

## Régulation de la synthèse des facteurs de virulence par la température chez la bactérie phytopathogène Dickeya dadantii

Elodie Hérault

### ► To cite this version:

Elodie Hérault. Régulation de la synthèse des facteurs de virulence par la température chez la bactérie phytopathogène Dickeya dadantii. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT: 2013LYO10259. tel-01127936

## HAL Id: tel-01127936 https://theses.hal.science/tel-01127936

Submitted on 9 Mar 2015  $\,$ 

**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.



N° d'ordre



Année 2013

#### THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

#### Délivrée par

#### L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

#### ECOLE DOCTORALE E2M2 « Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation »

DIPLOME DE DOCTORAT Spécialité Microbiologie

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 12 décembre 2013

par

### **Mlle Hérault Elodie**

#### TITRE

# Régulation de la synthèse des facteurs de virulence par la température chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*

Directeur de thèse : Dr. William Nasser

т	T	D	$\mathbf{V}$
J	U	1	. 1

M. Carlos Blanco, Professeur (Univ. Rennes I, Rennes)RapporteurM. Christophe Beloin, Chargé de Recherche (Institut Pasteur, Paris)RapporteurMme Sylvie Elsen, Chargé de Recherche CNRS (CEA Grenoble)ExaminateurM. Ludovic Vial, Maître de Conférence (Univ. Claude Bernard, Lyon)ExaminateurMme Sylvie Reverchon, Maître de Conférence (INSA de Lyon)EncadrantM. William Nasser, Directeur de Recherche CNRS (INSA, Lyon)Directeur de thèse

#### **RESUMÉ DE LA THÈSE EN FRANÇAIS**

## Chaque cadre doit contenir un résumé de 1700 caractères maximum, espaces compris. En cas de dépassement, la coupure sera automatique.

#### Le doctorant adresse son texte sous forme électronique selon les recommandations de la bibliothèque

*Dickeya dadantii* est une Entérobactérie responsable de la maladie de la pourriture molle sur de nombreuses plantes. Ce symptôme est lié à la production d'un arsenal d'enzymes dont les pectate lyases Pel qui dégradent les tissus végétaux. La synthèse des Pels est soumise à un contrôle très fin qui fait interveni différents régulateurs répondant chacun à une condition environnementale. La température est un facteur qu agit sur leur synthèse et pour lequel les mécanismes moléculaires restaient non élucidés.

Nous avons montré que le répresseur PecT intervient dans la thermorégulation de la synthèse de Pels et dans celle de deux autres fonctions de virulence : la mobilité et la synthèse des exopolysaccharides de surface. La quantification des transcrits des gènes de ces 3 fonctions de virulence a permis de montrer que l'action de PecT dans ce contrôle a lieu au niveau transcriptionnel. Par ailleurs, des résultats obtenus in vive ont montré que les températures élevées favorisent le relâchement de l'ADN de D. dadantii et facilitent la fixation de PecT sur les régions régulatrices des gènes pel. De manière remarquable, un relâchement artificie de l'ADN par un traitement inhibant la gyrase entraine une augmentation de la fixation de PecT sur les gène pel de cellules cultivées à basses températures. De plus, la délétion de PecT se traduit par une augmentation de la capacité de D. dadantii à induire la pourriture molle à hautes températures. Ainsi la topologie de l'ADN et PecT agissent de manière concertée pour moduler la synthèse des Pels en fonction de la température.

#### **RESUMÉ DE LA THÈSE EN ANGLAIS**

Bacteria are colonizers of various environments and host organisms, and they are often subjected to drastic temperature variations. *Dickeya dadantii* is a Gram-negative pathogen infecting a wide range of plant species. Soft rot, the visible symptom, is mainly due to the production of pectate lyases (Pels) that can destroy the plant cell walls. Production of Pels is controlled by a complex regulation system and responds to various stimuli, such as presence of pectin, plant extracts, growth phase, temperature or iron concentration. Although many studies have been carried out, the mechanisms of control of Pels production by temperature have not yet been elucidated. In bacteria, thermoregulation acting at the level of transcription initiation occurs usually both via transcription factors and DNA topology.

We show that PecT, a previously identified repressor, is involved in the thermoregulation of the *pel* gene expression. Using *in vivo* Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) coupled to quantitative RT-PCR (qRT-PCR), we reveal that PecT binding to the *pel* gene promoters is modulated by temperature. By manipulating the DNA topology *in vivo*, we further show that DNA supercoiling state is involved in the thermoregulation of *pel* gene expression by PecT. In addition, we show that the development of the pathogenicity of the *pecT* mutant according to changes in temperature is different from that of the parental strain. This report presents a new example of how plant pathogenic bacteria use transcription factor and DNA topology to adjust synthesis of virulence factors in response to temperature variation.

#### TITRE DE LA THÈSE EN ANGLAIS : Transcrire en toutes lettres les symboles spéciaux

REGULATION OF THE SYNTHESIS OF VIRULENCE FACTORS BY TEMPERATURE IN THE PLANT PATHOGENIC BACTERIUM DICKEYA DADANTII

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Carlos Blanco et Christophe Beloin d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également Mme Sylvie Elsen et M. Ludovic Vial d'avoir accepter d'examiner cette thèse.

Evidemment, je remercie très sincèrement William Nasser pour son encadrement et sa présence (excepté les soirs de matchs de football). Tout en étant à l'écoute, vous avez toujours été là pour m'encourager et me faire avancer. Grâce à vous, j'aurai compris que « rien ne sert de courir » et qu'une réflexion posée est toujours bien venue avant de passer à l'action.

Je remercie aussi Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat de m'avoir permis de réaliser ce travail dans le laboratoire Microbiologie, Adaptation et Pathogénie et d'avoir répondu à toutes mes questions relatives à la vie du laboratoire.

Mes sincères remerciements vont également à Sylvie Reverchon qui s'est beaucoup arraché les cheveux en ce qui concerne l'analyse des résultats, les corrections et, il faut l'avouer, mon style d'écriture. Heureusement ils ont appris à s'endurcir avec le temps et, surtout, les étudiants... Evidemment, un grand merci à Guy Condemine pour son aide à la relecture de l'article et aussi pour celle d'autres rapports. Le congrès de la FEMS à Leipzig aurait été totalement différent sans la présence de Vladimir Shevchik ! « Leipzig by night », ça vaut le détour... voilà quoi. Je remercie aussi sincèrement Claire Prigent-Combaret qui a suivi mon travail avec assiduité et qui a toujours su rester disponible pour m'aider. Egalement merci à Marie-Andrée Mandrand et Florence Wisniewski-Dye pour l'assistance qu'elles ont fournie lors ma thèse.

Les personnes sans qui nous ne ferions et ne serions rien (ou du moins grand-chose)... notre fameuse équipe technique ! Véronique Utzinger, Yvette Alvaro, Jean-Michel Prost : sans vous, nos thèses ne devraient pas durer 3 mais 5 ans. Et aussi notre équipe de secrétaires (Martine Baccou, Isabelle Thévenoux et Isabelle Bouillot) lesquelles sont souvent rudement éprouvées par nos demandes de dernière minute.

Bon bon, qui me reste-t-il ? Personne ? Mais non j'déc... Julien (lol, mdr, ce que tu veux quoi) ! Je te remercie pour tout, tu as été là depuis le début, je me souviens encore de notre première rencontre avec nostalgie (moi assise à côté des bains marie hurlant et toi venant me dire que je pouvais m'installer dans ton bureau... c'est comme dans un rêve). Garde le courage pour la suite, j'espère sincèrement que tout va se dérouler pour le mieux et je fais confiance à Manon, Camille et Magalie pour te « stimuler », au moins avec de la caféine. Je souhaite aussi un bon courage aux étudiants qui sont en place et qui prennent la relêve. Faites nous rêver avec *Dickeya*.

Que serai-je devenue sans ma « dream team » Camille et Natacha ? Les fous rires, les crises de nerf, les pauses dej avec nos amies les guêpes, les petits dîners où l'on a partagé nos (boires et nos) déboires. Vous allez tellement me manquer, sincèrement, je ne garderai que de bons souvenirs de nos moments passés. Ton invitation pour la Biélorussie n'est pas tombée dans l'oreille d'un sourd Natacha et j'espère qu'un jour j'aurai le plaisir de t'y rejoindre (pardonne-moi Camille mais Nantes je connais déjà et puis ça ne fait même pas partie de la Bretagne).

Une pincée de nostalgie aussi pour les personnes qui sont restées plus ou moins longtemps dans le laboratoire : Ouafa (j'ai adoré travailler avec toi et aussi nos papotages évidemment), Mélanie (la stagiaire parfaite avec laquelle notre équipe aurait certainement gagné le prix du meilleur gâteau lors du pique-nique du labo... non non j'ai totalement digéré cette injustice, crois-moi julien), Lou (te souhaite bon courage pour la thèse que tu viens de commencer), Julien (pour avoir mis Camille en joie pendant plus ou moins 5 mois), Gosia (toujours d'accord pour faire la fête, ce fut un plaisir de partager quelques mois en ta compagnie) et puis les autres que j'oublie (car il y en a certainement).

Pour finir, merci à mes amis qui durent, durent... Claire (oui oui un jour je viendrai dans ton appartement), Lucie, Angel, Orlane (ma patate adorée), Tristan, ma famille pour leur présence, toutes les petites attentions et les colis de soutien qu'ils ont pu m'envoyer, et puis mon petit capitaine de bateau qui a su endurer mes sautes d'humeur. Et évidemment Nicolas, oui, tu as le droit à une phrase pour toi tout seul, toujours dans mes pensées bien que trop loin à mon goût... mais attention j'arrive !

