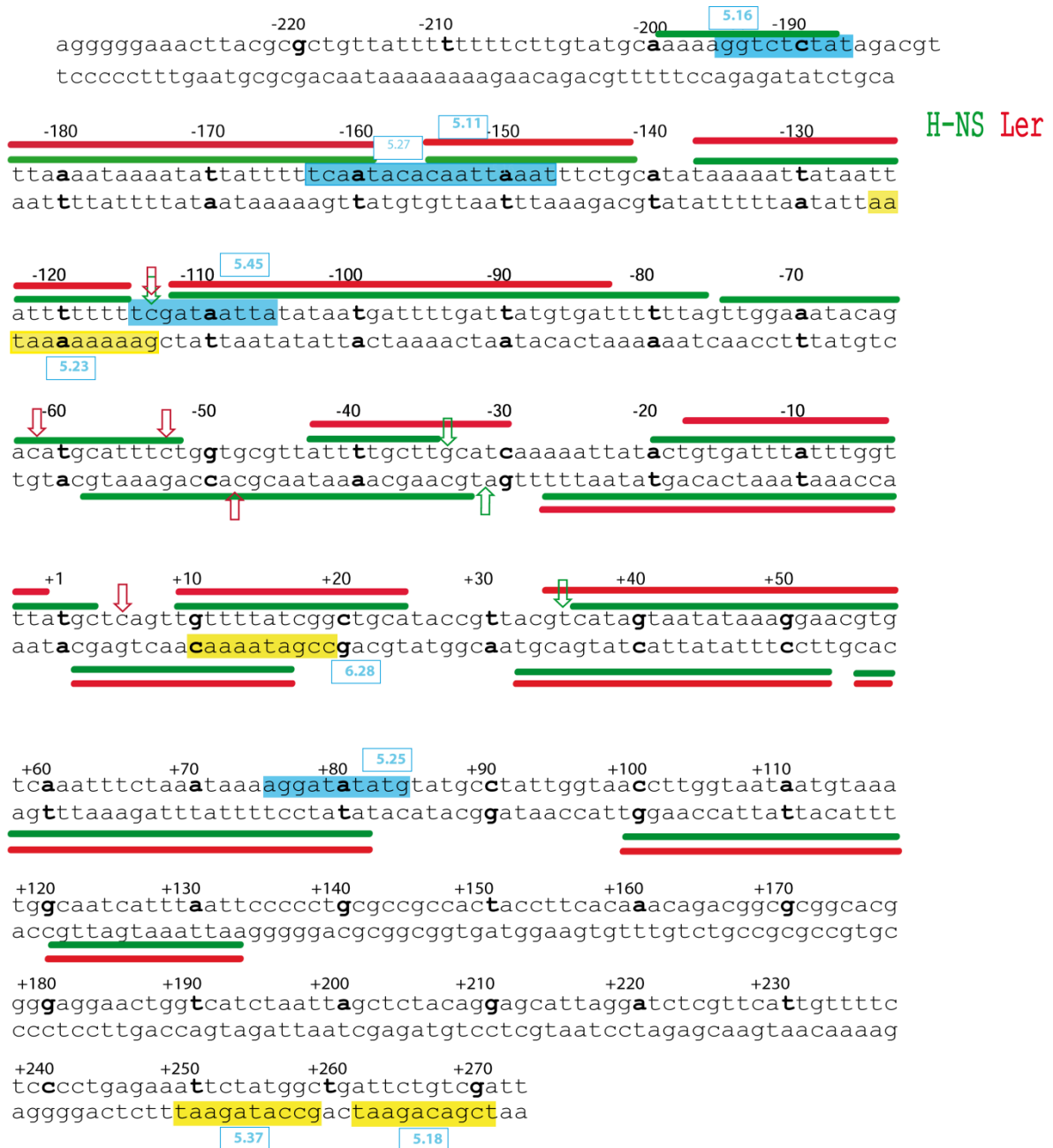


Figure 25 : représentation schématique résumant l'interaction de H-NS et Ler avec la séquence promotrice de l'opéron LEE5 sur le brin codant et non codant. Les barres vertes représentent les empreintes de H-NS, les barres rouges représentent les empreintes de Ler. Les flèches vertes représentent les hyperréactivités dues à H-NS et les flèches rouges celles qui sont dues à Ler. Les séquences surlignées en bleu (sur le brin codant) et en jaune (sur le brin non codant) représentent les sites consensus de fixation de H-NS identifiées sur la séquence par le logiciel Prodiric.

Compétition entre Ler et H-NS

Des expériences précédentes nous avons conclu que les différences d'affinité entre Ler et H-NS, même à la température de 37°C quand la fixation de H-NS est défavorisée, ne semblent pas suffisamment importantes pour expliquer l'expression des gènes de LEE5 quand Ler est présente. Nous avons donc décidé de mettre les deux protéines en compétition.

Des essais de compétition pour la liaison de LEE5 entre H-NS et Ler en empreintes à la DNaseI ont été faits à 20°C et à 37°C. Les résultats sont représentés dans la figure 26.

L'interaction différentielle de H-NS et de Ler en 3 positions différentes qui sont -62, -53 et -34 a servi pour déterminer laquelle de ces deux protéines impose son effet sur le promoteur (Figure 26, A et C). En effet Ler en positions -62 et -53 crée un site hyperréactif tandis que H-NS fait une empreinte. Inversement, en position -34 H-NS fait une hyperréactivité tandis que Ler fait une empreinte. Le promoteur a été incubé soit en présence des deux protéines, soit de l'une des protéines seule, soit attaqué sans protéines: dans tous les cas nous observons l'apparition de l'hyperréactivité caractéristique de H-NS en position -34 et la disparition des hyperréactivités caractéristiques de Ler en position -62 et -53 quand le rapport de concentration H-NS/Ler égal à 2/3 (piste h) à 20°C et 1 à 37°C (piste t). Ceci montre qu'H-NS impose son effet même en présence de Ler pour ce qui est de la déformation de l'ADN. J'ai décidé de faire les mêmes expériences en utilisant les retards sur gels (Figure 26, B) où nous pouvons distinguer les complexes faits avec Ler de ceux fait avec H-NS. On voit que Ler est capable de former son propre complexe (complexe le plus retardé en haut du gel) en présence de H-NS à partir d'un rapport de concentration H-NS 250 nM/Ler 125 nM (voie d). C'est donc Ler qui semble cette fois ci chasser H-NS préalablement fixée sur LEE5 à 250 nM pour former un complexe dont la migration ressemble plus au complexe formé avec Ler seule avec l'ADN, à partir d'une concentration de 100 nM (voie o).

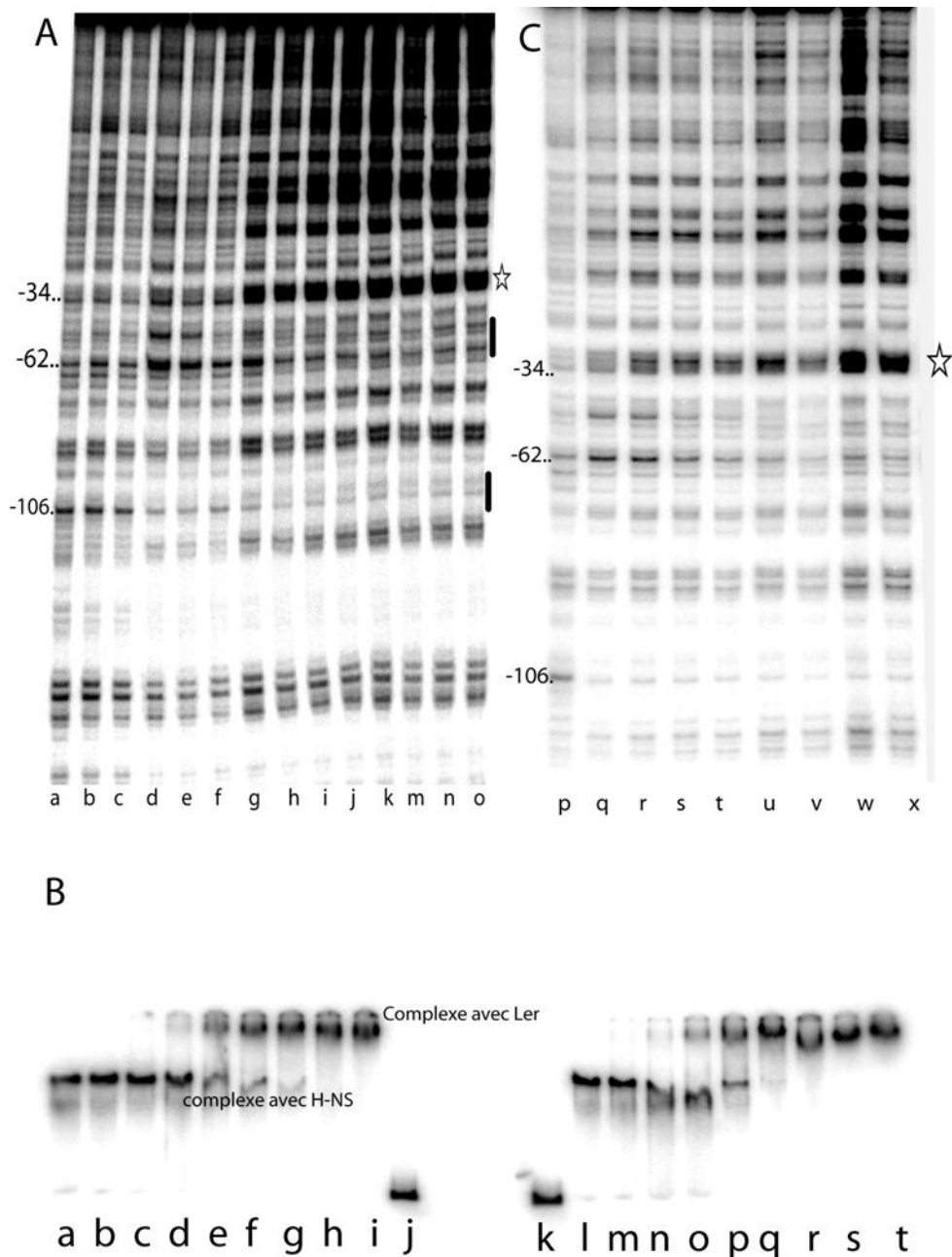


Figure 26 : Essais de compétition pour la fixation sur la région promotrice du promoteur LEE5 à 20 °C entre les protéines H-NS et Ler.

A, C : En empreintes à la DNaseI : Le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 20°C (A) et à 37°C (C) en absence de protéines (piste a, b, c et p), en présence de Ler seule à 150 nM (pistes d, e et q), en présence de Ler à 150 nM pré incubée avec des concentrations croissantes de H-NS 50, 75, 100, et 150 nM (pistes f, g, h et i respectivement) à 20°C et 50, 100, 150 nM à 37°C respectivement (pistes r, s, et t), en présence de H-NS à 150 nM et des concentrations décroissantes de Ler de 100, 50 et 25 nM (pistes j, k, m respectivement) à 20 °C et u, v et w à 37°C et en présence de H-NS seule à 150 nM (pistes n, o et x). Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont été migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine H-NS ou Ler protégés de l'attaque à la DNaseI sont indiqués par les barres noires et l'hyperréactivité due à H-NS par l'étoile.

B : en retard sur gel à 20°C : dans les voies notées a à i H-NS et Ler ont été incubées ensemble pendant 20 minutes avant l'ajout du mélange sur le fragment proLEE5 SVI/RII marqué. Les voies a à i correspondent respectivement au rapport : H-NS 250 nM/Ler 5 nM, H-NS 250 nM/ Ler 25 nM, H-NS 250 nM/ Ler 50 nM, H-NS 250 nM/Ler 125 nM, H-NS 250 nM/ Ler 250 nM, H-NS 125 nM/Ler 250 nM, H-NS 50 nM/Ler 250 nM, H-NS 25 nM/Ler 250 nM, H-NS 5 nM/Ler 250 nM. Les voies notées j et k correspondent à la migration du fragment en absence de protéines. Dans les voies notées l à q H-NS a été ajoutée à 250 nM et incubée avec LEE5 marqué pendant 20 min puis Ler a été ajoutée à 0 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM et 500 nM respectivement dans les voies l à q. Dans les voies r, s et t 100 nM, 250 nM et 500 nM de Ler on été ajoutées en absence de H-NS.

En conclusion dans les conditions de l'expérience des retards sur gel *in vitro* Ler est capable d'entrer en compétition avec H-NS pour sa fixation sur LEE5 et de perturber le complexe déjà formé avec H-NS et ce même à 20°C. Par contre lors des compétitions en DNaseI les signaux indiquant la présence de H-NS sont systématiquement observés que ce soit à 20 ou à 37°C. J'analyserai cette apparente contradiction dans la discussion de cette thèse.

Les sites de nucléation pour H-NS ont ils un effet sur la fixation et l'activation de Ler?

Si on cherche les sites pour H-NS sur ce promoteur on les trouve en très grand nombre. Pour affecter la fixation de H-NS et déstabiliser la protéine nous avons choisi de modifier les sites centrés en position -110, +15 et +254 (Figure 24). Nous avons remplacé les bases ATAA par CGCG dans le site centré en position -110, les bases ATA par CGC dans les sites centrés en position +15 et +254. Ces promoteurs modifiés peuvent aussi servir à vérifier si les sites consensus de H-NS sont nécessaires pour la reconnaissance par Ler. J'ai donc étudié la fixation de H-NS et de Ler sur le fragment contenant les 3 mutations par des expériences d'empreintes à la DNaseI. Les résultats sont représentés dans la figure 27 pour H-NS et figure 28 pour Ler.

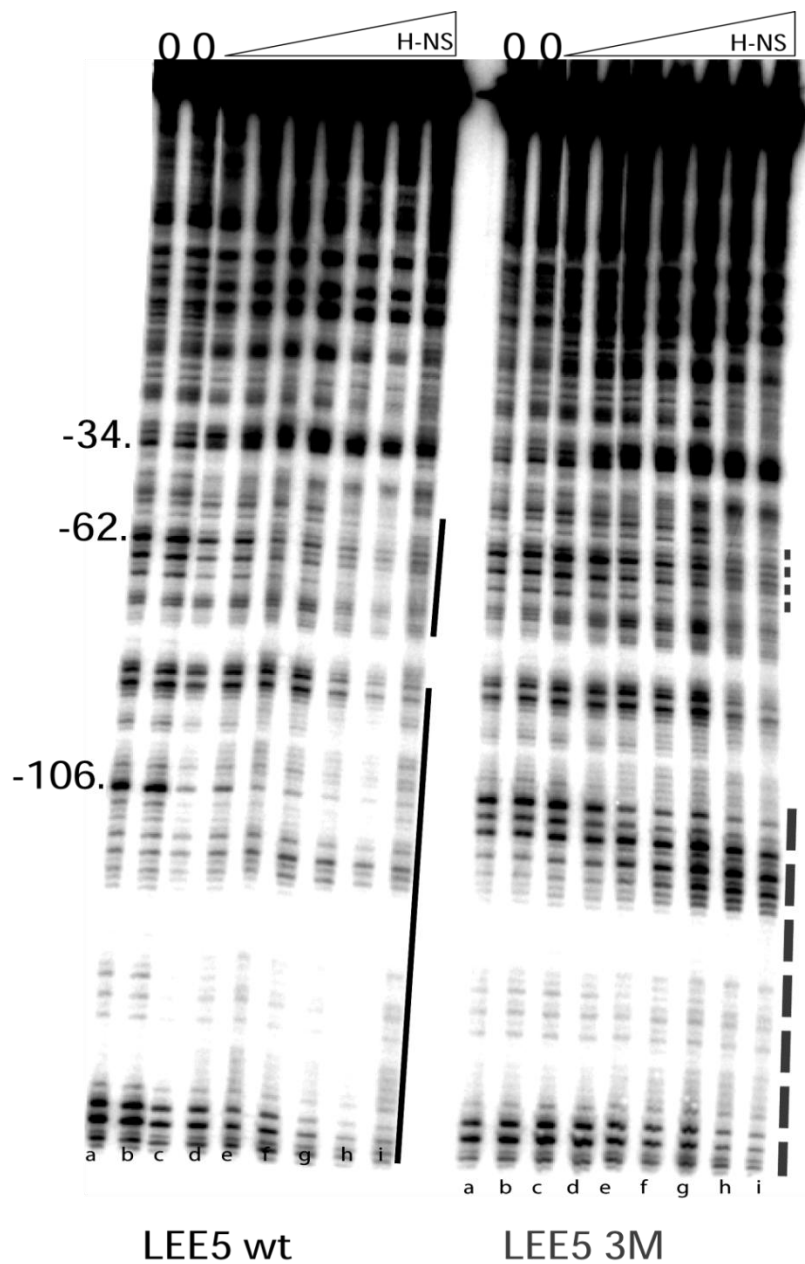


Figure 27 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 wt et LEE5 3M en présence de H-NS à 20°C. Le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 20°C en absence de protéines (piste a et b) en présence de concentrations croissantes de H-NS pistes c à i respectivement 25, 50, 100, 150, 300, 500 et 1000 nM pour LEE5 wt et 5, 15, 50, 100, 200, 300 et 500 nM pour le LEE5 3M. Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont été migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine H-NS affectés par la mutation dans le fragment 3M sont indiqués par les barres pointillées.