## Sommaire

Rer	nerc	iem	ents	3
Son	nma	ire .		4
List	te de	s fig	gures	8
List	te de	es ta	bleaux	12
Glo	ssai	re		13
Inti	rodu	ctio	n bibliographique	16
I.	Ada	apta	tion des êtres vivants à leur environnement	16
	1.		Introduction	16
	2.		La confrontation des organismes à la température est inévitable	17
	3.		La première barrière : l'enveloppe bactérienne	18
		a.	Organisation de l'enveloppe bactérienne	18
		b.	La membrane est une macrostructure fluide qui réagit aux variations des	
			conditions environnementales	20
	4.		Modifications structurales membranaires en liaison avec le contexte thermique	20
		a.	Pourquoi la température affecte la fluidité membranaire ?	20
		b.	Adaptation des phospholipides membranaires au contexte thermique	20
		c.	Influence de la température sur le peptidoglycane de l'enveloppe bactérienne	22
		d.	L'enveloppe bactérienne : un thermosenseur ?	22
II.	Mo	dula	ation de la structure de la chromatine bactérienne par la température	24
	1.		Influence de la température sur la structure globale de la chromatine	24
	2.		Les topoisomérases, des enzymes primordiales au métabolisme cellulaire	26
		a.	Premières conceptualisations de la nécessité des topoisomérases dans	
			un monde à ADN	26
		b.	Variété des topoisomérases dans le monde du vivant	26
	3.		Action complémentaire des protéines associées au nucléoïde dans la	
			structuration de la chromatine	28
		a.	Premières découvertes des protéines histones-like chez les organismes bactériens	28
		b.	Caractéristiques générales des protéines associées au nucléoïde	29
		c.	La protéine H-NS : un régulateur global de l'adaptation aux conditions	
			environnementales	30
		d.	Les protéines Fis, IHF et HU	31

		e.	Le surenroulement de l'ADN, les topoisomérases et les NAPs	
III.	La	tem	pérature, un signal physique	
	1.		Les signaux thermiques : une clé pour l'adaptation à un nouvel habitat	
	2.		Les réponses de stress engagées lors des chocs thermiques	
		a.	La réponse au choc thermique (+)	
		b.	La réponse au choc thermique (-)	
		c.	Les réponses au choc thermique (-) et (+) comme une ouverture vers	
			l'adaptation aux températures extrêmes	
	3.		La thermorégulation de la virulence chez les espèces du genre Yersinia :	
			un modèle complexe	
		a.	Pourquoi choisir les Yersinia spp. ?	
		b.	L'initiation de la transcription : un point critique de l'expression génique	
			hautement régulé	
		c.	La stabilité du répresseur YmoA est dépendante de la température	
		d.	L'ARNm <i>lcrF</i> est un ARN thermomètre	
		e.	RovA, un autre facteur transcriptionnel qui répond à la température chez	
			Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica	
	4.		La thermorégulation de la virulence chez les bactéries phytopathogènes	50
IV.	Dic	key	a dadantii, une bactérie phytopathogène ayant une capacité d'adaptation	
	aux	co	ntraintes environnementales	53
	1.		Ancienne taxonomie et caractéristiques générales des Dickeya spp	53
		a.	Taxonomies ancienne et actuelle	53
		b.	Expansion mondiale : les causes et les conséquences	
		c.	Cycle de vie des <i>Dickeya</i> spp	
		d.	Dickeya dadantii 3937, une référence dans l'étude de la régulation des	
			fonctions de virulence des bactéries pathogènes des plantes	
	2.		Le pouvoir pathogène de Dickeya dadantii est multifactoriel	
	3.		La dégradation des parois végétales	
		a.	Composition des parois végétales et diversité des pectines	
		b.	Action des pectinases synthétisées par Dickeya dadantii	61
		c.	Spécificité d'action des pectinases	
		d.	Les gènes codant les pectinases sont distribués tout le long du chromosome	
			de D. dadantii	
	4.		Importance de la perception des signaux et de leur intégration dans le	
			réseau de régulation des Pels	66
Obj	ectif	is d	e l'étude	69

Ma	tériel et	Méthode	. 70
I.	Souche	es bactériennes, plasmides et conditions de culture	. 70
II. Techniques de biologie moléculaire et de génétique		ques de biologie moléculaire et de génétique	. 70
	1.	Extraction plasmidique, digestion, ligation, électrophorèse, purification,	
		transformation de l'ADN	. 70
	2.	Transfert d'ADN par la technique de la transduction	. 71
	3.	Construction de souches génétiquement modifiées chez D. dadantii	. 72
	4.	Amplification de séquences spécifiques d'ADN par réaction de polymérase en chaîne.	. 73
	5.	Extraction des ARN : méthode du « phénol chaud »	. 75
	6.	Rétrotranscription	. 78
	7.	PCR quantitative en temps réel (Q-PCR)	. 78
	8.	Séparation des topoisomères plasmidiques par migration électrophorétique	
		sur gel d'agarose	. 79
III.	Techni	ques biochimiques	. 80
	1.	Détection d'activité enzymatique sur milieux solides : pectinase, cellulase et protéase .	. 80
	2.	Dosage de l'activité pectate lyase totale	. 81
	3.	Dosage de l'activité β-glucuronidase totale	. 81
	4.	Surproduction et purification de la protéine PecT	. 82
	5.	Electrophorèse en conditions dénaturantes ou SDS-PAGE	. 83
	6.	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et révélation par	
		immunodétection (Western-blot)	. 83
	7.	Obtention d'un sérum polyclonal et enrichissement en anticorps spécifiques de PecT	. 84
	8.	Technique de l'immunoprécipitation de la chromatine	. 85
	9.	Préparation des sondes radioactives	. 87
	10.	Retard de migration sur gel de polyacrylamide (band-shift)	. 88
IV.	Analys	es bio-informatique et statistique	. 88
Rés	ultats		. 89
I.	PecT t	hermorégule la virulence chez <i>D. dadantii</i>	. 89
	1.	PecT est un acteur important de la thermorégulation de la production des Pels	. 89
	2.	L'expression des gènes <i>pel</i> est thermorégulée	. 91
	3.	La thermorégulation exercée par PecT n'est pas limitée aux gènes pel	
		(résultats non publiés)	. 94
	4.	Le mutant <i>pecT</i> conserve un pouvoir pathogène à hautes températures	. 94
	5.	L'inactivation de PecT n'a pas un impact appréciable sur la stabilité des	
		transcrits <i>pel</i> ou des Pels vis-à-vis de la température de croissance	. 96
	6.	L'intégration du changement de température au niveau de la transcription	

		des gènes <i>pel</i> est réalisée par PecT de manière rapide	99
	7.	La production de PecT est thermorégulée	101
	8.	Influence de la température sur la fixation de PecT aux régions promotrices	
		des gènes <i>pel</i>	102
II.	Produc	tion et purification de PecT sous une forme stable	104
	1.	PecT est un régulateur de la famille LysR (LTTR)	104
	2.	Optimisation de la production et de la purification PecT sous une forme stable	106
	3.	Etude fonctionnelle de la protéine PecT purifiée	107
	a.	En utilisant la protéine obtenue via la méthode de purification mise au point	107
	b.	Essais d'optimisation de la stabilisation de PecT	109
III.	L'ADI	N de D. dadantii ressent les variations de température et sa dynamique	
	modul	e la fixation de régulateurs transcriptionnels	111
	1.	Le niveau de surenroulement de l'ADN est influencé par la température	111
	2.	La fixation de PecT est influencée par le niveau de surenroulement de l'ADN	112
IV.	Influer	ce des protéines associées au nucléoïde dans la réponse à la température et	
	dans la	virulence chez D. dadantii (résultats non publiés)	115
	1.	La répression de la synthèse des Pels par Fis est plus importante à basses	
		températures	115
	2.	L'expression du gène <i>fis</i> est plus favorable à basses températures lorsque	
		le niveau de surenroulement de l'ADN est élevé	117
	3.	Action de Fis dans la modulation du niveau d'enroulement de l'ADN par	
		la température	118
	4.	La protéine IHF de D. dadantii active la mobilité et la synthèse des enzymes	
		dégradatives extracellulaires	120
	5.	IHF module l'expression du gène <i>pecT</i>	123
Dis	cussion	générale	127
I.	H-NS	n'est pas impliqué dans la thermorégulation des gènes pel malgré son	
acti	on sur la	a synthèse de PecT, pourquoi ?	127
II.	PecT u	ne protéine de la famille LysR sensible à la topologie de l'ADN, une originalité ?	129
III.	La viru	lence de <i>D. dadantii</i> est régulée par PecT et la totoplogie de l'ADN	130
Cor	nclusion	et Perspectives	132
Réf	érences	bibliographiques	135
Anı	nexes		149

## Section « Introduction bibliographique »

Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif et à	
Gram positif	19
Figure 2 : Structuration de la bicouche phospholipidique et composition des	
phospholipides	19
Figure 3 : Interprétation individuelle d'un message physico-chimique à l'intérieur d'un	
écosystème	23
Figure 4 : Les trois paramètres topologiques de l'ADN : l'enlacement « Lk », les	
torsions « Tw » et les vrillages « Wr »	25
Figure 5 : Surenroulement du chromosome bactérien	25
Figure 6 : Equilibre existant entre l'activité des topoisomérases bactériennes chez E.	
coli	27
Figure 7 : Propriétés architecturales des principales protéines associées au nucléoïde	
chez E. coli	31
Figure 8 : L'homéostasie du niveau d'enroulement de l'ADN est influencée par la	
disponibilité en énergie, l'activité des gyrase / topoisomérase et les NAPs	33
Figure 9 : Les différents niveaux de régulation impliqués dans la réponse à la	
température	34
Figure 10 : Vue d'ensemble du contrôle de la qualité des protéines cellulaires opéré par	
les protéines chaperonnes et par les protéases après un choc thermique	37
Figure 11 : Le transcrit rpoH synthétisé par <i>E. coli</i> est un ARN thermomètre	38
Figure 12 : Modèle schématique de la réponse au choc thermique (+) chez E. coli	39
Figure 13 : Evolution de la synthèse protéique après un choc thermique (-) chez E. coli	41
Figure 14 : Modèle schématique de la réponse à la température par les protéines	
régulatrices LcrF et RovA chez les bactéries du genre Yersinia.	47
Figure 15 : Structure de l'ARN thermomètre yscW-lcrF synthétisé par les Yersinia spp.	
à 25°C	48
Figure 16 : Modèle schématique de la régulation de la synthèse de la coronatine par le	
système à deux composantes CorS/CorR-CorP chez Pseudomas syringae pv. glycinae	51
Figure 17: Symptômes caractéristiques de la maladie de la pourriture molle sur	
différents végétaux infectés par les Dickeya spp	55

Figure 18 : Incident de dissémination d'une infection par les bactéries du genre Dickeya	
lors de la culture hydroponique des endives	. 55
Figure 19 : Cycle de la pourriture molle lors de l'infection des plants de pomme de terre	
par les bactéries du genre <i>Dickeya</i>	. 57
Figure 20 : Le pouvoir pathogène de <i>D. dadantii</i> est multifactoriel	. 59
Figure 21 : Paroi végétale et structure biochimique de la pectine	. 60
Figure 22 : Modèle schématique de la voie de dégradation de la pectine par les	
pectinases	. 62
Figure 23 : Rôle des différentes pectinases dans le pouvoir pathogène de Dickeya sur	
des plants de Saintpaulia ionanthia	. 63
Figure 24 : Propriétés catalytiques et modèle schématique d'action des Pels au niveau	
de la paroi végétale	. 64
Figure 25 : Localisation chromosomique des gènes codant les différentes pectinases	. 65
Figure 26 : Intégration des signaux environnementaux et physiologiques directement au	
niveau de l'expression des gènes <i>pel</i> majeurs	. 67
Figure 27 : Modèle schématique de la régulation de la synthèse des facteurs de	
virulence par le régulateur global H-NS et place du répresseur PecT dans ce contrôle	. 68

## Section « Matériel et Méthode »

Figure 28 : Etapes de clonage et de marquage des régions régulatrices des gènes <i>pelE</i> et	
pelD utilisées lors de l'interaction ADN-protéine en conditions non dénaturantes	74
Figure 29 : Schéma récapitulatif des différentes approches expérimentales	76
Figure 30 : Exemple représentatif d'un profil électrophorétique d'échantillons d'ARN	
de bonne qualité	77
Figure 31 : Induction de la surproduction de la protéine PecT-6His chez E. coli M15	
pREP4 transformée par le plasmide recombinant pQE70- <i>pecT</i>	82
Figure 32 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la technique de	
l'immunoprécipitation de la chromatine	86

## Sections « Résultats » et « Discussion générale »

Figure 33 : Production des pectate lyases (Pels) en fonction de la température de	
croissance chez la souche parentale (PS) et les mutants dérivés pecT, hns et hns-pecT	91
Figure 34 : Recherche d'un gène de référence pour les expériences de RT-PCR	
quantitative	92
Figure 35 : Influence de la température de croissance sur l'expression des gènes <i>pel</i> et	
<i>pecT</i> et sur l'accumulation de PecT	93

Figure 36 : Influence de la température sur l'expression des gènes <i>fliC</i> et <i>weaP</i>	94
Figure 37 : Influence de la température sur la virulence de la souche sauvage et du	
mutant <i>pecT</i> de <i>D. dadantii</i>	95
Figure 38 : Stabilité des transcrits $pel$ , $pecT$ et $lpxC$ en fonction de la température de	
croissance dans la souche parentale et le mutant <i>pecT</i> dérivé	97
Figure 39 : Séquence nucléotidique de l'ADN correspondant aux régions 5' non	
traduites de l'ARNm des gènes pelD, peE et pelB et structures secondaires putatives de	
ces régions 5'UTR des ARNm pelD et pelE	98
Figure 40 : Influence de la température sur la stabilité de l'activité spécifique Pel et sur	
celle de l'accumulation de la protéine PecT	99
Figure 41 : Impact d'un choc thermique sur l'efficacité de la répression de l'expression	
des gènes <i>pel</i> par PecT	100
Figure 42 : Influence de la température sur la fixation de PecT aux régions promotrices	
des gènes <i>pelB</i> , <i>pelD</i> , <i>pelE</i> , <i>pecT</i> et <i>lpxC</i>	103
Figure 43: Prédiction de la structure secondaire de PecT et identification de ses	
domaines fonctionnels comparativement aux autres régulateurs de la famille des LTTRs	104
Figure 44 : Structure du domaine de liaison de l'effecteur de RovM, l'homologue de	
PecT chez Y. pseudotuberculosis	105
Figure 45 : Surproduction et purification de la protéine PecT-6His	107
Figure 46 : Analyse de la fixation de PecT sur les régions régulatrices courtes et	
longues des gènes <i>pelE</i> et <i>pelD</i> par retard de migration	108
Figure 47 : Influence de la température de croissance sur le niveau d'enroulement de	
l'ADN de D. dadantii	111
Figure 48 : Effet de la novobiocine sur le niveau de surenroulement de l'ADN chez la	
souche parentale et le mutant <i>pecT</i>	112
Figure 49 : Influence du niveau d'enroulement de l'ADN sur la répression exercée par	
PecT sur l'expression des gènes <i>pel</i>	113
Figure 50 : Modèle de la régulation de la synthèse des pectate lyases par la température	
chez D. dadantii	114
Figure 51 : Influence de la température sur la synthèse des Pels chez la souche sauvage	
de D. dadantii et le mutant fis dérivé	116
Figure 52 : Dépendance transcriptionnelle du gène <i>fis</i> vis-à-vis de la température, de	
PecT et du niveau de surenroulement de l'ADN	118
Figure 53 : Influence de la température et de Fis sur le niveau de surenroulement de	
l'ADN	119
Figure 54 : Modèle de l'action des régulateurs Fis et PecT en réponse aux variations de	
la température chez D. dadantii	120

Figure 55 : Changements phénotypiques induits par l'inactivation de la sous-unité $\alpha$ de	
la protéine IHF	121
Figure 56 : Production des Pels à différents stades de croissance chez la souche sauvage	
et le mutant <i>himA</i>	122
Figure 57 : Impact des protéines PecT et IHF dans la formation de structures	
d'adhérence lors de cultures liquides de D. dadantii	123
Figure 58 : Répartition des sites de fixation des protéines IHF, Fis, CRP et KdgR sur	
les réions promotrices des gènes <i>pelE</i> et <i>pecT</i>	124
Figure 59 : Influence de l'inactivation de HimA sur l'activité transcriptionnelle du gène	
pecT	125
Figure 60 : Modèle spéculatif de la régulation exercée par IHF sur l'expression des	
gènes <i>pecT</i> et <i>pel</i>	126
Figure 61 : Alignement des séquences des protéines H-NS1, H-NS2 et H-NS3	
identifiées dans le génome de <i>D. dadantii</i>	127

### Section « Introduction bibliographique »

Tableau I : Influence de la structure des chaînes carbonées des acides gras dans la	
résistance aux températures extrêmes	21
Tableau II : Classification des topoisomérases dans le monde du vivant	27
Tableau III : Les principales protéines associées au nucléoïde	29
Tableau IV : Quelques exemples caractéristiques des différents mécanismes utilisés par	
les pathogènes pour l'expression de leurs facteurs de virulence	35
Tableau V : Les différentes espèces de Dickeya spp. et leurs hôtes végétaux identifiés	54

### Section « Matériel et Méthode »

Tableau	VI : Programmes	d'amplifications	utilisés lors des expériences	de PCR 72	3
---------	-----------------	------------------	-------------------------------	-----------	---

### Section « Résultats »

Tableau VII : Impact de la température de croissance sur la synthèse des pectate lyases	
dans les différents mutants dérivés de la souche parentale A350 de D. dadantii	91
Tableau VIII : Récapitulatif des modifications réalisées dans les étapes de purification	
de PecT dans le but d'améliorer la stabilité de la protéine	109

### Section « Annexe »

## GLOSSAIRE

°C	degré Celsius	C=C	liaison double carbone-
μg	microgramme		carbone
μL	microlitre	cDNA	complementary
3-PG	3-		deoxyribonucleic acid
	phosphoglycéraldéhyde	CFA	acide coronafacique
$\Delta DO_x$	pente à la densité optique	CFA	acide coronamique
	х	CFU	colony forming units
Δ	différence	CH <sub>2</sub> O	formaldéhyde
А	adénine	ChIP	immunoprécipitation de
Å	ångström		la chromatine
aa	acide aminé	choc thermique (-)	choc thermique froid
AcNa	acétate de sodium	choc thermique (+)	choc thermique chaud
ADN	acide	Ci	curie
	désoxyribonucléique	cm	centimètre
ADNc	ADN complémentaire	Cm	chloramphénicol
ADN-T	ADN de transfert	cm <sup>2</sup>	centimètre carré
ADP	adénosine diphosphate	СМС	carboxy-méthyl-cellulose
AG	acide gras	Cm <sup>R</sup>	résistance au
AMPc	adénosine		chloramphénicol
	monophosphate cyclique	CNRS	centre national de la
Ар	ampicilline		recherche scientifique
Ap <sup>R</sup>	résistance à l'ampicilline	Ср	crossing point
ARN	acide ribonucléique	CSP	cold-shock protein
ARNm	acide ribonucléique	CSR	cold-shock response
	messager	Da	dalton
AS	activité spécifique	DB	downstream box
ATP	adénosine triphosphate	dCTP	désoxy cytidine tri-
BrET	bromure d'éthidium		phosphate
bp	paire de bases	déf.	définition
BSA	bovin serum albumin	dI-dC	désoxyinosine-
С	cytosine		désoxycytosine
CaCl <sub>2</sub>	chlorure de calcium	DiUGA	digalacturonate insaturé
CAP	cold acclimation protein	DKI	5-kéto-4-deoxyuronate
C-C	liaison simple carbone	DNA	deoxyribonucleic acid
	carbone	$DO_x$	densité optique à x nm
DTT	dithiothréitol		

E2M2	évolution écosystèmes	KCl	chlorure de potassium
	microbiologie	Kd	constante de dissociation
	modélisation	kDa	kilodalton
EDTA	éthylene diamine tétra	KDG	2-céto-3-
	acetate		désoxygluconate
EIEC	E. coli entéroinvasive	Km	kanamycine
EPS	exopolysaccharide de	Km <sup>R</sup>	résistance à la
	surface		kanamycine
ERO	espèce réactive de	КОН	hydroxyde de potassium
	l'oxygène	fw	forward
et al.	et alii « et les autres »	L	litre
Fe <sup>2+</sup>	fer ferreux	LB	Luria Bertani
Fe <sup>3+</sup>	fer ferrique	Lk	linking number
facteur $\sigma^{24}$	facteur sigma 24 ou	LPS	lipopolysaccharide
	RpoE	LTTR	lysR transcriptional type
facteur $\sigma^{32}$	facteur sigma 32 ou		regulator
	RpoH	М	molaire
FC	fold change	Mb	mégabase
FourU	quatre uraciles	mA	milliampère
G	gramme	MCS	site multiple de clonage
G	guanine	mg	milligramme
GA	galacturonate	min	minute
GUS	β-glucuronidase	mL	millilitre
h	heure	mM	millimolaire
HC1	acide chlorhydrique	NaCl	chlorure de sodium
Hepes	acide 4-(2-	NAG	N-acétyl-glucosamine
	hydroxyéthyl)-1-	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sodium dihydrogen
	pipérazine éthane		phosphate
	sulfonique	NAM	N-acétyl-muramique
HRP	horseradish peroxidase	NaOH	hydroxyde de sodium
HSP	heat-shock protein	NAPs	protéines associées au
HSR	heat-shock response		nucléoïde
Н	hydrogène	ND-2000	Nanodrop 2000
IgG	immunoglobuline G	ng	nanogramme
INSA	institut national des	nm	nanomètre
	sciences appliquées	nM	nanomolaire
IP	immunoprécipité	NP-40	nonyl phenoxy
IPTG	isopropyl-beta-D-		polyethoxylethanol
	thiogalactopyranoside	nt	nucléotide
kb	kilobase	0	oxygène