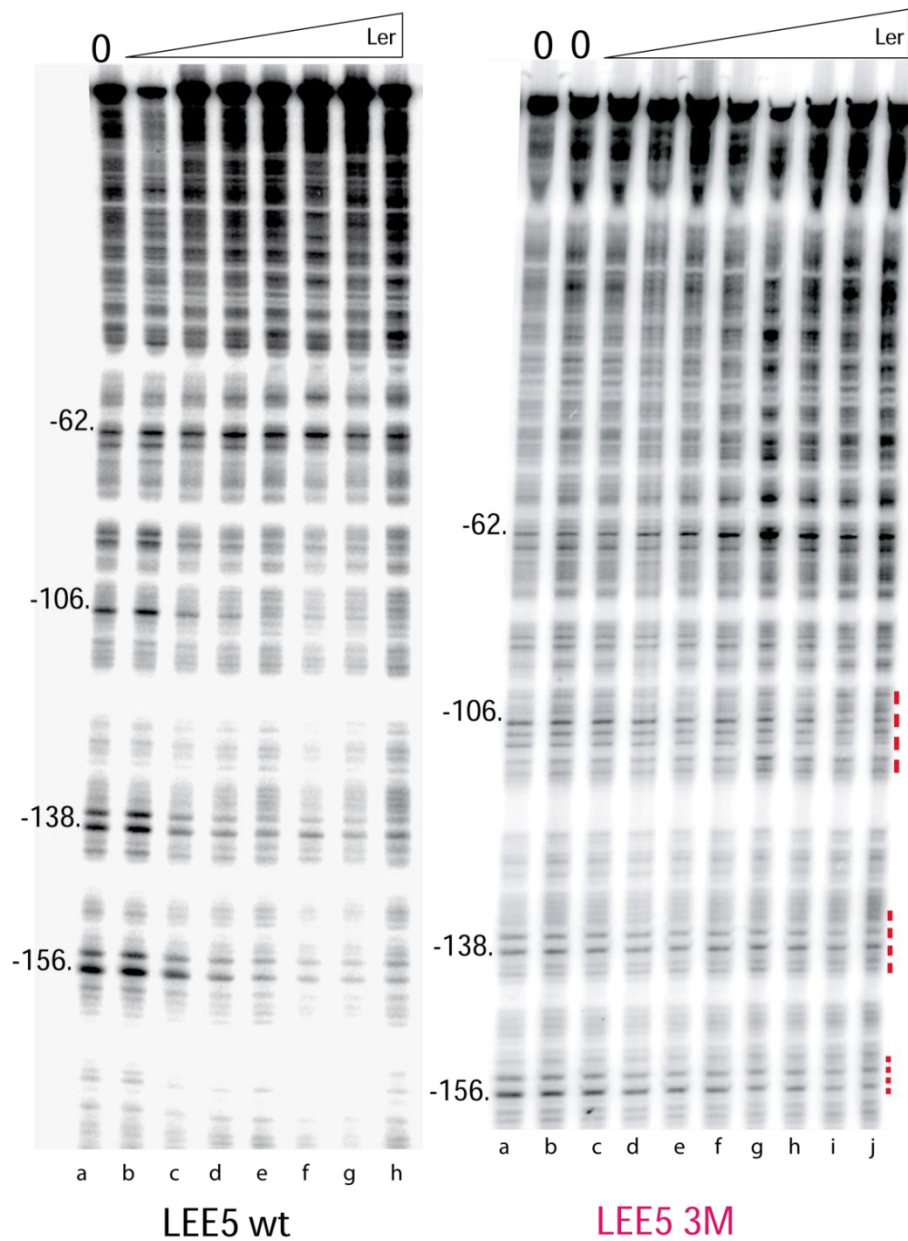


Figure 28 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 wt et LEE5 3M en présence de Ler à 20°C. Le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 20°C en absence de protéines piste a, en présence de concentrations croissantes de Ler pistes b à h respectivement 5, 50, 100, 150, 200, 300 et 500 nM pour LEE5 wt et 5, 25, 50, 100, 150, 200, 300 et 500 nM pour le LEE5 3M. Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont été migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine H-NS affectés par la mutation dans le fragment 3M sont indiqués par les barres pointillées.

Sur la figure 27 on voit que la mutation des sites consensus d'H-NS affecte d'une manière générale sa fixation le long du fragment. Plus précisément, on voit que l'empreinte d'H-NS en position -106 sur le fragment non muté (noté *wt*) est observée à partir de 25 nM (piste c) alors que sur le fragment 3M cette même empreinte n'apparaît qu'à 300 nM (piste h). En position -108 l'empreinte d'H-NS sur le fragment *wt* est observée à 25 nM alors que sur le fragment 3M et pour la même position l'empreinte est quasiment inexistante. L'empreinte d'H-NS en d'autres régions du fragment loin des sites mutés est aussi affectée comme on peut le voir en position -62 ; l'atténuation de la bande commence à la concentration de 100 nM de H-NS (piste e) sur le fragment *wt* et à 300 nM pour le fragment 3M. Par contre l'hyperréactivité produite par la présence de H-NS en position -34 est peu affectée par les mutations.

L'effet de ces mutations sur l'interaction de Ler avec LEE5, est proche de celui observé pour H-NS (Figure 28). En effet sur le fragment 3M l'empreinte de Ler en position -106 est observée à 300 nM (piste i) au lieu de 50 nM pour le fragment *wt* (piste c). A distance du site muté les empreintes de Ler en position -138 et -156 sont aussi affectées sur le fragment 3M.

En conclusion Ler reconnaît les séquences de haute affinité de H-NS et les utilise pour reconnaître d'autres sites, et comme pour H-NS l'affinité globale sur le fragment dépend de l'affinité pour les sites les plus forts. Bien que les 3 meilleurs sites soient mutés, la fixation de H-NS et de Ler au LEE5 ne sont pas complètement abolies. Il reste au moins 5 autres sites dont les séquences n'ont pas été modifiées et qui présente des séquences qui peuvent être très raisonnablement reconnues par H-NS. A nouveau il faut souligner que la séquence de LEE5 est particulièrement riche en sites pour H-NS et donc pour Ler.

Pour vérifier que la perte des empreintes au niveau des mutations est due à la mutation de la séquence en elle-même et pas à un changement dans la structure (courbure) de l'ADN provoquée par la mutation, j'ai fait une comparaison entre la courbure du petit fragment de LEE5 non muté et le même fragment comportant la mutation centré sur le site muté en +15 en utilisant un logiciel disponible sur le site (<http://www.lfd.uci.edu/~gohlke/dnacurve>) et en appliquant le modèle de Bolshoi compatible avec les séquences riches en AT et en séries de A (Goodsell & Dickerson, 1994)(Figure 29, A). En comparant la courbure du fragment *wt* et du fragment muté on remarque que la mutation ne provoque localement qu'un

changement très faible dans les valeurs de la courbure (points 77,78 et 79 sur l'axe des abscisses). De plus la courbure sur le reste du fragment reste intacte après la mutation. Ceci nous permet de dire que la perte d'empreinte de H-NS au niveau de la mutation dans le fragment muté 1M par rapport au fragment *wt* (Figure 29, B positions +15, +17 sur le gel) est due à la mutation en elle-même et non pas à un changement dans la courbure de l'ADN. Sur le reste du fragment, en analysant les empreintes de H-NS et la courbure sur LEE5 *wt* plusieurs points viennent corroborer que H-NS reconnaît bien des sites consensus et pas la courbure : le site de H-NS centré en position +15 par rapport au +1 de la transcription (point d'abscisse 77 dans la figure 28, A) n'est pas la région la plus courbe de ce fragment, la position 34 sur l'axe des abscisses qui est la région la plus courbe de ce fragment et qui correspond à la position -29 sur le promoteur présente une empreinte très faible (qui arrive à une de concentration 500 nM) par rapport à d'autres sites qui eux sont dans une région moins courbes (Figure 29 B, fragment LEE5 *wt*).

En conclusion l'étude qualitative, par la technique des empreintes à la DNaseI, de la fixation de H-NS et de Ler sur une région régulatrice étendue du promoteur LEE5 montre que les sites de fixation de ces deux protéines se superposent malgré le fait qu'elles régulent ce promoteur d'une manière opposée. Mais une analyse plus détaillée des empreintes obtenues nous a montré des différences très significatives dans la manière dont ces deux protéines organisent l'ADN, ces différences sont localisées majoritairement autour de la région promotrice cœur (-10, -35) et sont principalement des différences dans l'intensité de coupure par la DNaseI. De plus les résultats d'expériences de retards sur gel sur le petit fragment LEE5 (-80, +103) contenant les éléments de la région promotrice proprement dite vont dans ce sens, les complexes formés avec Ler sont différents et migrant plus haut dans le gel que ceux formés avec H-NS.

Cet arrangement différentiel de la région promotrice suggère que l'organisation du promoteur par Ler est favorable à l'initiation de la transcription et que si Ler est capable d'imposer une structure même en présence de H-NS, cela pourrait expliquer la régulation différentielle. Cependant les essais de compétition réalisés *in vitro* à 20°C et à 37°C, ne montrent pas que, dans les conditions de l'expérience *in vitro*, Ler soit capable de chasser H-NS et d'imposer une structure au promoteur en présence de H-NS. Ces conditions ne reflètent peut être pas les conditions réelles d'expression du promoteur *in vivo* où d'autres

activateurs reconnaissent LEE5 et pourraient faciliter la transcription en aidant Ler à réarranger le promoteur.

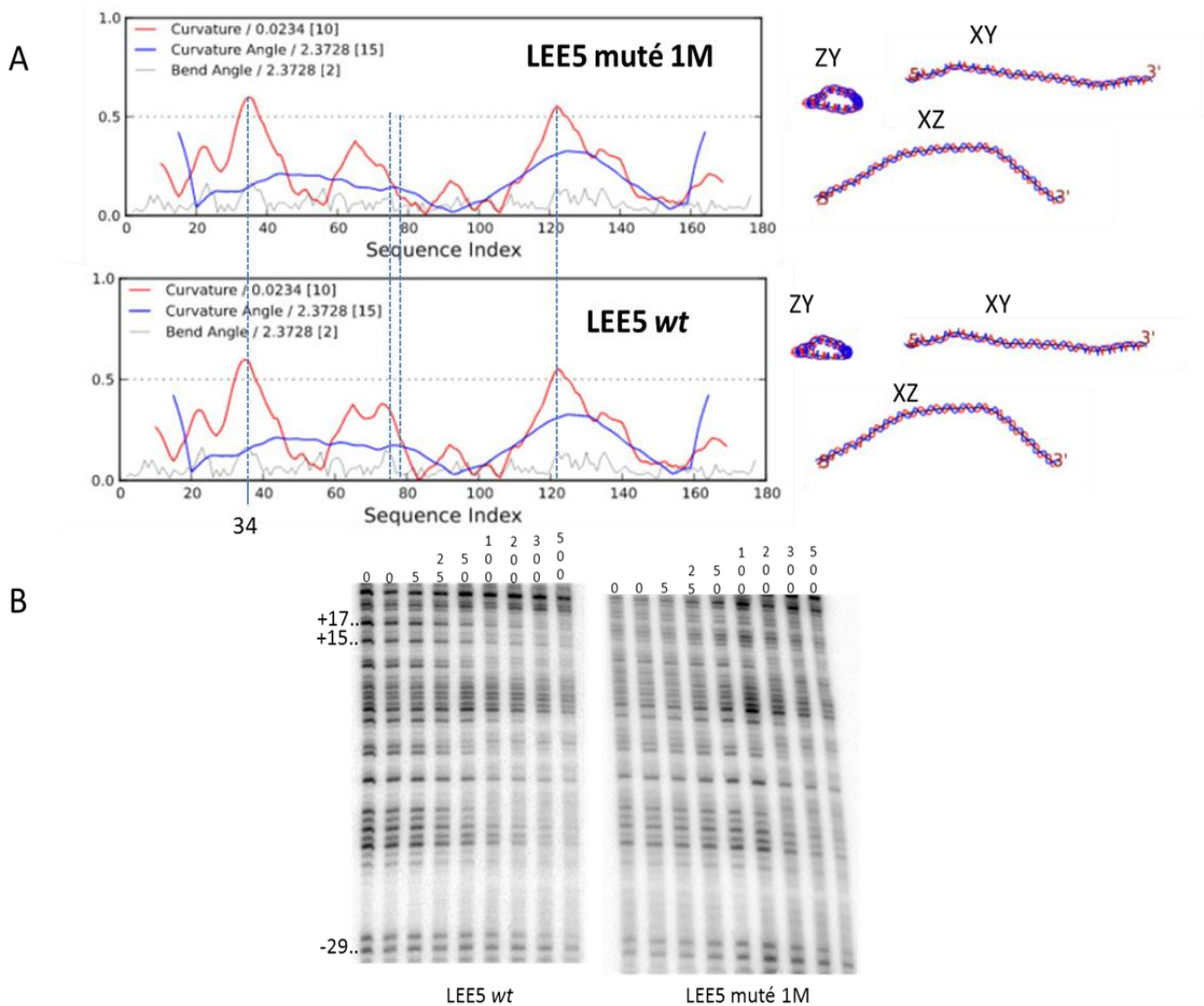


Figure 29 A : représentation de la courbure de la région allant du -64 à +116 (180 pb), par rapport au +1 de la transcription, du petit fragment LEE5 *wt* et LEE5 muté. Dans le fragment LEE5 muté, la mutation correspond aux points 77, 78 et 79 sur l'axe des abscisses. La variation de la courbure en fonction de la séquence est représentée par la courbe rouge.

B : empreintes à la DNaseI sur le petit fragment de LEE5 *wt* et muté 1M en présence de H-NS, montrant la perte de l'empreinte de H-NS au niveau de la mutation en position +15 et +17 sur le fragment muté. Les concentrations de H-NS en nM sont notées au dessus de chaque gel.

Chapitre 2 : Les sites consensus de H-NS et la régulation de l'expression de LEE5 *in vivo*

Dans les expériences d'empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 *wt* et le fragment LEE5 3M en présence de H-NS ou de Ler, nous avons vu un degré d'abolition de la fixation de H-NS et de Ler sur le fragment 3M au niveau de la mutation et une atténuation des empreintes de ces deux protéines ailleurs sur ce même fragment. Nous avons décidé de rechercher si ces mutations ont une signification physiologique sur la régulation de LEE5 *in vivo*, en d'autres termes si l'influence de H-NS et de Ler *in vivo* est liée à leurs interactions avec ces sites de fixation centrés sur les portions -110, +15 et +254. Dans ce but, nous avons étudié en parallèle l'expression des deux gènes de fusion *LEE5wt-gfp* et *LEE53M-gfp* dans différentes souches d'EPEC (EPEC *wt*, *hns(-)*, *ler(-)*, *hns(-) ler(-)*).

Les résultats de ces expériences sont montrés dans la figure 30.

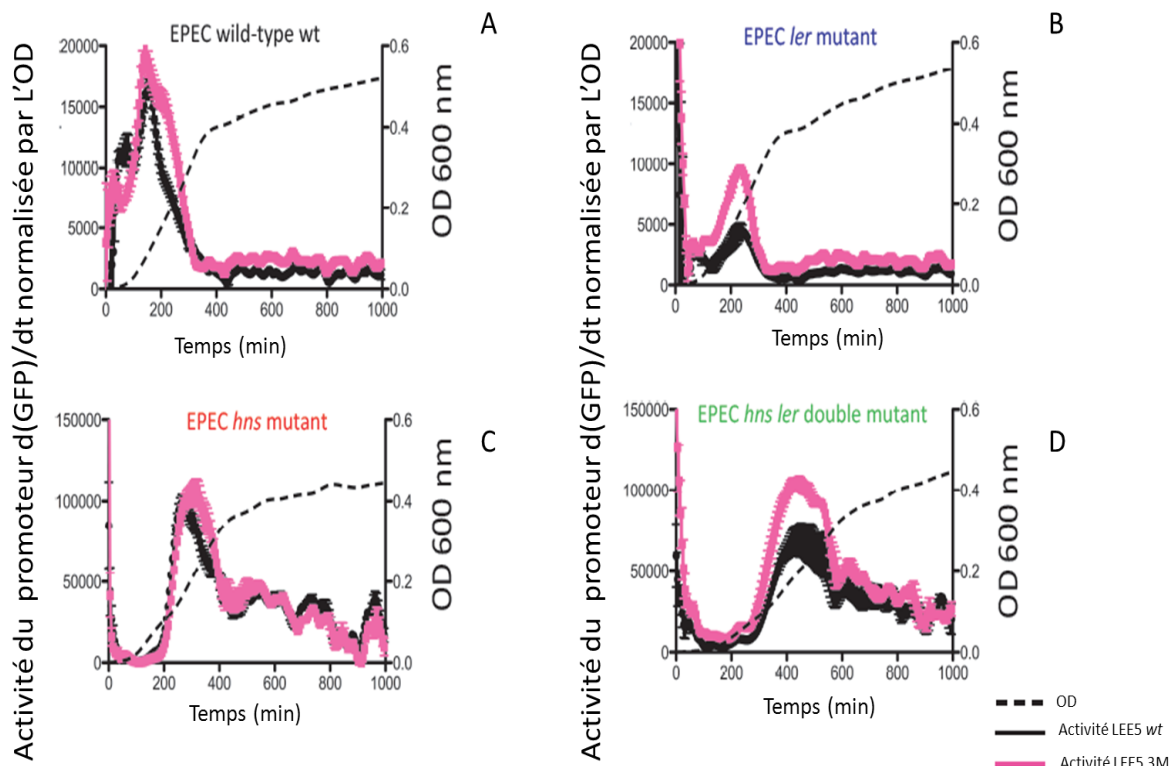


Figure 30 : Effet de la mutation des sites de fixation de la protéine H-NS sur la régulation du promoteur LEE5 par H-NS et Ler dans les EPEC. Représentation de la variation de l'activité en fonction du temps, dans les souches EPEC *wt* (A), EPEC mutante pour *ler* (B), EPEC mutante pour *hns* (C) et EPEC double mutante pour *hns* et *ler* (D) du promoteur LEE5 *wt* et LEE5 3M clonés dans le pKK-*gfp*. Les courbes en pointillés représentent la croissance bactérienne. Les transformants ont été cultivés en milieu M9 à 37°C dans une plaque 96 puits sous agitation. La fluorescence est suivie à 507 nm et la densité optique à 600 nm.