OEPP	organisation européenne	SA	specific activity
	et méditerranéenne pour	SD	Shine-Delgarno
	la protection des plantes	SDS	sodium dodécyl sulfate
ORF	open reading frame	Sm	streptomycine
PAGE	électrophorèse en gel de	Sm <sup>R</sup>	résistance à la
	polyacrylamide		streptomycine
PCR	réaction de	spp.	species pluralis « toutes
	polymérisation en chaîne		les espèces »
Pel	pectate lyase	SSTx	système de sécrétion de
PGA	polygalacturonate		type x
рН	potentiel hydrogène	syn.	synonyme
pI	point isoélectrique	Т	total ou thymine (selon
PL	phospholipide		contexte)
PMSF	phenylmethylsulfonyl	T°C	température en degré
	fluoride		Celsius
PNP	paranitropnénol	TBS	tris-buffered saline
PNPU	paranitrophényl-β-D-	TEMED	N,N,N',N'-tetra
	glucuronide		methylethylenediamine
PS	parental strain	Tris	tris-(hydroxyméthyl)-
pv.	pathovar		aminométhane
p-value	valeur p	Tw	twisting
Q	quantification relative	U	units
Q-PCR	PCR quantitative	UB	upstream box
Q-RT-PCR	rétrotranscription	UCBL	université Claude
	couplée à la PCR		Bernard Lyon 1
	quantitative	UGA	galacturonate insaturé
RBS	ribosome binding site	UMR	unité mixte de recherche
RNA	ribonucleic acid	Univ.	université
ROSE	repression of heat-shock	UP	upstream element
	gene expression	UV	ultraviolet
rpm	rotations par minute	V	volt
RR <sub>C</sub>	région régulatrice courte	V/V	volume / volume
RR <sub>L</sub>	région régulatrice longue	W/V	masse / volume
rv	reverse	Wr	writhing
S	seconde	WT	wild-type strain

#### I. Adaptation des êtres vivants à leur environnement

#### 1. Introduction

En 1935, sous l'impulsion du botaniste Arthur George Tansley dans « The use and abuse of vegetational terms and concept » (Tansley, 1935), le terme « écosystème » apparaît pour la première fois. Le but de cette initiative était alors de se démarquer de la mouvance scientifique de l'époque qui définissait l'unité de base de la nature comme une interaction d'organismes formant des communautés biologiques. Pour A.G. Tansley, les organismes interagissent non seulement entre eux mais aussi avec l'environnement qui les entoure (ndrl "Though the organisms may claim our prime interest, when we are trying to think fundamentally, we cannot separate them from their special environments, with which they form one physical system" (Tansley, 1935)). La définition d'écosystème prend alors le sens que nous lui connaissons actuellement : une biocénose (un groupe d'individus) dans un biotope (un habitat possédant des caractéristiques physico-chimiques propres). Les conditions de vie à l'intérieur de ce biotope sont caractérisées par les facteurs biotiques (du vivant) et abiotiques (du non vivant). Les facteurs biotiques représentent l'ensemble des interactions des organismes entre eux : c'est la résultante de l'action du vivant sur le vivant. Conjointement, les facteurs abiotiques administrent les conditions de vie à l'intérieur du biotope. Les facteurs édaphiques (structure du sol, granulométrie,...), topographiques (altitude, pente, ...), chimiques (composition en éléments minéraux, en gaz, ...) ou encore climatiques (eau, lumière, température, ...) qui caractérisent le biotope, représentent l'action du non vivant sur le vivant.

Tous les êtres vivants sont constitués de cellules : elles sont les briques qui les façonnent, c'est pourquoi T. Schwann & M.J. Schleiden les ont définies comme l'unité de base de la vie (1839). Les cellules peuvent rester isolées ou s'associer pour former des entités plus complexes. Les organismes unicellulaires tels que les bactéries, ne sont toutefois pas des ermites : ils ont une place intégrée dans la biocénose de leur écosystème. Ils sont particulièrement sensibles aux conditions biotiques et abiotiques de leur habitat. Pourtant, ils colonisent une grande diversité de milieux, y compris les plus extrêmes : à forte teneur en sel (organismes halophiles), très acides (organismes acidophiles), très alcalins (organismes alcalophiles), ou encore caractérisés par des niveaux de pression (organismes piézophiles) ou de température (organismes psychrophiles ou thermophiles) exceptionnels. Cette forte capacité d'adaptation des bactéries est certainement liée à leur cycle de vie relativement court ainsi qu'à leur forte propension à acquérir de nouveaux gènes : dans ces habitats divers, des traits favorables

à l'exploitation habile des ressources de l'écosystème sont rapidement acquis et transmis de génération en génération. Le caractère avantageux de ces traits conditionne leur héritabilité ; dans le cas contraire, ils ne sont naturellement pas conservés. C'est le génome des organismes vivants qui détient les programmes génétiques mis en place au cours du temps, celui-ci est donc le gardien du patrimoine évolutif des organismes. En fonction du contexte extracellulaire perçu, l'organisme qui porte le programme génétique le mieux adapté est favorisé par rapport aux autres car il peut exprimer un phénotype (ou une gamme de phénotypes) en adéquation avec l'écosystème qui l'entoure. Ainsi, de l'adaptation d'un organisme à un écosystème résulte un potentiel d'acclimatation face aux caractéristiques de l'environnement. Chaque réponse choisie doit être un sas menant inlassablement vers le même principe fondamental : l'homéostasie cellulaire.

La température est une des caractéristiques d'un écosystème qui a un effet prononcé sur différents processus fondamentaux de la cellule ; c'est pourquoi les phénomènes d'acclimatation et/ou d'adaptation à ce facteur environnemental seront traités ci-après. Bien que tous les êtres vivants soient affectés par la température, mon attention sera focalisée sur les bactéries en raison de leur capacité d'adaptation rapide aux changements environnementaux et du fait que mes travaux de thèse ont porté sur ces microorganismes.

#### 2. La confrontation des organismes à la température est inévitable

En thermodynamique, la température est définie comme une grandeur caractéristique d'un système qui permet une description quantitative des phénomènes liés à la sensation de chaud ou de froid ressentie, qui est d'autant plus élevée que le système est chaud (déf. Larousse).

Dans un écosystème, la température est un facteur qui influence les conditions de vie de la biocénose à l'intérieur du biotope. En fonction de la nature de cet habitat, la température a un caractère plus ou moins stable. A titre d'exemple, les bactéries vivant dans l'intestin des mammifères se multiplient à une température relativement constante alors que les bactéries de la rhizosphère sont exposées à des températures plus variables. Par ailleurs, chez ces dernières, s'ajoute à cette variation temporelle une variation spatiale : quelle est la taille de l'écosystème ? A quelques centimètres près, des différences thermiques sont facilement discernables : sous couvert de forêt, un sol peut être localement ombragé ou ensoleillé. Toutefois, une estimation de la température de l'environnement, ou de la température ambiante, apporte une information relative des conditions thermiques supportées par les organismes qui y vivent.

Sur Terre, une région à climat polaire atteint une température hivernale moyenne de  $-40^{\circ}$ C alors qu'une région à climat aride atteint des températures proches de  $+50^{\circ}$ C. Plus localement, la température autour de points chauds, comme les cheminées hydrothermales, est en moyenne de  $+100^{\circ}$ C. Ainsi, des habitats à caractéristique thermique très différente s'offrent aux organismes.

Les bactéries sont capables de vivre dans ces diverses niches thermiques. Ainsi, les cycles de vie des bactéries psychrophiles, mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles (Jacobs, 1957) peuvent se réaliser respectivement de 0 à 20°C, de 20 à 50°C, de 50 à 70°C et de 70°C à 110°C avec des optima de croissance situés entre les valeurs extrêmes.

Les études se sont largement portées sur la compréhension de l'hyperthermophilie certainement en raison du fait que l'apport d'énergie sous forme de chaleur est un point déterminant dans l'apparition de la vie (expérience de Miller-Urey, 1953). L'inemploi du terme « hyperpsychrophile » dans la littérature reflète la sous-estimation des capacités de vie bactérienne à très basses températures. Pourtant, depuis une dizaine d'années, de nombreuses études se sont intéressées au microbiome des permafrosts arctique et antarctique dont les températures moyennes de surface sont de -10°C et -20°C, respectivement. Des activités microbiennes y ont été détectées (Steven et al., 2006) et des organismes viables en ont été isolés : Psychrobacter cryopegella, Clostridium algoriphilum, Planococcus halocryophilus (Bakermans et al., 2003; Mykytczuk et al., 2013; Shcherbakova et al., 2005). Par ailleurs, le séquençage du génome de différentes bactéries psychrophiles tend à montrer que celui-ci contient de nombreux éléments génétiques mobiles de nature diverse tels que les prophages ou les transposons (Casanueva et al., 2010; DeLong et al., 2006 ; Simon et al., 2009 ; Vollmers et al., 2013). Les éléments génétiques mobiles sont des séquences d'ADN qui peuvent se déplacer voire se multiplier de façon autonome de manière intra-génomique ou inter-génomique. Ils sont généralement induits par les conditions de stress et représentent de ce fait un bon moyen d'augmenter les capacités d'adaptation des organismes soumis à de fortes contraintes environnementales (Allen et al., 2009; Casanueva et al., 2010). Il semble alors logique de se demander par quels mécanismes les variations thermiques sont perçues et induisent in fine des réponses appropriées.

#### 3. La première barrière : l'enveloppe bactérienne

#### a. Organisation de l'enveloppe bactérienne

L'enveloppe bactérienne est le premier rempart qui subit les assauts des agressions extérieures. Elle protège le cytoplasme et son contenu des facteurs externes tout en constituant la charpente des bactéries. Les bactéries à Gram positif possèdent une enveloppe constituée d'une unique membrane (protégée de l'extérieur par une épaisse couche de peptidoglycane) alors que celle des bactéries à Gram négatif, est constituée de deux membranes séparées par un espace intermédiaire nommé périplasme qui contient une fine couche de peptidoglycane (**figures 1A et 1B**). L'unique membrane des bactéries à Gram positif est organisée de la même manière que la membrane interne des bactéries à Gram négatif : deux couches de phospholipides sont disposées en miroir. La membrane externe des

bactéries à Gram négatif est différente : une couche externe de lipopolysaccharides surmonte une couche de phospholipides.

La structuration des membranes en bicouches est liée au caractère amphiphile des phospholipides membranaires (Singer, 1974). Ces molécules sont des triesters de glycérol constitués d'une tête polaire phosphatée et d'un corps apolaire formé par deux acides gras (figure 2).

Les chaînes carbonées des acides gras sont très modulables : (i) elles sont linéaires ou ramifiées, (ii) leur longueur varie de 14 à 22 carbones (en moyenne 18 à 20), (iii) elles peuvent être simples ou doubles : lorsque la chaîne d'un acide gras porte au moins une liaison double, il est insaturé, sinon c'est un acide gras saturé.



#### Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (A) et à Gram positif (B) (inspiré de Ruiz et al., 2009)

Chez les bactéries à Gram négatif, l'épaisseur des membranes interne et externe est d'environ 4 nm et celle du périplasme dans lequel se trouve le peptidoglycane est de 7 nm. Chez les bactéries à Gram positif, la couche de peptidoglycane est épaisse (de 20 à 80 nm) ; à l'intérieur de cette couche, s'enchâssent des acides téïchoïques et lipotéïchoïques qui améliorent la cohésion des chaînes du peptidoglycane composées de N-acétyl-muramique (NAM) et de N-acétyl-glucosamine (NAG).

**Région hydrophile Région hydrophobe** 



#### Figure 2 : Structuration de la bicouche phospholipidique et composition des phospholipides

Une molécule de glycérol est estérifiée en positions C1 et C2 par un acide constitué d'une chaîne hydrocarbonée (acide gras) et en position C3 par un groupement phosphate. Le substituant R greffé sur la tête polaire est variable (éthanolamine, choline, glycérol, inositol, hydrogène ou sérine).



# b. La membrane est une macrostructure fluide qui réagit aux variations des conditions environnementales

La membrane, bien que conférant un cadre structuré, est en mouvement constant. La fluidité membranaire est non seulement primordiale à la division cellulaire mais aussi aux échanges entre le cytoplasme bactérien et l'environnement extérieur. De manière non surprenante, la fluidité membranaire est modulée par des facteurs abiotiques tels que le pH de l'habitat ou la température ambiante. Ainsi, une augmentation de la température accroit sa fluidité alors qu'une diminution la rigidifie (Shivaji and Prakash, 2010).

Les mouvements des phospholipides sont à l'origine de la fluidité membranaire : ils peuvent en effet bouger à l'intérieur de la bicouche par diffusion latérale, par basculement (« flip-flop ») ou encore par rotation. L'occurrence de la circulation des phospholipides à l'intérieur d'une membrane dépend essentiellement de la structure des chaînes hydrocarbonées qui les constituent (**Tableau I**). A cette échelle nanoscopique, plus les atomes de carbone sont proches, plus ils interagissent entre eux *via* les forces de Van der Waals. Ces interactions ne correspondent pas à des liaisons chimiques : les atomes échangent des particules virtuelles. Toutefois ce phénomène exerce une attraction suffisamment forte pour limiter les vibrations des chaînes. Par conséquent, plus les chaînes carbonées s'enchevêtrent, plus l'attraction est forte : la mobilité des phospholipides est limitée et la membrane est rigidifiée.

#### 4. Modifications structurales membranaires en liaison avec le contexte thermique

#### a. Pourquoi la température affecte la fluidité membranaire ?

Les basses températures limitent la rotation libre des atomes de carbone autour des liaisons simples C-C des chaînes hydrocarbonées des phospholipides membranaires, cette perte de flexibilité favorise le compactage de ces chaînes ; la membrane est alors plus rigide. Inversement, l'énergie thermique apportée par les températures plus élevées accroît la flexibilité des liaisons C-C : leur mouvement incessant défavorise le compactage des chaînes des acides gras ; la membrane est plus instable (Mrozik *et al.*, 2004). Pour contrebalancer les effets excessifs générés par les températures extrêmes, les bactéries psychrophiles et thermophiles synthétisent des phospholipides membranaires adaptés à la vie dans des habitats froids et chauds, respectivement.

#### b. Adaptation des phospholipides membranaires au contexte thermique

Les phospholipides membranaires, bien qu'ayant une organisation similaire (**figure 2**), sont variés. Cette diversité, portée en grande partie par les caractéristiques des chaînes carbonées des acides

gras, est un facteur important dans l'établissement d'une réponse cellulaire adaptée à divers contextes environnementaux tels que des températures basses ou élevées. Les bactéries qui supportent des températures basses ont tendance à synthétiser des phospholipides dont les chaînes carbonées sont coudées ou méthylées : dans un contexte membranaire, les coudes et les groupements méthyls espacent les chaînes ce qui limite leur empaquetage. Au contraire les bactéries qui supportent des températures élevées synthétisent préférentiellement des phospholipides dont les chaînes sont étirées et sans ramification afin de faciliter leur compaction dans les membranes (pour un récapitulatif, voir le **Tableau I**).

 Tableau I : Influence de la structure des chaînes carbonées des acides gras dans la résistance aux températures extrêmes

Constitution do la	Peu Insaturation			Ramification			
constitution de la chaîne carbonée des AG	d'insaturation et de ramification	En Trans	En Cis	Iso	Anteiso		
Structure de la chaîne ; Représentation schématique des PL dans la membrane	$n \text{ fois } \downarrow \qquad \qquad$		С				
Fluidité membranaire	Réduite	Réduite <sup>1</sup>	Augmentée	Augmenté	$ee (en anteiso^2)$		
Résistance à des T°C	Plus élevées	Plus élevées	Plus basses	Plu	s basses <sup>3</sup>		
Exemples d'organismes concernés		Pseudomona. Lz4V (Chintalapati e	s syringae V <sup>4</sup> et al., 2004)	Listeria n Bacillus (Kan	<i>nonocytogenes</i> psychrophiles eda, 1991)		

AG : Acide Gras ; PL : PhosphoLipides ; T°C : Température ; *n* : nombre de carbones de la chaîne

<sup>1</sup> Structure très similaire à celle des AG saturés

<sup>2</sup> Par comparaison à la position *iso* 

<sup>3</sup> Résistance aux températures basses des AG anteiso > Résistance aux températures basses des AG *iso* 

<sup>4</sup> Ratio trans/cis modulé en fonction de la température de croissance

La modulation du ratio acides gras saturés / insaturés est un mécanisme couramment utilisé pour faire face aux contraintes thermiques (Keweloh and Heipieper, 1996). En effet, la présence de doubles liaisons C=C au sein des chaînes d'acides gras empêche toute rotation libre autour de ces liaisons ; la conformation est bloquée en *cis* lorsque les atomes d'hydrogènes sont du même côté et en *trans* lorsqu'ils sont à l'opposé. La conformation en *cis* des atomes d'hydrogène de la liaison C=C génère un coude irréversible dans la chaîne des acides gras ce qui limite les phénomènes de

compactage à l'intérieur d'une membrane. Au contraire, lorsque l'insaturation est en *trans*, la structure reste globalement étirée : la conformation adoptée est similaire à celle des acides gras saturés. La linéarité de la chaîne d'un acide gras saturé favorise la compaction des phospholipides ce qui a tendance à limiter la fluidité membranaire.

La méthylation des chaînes des acides gras est un autre mécanisme permettant d'augmenter la fluidité membranaire car elle limite la compaction des chaînes. Lorsque le groupement méthyl est ajouté sur le deuxième carbone à partir de la fin de la chaîne, il est en position *iso* ; s'il est ajouté sur le troisième carbone à partir de la fin de la chaîne, il est en position *anteiso*. Toutefois, du fait de l'encombrement stérique plus fort quand la méthylation est *anteiso*, la fluidité d'une membrane qui contient plus de phospholipides à méthylation *anteiso* est plus élevée.

#### c. Influence de la température sur le peptidoglycane de l'enveloppe bactérienne

Le peptidoglycane est un polymère formé par la liaison alternée d'un polysaccharide, l'acide N-acétyl-muramique (NAM), et d'un peptide, la N-acétyl-glucosamine (NAG). Chez les bactéries à Gram positif (**figure 1B**), ce polymère de glycosaminopeptide est directement en contact avec le milieu extérieur. De manière intéressante, il est plus épais chez les bactéries psychrophiles à Gram positif (Mykytczuk *et al.*, 2013) en raison d'une expression plus forte chez ces bactéries des gènes de l'opéron *murADEI*, qui est impliqué dans la biosynthèse du peptidoglycane. Ce mécanisme pourrait permettre aux cellules de résister non seulement aux basses températures mais aussi de contrer les menaces qui en découlent : celle de la faible disponibilité en eau due à la formation des cristaux de glace et celle de la forte pression osmotique due à la concentration des solutés dans l'eau qui reste sous forme liquide (Rodrigues *et al.*, 2008).

#### d. L'enveloppe bactérienne : un thermosenseur ?

La température induit donc une modification de la conformation de l'enveloppe bactérienne. Toutefois, cet ajustement n'est pas spécifique à la température étant donné que d'autres conditions extérieures, telles que l'acidité du milieu, induisent le même type de réponses. Par ailleurs, la caractéristique fondamentale des molécules appelées thermosenseurs est qu'une modification structurale, même infime, liée à un changement de température, s'accompagne de modifications importantes de leurs fonctions. Peut-on alors considérer que la membrane et le peptidoglycane sont des thermosenseurs car, finalement, la réponse n'est pas spécifique à la température et leur fonction primaire - *id est* conférer une enveloppe stable aux bactéries - n'est pas réellement modifiée.

Pourtant, le message thermique qui arrive au niveau de l'enveloppe bactérienne doit être traduit correctement afin d'ajuster le métabolisme cellulaire aux conditions ressenties. De nouvelles questions prennent un sens sous ces faits : Comment qualifier un message physico-chimique senti par

un organisme bactérien et porteur d'une information sur la qualité de l'environnement ? Doit-on parler d'un stimulus, d'un signal, d'un stress voire d'une catastrophe ? Car la barrière existant entre chacun de ces mots est assez floue (Cases and De Lorenzo, 2005). D'une part, la terminologie employée est différente selon l'origine physico-chimique du message (notion qualitative) et son intensité (notion quantitative). D'autre part, un message est différemment interprété en fonction de l'organisme qui le perçoit (**figure 3**).



## Figure 3 : Interprétation individuelle d'un message physico-chimique à l'intérieur d'un écosystème

Un individu (dans ce cas, bactérien) reçoit de nombreux messages venant de son écosystème. Ceux-ci sont interprétés de diverses manières selon leur nature et leur intensité. De cette interprétation par la cellule bactérienne découle une réponse ajustée vis-à-vis du contexte environnemental perçu.

Les bactéries doivent nécessairement identifier le message (ici, thermique) afin de l'intégrer dans les circuits métaboliques et d'émettre une réponse en accord avec la force de la variation. Parallèlement à son impact sur la structure des membranes, la température influence de manière plus ou moins prononcée la structure des molécules cellulaires telles que les acides nucléiques et les protéines. Les molécules thermosenseurs sont généralement identifiées parmi ces molécules certainement en raison de l'existence d'une relation forte entre leur structure et leur fonction cellulaire (Steinmann and Dersch, 2013).