Sur la Figure 30 (A) sont présentés les résultats de l'étude de l'expression des promoteurs LEE5 *wt* et LEE5 3M dans la souche EPEC *wt*, au cours de la croissance jusqu'en phase stationnaire en milieu M9. En regardant tout d'abord la variation de l'activité du promoteur LEE5 *wt* en fonction du temps on s'aperçoit que le pic d'expression a lieu en phase exponentielle de croissance, ce qui est en accord avec la littérature (Umanski et al ; 2002). Par contre nous avons utilisé ici du milieu M9, et nous voyons une induction de l'expression de LEE5 dans un milieu autre que le DMEM, milieu riche pour culture cellulaire considéré comme une condition requise pour l'expression des gènes de LEE. L'expérience en DMEM donne des valeurs d'activité similaire. C'est la première fois que l'activité du promoteur est observée sur l'ensemble de la phase de croissance et on voit que l'activation est transitoire et principalement en phase exponentielle. Le promoteur est totalement inactif en phase stationnaire.

Si on compare maintenant l'activité du promoteur LEE5 *wt* à celle du promoteur où les sites de H-NS sont mutés (LEE5 3M), on observe une activité très similaire, comme si la mutation de ces 3 sites n'avait pas d'effet sur la régulation du promoteur *in vivo*. Dans la souche mutante pour *ler* (Figure 30 (B)), où le promoteur n'est pas activé à cause de l'absence de Ler (Bustamante et al, 2001; Haack et al, 2003a), on observe une perte de 75% de l'activité par rapport à la souche *wt* où Ler est présente (l'activité passe d'une valeur proche de 20000 dans la souche EPEC sauvage à une valeur de 5000 dans la souche *ler*). On observe par contre que le promoteur 3M est plus actif que le *wt* (facteur 2), ce qui nous interprétons comme une perte de la répression par H-NS dont nous avons affaibli la fixation en modifiant les 3 sites. Malgré l'absence de Ler le promoteur montre une activation en phase exponentielle mais cependant plus faible.

La souche *hns(-)* Figure 30 (C), représente des conditions d'expression optimales où l'activateur Ler est présent et le répresseur est absent (Umanski et al, 2002). Dans ces conditions l'activité du promoteur LEE5 *wt* est augmentée d'un facteur 5 par rapport à son expression dans la souche EPEC sauvage (les valeurs d'activité passent de 20000 dans la souche sauvage à 100000 dans la souche mutante pour *hns*, pour les deux promoteurs). En absence de H-NS, l'expression de LEE5 est sous le contrôle positif essentiel de Ler. Nous n'observons pas de différence entre l'expression du promoteur LEE5 *wt* et celle du promoteur muté 3M. On peut donc dire que l'induction de l'expression de *LEE5* par Ler ne requiert pas ces sites *in vivo*, bien qu'*in vitro* la fixation de Ler sur le promoteur muté soit affectée d'une manière globale par cette mutation. Ceci montre qu'en absence de H-NS il n'y a pas d'activation directe par Ler et que Ler se contente d'antagoniser l'action répressive de H-NS comme c'est le cas de plusieurs protéines activatrices de promoteurs réprimés par H-NS (revue (Stoebel et al, 2008)).

Autre répresseur de LEE5

Pour la souche double mutante pour *hns* et *ler*, on observe une baisse de l'activité du promoteur *wt* de 25% (100 000 à 75 000). Par contre pour le promoteur muté 3M il n'y a pas de changement d'activité entre *hns* et le double mutant *hns ler*, elle est constante à une valeur de 100 000. On peut donc en déduire que l'activité du promoteur *wt* a baissé entre la souche *hns* et la souche *hns ler* ce qui va dans le sens où Ler est encore activateur: ceci ne peut s'expliquer que par la présence d'un ou (plusieurs) régulateur(s) négatif(s) agissant sur l'expression de LEE5 dont l'effet est visible uniquement en absence de H-NS et de Ler. La répression induite par ce répresseur inconnu est sensible à la mutation des sites de H-NS. Ce répresseur reconnaît les sites de fixation de consensus de H-NS pour son effet répresseur. Le premier candidat qui vient à l'esprit est StpA, paralogue de H-NS qui se fixe sur les mêmes sites et qui se comporte comme un remplaçant (backup) quand H-NS est absente (Sonnenfield et al, 2001).

Chapitre 3 : Caractérisation d'autres régulateurs potentiels agissant sur l'expression de LEE5

Les expériences d'expression *in vivo* dans les différentes souches d'EPEC ont montré l'existence d'un ou de plusieurs régulateurs négatifs, en plus de H-NS. L'action de ce régulateur négatif est sensible à la mutation des sites consensus de H-NS. Pour vérifier notre hypothèse suggérant qu'il s'agit de StpA, protéine appartenant à la famille des protéines H-NS et connue pour son action de remplacement de H-NS, nous avons décidé de montrer tout d'abord que StpA reconnaît la région promotrice de LEE5. Comme pour H-NS et Ler nous avons utilisé la technique des empreintes à la DNaseI pour caractériser les sites de fixation de StpA.

Ensuite pour vérifier que la fixation de StpA sur LEE5 *in vitro* est sensible à la mutation des sites de consensus de H-NS, des empreintes à la DNaseI en présence de StpA sur le fragment LEE5 3M ont été réalisées. Puis, l'activité des promoteurs *LEE5wt-gfp* et *LEE5-3M-gfp* a été mesurée dans des souches d'*E. coli* sauvage, mutante pour *hns* et mutante pour *stpA*. L'avantage de réaliser ces expériences dans des souches d'*E. coli* K12 est que nous travaillons sans l'interférence de Ler dans la régulation de LEE5.

StpA se fixe et régule la région promotrice de LEE5

Les résultats des expériences d'empreintes à la DNaseI sont présentés dans la figure 31 et ceux des expériences de suivi de l'activité des deux promoteurs dans la figure 32 et 33.

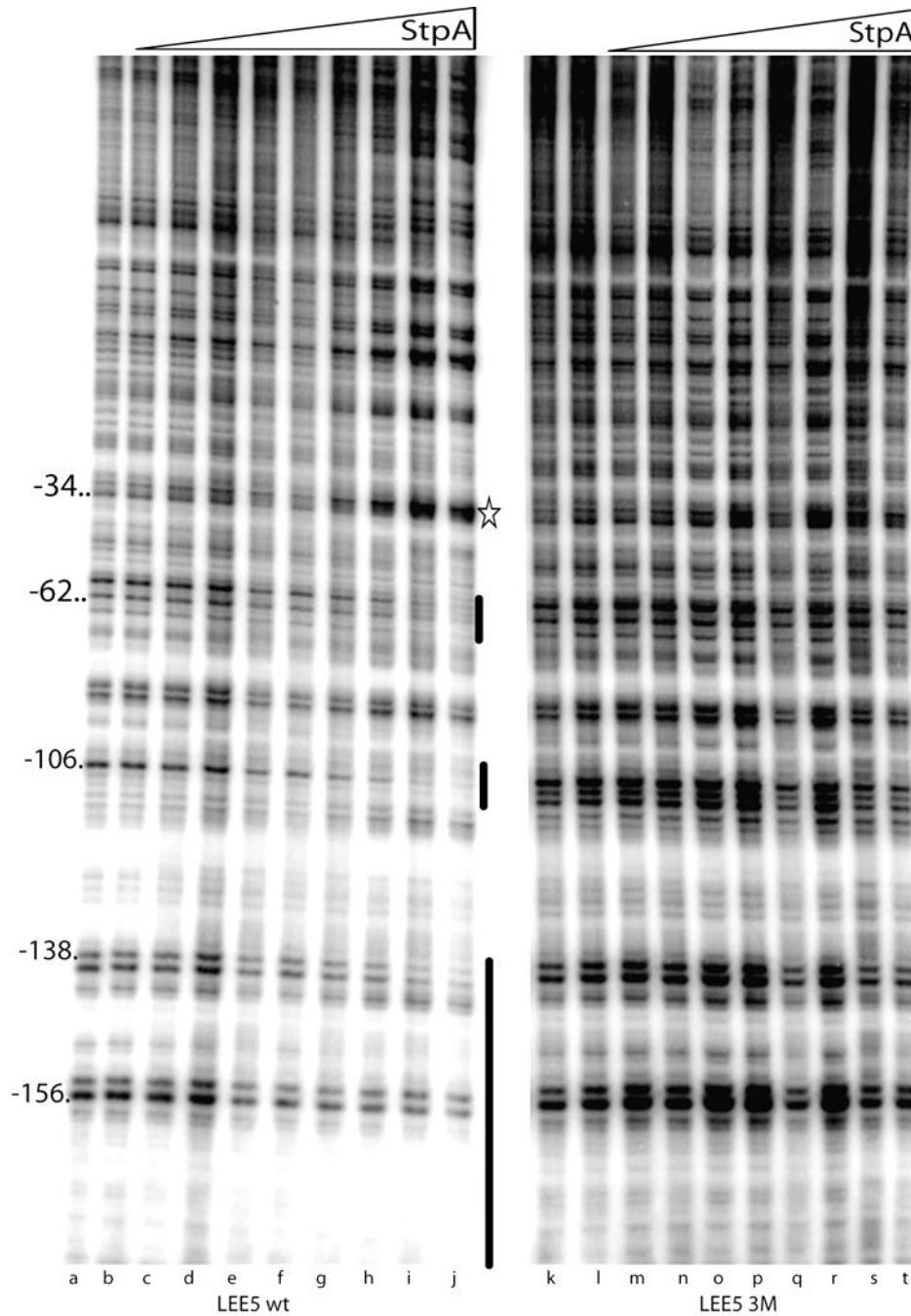


Figure 31 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 wt et LEE5 3M en présence de StpA à 20°C. Le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 20°C en absence de protéines (pistes a, k et l) en présence de concentrations croissantes de StpA pistes b à j respectivement 25, 37, 50, 72, 100, 125, 250, 500 et 1000 nM pour LEE5 wt et 25, 50, 72, 100, 125, 250, 500 et 1000 nM pour le LEE5 3M. Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont été migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine StpA sont indiqués par les barres verticales et l'hyperréactivité par une étoile.

Une première analyse du gel de la figure 31 (fragment LEE5 *wt*) montre d'une manière non discutable que StpA reconnaît la région promotrice de LEE5 et se fixe sur le promoteur. Bien que présentant une moins bonne affinité apparente que H-NS, elle se fixe sur des sites communs avec H-NS, (centrés sur -106, -62 etc) indifférenciables de ceux de H-NS. Elle fait de plus les mêmes bandes d'hyperréactivité à -34 et en aval; Si on compare maintenant la fixation de StpA sur le fragment LEE5 *wt* et le fragment LEE5 3M on s'aperçoit que la mutation des sites de haute affinité de H-NS, abolit la fixation de StpA non seulement au niveau du site muté mais aussi globalement sur tout le fragment. Étonnamment et d'une manière qualitative l'effet des trois mutations sur la fixation globale de StpA semble être plus fort que celui sur la fixation de H-NS même si la protéine est globalement moins active car nous ne voyons plus aucune fixation, bien que l'hyperréactivité en position -34 soit finalement visible à partir de 250 nM de protéine. Ce résultat montre que la mutation des sites consensus de H-NS sur le promoteur de LEE5 affecte la fixation et la reconnaissance de ce promoteur par StpA.

Effet *in vivo* de StpA sur le promoteur LEE5 dans des *E. coli* K12

Il reste à montrer que ce résultat *in vitro* a une signification physiologique qui se traduit par un impact de StpA sur l'expression du promoteur LEE5 *wt* et aussi par une différence dans l'expression entre LEE5 *wt* et LEE5 3M lorsqu'ils sont essentiellement sous le contrôle de StpA. Pour répondre à cette question j'ai étudié l'expression de la fusion *gfp* du promoteur LEE5 et du promoteur LEE5 3M dans des souches d'*E. coli* K12 en présence de H-NS et de StpA, en présence de H-NS seule et en présence de StpA seule. Les résultats de ces expériences sont représentés dans les figures 32 et 33.

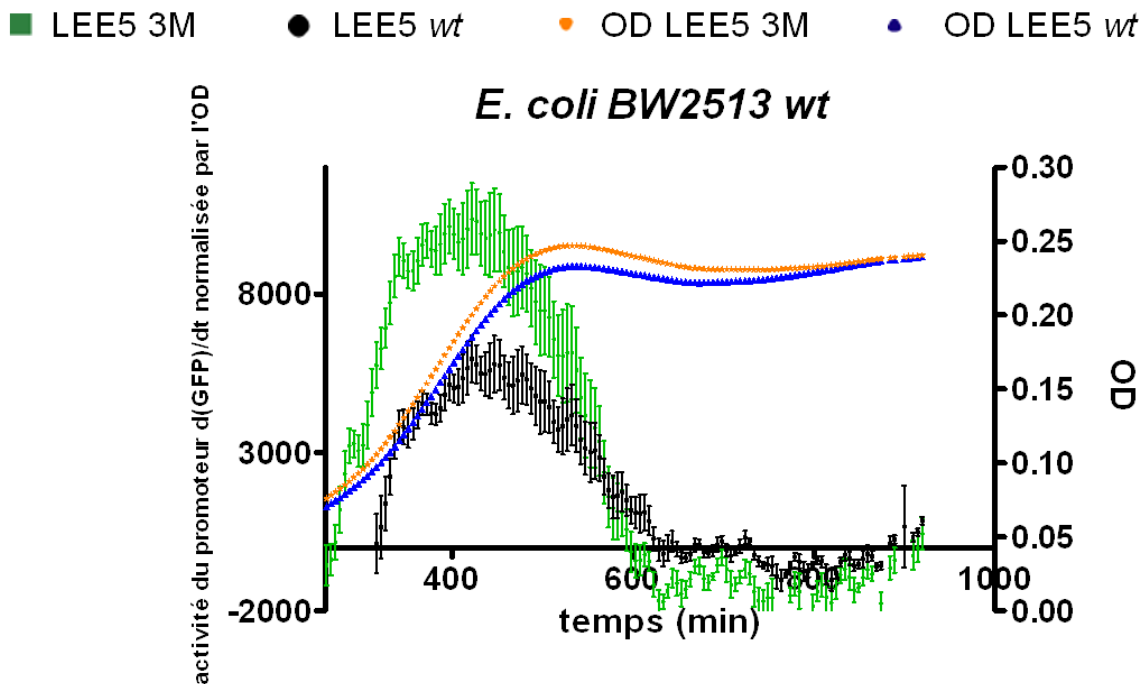


Figure 32 : Représentation de la variation de l'activité du promoteur *LEE5 wt* et *LEE5 3M* en en fonction du temps dans la souche *E. coli BW2513 wt*. L'activité du promoteur *LEE5 wt* est représentée par la courbe noire, celle du promoteur muté 3M par la courbe verte. La densité optique de la bactérie transformée par le pKK*LEE5wt-gfp* est en bleu, celle de la bactérie transformée par pKK*LEE53M-gfp* est en orange. Les transformants ont été cultivés en milieu DMEM à 37°C dans une plaque 96 puits sous agitation, avec 4 répétitions pour chaque transformant. La fluorescence est suivie à 507 nm et la densité optique à 600 nm. Les barres d'erreurs représentent la variation entre 3 expériences indépendantes.

Sur la figure 32 sont rapportés les résultats des mesures de l'activité du promoteur *LEE5 wt* et *LEE5 3M* au cours de la croissance bactérienne dans une souche d'*E. coli* K12. On constate que les valeurs d'activité des promoteurs *LEE5 wt* et *LEE5 3M* sont très similaires à celles obtenues dans la souche *EPEC ler(-)*. En effet, le pic d'activité du promoteur *LEE5 wt* dans la souche *EPEC ler* et dans la souche *BW2513 wt* a une valeur proche de 5000, en phase exponentielle dans les deux cas. La même constatation est valable pour le promoteur muté *LEE5 3M*; son pic d'activité arrive aussi en phase exponentielle et atteint une valeur maximale proche de 10000 dans la souche *EPEC ler(-)* et dans la souche *BW2513 wt*. L'étude

de l'effet de StpA sur la régulation de l'expression de LEE5 dans un contexte non pathogène (*BW2513 wt*) où Ler est absente naturellement reflète donc l'image de la régulation par StpA dans un contexte EPEC pathogène où le gène de Ler a été supprimé.

Comme je l'ai mentionné dans le contexte de la souche *BW2513 wt*, le promoteur LEE5 est soumis essentiellement à la régulation de H-NS et possiblement de StpA. La valeur d'activité deux fois plus élevée pour le promoteur muté 3M par rapport au promoteur sauvage est expliquée par le fait que H-NS et éventuellement StpA reconnaissent moins bien leurs sites de fixation et exercent un effet répressif moins fort que dans le cas du promoteur LEE5 *wt*. La même étude d'expression des deux promoteurs *LEE5 wt* et *LEE5 3M* a été réalisée ensuite dans une souche *stpA(-)* et *hns(-)*. Les résultats de cette étude sont illustrés dans la figure 33.

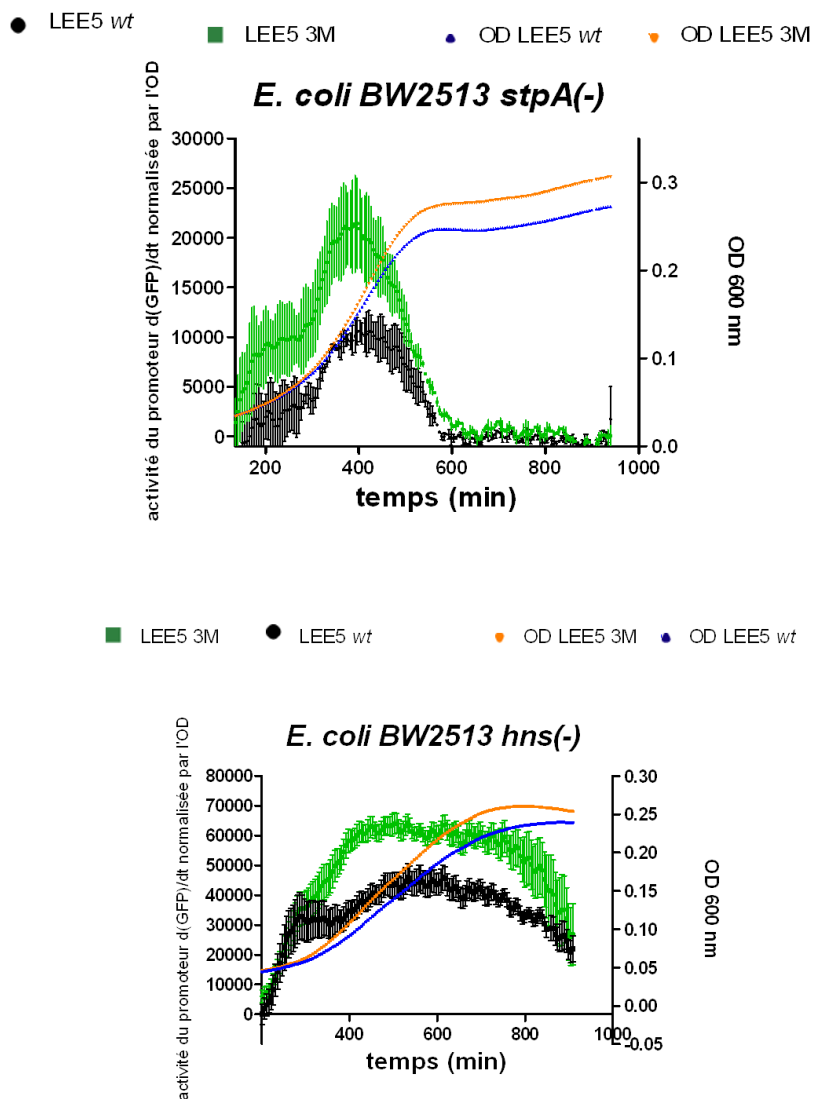


Figure 33: Représentation de la variation de l'activité du promoteur LEE5 *wt* et LEE5 3M en fonction du temps dans la souche *E. coli* BW2513 *stpA*(-) (A) et *E. coli* BW2513 *hns*(-) (B). L'activité du promoteur LEE5 *wt* est représentée par la courbe noire, celle du promoteur muté 3M par la courbe verte. La densité optique de la bactérie transformée par le pKKLEE5*wt-gfp* est en bleu, celle de la bactérie transformée par pKKLEE53M-*gfp* est en orange. Les transformants ont été cultivés en milieu DMEM à 37°C dans une plaque 96 puits sous agitation, avec 4 répétitions pour chaque transformant. La fluorescence est suivie à 507 nm et la densité optique à 600 nm. Les barres d'erreurs représentent la variation entre 3 expériences indépendantes.

Dans la souche *stpA*(-) (Figure 33, A) le pic d'activation du promoteur LEE5 *wt* atteint une valeur maximale 10000. Cette valeur est deux fois plus élevée que dans la souche sauvage. StpA participe donc à la répression du LEE5 *in vivo* et ceci même en présence de H-NS. Concernant le promoteur LEE5 3M, son activité maximale de 20000 est deux fois plus élevée que celle du *wt*, et ce rapport est comparable à celui observé entre ces deux promoteurs dans une souche EPEC *hns ler* donc nous avons un effet similaire même en absence des éléments de régulation propre au LEE ce qui montre que l'effet prépondérant de ces mutations 3M joue sur la régulation négative par H-NS et StpA et non pas sur des régulateurs propre au LEE qui sont ici absents.

Lorsqu'on passe dans la souche *hns*(-) (Figure 32, B) on n'observe plus un pic d'activité comme dans les EPEC mais une activité qui va être en plateau pendant l'entrée en phase stationnaire. Cette variation est sans doute due à la différence entre la souche *hns*(-) entre K12 et EPEC: en effet, malgré nos efforts pour produire une délétion complète du gène *hns* nous n'avons pas pu obtenir une telle souche chez les EPEC. Celle que nous utilisons est en fait une souche obtenue dans le laboratoire d'Ilan Rosenshine qui est un mutant négatif dominant de H-NS. Cependant même chez les EPEC l'activité du promoteur est plus forte en phase stationnaire dans les mutant *hns*(-) et *hns*(-) *ler*(-) que dans la souche sauvage ou *ler*. Ceci suggère que dans cette phase, c'est bien H-NS qui est encore répresseur. L'activité maximale de ce promoteur LEE5 *wt* atteint 40000, soit 8 fois plus que dans la souche sauvage. La contribution de H-NS dans la régulation de LEE5 est donc quatre fois plus forte que celle de StpA. Si StpA est régulée négativement par H-NS elle ne remplace cependant

pas entièrement son activité dans un mutant *hns* (Sonnenfield et al, 2001). Le promoteur LEE5 3M atteint lui un pic d'activité à 60000, valeur 1,5 fois plus élevée que celle du LEE5 *wt*. Si on se réfère à ces résultats et à ceux obtenus chez les EPEC on peut avoir une évaluation de l'effet de ces mutations 3M sur l'activité de ces trois protéines homologues: on a un facteur 2 pour H-NS, 1,5 pour StpA et nul pour Ler. En d'autre terme la reconnaissance des sites consensus a un effet sur l'activité des protéines qui agissent comme répresseur mais pas sur celle de Ler qui est activatrice.

En conclusion, la combinaison des résultats d'empreintes à la DNaseI sur le promoteur LEE5 *wt* et le promoteur 3M avec les résultats d'expression des deux promoteurs dans les différentes souches permet de confirmer une intervention directe significative de StpA sur l'expression de LEE5 *in vivo*. Ces résultats sont les premiers à montrer un rôle de StpA dans la régulation d'un opéron de la région LEE.

IHF se fixe et régule la région promotrice de LEE5

L'analyse bio-informatique de la région promotrice de LEE5 a montré l'existence des sites pour H-NS, mais aussi pour IHF. Nous avons décidé de vérifier si IHF est impliqué dans la régulation directe de LEE5. Les données dans la littérature sont contradictoires concernant le rôle direct d'IHF dans la régulation et la production des produits gènes de LEE5 : IHF induit l'expression des gènes de LEE5 et des autres opérons de la région indirectement en activant le gène codant pour la protéine Ler (Friedberg et al ; 1999). Ces auteurs constatent cependant un taux de production de Tir et de l'Intimine plus élevé dans la souche *ihf(-)* complémentée par IHF que dans celle complémentée par Ler, et concluent que l'apport de Ler en *trans* restaure complètement la production de Tir et de l'intimine (Friedberg et al.). De plus une étude protéomique analysant les protéines codées dans les différents opérons de la région LEE dans la souche EPEC E2348/69 sauvage, mutée pour *ihf* et mutée pour *ler* a montré l'absence de la protéine Tir dans la souche mutée pour *ler* (en présence de IHF), mais aussi dans la souche mutée pour *ihf* (en présence de Ler ; malgré l'absence de IHF qui induit l'expression de *ler*, la production de Ler n'est pas complètement absente parce qu'il y a d'autres régulateurs induisant l'expression de Ler comme Fis, PerC, QseA et GrlA). L'ensemble de ces résultats ouvre la possibilité d'une implication directe d'IHF dans la régulation de LEE5.

Nous avons décidé d'explorer cet éventuel rôle : 3 sites consensus de fixation d'IHF ont été identifiés par analyse bio-informatique (un sur le brin non codant allant de la position -142 à -155 et 2 autres sites qui se superposent sur le brin non codant le premier allant de +118 à +133, le second allant de +122 à +137), j'ai donc vérifié en utilisant les empreintes à la DNaseI où IHF se fixe *in vitro* sur la région promotrice de LEE5. Les résultats de ces expériences sont montrés dans la figure 34.

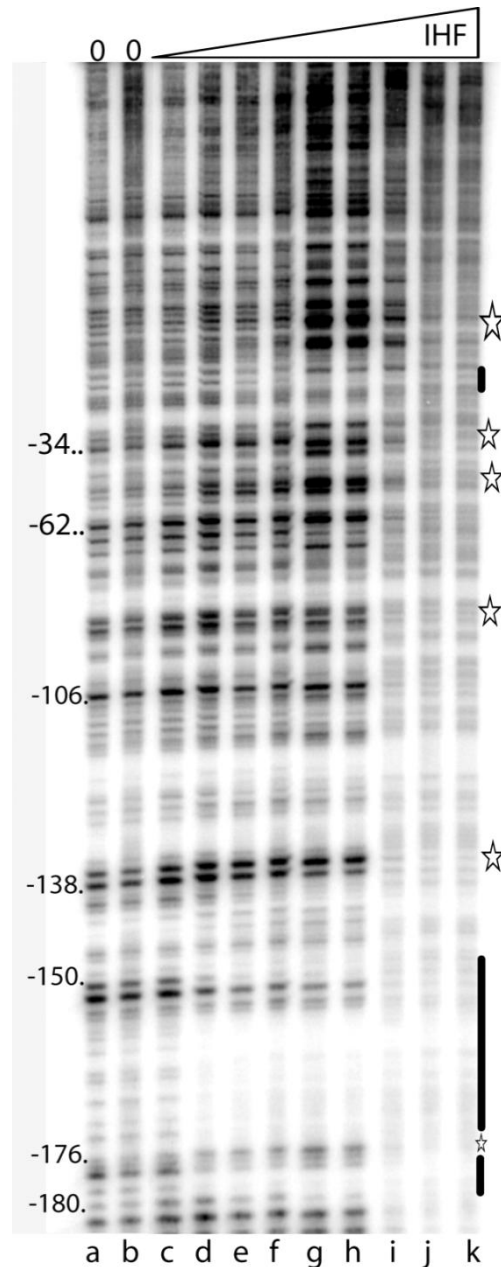


Figure 34 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment LEE5 wt en présence d'IHF à 25°C. Le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 25°C en absence de protéines (pistes a et b) en présence de concentrations croissantes d'IHF pistes c à k respectivement 5, 25, 50, 75,100, 125, 250, 500 et 1000 nM. Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont été migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine IHF sont indiqués par les barres verticales et les hyperréactivités par des étoiles.

L'analyse du gel de la figure 34 montre l'existence d'une empreinte d'IHF. Cette empreinte commence à partir de la position -150 et s'arrête en position -180. Une hyperréactivité apparaît en position -176. D'après ces empreintes IHF se fixe avec une bonne affinité entre 5 et 25 nM. Une protection globale de l'ensemble du fragment par fixation non spécifique est observée aux concentrations plus élevées d'IHF (à partir de 250 nM). La fixation d'IHF sur LEE5 provoque l'apparition de plusieurs sites hyper réactifs à la DNaseI. Ces hyperréactivités témoignent d'une courbure de l'ADN due à la fixation d'IHF, ce qui est une propriété de cette protéine. Les expériences sur le brin non codant pour regarder la fixation d'IHF sur le deuxième site identifié autour de la position +122 n'ont pas montré d'empreintes au niveau de ce site.

Friedberg et al, ont comparé l'expression des différentes fusions transcriptionnelles contenant des gènes provenant des différents opérons de LEE dans une souche EPEC et sauvage et *ihfA(-)*, parmi lesquels il y avait le gène *eae* de LEE5 codant pour l'Intimine. Ils n'ont pas observé un effet de la mutation d'*ihfA* sur l'expression du gène *eae*. J'ai cependant voulu confirmer ce résultat, puisque la fixation d'IHF identifiée par les expériences d'empreintes à la DNaseI est très spécifique et l'affinité d'IHF est entre 5 à 25 nM. C'est pourquoi j'ai étudié la variation de l'expression de la fusion *LEE5-gfp* clonée dans une souche d'*E. coli* sauvage et dans une souche mutée pour *ihfA*. En parallèle nous avons suivi la variation de l'expression de la fusion *proU-gfp* disponible dans le laboratoire en l'utilisant comme témoin négatif puisqu'il n'a jamais été identifié un rôle d'IHF dans la régulation de *proU in vivo*. Les résultats du suivi de la variation de l'expression de *LEE5-gfp* dans les deux souches sont présentés dans la figure 35.

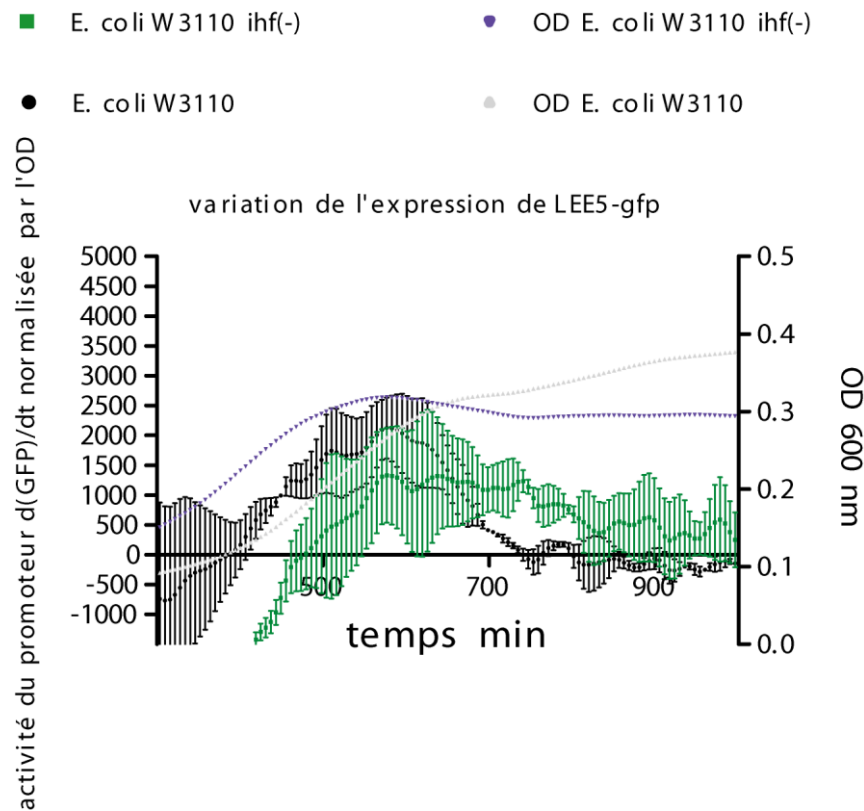


Figure 35 : Représentation de la variation de l'activité du promoteur LEE5 *wt* en fonction du temps dans la souche *E. coli* W3110 et *E. coli* W3110 *ihfA*(-). L'activité du promoteur LEE5 *wt* dans la souche sauvage est représentée par la courbe noire, et dans la souche *ihf*(-) par la courbe verte. La densité optique de la souche sauvage est en grise et celle de la souche *ihf*(-) est en bleu. Les transformants ont été cultivés en milieu DMEM à 37°C dans une plaque 96 puits sous agitation, avec 6 répétitions pour chaque transformant. La fluorescence est suivie à 507 nm et la densité optique à 600 nm. Les barres d'erreurs représentent la variation entre 3 expériences indépendantes.

Les résultats de la figure 35 confirment ceux de Freidberg et al. En effet on ne voit pas de différence dans l'activité du promoteur dans la souche sauvage en comparaison avec la souche *ihf*(-). Le faible taux d'activité du promoteur dans ces conditions (c'était le cas aussi dans les expériences réalisées dans les EPEC par Freidberg et al) pourrait expliquer l'effet très modeste de la mutation *ihf*(-) en comparaison avec la souche sauvage.

Résultat annexe

J'ouvre une parenthèse ici pour dire que sur le promoteur *proU* que j'avais inclus dans l'expérience en pensant l'utiliser comme témoin négatif j'ai observé une diminution de son expression d'un facteur 4 lorsqu'on passe de la souche sauvage à la souche *ihf*. *proU* est le promoteur de l'opéron du même nom et code pour un transporteur osmoprotectant la glycine bêtaïne (Gowrishankar ; 1989). Cet opéron est induit dans des souches en croissance dans un milieu d'osmolarité élevée (Cairney et al ; 1987). En absence de la protéine H-NS le taux d'induction varie de 8 à 15 suivant les conditions. Cependant si on compare cette valeur au taux d'induction osmotique (50 à 400 fois), on peut voir que la protéine H-NS n'est pas le seul facteur qui intervient dans la régulation osmotique de l'opéron *proU* (Gowrishankar et Manna ; 1996). La figure 36 montre l'étude de l'expression du promoteur *proU-gfp* dans les deux souches *E. coli W3110* et *E. coli W3110 ihf(-)*.