#### **II.** Modulation de la structure de la chromatine bactérienne par la température

#### 1. Influence de la température sur la structure globale de la chromatine

Bien que l'enveloppe bactérienne soit une barrière protectrice en interaction directe avec le milieu extérieur, elle ne constitue cependant pas une frontière étanche. Les caractéristiques physicochimiques externes sont répercutées sur d'autres structures cellulaires telles que la chromatine bactérienne. Composée majoritairement d'acides nucléiques (60% d'ADN et 30% d'ARN) et minoritairement de protéines (10%), elle forme une masse compacte et structurée dans le cytoplasme. L'aspect topologique de la chromatine est intrinsèquement lié à (i) la structure enlacée de la double hélice d'ADN et (ii) à sa circularité. La topologie d'un ADN circulaire peut être décrite par trois paramètres fondamentaux : l'enlacement « Linking number » (figure 4A), la torsion « Twist » et le vrillage « Writhe » de la molécule (figures 4B et 4C). L'équation suivante « Lk = Wr + Tw » permet de relier ces trois paramètres. Ainsi, afin de maintenir un enlacement constant, l'augmentation des tours d'hélice (Tw) est compensée par la diminution des vrillages de la molécule (Wr), et inversement. Quand le vrillage est nul (Wr = 0), l'état de l'ADN est dit relâché (Lk = Tw). Cependant, le vrillage est rarement nul et l'état de l'ADN est souvent surenroulé (*id est*  $Lk \neq Tw$ ). Le niveau de surenroulement reflète la forme de la molécule d'ADN qui s'enroule plus ou moins sur elle-même pour atteindre un niveau d'organisation supérieur (figure 5) : il est dit négatif lorsque le nombre de paires de bases par tour d'hélice d'une molécule d'ADN augmente (Lk-Tw < 0) et positif lorsque celui-ci diminue (Lk-Tw > 0). Chez la majorité des bactéries, l'ADN circulaire double brin adopte une forme surenroulée négativement. Si le surenroulement négatif de l'ADN présente l'avantage de condenser le chromosome en une structure compatible avec la taille de la cellule bactérienne, il facilite également le désappariement local des brins de la double hélice en raison de l'augmentation du nombre de paires de bases par tour d'hélice (Dorman, 2008). Ainsi, les supertours négatifs sont une source d'énergie mise à la disposition de l'ARN polymérase pour faciliter l'ouverture locale de la double hélice et initier la transcription.

La température est un paramètre extérieur au métabolisme cellulaire qui influence directement le niveau de surenroulement (Higgins, 1990). En effet, les molécules d'ADN doivent conserver leur intégrité et leur fonctionnalité surtout si les conditions environnementales s'avèrent extrêmes. De manière intéressante, chez les bactéries hyperthermophiles, le surenroulement négatif de l'ADN est moins fort que chez les mésophiles, il est parfois même plutôt positif (López-García, 1999 ; López-García and Forterre, 2000). Chez les bactéries hyperthermophiles, les supertours positifs permettent d'augmenter la stabilité de l'ADN vis-à-vis de la température évitant ainsi une dénaturation exagérée de la double hélice lors de son ouverture pour les processus cellulaires fondamentaux (Guipaud *et al.*, 1997). Dans ce cas, l'énergie nécessaire à la séparation des brins est apportée par les températures élevées. Le surenroulement de l'ADN permet donc à la chromatine de conserver une structure stable tout en rationalisant l'expression génique en fonction des conditions environnementales mais aussi physiologiques (Travers and Muskhelishvili, 2005a ; Dorman, 2006). L'organisation structurale de la chromatine étant primordiale, ses variations sont finement régulées *via* un réseau complexe.



Figure 4 : Les trois paramètres topologiques de l'ADN : l'enlacement « Lk » (A), les torsions « Tw » et les vrillages « Wr » (B)

**A.** L'enlacement de la molécule « Lk » (ici, de 8) est la somme des intersections qu'un brin d'ADN (ici, en rouge) accomplit à travers la surface imaginaire taillée par l'autre brin d'ADN (ici, en vert).

**B.** Le désenlacement local de la molécule, surligné en noir, génère un déficit de 3 tours d'hélice « Tw » dans la région encadrée. Ce déficit est compensé par trois vrillages moléculaires « Wr » (indiquées par des flèches noires). Le vrillage apparaît quand la molécule circulaire d'ADN n'est pas plate ( $Lk \neq Tw$ ) et se surenroule sur elle-même pour former une superhélice.



## Figure 5. Surenroulement du chromosome bactérien

L'introduction de supertours dans l'ADN circulaire double brin relâché induit le surenroulement de l'ADN. Le surenroulement négatif de l'ADN favorise le fonctionnement des processus cellulaires liés à l'ADN contrairement au surenroulement positif. Chez la majorité des bactéries, l'ADN est surenroulé négativement excepté chez les bactéries hyperthermophiles où l'ADN est surenroulé positivement.

#### 2. Les topoisomérases, des enzymes primordiales au métabolisme cellulaire

# a. Premières conceptualisations de la nécessité des topoisomérases dans un monde à ADN

Après avoir révélé la structure de l'ADN en 1953, Watson et Crick avaient immédiatement pointé un problème fondamental (ndrl "Since the two chains in our model are intertwined, it is essential for them to untwist if they are to separate [...] Although it is difficult at the moment to see how these processes occur without everything getting tangled, we do not feel that this objection will be insuperable") : puisque les deux brins d'ADN s'entrelacent, les torsions doivent pouvoir être chassées afin de séparer localement la double hélice et de rendre l'ADN disponible aux processus cellulaires tels que la réplication, la transcription,... Cette réflexion posait alors les fondements d'un nouveau questionnement : étant donné les contraintes topologiques de l'ADN, comment les réactions qui nécessitent une ouverture de la double hélice peuvent-elles avoir lieu sans encombre ? La recherche de systèmes moléculaires qui permettent ces réactions essentielles, tout en respectant la topologie, a alors débuté. C'est dans ce contexte scientifique que Jim Wang a identifié en 1971 chez le le modèle bactérien *Escherichia coli* la première topoisomérase appelée Topo I. Par la suite, d'autres topoisomérases ont été isolées d'organismes appartenant à tous les domaines du vivant (**Tableau II**). Leur existence représente un réel avantage adaptatif pour répondre aux contraintes topologiques inhérentes à un monde à ADN (Mirkin *et al.*, 2003).

#### b. Variété des topoisomérases dans le monde du vivant

Les topoisomérases sont des enzymes qui modulent le niveau d'enlacement global de l'ADN : elles sont essentielles pour réguler les contraintes topologiques induites par les processus cellulaires (réplication, ségrégation des chromosomes, transcription, recombinaison). Elles sont différenciées en deux classes (I et II) qui chacune se divisent en 2 sous-classes (A et B) : chaque sous-classe est caractérisée par des spécificités de fonction et de structure (Wang, 2002). La classification des topoisomérases et la spécificité de leur action sont décrites en détail dans le **tableau II**. Chez *Escherichia coli*, le maintien du niveau de surenroulement négatif exige les activités coordonnées et équilibrées de la topoisomérase I (classe I) et de l'ADN gyrase (classe II) principalement (Zechiedrich *et al.*, 2000) (**figure 6**). La topoisomérase I favorise la relaxation de l'ADN en éliminant les supertours négatifs *via* un mécanisme indépendant de l'ATP (Wang, 1971). L'ADN gyrase est, quant à elle, une enzyme ATP-dépendante qui utilise l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP pour introduire des supertours négatifs dans l'ADN circulaire double brin (Gellert *et al.*, 1976). Ainsi l'activité de la gyrase est intimement dépendant du niveau énergétique de la cellule (rapport ATP/ADP).

Tableau II : Classification des	opoisomérases dans	le monde du vivant
---------------------------------	--------------------	--------------------

Différenciation primaire en classe : liée à leur mécanique d'action de base									
Classe I : Coupure d avec activité AT	Classe II : Coupure des deux brins d'ADN avec activité ATP dépendante								
Différenciation second	laire en sous-classe : liée aux sp	écificités fonctionne	elles (et structurales)	des topoisomérases					
Classe I Sous-classe A Tendance à couper l'ADN simple brin Liaison covalente avec les extrémités 5' des sites de clivage Relâche uniquement les supertours négatifs		Classe II Sous-classe AIntroduit desRelâchesupertoursprincipalementnégatifs /les supertoursRelâche lespositifssupertoursConcaténationpositifsl'extrémité 5'Concaténation àdes sites del'extrémité 5'clivagedes sites clivéslivage		Classe II Sous-classe B Relâche les supertours négatifs et positifs Concaténation à l'extrémité 5' des sites de clivage					
	Quelques exemples r	eprésentatifs (référe	ences)						
Topoisomérases I et III (Escherichia coli) et homologues (I-like et II- like) (Kikuchi and Asai, 1984) Reverse Gyrase (Sulfolobus acidocaldarius) et homologues (RG-like) (Forterre et al., 1985)	<ul> <li>Topoisomérase I Eucaryote (Mus musculus) (Champoux and Dulbecco, 1972)</li> <li>Topoisomérase des Pox virus (Bauer et al., 1977)</li> <li>Topoisomérase V des Archées (Methanopyrus knadleri) (Kozyavkin et al., 1995)</li> </ul>	Gyrase (Escherichia coli) et homologues (G- like) (Gellert et al., 1976)	Topoisomérase IV (Escherichia coli) et homologues (non G-like) (Kato et al., 1990)	<b>Topoisomérase VI</b> ( <i>Sulfolobus shibatae</i> ) (Bergerat <i>et al.</i> , 1997)					



#### Figure 6 : Equilibre existant entre l'activité des topoisomérases bactériennes chez E. coli

Alors que l'activité de la gyrase (topoisomérase de classe II) renforce le surenroulement négatif de l'ADN, celle des topoisomérases de classe I (TopoI et TopoIII) le contrebalance. En effet, l'activité de ces dernières favorise le relâchement structural.

La présence des topoisomérases de classe I et de classe II dans tous les domaines du vivant (Archées, Eucaryotes, Procaryotes) reflète (i) leur origine commune avant la diversification et (ii) leur nécessité au maintien de tout être vivant (López-García, 1999). Toutefois, une topoisomérase

originale, la reverse gyrase, a été détectée jusqu'à présent uniquement chez des organismes dont la température de croissance optimale est supérieure à 65°C ; elle est présente sans exception chez les bactéries hyperthermophiles (et les Archées). La reverse gyrase a la capacité d'introduire des supertours positifs en hydrolysant, non pas l'ATP, mais les nucléotides de l'ADN sur lequel elle agit. La stabilité génomique des hyperthermophiles est vraisemblablement favorisée par le surenroulement positif de l'ADN (voir la partie **II.1** de la section bibliographique).

Par ailleurs, l'inactivation de la topoisomérase I chez la bactérie *E. coli* la rend incapable de survivre en dessous d'une température de 30°C (Liu *et al.*, 2009). Ces données semblent indiquer que chez *E. coli*, la topoisomérase I est indispensable à la survie à basses températures car elle relâche les supertours négatifs, qui sont plus fréquents à basses températures (voir la partie **II.1** de la section bibliographique). L'adaptabilité des organismes vis-à-vis de conditions extrêmes mais aussi « modérées » dépendrait donc, au moins en partie, de l'action des topoisomérases.

En complément de l'action des topoisomérases, la structuration du chromosome bactérien est modulée par l'action de protéines architecturales appelées « nucleoid associated proteins » (NAPs), qui interagissent directement avec l'ADN (Azam and Ishihama, 1999).