Variation de l'activité du promoteur *proV-gfp*

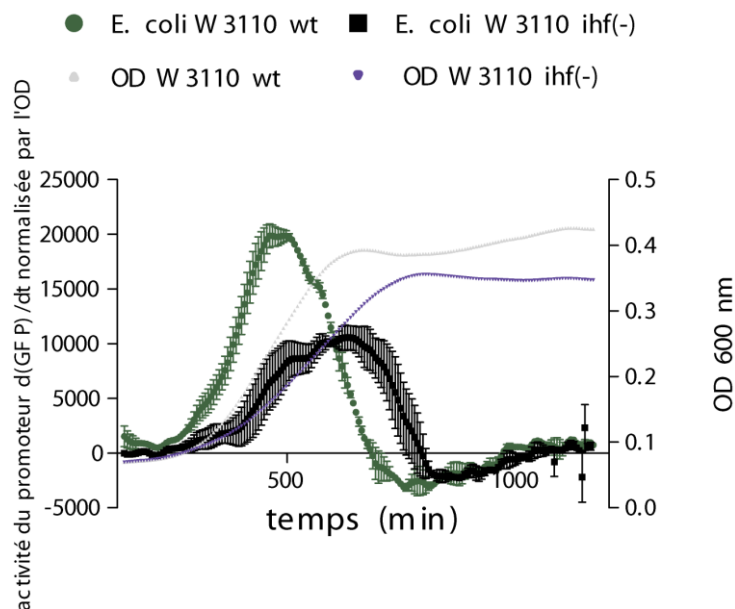


Figure 36 : Représentation de la variation de l'activité du promoteur *proV-gfp* en fonction du temps dans la souche *E. coli W3110* et *E. coli W3110 ihf(-)*. L'activité du promoteur *proV* dans la souche sauvage est représentée par la courbe verte, et dans la souche *ihf(-)* par la courbe noire. La densité optique de la souche sauvage est en gris et celle de la souche *ihf(-)* est en bleu. Les transformants ont été cultivés en milieu DMEM à 37°C dans une plaque 96 puits sous agitation, avec 6 répétitions pour chaque transformant. La fluorescence est suivie à 507 nm et la densité optique à 600 nm. Les barres d'erreurs représentent la variation entre 3 expériences indépendantes.

En comparant le pic d'activité du promoteur *proV-gfp* on s'aperçoit qu'il y a une diminution d'un facteur 4 lorsqu'on passe de la souche *wt* à la souche *ihf(-)* (le pic d'activité dans la souche mutée est aux alentours de 5000 et dans la souche sauvage aux alentours de 20000). IHF est donc impliquée dans l'activation de l'expression *proU in vivo*. Est-ce qu'il s'agit d'une implication directe ? Est ce qu'IHF se fixe d'une manière directe sur le promoteur *proU* pour induire son expression. Pour répondre à cette question une étude de la fixation d'IHF sur la région promotrice du *proU* était nécessaire. Les résultats de cette étude sont montrés dans la figure 37.

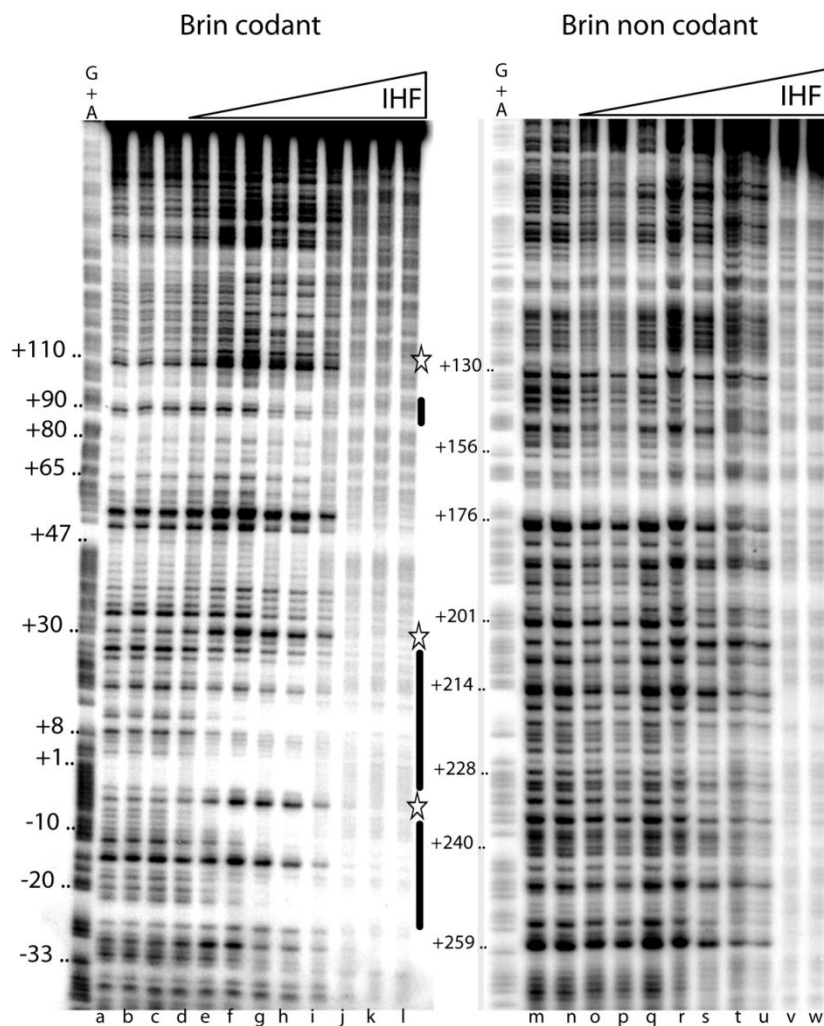


Figure 37 : Empreintes à la DNaseI sur le fragment *proV* en présence d'IHF à 25°C. Le fragment radiomarqué en 5' du brin codant a été incubé à 25°C en absence de protéines (pistes a, b, c, m et n) en présence de concentrations croissantes d'IHF pistes c à l et o à w respectivement 5, 25, 50, 100, 125, 200, 250, 500 et 1000 nM. Les produits de la digestion ménagée à la DNaseI ont été migrés dans un gel dénaturant 7% acrylamide (19:1). Les sites de fixation de la protéine IHF sont indiqués par les barres verticales et les hyperréactivités par des étoiles.

Sur le gel de la figure 37, montrant les empreintes d'IHF sur le brin codant, on voit clairement qu'elle se fixe sur plusieurs sites dans la région promotrice *proU*. Une première empreinte autour du site d'initiation de la transcription est observée de la position -33 jusqu'à +6. Cette empreinte se termine par une hyperréactivité en position +5. Une deuxième empreinte s'étendant de la position +2 jusqu'à +28 est aussi observée et se termine par une hyperréactivité en position +30. IHF se fixe sur ces deux sites avec une très bonne affinité variant entre 5 et 25 nM. Une troisième empreinte dans une région plus éloignée du promoteur en position +90 arrive à une concentration plus élevée (100 nM). Plus loin en position +110 une hyperréactivité à la DNaseI se forme à partir de 25 nM. Une protection globale de tout le fragment due à une fixation non spécifique d'IHF arrive à 250 nM. Les deux premières empreintes centrées autour du +1 de la transcription viennent confirmer les données obtenues par analyse bio-informatique où un site consensus de fixation d'IHF est repéré sur le brin codant et s'étend de la position -8 à -26. L'expérience sur le brin non codant ne montre aucune fixation directe d'IHF de ce côté du promoteur, malgré l'identification d'un site consensus d'IHF dans cette région allant de +134 à +150. IHF reconnaît et se fixe d'une manière sélective autour de la région promotrice proprement dite du promoteur *proU*.

La combinaison des résultats d'expérience d'étude de l'activité et des empreintes à la DNaseI constitue une preuve de l'implication d'IHF (comme un deuxième élément agissant en *trans* en plus de H-NS) dans la régulation du promoteur *proU in vivo*. Est ce qu'il s'agit d'une vraie activation ? Ou bien c'est une anti répression dirigée contre l'effet négatif de H-NS sur ce promoteur ? En effet c'est ce mécanisme qui est le plus courant sur plusieurs autres promoteurs (Stoebel et al, 2008) ou bien en induisant un changement conformationnel dans l'ADN, IHF favorise la fixation d'un autre activateur qui lui enlève la répression induite par H-NS (ex : *virB* chez *S. fleneri*, Porter et al ; 1997).

Ces résultats sur *proU* vont compléter une étude réalisée dans notre équipe caractérisant le rôle des protéines H-NS et IHF dans la structuration et la régulation du promoteur *proU in vivo* par empreinte laser UV. Je ferme ici la parenthèse que j'ai ouverte sur la régulation de *proV* par IHF pour parler brièvement d'une étude de l'interactome protéique de H-NS et pour discuter après les résultats sur la régulation de LEE5 par H-NS et Ler.

Etude de l'interactome de H-NS par SPRi

L'étude de l'interaction entre H-NS et Ler était utile pour mieux caractériser la nature des complexes qui se forment avec LEE5 en présence des deux protéines, c'est pourquoi j'ai utilisé la SPRi pour essayer de caractériser l'interactome de H-NS (l'ensemble des protéines qui interagissent avec H-NS).

La SPR est un phénomène physique principalement connu pour son utilisation comme méthode de mesure de la liaison d'un ligand sur un récepteur adsorbé à la surface d'une couche métallique. Brièvement l'approche utilisée consistait à fixer les protéines à étudier sur la surface d'un prisme couvert d'une fine couche d'or et d'injecter la protéine à analyser dans le flux de la machine. Une lumière incidente est dirigée sous un angle θ vers la surface d'or séparant le prisme du liquide, l'énergie de la lumière est perdue sur la couche d'or sous la forme d'une oscillation appelée plasmon de surface. Lorsque $\theta = \theta_{\text{spr}}$ la résonance a lieu et il y a un minimum de lumière réfléchi. La SPR consiste à mesurer la variation de l'angle θ_{spr} dû à l'interaction entre la protéine dans le flux et la protéine fixée sur la surface. Les données sont ensuite analysées et nous donnent accès à la constante d'affinité caractérisant l'interaction des deux protéines.

Malheureusement malgré le temps passé pour optimiser cette étude je n'ai pas réussi à avoir des données reproductibles confirmant une interaction spécifique entre Ler (ou autres protéines) et H-NS. Ce manque de reproductibilité on l'a expliqué par la nature de la protéine H-NS qui se colle dans les canalisations de la machine ce qui fausse la concentration réelle de l'analyte arrivant à la surface du prisme (ce paramètre est non contrôlable) et aussi par une incapacité à régénérer la surface complètement après avoir injecté H-NS ce qui faussait les résultats entre une injection et une autre dans une même expérience.

Discussion

H-NS, petite protéine de la chromatine bactérienne est aussi responsable de la régulation des gènes par un mécanisme dit de «silencing» attribué à ses propriétés de fixation sur l'ADN : dans une région riche en AT après avoir reconnu des sites spécifiques, H-NS va s'étendre sur l'ADN, créant ainsi un complexe nucléoprotéique qui rend l'ADN inaccessible aux protéines de régulation. Cependant sur la plupart des régions intergéniques occupées par H-NS, l'ARN polymérase est aussi présente (Grainger et al, 2006b). Le mécanisme de régulation négative par H-NS passe donc par une interférence avec les premières étapes de la transcription plus que par une gêne stérique qui empêcherait la polymérase d'accéder aux promoteurs. Pour activer un promoteur présent dans une structure nucléoprotéique formée par H-NS, on peut donc imaginer que, comme pour la chromatine eucaryote, il suffit de perturber ce complexe, d'y faire des ouvertures pour permettre aux activateurs ayant des sites spécifiques de supprimer la répression générée par H-NS. Dans ce schéma, la plupart des cas les activateurs eux, travailleraient classiquement selon les modèles déjà décrits (voir introduction) (Stoebel et al, 2008). Une particularité de ce processus de régulation est que l'activation est en fait un acte antagoniste de l'effet d'H-NS et qui n'est donc pas nécessaire en l'absence de cette protéine, pour observer une activité du promoteur. Pour compliquer un peu le schéma, il existe des modèles d'interaction d'H-NS sur l'ADN quand les complexes sont de grandes tailles qui impliquent au moins deux doubles hélices, H-NS pouvant les rassembler. Ces modèles montrent souvent ces deux doubles hélices comme deux éléments parallèles joints en leur milieu par une suite continue de protéines H-NS ayant entre elles des interactions.

Dans notre laboratoire nous pensons que cette représentation est simpliste, car elle ne prend pas en compte l'effet d'H-NS sur la topologie de l'ADN. En effet, H-NS modifiant le nombre de super tour de l'ADN, il nous paraît plutôt nécessaire d'imaginer un modèle où les deux doubles brins sont organisés en plectonème. Une telle organisation possède l'avantage de contraindre topologiquement l'ADN surtout si l'on imagine qu'elle forme une boucle. Si

un promoteur est localisé dans cette boucle alors il va se trouver dans une configuration topologique qui peut être défavorable à l'isomérisation d'un complexe fermé en complexe ouvert. Dans ce modèle, il n'est pas nécessaire qu'H-NS forme une barrière stérique, et il explique pourquoi H-NS, qui maintient deux duplex ensemble avec une force de seulement 5 pN (Dame et al, 2002), pourrait empêcher une polymérase d'avancer alors que celle-ci peut développer une force motrice de 14 pN. Cette contrainte topologique peut être modulée par la présence des NAP, qui en général affectent la structure locale de l'ADN. Ainsi, des protéines comme, Fis, IHF, HU, Lrp sont très souvent retrouvées dans la régulation positive des promoteurs éteints par H-NS. Des facteurs extérieurs, comme la température ou l'osmolarité, jouent également sur la topologie, et pourraient être à l'origine de levée de répression. Cependant les différents mécanismes proposés pour l'activation de la transcription quand H-NS est présente restent tous relativement hypothétiques puisque l'on ignore la structure réelle des complexes nucléoprotéiques H-NS/ADN dans le cas des promoteurs. La levée de la répression par H-NS est alors expliquée par une interférence avec sa multimérisation (dont le mécanisme n'est pas connu) et par l'introduction sur les promoteurs de protéines spécifiques à leurs sites souvent unique, impliquant alors une compétition classique, ou une combinaison de ces mécanismes (Navarre, 2010; Stoebel et al, 2008).

Dans le cas des promoteurs du LEE, la levée de la répression se fait par Ler. Or Ler et H-NS sont des protéines homologues et Ler, comme H-NS, semble faire des complexes étendus sur l'ADN, du moins *in vitro* (Mellies et al, 2011), complexes qui peuvent également rassembler deux doubles hélices d'ADN. Dans ce travail nous avons essayé de comprendre comment ces deux protéines reconnaissent le promoteur *LEE5* du LEE et comment on passe de la répression à l'activation.

La première question était d'identifier les sites reconnus par Ler : nous avons montré que Ler reconnaît les mêmes sites de fixation, sur des régions en amont et en aval du +1 de la transcription de la région promotrice de *LEE5* mais qu'H-NS est capable d'étendre son complexe sur des régions plus étendues que Ler. Les sites de fixation de ces deux protéines sont bien définis et d'une taille d'une dizaine de paires de bases. Les différences dans l'interaction de ces deux protéines avec le promoteur *LEE5* résident surtout autour du +1 et des boîtes -10 et -35. Il a déjà été proposé que H-NS se fixe en amont et en aval du +1 pour

former le complexe de répression et que la fixation de Ler perturbe ce complexe (Haack et al, 2003b). Nous montrons ici que Ler et H-NS se fixent sur les mêmes sites à l'exception de la partie cœur du promoteur et que c'est la structure fine de cette région qui va être différente suivant la protéine fixée. Il est évident dans nos expériences de compétition en retard sur gel que Ler est capable de perturber le complexe H-NS/LEE5 déjà formé et constituer un nouveau complexe qui a une organisation topologique différente du fait qu'il migre plus haut dans le gel que le complexe H-NS/LEE5. On peut donc supposer que Ler forme un plectonème sur le promoteur qui donnerait à la région de reconnaissance de la polymérase une structure plus favorable au démarrage de la transcription; Nous ne pouvons cependant pas exclure que H-NS soit présente dans le complexe observé. Des expériences complémentaires permettant d'identifier les protéines dans les complexes soit avec des anticorps soit en marquant l'une d'elles seront maintenant nécessaires. En effet les différences que nous avons mesurées dans l'affinité des deux protéines pour ce promoteur ne permettent pas de prédire que l'une pourra chasser l'autre. Par ailleurs, lorsque les compétitions sont étudiées en utilisant une technique d'empreinte, le profil de fixation d'H-NS plutôt que celui de Ler est observé. Nous ne pouvons non plus totalement exclure que nous n'ayons pas identifié le vrai site de nucléation de Ler qui pourrait permettre à celle-ci d'envahir le LEE en entier par interaction protéine/protéine à partir d'un site distant de LEE5. Cependant la similitude des deux protéines n'est pas en faveur d'un tel mécanisme et nous savons qu'H-NS a besoin de sites multiples de plus ou moins bonne affinité pour devenir répresseur, ce qui est sans doute le cas de Ler aussi pour devenir activateur. Ler et H-NS sont particulièrement homologues au niveau de leur domaine de reconnaissance de l'ADN et il est donc probable que Ler n'est pas non plus une protéine qui peut s'ancrer de façon très stable sur l'ADN (isolé du reste de la protéine ce domaine chez H-NS a une très mauvaise constante d'affinité autour de 9 μ M). Le fait que nous observions un effet sur la régulation en utilisant un plasmide en l'absence du reste du LEE dans l'environnement du promoteur écarte l'idée d'un site extérieur au LEE5 à partir duquel Ler acquerrait sa fonction.

Une autre possibilité est que Ler ne se fixe pas d'une manière directe sur LEE5 mais qu'elle interagisse avec H-NS déjà fixée pour changer la nature du complexe formé. Cependant les données de la littérature prédisent que H-NS et Ler n'interagissent pas par des contacts

protéines/protéines (Puente communication personnelle). J'ai souhaité vérifier ce résultat et aussi faire une étude de l'interactome protéique de H-NS (ensemble des protéines qui pourraient interagir avec H-NS), en utilisant la technique de résonance des plasmons de surface (« Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi) »). Cette approche s'est malheureusement révélée inadéquate, la nature d'H-NS et de Ler qui peuvent former de grands oligomères les rendant aussi très adhérentes sur différents type de surfaces et en particulier celles que l'on utilise dans cette technique.

Pour essayer de modéliser un complexe avec Ler et/ou H-NS sur le promoteur nous devons imaginer des structures en plectonème avec formations d'hélice d'hélices d'ADN. J'ai dans ce but modifié le tampon des expériences afin de me mettre dans les conditions décrites dans la littérature pour défavoriser la formation de ces structures au profit de complexes H-NS/ADN qui seraient plus rigides et impliqueraient une seule hélice d'ADN. Nous n'avons pas vu de différence entre les différents tampons, ce qui signifie soit que nous ne voyons pas ce type de structure ni par empreintes ni par gel de retard, soit que les expériences de microscopie et de molécules uniques (Liu et al, 2010) qui ont mené à ce résultats utilisaient des ADN qui ne peuvent pas servir de modèle pour étudier la régulation des promoteurs.

Nous avons vu que les sites consensus pour H-NS sont aussi reconnus par Ler et la modification de leurs séquences affectent négativement la fixation des deux protéines : pourtant lorsque l'on regarde l'activité de ce promoteur modifié *in vivo* on voit une corrélation entre cette modification et l'affinité de H-NS mais pas avec l'affinité de Ler : cette constatation favorise un modèle où Ler agirait par contact avec H-NS et non pas par contact avec l'ADN. Dans la littérature il est décrit une double action de Ler : une activation directe du promoteur et une anti-répression de H-NS (Haack et al ; 2003, Umanski et al ; 2002). Ici nous voyons en utilisant le mutant 3M que si le taux maximum d'expression du promoteur *LEE5 wt* est observé dans la souche mutante pour *hns* et donc en présence de Ler, ceci n'est pas dû à une activation directe par Ler mais plutôt à une levée de la répression d'un facteur négatif sensible à la mutation des sites de haute affinité de H-NS, facteur dont l'existence avait déjà été suggérée (Haack et al ; 2003, Mellies et al ; 2011). Nous montrons ici que le mécanisme principal d'action de Ler, est essentiellement d'antagoniser la répression induite par H-NS, et que cette action n'est pas directement sensible à l'intégralité des sites de reconnaissance de H-NS. Par contre le deuxième

régulateur négatif est, lui, sensible à cette modification. La protéine la plus proche de H-NS et présente dans les EPEC est StpA. Nous voyons que dans une *Escherichia coli* K12, en absence de Ler, l'effet de StpA sur l'expression de LEE5 n'est pas négligeable et on peut donc penser que les hétérodimères H-NS/StpA participent à la répression en plus des homodimères H-NS/H-NS. La fixation de StpA peut se faire directement sur l'ADN, mais, StpA existant principalement sous forme hétérodimérique avec H-NS, on ne peut pas exclure que ce soit essentiellement H-NS qui fasse les contacts avec l'ADN dans les EPEC *wt*.

Nous devons cependant souligner que La souche EPEC *hns(-)* que nous avons utilisée n'est pas une délétion complète du gène *hns*, il s'agit d'un mutant négatif dominant, un morceau allant des acides aminé 1 à 58 étant toujours exprimé dans cette souche. Il existe chez certains pathogènes des variantes de H-NS qui sont des protéines courtes et homologues du domaine N-terminal de H-NS. Ces protéines sont appelées H-NST pour (H-NS «truncated»). Le fait que les gènes codant pour ces protéines aient persisté après de longues périodes d'évolution suggère qu'elles jouent un rôle dans la régulation (Williamson & Free, 2005). Il est alors possible que dans le cas de notre mutant EPEC *hns* la partie restante de la protéine agisse comme une protéine à effet négatif dominant et peut aussi interagir avec StpA la rendant plus stable. Ce mécanisme existe dans le cas de la répression de l'opéron *bgl* par StpA en présence des protéines de type H-NST. Par contre quand nous sommes dans les souches K12 d'*E. coli* les délétions de *hns* et de *stpA* sont complètes et nous mesurons l'effet de StpA sur la régulation de LEE5 dans ces souches. Bien que ces expériences soient réalisées dans un contexte génétique différent des EPEC, l'interprétation des résultats est soutenue par plusieurs arguments : tout d'abord il s'agit d'une interaction directe de StpA avec LEE5, montrant ainsi que StpA n'a pas besoin des facteurs spécifiques des EPEC pour exercer son rôle répresseur. D'autre part dans le cas de l'auto-répression du promoteur LEE1 par Ler (apportée sur plasmide), elle est observée dans une EPEC *ler::kan* mais également dans une souche *E. coli* K12 qui ne contient ni *ler* ni les autres gènes du LEE (Berdichevsky et al, 2005). En effet l'obtention de souches mutées chez les EPEC est beaucoup plus difficile que chez les K12 et plusieurs études ont été faites en utilisant les K12 pour caractériser la régulation des gènes des EPEC. Dans tous les cas où les contrôles ont été possibles, les mesures d'activité, si elles ne dépendent pas de facteurs spécifiques des EPEC, sont reproductibles dans le contexte K12. Inversement c'est aussi le moyen de montrer

qu'une régulation ne dépend pas des autres facteurs du LEE. Il est clair que le contexte génétique EPEC est plus adéquat pour l'interprétation des résultats mais les difficultés que nous avons rencontrées dans la construction des mutants EPEC avec des délétions complètes du gène *stpA* (pour ne pas avoir l'effet négatif dominant) ou pour un double mutant *hns ler* (de même avec une délétion complète de H-NS) explique pourquoi ces souches n'existent pas dans la littérature. Nous avons donc fait le choix des souches K12 comme un compromis raisonnable et adopté par les spécialistes de LEE (Bustamante et al, 2011).

Nous concluons que la répression par StpA est clairement antagonisée par Ler comme celle d'H-NS. A nouveau si l'activation de Ler n'est pas sensible aux mutations des sites consensus de H-NS. StpA, elle, y est sensible, et si Ler peut activer quand seul StpA réprime, on doit à nouveau envisager une interaction entre ces protéines impliquant cette fois StpA. Nous sommes en train de construire les outils pour regarder ces interactions entre protéines au laboratoire. Si Ler n'interagit pas avec H-NS, elle pourrait interagir avec StpA, qui lui donnerait ainsi une porte d'entrée dans le complexe de répression. Il reste que l'on comprend mal pourquoi, dans le cadre de cette hypothèse, Ler aurait un motif de liaison à l'ADN si elle n'interagit pas directement avec lui.

Ce jeu des interactions entre les protéines H-NS a été récemment mis en évidence dans une étude sur le facteur de terminaison de la transcription Rho lorsqu'il est impliqué dans le «silencing» de l'expression des ADN acquis par transfert horizontal. La terminaison de la transcription Rho-dépendante constitue un système «immunitaire» séparé qui protège la bactérie de l'activité néfaste des gènes étrangers (Cardinale et al, 2008). Certaines variantes de H-NS (défaillant pour l'oligomérisation, par exemple la protéine tronquée H-NS Δ 64, le mutant L26P) peuvent agir comme des mutants négatifs dominant (Williams 2006), et permettent à la bactérie *rho(-)* et *nusG(-)* de restaurer un phénotype de terminaison de la transcription normale. Par contre cette restauration du phénotype de terminaison n'a pas lieu dans un mutant avec une délétion complète de *hns* ou de *hns/stpA*. Les auteurs en déduisent que l'effet de la mutation *hns* sur la modulation de la terminaison dépendante de Rho n'est pas complètement liée à l'initiation de la transcription ou bien au «silencing» des gènes. Ils proposent un modèle suggérant que l'interruption du filament (« scaffold ») de H-NS et de StpA par le recrutement de ces mutants négatifs dominants de H-NS soit

nécessaire pour la restauration de la terminaison de la transcription dans un mutant *nusG* et *rho* (Saxena & Gowrishankar, 2011). En bref ce modèle privilégie l'effet des interactions protéines/protéines sur la terminaison de la transcription Rho dépendante.

Nous pouvons proposer un modèle (Figure 38) où le mécanisme de levée de la répression induite par H-NS sur LEE5 se passe dans un premier temps au niveau des interactions protéines/protéines. En effet, lorsque les conditions environnementales sont favorables pour l'expression des gènes de LEE, il y a expression de la protéine Ler qui par interaction protéine/protéine avec sans doute StpA peut perturber le filament nucléoprotéique formé sur la région promotrice de LEE5. Ensuite Ler, par interaction avec elle même, réorganise le plectonème et donc la topologie ou la structure fine de la région promotrice cœur pour la rendre favorable à l'initiation de la transcription. Une fois que l'ARN polymérase a démarré, elle peut écartier le complexe répresseur de H-NS. Il existe plusieurs exemples dans la littérature de protéines qui se lient à l'ADN en modifiant sa topologie, et qui lèvent la répression induite par H-NS : sur le promoteur *yjj-bglJ* d'*E. coli* la protéine LeuO induit une courbure de l'ADN qui empêche l'oligomérisation de H-NS sur le promoteur (Stratmann et al, 2008), IHF est souvent un agent levant la répression induite par H-NS sur les promoteurs et elle est connue pour modifier la topologie de l'ADN (voir page 44), Fis s'oppose à la répression de H-NS sur son propre promoteur et sur le promoteur *rrnB* (Falconi et al, 1996), sur les promoteurs *ugtL* et *pagC* de *S. typhimurium* la protéine SlyA modifie la topologie du complexe H-NS/ADN pour permettre la transcription (Stoebel et al, 2008).

La question qui reste ouverte est pourquoi Ler est spécifique du LEE, pourquoi ne régule-t-elle pas des promoteurs d'*E. coli* comme *proU* qui ont aussi la particularité d'être rendu silencieux par H-NS (Gowrishankar & Manna, 1996) . La proximité de l'expression de Ler et des gènes qu'elle régule est elle importante ? On ne sait que peu de choses sur les concentrations relatives des protéines Ler et H-NS dans la cellule et nous travaillons actuellement pour mesurer la quantité des ARN messagers de ces protéines dans la cellule. Une estimation de leur concentration, ainsi que de celle de StpA sera nécessaire pour comprendre cette régulation qui, d'après ce que nous observons est transitoire, en phase exponentielle dans les conditions utilisées. En effet s'il est connu que la protéine H-NS est en quantité relativement stable (autour de 20000 copies) au cours de la croissance, ce n'est pas le cas des autres paralogues et chez les UPEC il a été montré que HfP et StpA sont

régulés de façon distinctes en fonction des conditions environnementales ce qui amène à H-NS, des taux variables de ses partenaires (Müller et al, 2006)

Un autre aspect intéressant est la localisation de H-NS dans la cellule: En utilisant des fusions à une protéine photoactivable, on peut localiser les différentes NAPs dans le nucléoïde bactérien. Cette étude a été réalisée pour les quatre principales NAP (HU, Fis, IHF et H-NS). Si on voit que HU, Fis et IHF et StpA sont distribués dans l'ensemble du volume du nucléoïde, H-NS forme des paquets bien définis occupant une petite portion de la chromatine. Nous pouvons alors nous demander si les gènes régulés par H-NS sont séquestrés dans un point particulier. En ce sens, l'observation que les amas de H-NS sont relativement statiques alors que les des gènes régulés par H-NS sont plus dynamiques et peuvent quitter ces amas montre une organisation hétérogène et dynamique du nucléoïde bactérien (Wang et al, 2011). Nous pouvons alors suggérer que dans le cas du LEE quand les conditions environnementales favorisent son expression, il sort des amas de H-NS qui se comporteraient alors comme des usines de répression (qu'on pourrait appeler « Repression factories » par analogie avec les « Transcription factories » (Papantonis A, 2011), Une fois sorti de cette usine, la concentration de H-NS est alors très faible et on peut comprendre que même avec une affinité similaire, dans ces conditions que ce soient les analogues de H-NS (eux sont répartis dans la cellule) qui assurent la régulation. La compétition ne se fait dans ce cas qu'entre facteurs paralogues de H-NS et ceux-ci sont, comme le montre l'exemple des UPEC, exprimés de façon différentielle en raison de la phase de croissance ou de l'environnement.

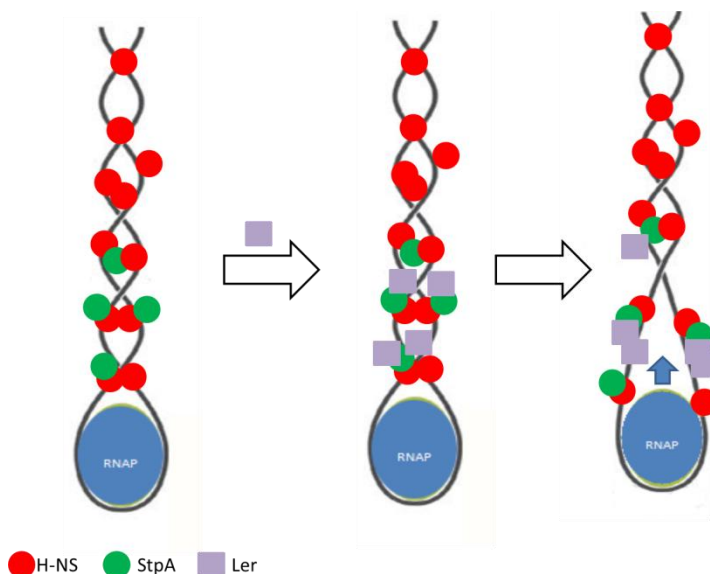


Figure 38 : Schéma proposant un modèle d'action de Ler pour lever la répression induite par H-NS sur le promoteur de LEE5. StpA sert de porte d'entrée pour Ler qui une fois fixée sur la région promotrice de LEE5 induit un changement dans la topologie de la région promotrice proprement dite favorable pour l'initiation de la transcription.

Bibliographie

Abe H, Tatsuno I, Tobe T, Okutani A, Sasakawa C (2002) Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**: 3500-3509

Abril MA, Ramos JL (1993) Physical organization of the upper pathway operon promoter of the *Pseudomonas* TOL plasmid. Sequence and positional requirements for XylR-dependent activation of transcription. *Molecular & general genetics : MGG* **239**: 281-288

Aiyar SE, McLeod SM, Ross W, Hirvonen CA, Thomas MS, Johnson RC, Gourse RL (2002) Architecture of Fis-activated transcription complexes at the *Escherichia coli* rrnB P1 and rrnE P1 promoters. *Journal of molecular biology* **316**: 501-516

Amit R, Oppenheim AB, Stavans J (2004) Single molecule elasticity measurements: a biophysical approach to bacterial nucleoid organization. *Biophysical journal* **87**: 1392-1393

Ansari AZ BJ, O'Halloran TV. (1995) DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature* **374**: 371-375

Arold ST, Leonard PG, Parkinson GN, Ladbury JE (2010) H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 15728-15732

Auner H, Buckle M, Deufel A, Kutateladze T, Lazarus L, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pemberton I, Schneider R, Travers A (2003) Mechanism of transcriptional activation by FIS: role of core promoter structure and DNA topology. *Journal of molecular biology* **331**: 331-344

Azam TA, Ishihama A (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* **274**: 33105-33113

Bakaev VV (1981) [Structure of chromosomal deoxyribonucleoproteins. XI. Organization of deoxyribonucleoprotein complex in bacterial cells]. *Molekuliarnaia biologiya* **15**: 1350-1363

- Balandina A, Claret L, Hengge-Aronis R, Rouviere-Yaniv J (2001) The Escherichia coli histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol Microbiol* **39**: 1069-1079
- Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW (1983) Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic Escherichia coli. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **2**: 534-538
- Banos RC, Pons JI, Madrid C, Juarez A (2008) A global modulatory role for the Yersinia enterocolitica H-NS protein. *Microbiology* **154**: 1281-1289
- Barnard A, Wolfe A, Busby S (2004) Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Curr Opin Microbiol* **7**: 102-108
- Berdichevsky T, Friedberg D, Nadler C, Rokney A, Oppenheim A, Rosenshine I (2005) Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **187**: 349-357
- Bloch V, Yang Y, Margeat E, Chavanieu A, Auge MT, Robert B, Arold S, Rimsky S, Kochoyan M (2003) The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition. *Nature structural biology* **10**: 212-218
- Borukhov S, Nudler E (2008) RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends Microbiol* **16**: 126-134
- Bouffartigues E, Buckle M, Badaut C, Travers A, Rimsky S (2007) H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nature structural & molecular biology* **14**: 441-448
- Braun OH (1974) Letter: Bray's discovery of pathogenic Esch. coli as a cause of infantile gastroenteritis. *Archives of disease in childhood* **49**: 668
- Brescia CC, Kaw MK, Sledjeski DD (2004) The DNA binding protein H-NS binds to and alters the stability of RNA in vitro and in vivo. *Journal of molecular biology* **339**: 505-514
- Browning DF, Busby SJ (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature reviews Microbiology* **2**: 57-65

Browning DF, Grainger DC, Busby SJ (2010) Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol* **13**: 773-780

Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, Puente JL (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**: 664-678