# 3. Action complémentaire des protéines associées au nucléoïde dans la structuration de la chromatine

#### a. Premières découvertes des protéines histones-like chez les organismes bactériens

Les premières découvertes concernant les protéines associées au nucléoïde remontent aux années 1970-1980. A cette époque, les données acquises révélaient l'existence de petites protéines basiques et abondantes qui se lient à l'ADN. En 1980, Felsenfeld et McGhee ont montré le rôle de ces protéines, appelées communément « histones », dans la compaction de l'ADN en nucléosomes. En revanche, peu d'informations étaient alors disponibles sur l'organisation du génome bactérien. La découverte des NAPs H-NS (en tant que contaminant de préparations d'ARN polymérase (Jacquet *et al.*, 1971)) et HU (purifiée à partir de lysats bactériens (Rouvière-Yaniv et Gros, 1975)) chez *E. coli* a permis d'avancer l'hypothèse selon laquelle les bactéries possèdent des protéines homologues aux histones. Au début des années 1990, l'idée d'une implication de l'organisation structurale du génome dans la régulation de l'expression génique commençait à émerger (Higgins *et al.*, 1988 ; Dorman *et al.*, 1990). Cette hypothèse a rapidement été confortée par la mise en évidence du rôle de H-NS dans l'organisation de la chromatine bactérienne et dans le contrôle de l'expression des gènes (Owen-Hughes *et al.*, 1992). Cette avancée scientifique peut être considérée comme le point de départ d'un engouement pour les mécanismes concernant le lien entre NAPs, surenroulement de l'ADN et expression génique.

#### b. Caractéristiques générales des protéines associées au nucléoïde

La relative forte proportion en acide aminés basiques des NAPs leur permet d'établir des liaisons ioniques avec les groupements phosphates de l'ADN. Ces protéines exercent à la fois une fonction d'organisateur structural de la chromatine et de régulateur global de la transcription. Chez *E. coli*, les principales protéines associées au nucléoïde sont H-NS (<u>Histone-like Nucleoid-Structuring protein</u>), Fis (<u>Factor for inversion stimulation</u>), IHF (<u>Integration Host Factor</u>) et HU (<u>Heat-U</u>nstable DNA binding protein) (**tableau III**). Elles agissent sur une large variété de gènes impliqués dans le métabolisme de base et/ou dans les mécanismes adaptatifs (Dillon and Dorman, 2010 ; Dorman and Deighan, 2003).

NAP	Gène	Structure	Caractéristiques et consensus de fixation	Fonctions architecturales majeures
H-NS	hns	H-NS : 15.4 kDa Homodimère : 2 x 15.4 kDa	Non basique ; de 20000 à 40000 dimères / $C$ ; Kd = 1 à 3 $\mu$ M	Modulation de la topologie de l'ADN Oligomérisation des dimères induisant un « pontage » de deux brins d'ADN
Fis	Fis	Fis : 11.2 kDa Homodimère : 2 x 11.2 kDa	Basique ; de 2000 à 50000 dimères / $\mathcal{C}$ ; Kd = 2 à 5 nM	Modulation de la topologie de l'ADN Fixation induisant de fortes courbures de l'ADN (jusqu'à 90°)
IHF	himA himD	$IHF\alpha : 11.2 \text{ kDa}$ $IHF\beta : 10.7 \text{ kDa}$ $Hétérodimère :$ $11.2 + 10.7 \text{ kDa}$	Basique ; de 25000 à 30000 dimères / $C$ ; Kd = 0.3 à 20 nM	Fixation induisant de très fortes courbures de l'ADN (jusqu'à 180°)
HU	hupA hupB	HU $\alpha$ : 9.2 kDa HU $\beta$ : 9.5 kDa Hétérodimère : 9.2 + 9.5 kDa	Basique ; 15000 à 30000 dimères / $\emptyset$ ; Kd = 0.4 $\mu$ M à 30 $\mu$ M Fixation aspécifique <sup>1</sup>	Formation de structures rigides Fixation induisant de faibles courbures de l'ADN (3°)

Tableau III : Les	principales	protéines	associées a	u nucléoïde (	(d'	après	Prossed	la <i>et al</i> .	,2002)
-------------------	-------------	-----------	-------------	---------------	-----	-------	---------	-------------------	--------

C : cellule ; Kd : constante de dissociation à l'équilibre ; kDa : kilo Daltons.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Les séquences consensus de fixation ont été identifiées dans le cas de H-NS, Fis et IHF (Lang *et al.*, 2007 ; Pan *et al.*, 1996 ; Ussery *et al.*, 2001). En ce qui concerne la fixation de HU, aucune séquence spécifique n'a été jusqu'à présent identifiée (Grove and Saavedra, 2002 ; Schröder and Wagner, 2002).

Le rôle des NAPs est conditionné par leur spécificité de liaison à l'ADN (**tableau III**) et par leur concentration cellulaire lors de la croissance bactérienne. Chez *E. coli*, la concentration de la protéine H-NS est relativement constante tout au long de la croissance (Free and Dorman, 1995) ; la concentration de Fis est très forte en début de phase exponentielle de croissance puis diminue très rapidement par la suite (Azam and Ishihama, 1999) ; celle de IHF augmente en milieu de phase exponentielle et est à son maximum au début de la phase stationnaire de croissance (Dillon and Dorman, 2010) ; la situation avec HU est plus complexe car la composition de ses deux sous-unités varie avec la croissance (Claret and Rouviere-Yaniv, 1996), toutefois sa concentration diminue lors de la phase stationnaire de croissance (Balandina *et al.*, 2001).

# c. La protéine H-NS : un régulateur global de l'adaptation aux conditions environnementales

La protéine H-NS est une NAP très conservée chez les Entérobactéries et possède de nombreux homologues chez les protéobactéries. Elle contrôle l'expression d'un nombre important de gènes impliqués à la fois dans le métabolisme de base et dans divers processus adaptatifs (température, osmolarité, pH,...). Dans la plupart des cas, H-NS réprime la transcription de gènes dans des conditions où ceux-ci ne doivent pas s'exprimer (Atlung and Ingmer, 1997). H-NS est donc considérée comme un régulateur sensible aux conditions environnementales (Atlung and Ingmer, 1997; Dillon and Dorman, 2010). Elle est par ailleurs considérée comme la sentinelle de l'évolution génétique ; en effet, elle module fréquemment l'expression des gènes acquis par transfert horizontal (Dorman, 2004). Enfin H-NS module la virulence de diverses bactéries pathogènes telles que E. coli, Shigella, Salmonella, Pseudomonas et Dickeya (Castang et al., 2008; Nasser et al., 2001; Prosseda et al., 1998 ; Tran et al., 2011). La protéine H-NS est constituée de deux domaines fonctionnellement différents connectés par une région charnière flexible : un domaine C-terminal qui se lie à l'ADN et un domaine N-terminal impliqué dans la dimérisation (Shindo et al., 1995). La liaison coopérative de plusieurs dimères de H-NS conduit à la formation de structures nucléoprotéiques responsables du pontage de deux duplex d'ADN adjacents (figure 7A). De ce verrou moléculaire résulte une boucle qui bloque l'accès de l'ARN polymérase aux promoteurs ou qui la piège en l'empêchant d'avancer (Rimsky et al., 2001) : ceci explique le rôle majoritairement répresseur de H-NS. De manière intéressante, les hautes températures altéreraient la capacité de H-NS à former des oligomères et donc à créer des complexes nucléoprotéiques bloquant l'accès aux promoteurs (Ono et al., 2005). Par ailleurs, une des caractéristiques remarquables des sites de liaison préférentiels de H-NS est leur forte proportion en bases A et T, susceptibles d'adopter une structure courbe (Dame et al., 2002). La dénaturation plus propice de ces régions les rend plus modulables : les courbures s'atténuent quand la température augmente (Dame et al., 2002). L'élimination des structures courbes liée à l'augmentation de la température diminue l'affinité de la protéine H-NS pour l'ADN (Ussery et al., 1999). La fonction de H-NS est donc altérée par la température *via* deux paramètres : la modulation de son état d'oligomérisation et de sa fixation sur l'ADN. C'est la raison pour laquelle cette protéine est souvent impliquée dans les mécanismes d'adaptation vis-à-vis de la température. A titre d'exemple, chez *E. coli*, H-NS contrôle 69% des gènes régulés par la température (Steinmann and Dersch, 2013).



**Figure 7 : Propriétés architecturales des principales protéines associées au nucléoïde chez** *E. coli* (images obtenues en micrographies à force atomique)

**A.** Boucles d'ADN formées par l'établissement de ponts entre deux duplex d'ADN adjacents par la fixation coopérative de plusieurs dimères de H-NS (110 x 340 nm) ; **B.** Complexe Fis-ADN (700 x 500 nm) (Schneider *et al.*, 2001) ; **C.** Complexe IHF-ADN (Dame, 2005) ; **D.** Complexe HU-ADN : lorsque la concentration de HU est faible, sa fixation induit de faible courbures de l'ADN (gauche, 200 x 200 nm) ; lorsque sa concentration est forte, des filaments rigides sont générés par la fixation coopérative de plusieurs dimères de HU sur des sites adjacents de l'ADN (droite, 70 x 70 nm) (Van Noort *et al.*, 2004).

#### d. Les protéines Fis, IHF et HU

La fixation de la NAP « <u>Factor for inversion stimulation</u>» (Fis) à l'ADN induit une courbure (**figure 7B**) qui module localement le niveau de surenroulement de l'ADN (Travers *et al.*, 2001). En effet, sa fixation crée artificiellement des supertours négatifs réduisant ainsi la dépendance de certains promoteurs vis-à-vis du surenroulement. Certains promoteurs sont plus sensibles que d'autres au surenroulement négatif de l'ADN : c'est le cas des gènes codant les constituants de la machinerie de traduction (Dorman, 2006). Fis en activant la synthèse de ces constituants durant la phase exponentielle de croissance stimule la croissance cellulaire. Par ailleurs, la protéine Fis régule la transcription des gènes codant les topoisomérases : elle active la synthèse de la Topo I et réprime celle des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la gyrase. Fis joue donc un rôle déterminant dans l'homéostasie du niveau d'enroulement global de l'ADN (Rochman *et al.*, 2004 ; Travers and Muskhelishvili, 2005b). De ce fait, Fis est considéré comme un régulateur des conditions physiologiques. Il régule également les fonctions de virulence chez diverses espèces bactériennes telles que *E. coli, Shigella flexneri* ou encore *Vibrio cholerae* (Falconi *et al.*, 2001 ; Goldberg *et al.*, 2001 ; Croinin *et al.*, 2006)

Tout comme Fis, IHF (<u>Integration Host Factor</u>) est capable de manipuler la topologie de l'ADN en y induisant, après sa fixation, des flexions très fortes (**figure 7C**) qui peuvent favoriser le rapprochement d'un régulateur éloigné avec l'ARN polymérase au niveau d'un promoteur (Parekh and Hatfield, 1996). Ainsi, la transcription du gène associé au promoteur sera indirectement affectée par la fixation de IHF. Quant au rôle structural de la petite protéine HU (<u>Heat-U</u>nstable DNA binding

protein) au sein du nucléoïde (**figure 7D**), il semble stabiliser voire augmenter le niveau de surenroulement négatif de l'ADN (Dame *et al.*, 2002). Ceci s'oppose d'ailleurs à la formation des structures condensées typiques de la protéine H-NS. HU serait donc un antagoniste de H-NS et a un rôle dans la régulation d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme central. IHF et HU sont également impliqués dans la régulation de la virulence bactérienne mais à un degré moindre que Fis et H-NS. A titre d'exemple, IHF se trouve impliqué dans la synthèse de la toxine cholérique chez *V. cholerae* (Stonehouse *et al.*, 2008) et dans celle des effecteurs du système de type III chez *E. coli* (Li *et al.*, 2004).