Bustamante VH, Villalba MI, Garcia-Angulo VA, Vazquez A, Martinez LC, Jimenez R, Puente JL (2011) PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **82**: 398-415

Campellone KG (2010) Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. *The FEBS journal* **277**: 2390-2402

Campellone KG, Leong JM (2005) Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. *Mol Microbiol* **56**: 416-432

Campellone KG, Robbins D, Leong JM (2004) EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Developmental cell* **7**: 217-228

Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary research* **36**: 289-311

Cardinale CJ, Washburn RS, Tadigotla VR, Brown LM, Gottesman ME, Nudler E (2008) Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science* **320**: 935-938

Ceschini S, Lupidi G, Coletta M, Pon C, Fioretti E, Angeletti M (2000) Multimeric self-assembly equilibria involving the histone-like protein H-NS. A thermodynamic study. *J Biol Chem* **275**: 729-734

Chesarone MA, Goode BL (2009) Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Current opinion in cell biology* **21**: 28-37

Cho BK, Knight EM, Barrett CL, Palsson BO (2008) Genome-wide analysis of Fis binding in *Escherichia coli* indicates a causative role for A-/AT-tracts. *Genome research* **18**: 900-910

Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH (2003) Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical microbiology reviews* **16**: 365-378

Clements A, Smollett K, Lee SF, Hartland EL, Lowe M, Frankel G (2011) EspG of enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* binds the Golgi matrix protein GM130 and disrupts the Golgi structure and function. *Cellular microbiology* **13**: 1429-1439

Cordeiro TN, Schmidt H, Madrid C, Juarez A, Bernado P, Griesinger C, Garcia J, Pons M (2011) Indirect DNA Readout by an H-NS Related Protein: Structure of the DNA Complex of the C-Terminal Domain of Ler. *PLoS pathogens* **7**: e1002380

Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nature reviews Microbiology* **4**: 811-825

Creasey EA, Delahay RM, Daniell SJ, Frankel G (2003) Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 2093-2106

Crepin VF, Shaw R, Abe CM, Knutton S, Frankel G (2005) Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. *J Bacteriol* **187**: 2881-2889

Dame R, Noom M, Wuite G (2006) Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* **444**: 387-390

Dame RT, Wyman C, Wurm R, Wagner R, Goosen N (2002) Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J Biol Chem* **277**: 2146-2150

Daniell SJ, Kocsis E, Morris E, Knutton S, Booy FP, Frankel G (2003) 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**: 301-308

de Kievit TR, Iglewski BH (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* **68**: 4839-4849

de Lorenzo V, Herrero M, Metzke M, Timmis KN (1991) An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent Pu promoter of TOL plasmid. *The EMBO journal* **10**: 1159-1167

Dean P, Maresca M, Schuller S, Phillips AD, Kenny B (2006) Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected

effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 1876-1881

Dean P, Scott JA, Knox AA, Quitard S, Watkins NJ, Kenny B (2010) The enteropathogenic *E. coli* effector EspF targets and disrupts the nucleolus by a process regulated by mitochondrial dysfunction. *PLoS pathogens* **6**: e1000961

deHaseth PL, Helmann JD (1995) Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Mol Microbiol* **16**: 817-824

Deighan P, Beloin C, Dorman CJ (2003) Three-way interactions among the Sfh, StpA and H-NS nucleoid-structuring proteins of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T. *Mol Microbiol* **48**: 1401-1416

Delahay RM, Shaw RK, Elliott SJ, Kaper JB, Knutton S, Frankel G (2002) Functional analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system chaperone CesT identifies domains that mediate substrate interactions. *Mol Microbiol* **43**: 61-73

Demple (1996) Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon--a review. *Genes & development* **179**: 53-57

Deng S, Stein RA, Higgins NP (2004a) Transcription-induced barriers to supercoil diffusion in the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3398-3403

Deng S, Stein RA, Higgins NP (2005) Organization of supercoil domains and their reorganization by transcription. *Mol Microbiol* **57**: 1511-1521

Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T, Finlay BB (2004b) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3597-3602

DeVinney R, Puente JL, Gauthier A, Goosney D, Finlay BB (2001) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* **41**: 1445-1458

Dillon SC, Dorman CJ (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature reviews Microbiology* **8**: 185-195

Dong T, Kirchhof MG, Schellhorn HE (2008) RpoS regulation of gene expression during exponential growth of Escherichia coli K12. *Molecular genetics and genomics : MGG* **279**: 267-277

Dong T, Schellhorn HE (2009a) Control of RpoS in global gene expression of Escherichia coli in minimal media. *Molecular genetics and genomics : MGG* **281**: 19-33

Dong T, Schellhorn HE (2009b) Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic Escherichia coli O157:H7 strain EDL933. *BMC genomics* **10**: 349

Dong T, Schellhorn HE (2010) Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect Immun* **78**: 887-897

Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM (1993) Role of the eaeA gene in experimental enteropathogenic Escherichia coli infection. *The Journal of clinical investigation* **92**: 1412-1417

Dorman CJ (2006) DNA supercoiling and bacterial gene expression. *Science progress* **89**: 151-166

Dorman CJ, McKenna S, Beloin C (2001) Regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri, a facultative intracellular pathogen. *International journal of medical microbiology : IJMM* **291**: 89-96

Dorman CJ, Ni Bhriain N (1993) DNA topology and bacterial virulence gene regulation. *Trends Microbiol* **1**: 92-99

Dorman CJ, Ni Bhriain N, Higgins CF (1990) DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri. *Nature* **344**: 789-792

Dorman CJ, Porter ME (1998) The Shigella virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol Microbiol* **29**: 677-684

Dove SL, Darst SA, Hochschild A (2003) Region 4 of sigma as a target for transcription regulation. *Mol Microbiol* **48**: 863-874

Ebright RH (1993) Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol* **8**: 797-802

Ebright RH (2000) RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *Journal of molecular biology* **304**: 687-698

Elliott S, Sperandio V, Girón J, Shin S, Mellies J, Wainwright L, Hutcheson S, McDaniel T, Kaper J (2000) The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**: 6115-6126

Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4

Elliott SJ, Yu J, Kaper JB (1999) The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect Immun* **67**: 4260-4263

Espeli O, Bocard F (2006) Organization of the *Escherichia coli* chromosome into macrodomains and its possible functional implications. *Journal of structural biology* **156**: 304-310

Esposito D, Petrovic A, Harris R, Ono S, Eccleston JF, Mbabaali A, Haq I, Higgins CF, Hinton JC, Driscoll PC, Ladbury JE (2002) H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein. *Journal of molecular biology* **324**: 841-850

Falconi M, Brandi A, La Teana A, Gualerzi CO, Pon CL (1996) Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression. *Mol Microbiol* **19**: 965-975

Falconi M, Colonna B, Prosseda G, Micheli G, Gualerzi CO (1998) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *The EMBO journal* **17**: 7033-7043

Falconi M, Gualtieri MT, La Teana A, Losso MA, Pon CL (1988) Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. *Mol Microbiol* **2**: 323-329

Feklistov A, Darst SA (2009) Promoter recognition by bacterial alternative sigma factors: the price of high selectivity? *Genes & development* **23**: 2371-2375

Foster JW, Moreno M (1999) Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. *Novartis Foundation symposium* **221**: 55-69; discussion 70-54

Frankel G, Philips AD, Novakova M, Batchelor M, Hicks S, Dougan G (1998) Generation of Escherichia coli intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol Microbiol* **29**: 559-570

Free A, Dorman CJ (1995) Coupling of Escherichia coli hns mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control. *Mol Microbiol* **18**: 101-113

Friedberg D, Umanski T, Fang Y, Rosenshine I (1999) Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* **34**: 941-952

Garmendia J, Frankel G, Crepin VF (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**: 2573-2585

Garmendia J, Phillips AD, Carlier MF, Chong Y, Schuller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw RK, Knutton S, Frankel G (2004) TccP is an enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cellular microbiology* **6**: 1167-1183

Gauthier A, Puente JL, Finlay BB (2003) Secretin of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* **71**: 3310-3319

Glading A, Lauffenburger DA, Wells A (2002) Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends in cell biology* **12**: 46-54

Goldberg MD, Johnson M, Hinton JC, Williams PH (2001) Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* **41**: 549-559

Goodsell DS, Dickerson RE (1994) Bending and curvature calculations in B-DNA. *Nucleic Acids Res* **22**: 5497-5503

Goosen N, van de Putte P (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* **16**: 1-7

Gordon BR, Li Y, Cote A, Weirauch MT, Ding P, Hughes TR, Navarre WW, Xia B, Liu J (2011) Structural basis for recognition of AT-rich DNA by unrelated xenogeneic silencing proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 10690-10695

Gourse RL, Ross W, Gaal T (2000) UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol* **37**: 687-695

Gowrishankar J, Manna D (1996) How is osmotic regulation of transcription of the Escherichia coli proU operon achieved? A review and a model. *Genetica* **97**: 363-378

Grainger D, Hurd D, Goldberg M, Busby S (2006a) Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the Escherichia coli genome. *Nucleic Acids Res* **34**: 4642-4652

Grainger DC, Goldberg MD, Lee DJ, Busby SJ (2008) Selective repression by Fis and H-NS at the Escherichia coli dps promoter. *Mol Microbiol* **68**: 1366-1377

Grainger DC, Hurd D, Goldberg MD, Busby SJ (2006b) Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the Escherichia coli genome. *Nucleic Acids Res* **34**: 4642-4652

Grove A, Saavedra TC (2002) The role of surface-exposed lysines in wrapping DNA about the bacterial histone-like protein HU. *Biochemistry* **41**: 7597-7603

Gruenheid S, DeVinney R, Bladt F, Goosney D, Gelkop S, Gish GD, Pawson T, Finlay BB (2001) Enteropathogenic E. coli Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nature cell biology* **3**: 856-859

Haack K, Robinson C, Miller K, Fowlkes J, Mellies J (2003a) Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **71**: 384-392

Haack KR, Robinson CL, Miller KJ, Fowlkes JW, Mellies JL (2003b) Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **71**: 384-392

Habdas BJ, Smart J, Kaper JB, Sperandio V (2010) The LysR-type transcriptional regulator QseD alters type three secretion in enterohemorrhagic Escherichia coli and motility in K-12 Escherichia coli. *J Bacteriol* **192**: 3699-3712

Hardwidge PR, Deng W, Vallance BA, Rodriguez-Escudero I, Cid VJ, Molina M, Finlay BB (2005) Modulation of host cytoskeleton function by the enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* effector protein EspG. *Infect Immun* **73**: 2586-2594

Hartland EL, Robins-Browne RM (1998) In vitro association between the virulence proteins, YopD and YopE, of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS microbiology letters* **162**: 207-213

Hayward RD, Hume PJ, Humphreys D, Phillips N, Smith K, Koronakis V (2009) Clustering transfers the translocated *Escherichia coli* receptor into lipid rafts to stimulate reversible activation of c-Fyn. *Cellular microbiology* **11**: 433-441

Hayward RD, Leong JM, Koronakis V, Campellone KG (2006) Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nature reviews Microbiology* **4**: 358-370

Helmann JD CM (1987) DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84(18):6422-4**

Higgins CF, Dorman CJ, Stirling DA, Waddell L, Booth IR, May G, Bremer E (1988) A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**: 569-584

Higgins NP, Yang X, Fu Q, Roth JR (1996) Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 2825-2835

Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **62**: 379-433

Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, Kenny B, Quail MA, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel G (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* **191**: 347-354

Iizumi Y, Sagara H, Kabe Y, Azuma M, Kume K, Ogawa M, Nagai T, Gillespie PG, Sasakawa C, Handa H (2007) The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell host & microbe* **2**: 383-392

Ishihama A (2000) Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. *Annual review of microbiology* **54**: 499-518

Jimenez R, Cruz-Migoni SB, Huerta-Saquero A, Bustamante VH, Puente JL (2010) Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of ler expression in enteropathogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **192**: 4627-4642

Jordi BJ, Higgins CF (2000) The downstream regulatory element of the proU operon of Salmonella typhimurium inhibits open complex formation by RNA polymerase at a distance. *J Biol Chem* **275**: 12123-12128

Kanack KJ, Crawford JA, Tatsuno I, Karmali MA, Kaper JB (2005) SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system. *Infect Immun* **73**: 4327-4337

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic Escherichia coli. *Nature reviews Microbiology* **2**: 123-140

Karem K, Foster JW (1993) The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol* **10**: 75-86

Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H (1985) The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing Escherichia coli. *The Journal of infectious diseases* **151**: 775-782

Kauffmann F (1947) The serology of the coli group. *J Immunol* **57**: 71-100

Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ (2005) Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **69**: 527-543

Kendall MM, Rasko DA, Sperandio V (2010) The LysR-type regulator QseA regulates both characterized and putative virulence genes in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Mol Microbiol* **76**: 1306-1321

Kenny B (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* **31**: 1229-1241

Kenny B (2002) Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *International journal of medical microbiology : IJMM* **291**: 469-477

Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520

Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *The EMBO journal* **17**: 2166-2176

Kodama T (2002) [Mechanism of A/E lesion formation produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli*: O157--role of EspB, Tir and cortactin]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* **60**: 1101-1107

Kodama T, Akeda Y, Kono G, Takahashi A, Imura K, Iida T, Honda T (2002) The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with alpha-catenin. *Cellular microbiology* **4**: 213-222

Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**: 775-779

Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605

Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi C, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pon C, Rimsky S, Stella S, Babu M, Travers A (2007) High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **35**: 6330-6337

Leonard PG, Ono S, Gor J, Perkins SJ, Ladbury JE (2009) Investigation of the self-association and hetero-association interactions of H-NS and StpA from Enterobacteria. *Mol Microbiol* **73**: 165-179

Levine MM, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H, Wachsmuth K (1987) A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *The Journal of infectious diseases* **156**: 175-182

Liu Y, Chen H, Kenney LJ, Yan J (2010) A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes. *Genes & development* **24**: 339-344

Lucchini S, McDermott P, Thompson A, Hinton JC (2009) The H-NS-like protein StpA represses the RpoS (sigma 38) regulon during exponential growth of *Salmonella Typhimurium*. *Mol Microbiol* **74**: 1169-1186

Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, Hinton JC (2006) H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS pathogens* **2**: e81

Luijsterburg MS, White MF, van Driel R, Dame RT (2008) The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archaea and eukaryotes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **43**: 393-418

Malik M, Bensaid A, Rouviere-Yaniv J, Drlica K (1996) Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *Journal of molecular biology* **256**: 66-76

Marches O, Covarelli V, Dahan S, Cougoule C, Bhatta P, Frankel G, Caron E (2008) EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsonophagocytosis. *Cellular microbiology* **10**: 1104-1115

Martinez-Antonio A, Salgado H, Gama-Castro S, Gutierrez-Rios RM, Jimenez-Jacinto V, Collado-Vides J (2003) Environmental conditions and transcriptional regulation in *Escherichia coli*: a physiological integrative approach. *Biotechnology and bioengineering* **84**: 743-749

Mathew R, Mukherjee R, Balachandar R, Chatterji D (2006) Deletion of the *rpoZ* gene, encoding the omega subunit of RNA polymerase, results in pleiotropic surface-related phenotypes in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **152**: 1741-1750

Matsuzawa T, Kuwae A, Yoshida S, Sasakawa C, Abe A (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. *The EMBO journal* **23**: 3570-3582

McLeod SM, Johnson RC (2001) Control of transcription by nucleoid proteins. *Curr Opin Microbiol* **4**: 152-159

McNairn E, Ni Bhriain N, Dorman CJ (1995) Overexpression of the *Shigella flexneri* genes coding for DNA topoisomerase IV compensates for loss of DNA topoisomerase I: effect on virulence gene expression. *Mol Microbiol* **15**: 507-517

Mellies JL, Barron AM, Carmona AM (2007) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* **75**: 4199-4210

Mellies JL, Benison G, McNitt W, Mavor D, Boniface C, Larabee FJ (2011) Ler of pathogenic *Escherichia coli* forms toroidal protein-DNA complexes. *Microbiology* **157**: 1123-1133

Mercier R, Petit MA, Schbath S, Robin S, El Karoui M, Boccard F, Espeli O (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* **135**: 475-485

Miroslavova NS, Busby SJ (2006) Investigations of the modular structure of bacterial promoters. *Biochemical Society symposium*: 1-10

Mitchell JE ZD, Busby SJ, Minchin SD. (2003 Aug) Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **15;31**: 4689-4695.

Moulin L, Rahmouni AR, Boccard F (2005) Topological insulators inhibit diffusion of transcription-induced positive supercoils in the chromosome of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **55**: 601-610

Müller C, Dobrindt U, Nagy G, Emödy L, Uhlin B, Hacker J (2006) Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 5428-5438

Mundy R, MacDonald TT, Dougan G, Frankel G, Wiles S (2005) *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cellular microbiology* **7**: 1697-1706

Munera D, Crepin VF, Marches O, Frankel G (2010) N-terminal type III secretion signal of enteropathogenic *Escherichia coli* translocator proteins. *J Bacteriol* **192**: 3534-3539

munoz A (2010) Extreme DNA bending: Molecular Basis of the regulatory Breadth of IHF. In *Bacterial Chromatin* Springer (ed).

Murakami KS, Darst SA (2003) Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Current opinion in structural biology* **13**: 31-39

Murakami KS, Masuda S, Campbell EA, Muzzin O, Darst SA (2002) Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* **296**: 1285-1290

Muskhelishvili G, Buckle M, Heumann H, Kahmann R, Travers AA (1997) FIS activates sequential steps during transcription initiation at a stable RNA promoter. *The EMBO journal* **16**: 3655-3665

Muskhelishvili GT, A. (2010) FIS and Nucleoid Dynamics upon Exit from Lag Phase. In *Bacterial chromatin*, Springer (ed).

Nagai T, Abe A, Sasakawa C (2005) Targeting of enteropathogenic Escherichia coli EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J Biol Chem* **280**: 2998-3011

Nagarajavel V, Madhusudan S, Dole S, Rahmouni AR, Schnetz K (2007) Repression by binding of H-NS within the transcription unit. *J Biol Chem* **282**: 23622-23630

Navarre WW (2010) H-NS as defense system. In *Bacterial Chromatin*, Dame RTD, C. J (ed).

Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in Salmonella. *Science* **313**: 236-238

Niki H, Yamaichi Y, Hiraga S (2000) Dynamic organization of chromosomal DNA in Escherichia coli. *Genes & development* **14**: 212-223

Noom MC, Navarre WW, Oshima T, Wuite GJ, Dame RT (2007) H-NS promotes looped domain formation in the bacterial chromosome. *Current biology : CB* **17**: R913-914

O'Brien AD, LaVeck GD (1983) Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli. *Infect Immun* **40**: 675-683

O'Loughlin EV, Robins-Browne RM (2001) Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**: 493-507

O'Reilly M, Devine KM (1997) Expression of AbrB, a transition state regulator from Bacillus subtilis, is growth phase dependent in a manner resembling that of Fis, the nucleoid binding protein from Escherichia coli. *J Bacteriol* **179**: 522-529

Ochoa TJ, Clearly TG (2004) Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *Biomaterials : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **17**: 257-260

Ohniwa RL, Morikawa K, Kim J, Ohta T, Ishihama A, Wada C, Takeyasu K (2006) Dynamic state of DNA topology is essential for genome condensation in bacteria. *The EMBO journal* **25**: 5591-5602

Ohniwa RL, Morikawa K, Takeshita SL, Kim J, Ohta T, Wada C, Takeyasu K (2007) Transcription-coupled nucleoid architecture in bacteria. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **12**: 1141-1152

Oshima T, Ishikawa S, Kurokawa K, Aiba H, Ogasawara N (2006) Escherichia coli histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **13**: 141-153

Pan CQ, Feng JA, Finkel SE, Landgraf R, Sigman D, Johnson RC (1994) Structure of the Escherichia coli Fis-DNA complex probed by protein conjugated with 1,10-phenanthroline copper(I) complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 1721-1725

Pan CQ, Finkel SE, Cramton SE, Feng JA, Sigman DS, Johnson RC (1996a) Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. *Journal of molecular biology* **264**: 675-695

Pan CQ, Johnson RC, Sigman DS (1996b) Identification of new Fis binding sites by DNA scission with Fis-1,10-phenanthroline-copper(I) chimeras. *Biochemistry* **35**: 4326-4333

Papantonis A CP (2011) Fixing the model for transcription: The DNA moves, not the polymerase. *Transcription*

Perez-Rueda E, Collado-Vides J (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Res* **28**: 1838-1847

Phillips N, Hayward RD, Koronakis V (2004) Phosphorylation of the enteropathogenic E. coli receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nature cell biology* **6**: 618-625

Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**: 453-465

Porter ME, Dorman CJ (1997) Positive regulation of *Shigella flexneri* virulence genes by integration host factor. *J Bacteriol* **179**: 6537-6550

Postow L, Hardy CD, Arsuaga J, Cozzarelli NR (2004) Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes & development* **18**: 1766-1779

Price SB, Cheng CM, Kaspar CW, Wright JC, DeGraves FJ, Penfound TA, Castanie-Cornet MP, Foster JW (2000) Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and environmental microbiology* **66**: 632-637

Renzoni D, Esposito D, Pfuhl M, Hinton JC, Higgins CF, Driscoll PC, Ladbury JE (2001) Structural characterization of the N-terminal oligomerization domain of the bacterial chromatin-structuring protein, H-NS. *Journal of molecular biology* **306**: 1127-1137

Rice PA, Yang S, Mizuuchi K, Nash HA (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**: 1295-1306

Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ (2005) ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8006-8011

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England journal of medicine* **308**: 681-685

Rimsky S (2004) Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr Opin Microbiol* **7**: 109-114

Rimsky S, Travers A (2011) Pervasive regulation of nucleoid structure and function by nucleoid-associated proteins. *Curr Opin Microbiol* **14**: 136-141

Roe AJ, Yull H, Naylor SW, Woodward MJ, Smith DG, Gally DL (2003) Heterogeneous surface expression of EspA translocon filaments by *Escherichia coli* O157:H7 is controlled at the posttranscriptional level. *Infect Immun* **71**: 5900-5909

Rosenshine I, Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB (1992) Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *The EMBO journal* **11**: 3551-3560

Ross W, Gosink KK, Salomon J, Igarashi K, Zou C, Ishihama A, Severinov K, Gourse RL (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* **262**: 1407-1413

Ruchaud-Sparagano MH, Maresca M, Kenny B (2007) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. *Cellular microbiology* **9**: 1909-1921

Russo TA, Johnson JR (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of infectious diseases* **181**: 1753-1754

Sal-Man N, Biemans-Oldehinkel E, Finlay BB (2009) Structural microengineers: pathogenic *Escherichia coli* redesigns the actin cytoskeleton in host cells. *Structure* **17**: 15-19

Saxena S, Gowrishankar J (2011) Modulation of Rho-dependent transcription termination in *Escherichia coli* by the H-NS family of proteins. *J Bacteriol* **193**: 3832-3841

Schmidt MA (2010) LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular microbiology* **12**: 1544-1552

Shames SR, Deng W, Guttman JA, de Hoog CL, Li Y, Hardwidge PR, Sham HP, Vallance BA, Foster LJ, Finlay BB (2010) The pathogenic *E. coli* type III effector EspZ interacts with host CD98 and facilitates host cell prosurvival signalling. *Cellular microbiology* **12**: 1322-1339

Sharma VK, Zuerner RL (2004) Role of hha and ler in transcriptional regulation of the esp operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **186**: 7290-7301

Sharp FC, Sperandio V (2007) QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**: 2432-2440

Shaw RK, Smollett K, Cleary J, Garmendia J, Straatman-Iwanowska A, Frankel G, Knutton S (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 4385-4390

Shimada T, Bridier A, Briandet R, Ishihama A (2011) Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Mol Microbiol* **82**: 378-397

Shin D, Lim S, Seok YJ, Ryu S (2001) Heat shock RNA polymerase (E sigma(32)) is involved in the transcription of *mlc* and crucial for induction of the Mlc regulon by glucose in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 25871-25875

Shin M, Song M, Rhee JH, Hong Y, Kim YJ, Seok YJ, Ha KS, Jung SH, Choy HE (2005) DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of E sigma70 as a cofactor for looping. *Genes & development* **19**: 2388-2398

Shindo H, Iwaki T, Ieda R, Kurumizaka H, Ueguchi C, Mizuno T, Morikawa S, Nakamura H, Kuboniwa H (1995) Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **360**: 125-131

Shindo H, Ohnuki A, Ginba H, Katoh E, Ueguchi C, Mizuno T, Yamazaki T (1999) Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from *Escherichia coli* by heteronuclear NMR spectroscopy. *FEBS Lett* **455**: 63-69

Siegele DA, Hu JC, Walter WA, Gross CA (1989) Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Journal of molecular biology* **206**: 591-603

Sieira R, Comerici DJ, Pietrasanta LI, Ugalde RA (2004) Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* *virB* operon. *Mol Microbiol* **54**: 808-822

Sinden RR, Pettijohn DE (1981) Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 224-228

Skoko D, Yoo D, Bai H, Schnurr B, Yan J, McLeod SM, Marko JF, Johnson RC (2006) Mechanism of chromosome compaction and looping by the *Escherichia coli* nucleoid protein Fis. *Journal of molecular biology* **364**: 777-798

Smyth C, Lundbäck T, Renzoni D, Siligardi G, Beavil R, Layton M, Sidebotham J, Hinton J, Driscoll P, Higgins C, Ladbury J (2000) Oligomerization of the chromatin-structuring protein H-NS. *Mol Microbiol* **36**: 962-972

Sonnenfield JM, Burns CM, Higgins CF, Hinton JC (2001) The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutants. *Biochimie* **83**: 243-249

Spassky A, Rimsky S, Garreau H, Buc H (1984) H1a, an E. coli DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA in vitro. *Nucleic Acids Res* **12**: 5321-5340

Sperandio V, Mellies J, Delahay R, Frankel G, Crawford J, Nguyen W, Kaper J (2000) Activation of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol Microbiol* **38**: 781-793

Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8951-8956

Spurio R, Durrenberger M, Falconi M, La Teana A, Pon CL, Gualerzi CO (1992) Lethal overproduction of the Escherichia coli nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. *Molecular & general genetics : MGG* **231**: 201-211

Stella S, Spurio R, Falconi M, Pon CL, Gualerzi CO (2005) Nature and mechanism of the in vivo oligomerization of nucleoid protein H-NS. *The EMBO journal* **24**: 2896-2905

Stoebel DM, Free A, Dorman CJ (2008) Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology* **154**: 2533-2545

Stonehouse E, Kovacicova G, Taylor RK, Skorupski K (2008) Integration host factor positively regulates virulence gene expression in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **190**: 4736-4748

Stonington OG, Pettijohn DE (1971) The folded genome of Escherichia coli isolated in a protein-DNA-RNA complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 6-9

Stratmann T, Madhusudan S, Schnetz K (2008) Regulation of the yjjQ-bglJ operon, encoding LuxR-type transcription factors, and the divergent yjjP gene by H-NS and LeuO. *J Bacteriol* **190**: 926-935

Swinger KK, Lemberg KM, Zhang Y, Rice PA (2003) Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures. *The EMBO journal* **22**: 3749-3760

Swinger KK, Rice PA (2004) IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Current opinion in structural biology* **14**: 28-35

Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M (2004) Conserved features of type III secretion. *Cellular microbiology* **6**: 805-816

Tanaka H, Yasuzawa K, Kohno K, Goshima N, Kano Y, Saiki T, Imamoto F (1995) Role of HU proteins in forming and constraining supercoils of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics : MGG* **248**: 518-526

Tendeng C, Bertin P (2003) H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol* **11**: 511-518

Teramoto J, Yoshimura SH, Takeyasu K, Ishihama A (2010) A novel nucleoid protein of *Escherichia coli* induced under anaerobic growth conditions. *Nucleic Acids Res* **38**: 3605-3618

Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ (2006) An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdaoid phages in their dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14941-14946

Tobe T, Yoshikawa M, Sasakawa C (1995) Thermoregulation of *virB* transcription in *Shigella flexneri* by sensing of changes in local DNA superhelicity. *J Bacteriol* **177**: 1094-1097

Touze T, Hayward RD, Eswaran J, Leong JM, Koronakis V (2004) Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. *Mol Microbiol* **51**: 73-87

Travers A, Muskhelishvili G (2005) DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nature reviews Microbiology* **3**: 157-169

Tree JJ, Wolfson EB, Wang D, Roe AJ, Gally DL (2009) Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **17**: 361-370

Tristao LC, Gonzalez AG, Coutinho CA, Cerqueira AM, Gomes MJ, Irino K, Guth BE, Andrade JR (2007) Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Veterinary microbiology* **119**: 358-365

Tsujikawa L, Tsodikov OV, deHaseth PL (2002) Interaction of RNA polymerase with forked DNA: evidence for two kinetically significant intermediates on the pathway to the final

complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 3493-3498

Ueguchi C, Mizuno T (1996) Purification of H-NS protein and its regulatory effect on transcription in vitro. *Methods in enzymology* **274**: 271-276

Ueguchi C, Suzuki T, Yoshida T, Tanaka K, Mizuno T (1996) Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of Escherichia coli nucleoid protein H-NS. *Journal of molecular biology* **263**: 149-162

Umanski T, Rosenshine I, Friedberg D (2002) Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic Escherichia coli. *Microbiology* **148**: 2735-2744

Ussery D, Larsen TS, Wilkes KT, Friis C, Worning P, Krogh A, Brunak S (2001) Genome organisation and chromatin structure in Escherichia coli. *Biochimie* **83**: 201-212

Uyar E, Kurokawa K, Yoshimura M, Ishikawa S, Ogasawara N, Oshima T (2009) Differential binding profiles of StpA in wild-type and h-ns mutant cells: a comparative analysis of cooperative partners by chromatin immunoprecipitation-microarray analysis. *J Bacteriol* **191**: 2388-2391

van Workum M, van Dooren SJ, Oldenburg N, Molenaar D, Jensen PR, Snoep JL, Westerhoff HV (1996) DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **20**: 351-360

Vanmaele RP, Armstrong GD (1997) Effect of carbon source on localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **65**: 1408-1413

Wang W, Li GW, Chen C, Xie XS, Zhuang X (2011) Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria. *Science* **333**: 1445-1449

Weisberg RA, Freundlich M, Friedman D, Gardner J, Goosen N, Nash H, Oppenheim A, Rouviere-Yaniv J (1996) Nomenclature of the genes encoding IHF. *Mol Microbiol* **19**: 642

Willenbrock H, Ussery DW (2004) Chromatin architecture and gene expression in Escherichia coli. *Genome biology* **5**: 252

Williams R, Rimsky S, Buc H (1996) Probing the structure, function, and interactions of the Escherichia coli H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives. *J Bacteriol* **178**: 4335-4343

Williamson HS, Free A (2005) A truncated H-NS-like protein from enteropathogenic *Escherichia coli* acts as an H-NS antagonist. *Mol Microbiol* **55**: 808-827

Wilson RK, Shaw RK, Daniell S, Knutton S, Frankel G (2001) Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology* **3**: 753-762

Wolf T, Janzen W, Blum C, Schnetz K (2006) Differential dependence of StpA on H-NS in autoregulation of *stpA* and in regulation of *bgl*. *J Bacteriol* **188**: 6728-6738

Wolff C, Nisan I, Hanski E, Frankel G, Rosenshine I (1998) Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 143-155

Worcel A, Burgi E (1972) On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **71**: 127-147

Wu LJ, Ishikawa S, Kawai Y, Oshima T, Ogasawara N, Errington J (2009) Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *The EMBO journal* **28**: 1940-1952

Yerushalmi G, Nadler C, Berdichevski T, Rosenshine I (2008) Mutational analysis of the locus of enterocyte effacement-encoded regulator (Ler) of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 7808-7818

Yip CK, Kimbrough TG, Felise HB, Vuckovic M, Thomas NA, Pfuetzner RA, Frey EA, Finlay BB, Miller SI, Strynadka NC (2005) Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**: 702-707

Yona-Nadler C, Umanski T, Aizawa S, Friedberg D, Rosenshine I (2003) Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 877-884

Zhang A, Belfort M (1992) Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein. *Nucleic Acids Res* **20**: 6735

Zhang A, Rimsky S, Reaban ME, Buc H, Belfort M (1996) *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *The EMBO journal* **15**: 1340-1349

Zhang G, Campbell EA, Minakhin L, Richter C, Severinov K, Darst SA (1999) Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* **98**: 811-824

Résumé

Le génome des bactéries vivantes n'est pas une entité statique mais au contraire c'est quelque chose très dynamique évoluant avec le temps. Les bactéries évoluent en acquérant par transfert horizontal des gènes du matériel génétique. C'est le cas des EPEC qui ont acquis l'îlot LEE via ce mécanisme. La protéine H-NS joue un rôle important dans la reconnaissance de cet ADN étranger, dans la liaison à cet ADN et dans la répression de son expression quand ce n'est pas en profit du « fitness » de la bactérie. Comme résultat H-NS régule la majorité des gènes associés à la virulence chez les entérobactéries *Salmonella*, *Yersinia* et les EPEC.

Les EPEC possèdent une protéine paralogue à H-NS et codée dans le premier opéron de leur îlot LEE, il s'agit de la protéine Ler. Une fois exprimée Ler induit l'expression des 4 opérons restant de la région parmi lesquels *LEE5*. Ler partage une grande homologie avec H-NS surtout au niveau de leurs domaines de reconnaissance de l'ADN. Malgré cette homologie H-NS réprime *LEE5* tandis que Ler l'active. De plus si H-NS est un régulateur global agissant sur plus de 500 gènes chez *E. coli* Ler est une protéine spécifique qui ne va agir que sur un petit nombre de promoteurs tous impliqués dans la virulence

L'étude qualitative et quantitative de l'interaction de H-NS et de Ler avec la région promotrice de *LEE5* montre qu'elles partagent globalement les mêmes sites de fixation sur des régions étendues en amont et en aval du +1 de la transcription. Ces sites de fixation sont bien définis d'une dizaine de paires de bases. L'affinité de ces sites pour H-NS est variable. Trois sites de haute affinité pour H-NS ont été identifiés. La séquence de ces sites est similaire à celle du site consensus élaboré en étudiant le promoteur *proU* (Bouffartigues et al ; 2007). Des différences dans l'interaction de ces deux protéines avec le promoteur *LEE5* résident surtout autour du +1 et des boîtes -10 et -35. Il s'agit de la première étude comparant la fixation de H-NS et de Ler sur des régions étendues de ce promoteur dans le but d'expliquer la régulation différentielle de ces deux protéines paralogues.

L'étude de l'expression de *LEE5 in vivo* nous a permis de proposer que le mécanisme essentiel d'action de Ler est dirigé contre la répression induite par H-NS et que le taux maximum d'expression du promoteur *LEE5 wt* observé dans la souche mutante pour *hns* en présence de Ler (en comparaison avec la souche double mutante où Ler est absente) n'est pas dû à une activation directe par Ler mais plutôt à une répression par StpA, sensible à la mutation des sites de haute affinité de H-NS.