#### e. Le surenroulement de l'ADN, les topoisomérases et les NAPs

La régulation coordonnée de l'expression des gènes est essentielle pour une adaptation des processus cellulaires aux stimuli externes. Cette coordination dépend d'une coopération dynamique entre l'ARN polymérase et l'organisation structurale de la chromatine. L'action des NAPs et des ADN topoisomérases est de ce fait nécessaire pour adapter l'organisation structurale de l'ADN aux exigences de l'ARN polymérase. Ainsi l'organisation topologique des différents promoteurs d'un génome dépendrait de l'état d'enroulement local qui résulte de l'action des ADN topoisomérases et de la dynamique de fixation des protéines associées au nucléoïde (figure 8). Les changements de température influencent non seulement la structure globale de la chromatine mais aussi la topologie des promoteurs. La topologie des sites de fixation des protéines régulatrices s'en trouvent modifiée et l'expression des gènes en aval aussi. Le surenroulement de l'ADN est donc un thermosenseur global dont la modulation permet (i) la fixation plus ou moins efficace de protéines régulatrices (telles que les NAPs et/ou des facteurs de transcription plus spécifiques) et (ii) la synthèse d'autres molécules qui peuvent par ailleurs êtres des protéines régulatrices. Cette modulation du génome permet d'ajuster la physiologie cellulaire en fonction du contexte thermique. Toutefois, en considérant le fait qu'un changement de température puisse être un signal représentatif d'un environnement précis, la mise en place de systèmes thermosenseurs moins globaux est primordiale afin d'optimiser la thermoadaptation des organismes.



## Figure 8 : L'homéostasie du niveau d'enroulement de l'ADN est influencée par la disponibilité en énergie, l'activité des gyrase / topoisomérase et les NAPs

**A.** Lors de la phase exponentielle de croissance bactérienne, le surenroulement négatif de l'ADN est favorisé par (i) la fixation de la protéine Fis sur l'ADN mais aussi (ii) par l'activité plus intense de la gyrase bactérienne qui introduit des supertours négatifs en utilisant l'ATP fortement disponible.

**B.** Lors de la phase stationnaire de croissance bactérienne, le faible niveau énergétique défavorise l'activité de la gyrase par rapport à celle de la topoisomérase I. Par ailleurs, la quantité de la protéine Fis, qui tamponne le niveau d'enroulement de l'ADN est très faible ; il s'en suit un relâchement global de l'ADN.
### III. La température, un signal physique

### 1. Les signaux thermiques : une clé pour l'adaptation à un nouvel habitat

Considérant l'importance de la perception des signaux thermiques pour les bactéries interagissant avec les mammifères, il est compréhensible que celles-ci aient été contraintes de développer des systèmes moléculaires qui leur permettent non seulement de percevoir les variations de température mais aussi de définir une fenêtre thermique représentative d'une niche particulière (Konkel and Tilly, 2000). Cette notion implique la perception d'une valeur seuil à partir de laquelle différents mécanismes de thermorégulation peuvent se mettre en place. Comme indiqué dans la **figure 9**, ces mécanismes peuvent s'exercer à différents niveaux (transcriptionnel, post-transcriptionnel, ...) et font intervenir 3 types de macromolécules : l'ADN, les ARNm et les protéines (Steinmann and Dersch, 2013). Des exemples qui impliquent chacune de ces molécules sont répertoriés dans le **tableau IV** en se référant au niveau de régulation défini dans la **figure 9**.



### Figure 9 : Les différents niveaux de régulation impliqués dans la réponse à la température

A. Le niveau d'enroulement de l'ADN répond au contexte environnemental (voir la partie II de la section bibliographique). Ceci en fait une structure réactive qui intègre rapidement un signal environnemental en modifiant sa propre topologie pour ajuster le programme transcriptionnel et favoriser l'activation et/ou la répression de gènes particuliers (Peter *et al.*, 2004). L'action des topoisomérases est requise pour la modulation du niveau d'enroulement en concertation avec celle des protéines associées au nucléoïde (H-NS, Fis, IHF, HU...) qui, en se fixant à l'ADN, induisent des contraintes topologiques variées. Ces NAPs sont très conservées chez les protéobactéries.

**B.** Les régulations ont majoritairement lieu au niveau de l'initiation de la transcription : la fixation d'un ou plusieurs facteurs transcriptionnels et/ou de protéines associées au nucléoïde modulent la fixation de l'ARN polymérase pour la transcription. Par ailleurs, l'avancée de l'ARN polymérase peut être bloquée par la fixation de protéines après le site initiateur de la transcription. Bien entendu, la fixation des facteurs transcriptionnels est largement dépendante des contraintes structurales supportées par les régions promotrices.

**C.** Après la transcription, la structuration des ARNm peut influencer leur stabilité et induire leur dégradation à une température inappropriée pour leur traduction. Leur traduction peut aussi être bloquée *via* leur séquestration par une protéine affine pour les ARNm ou encore *via* la formation d'une structure intramoléculaire bloquant l'accès aux ribosomes.

**D.** Après la traduction par les ribosomes, les protéines peuvent se replier de façon plus ou moins efficace en fonction de la température, être dégradées par des protéases ou se lier à une autre molécule. Tous ces mécanismes modulent leur activité biologique (enzymatique, transcriptionnelle, ...) et engendrent *in fine* des répercussions sur d'autres fonctions cellulaires.

Organismes concernés	Système impliqué	Mécanisme affecté par la température	Réponse bactérienne engendrée (référence)		
Shigella flexneri (figures 9A et 9B)	Structure de l'ADN couplée à l'action de H- NS et Fis	< $32^{\circ}$ C : H-NS inhibe l'expression de <i>virF</i> > $32^{\circ}$ C jusqu'à $37^{\circ}$ C : La conformation de l'ADN est moins propice à la fixation de H-NS ; Fis se fixe et active la transcription de <i>virF</i> ; Celle-ci est aussi favorisée par la fixation de IHF, en phase exponentielle et en début de phase stationnaire de croissance <sup>1</sup>	A 37°C : VirF active la synthèse de VirB, l'activateur des gènes de virulence => Expression de la virulence favorable (Kane and Dorman, 2012)		
Listeria monocytogenes (figure 9C)	ARNm <i>prfA</i>	< 30°C : PrfA n'est pas traduit car une structure en épingle à cheveux en 5'UTR bloque l'accès du site d'initiation au ribosome 37°C : La disparition de la structure secondaire permet la fixation du ribosome	A 37°C : La traduction efficace de PfrA lui permet de jouer son rôle activateur dans la transcription des gènes de virulence (Loh <i>et</i> <i>al.</i> , 2012)		
Salmonella enterica (figure 9 D)	Protéine TlpA	< 28°C : Les dimères de TlpA se fixent sur l'ADN et exercent une action répressive sur les gènes cibles 37°C : Les dimères se dissocient et libèrent l'accès de la région promotrice à l'ARN polymérase	A 37°C : Ce mécanisme aboutit à l'activation des gènes de virulence (Hurme and Rhen, 1998)		

 Tableau IV : Quelques exemples caractéristiques des différents mécanismes utilisés par les pathogènes pour l'expression de leurs facteurs de virulence

<sup>1</sup> Chez *S. flexneri*, la protéine IHF, bien que requise pour la synthèse des facteurs de virulence, n'a pas de rôle dans la thermorégulation de leur expression.

Pour les raisons précédemment évoquées, l'étude la thermorégulation et de la thermoadaptation a majoritairement concerné les Entérobactéries (pathogènes et commensales) ayant pour hôte des mammifères. En effet, celles-ci constituent de bons modèles pour cette étude car, durant leur cycle de vie, la température de leur hôte varie peu (de 35 à 41°C) alors que celle de leurs réservoirs environnementaux (sols, eau, aliments,...) est variable et souvent différente de celle de leur hôte. Ceci a certainement contraint les Entérobactéries pathogènes des mammifères à mettre en place des systèmes adaptés leur permettant d'induire l'expression de leurs gènes de virulence à des températures voisines de celles caractérisant leurs hôtes. Ainsi, le passage vers une température comprise entre 35 et 41°C est un signal représentatif de l'entrée à l'intérieur d'un mammifère.

### 2. Les réponses de stress engagées lors des chocs thermiques

Lors de l'entrée à l'intérieur et/ou de la sortie d'un hôte mammifère, les bactéries pathogènes (et commensales) doivent mettre en place des réponses leur permettant de s'adapter à ces nouvelles conditions. Dans le cas de la température, ces réponses sont produites si les températures caractérisant le réservoir initial (x) et le réservoir d'arrivée (y) sont très différentes : par exemple du sol vers un animal à sang chaud, et réciproquement. En fonction du sens du choc, deux types de réponse peuvent être engagées :

- la réponse au choc thermique froid, traduit de l'anglais « Cold Shock Response », lorsque la température diminue de manière drastique ;
- la réponse au choc thermique chaud, traduit de l'anglais « Heat Shock Response » lorsque la température augmente drastiquement ;

Dans les deux cas, les systèmes mis en jeu répondent aux conséquences des dommages moléculaires causés par la variation de température tels que la dénaturation des protéines. L'énergie allouée au métabolisme bactérien dans les conditions clémentes est alors détournée en faveur de la mise en place des processus de résistance. La finalité de ces réponses est de limiter les dommages moléculaires générés pour éviter une situation catastrophique irréversible, la mort cellulaire précoce. La majorité des études concernant la réponse aux chocs thermiques ont été réalisées chez la bactérie à Gram négatif *E. coli* et chez la bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis*. Leur compilation permet de fournir un modèle très abouti des mécanismes cellulaires mis en place. Par ailleurs, *E. coli* fait partie de la famille des Entérobactéries qui regroupe de nombreux organismes dont le cycle de vie alterne des habitats x et y dissemblables en termes de température (x : sol, eau / y : mammifère). L'organisme concerné par mes travaux étant également une Entérobactérie, les résultats obtenus chez *E. coli* seront présentés en détail et accompagnés d'une description succinte des spécificités observées chez *B. subtilis*.

Dans la suite de ce manuscrit, les deux types de chocs seront qualifiés par le sens du changement : (-) et (+) pour les chocs thermiques froid et chaud, respectivement.

#### a. La réponse au choc thermique (+)

Lorsque la température de culture de cellules bactériennes passe subitement de  $30^{\circ}$ C à  $42^{\circ}$ C, le premier impact cellulaire généré est la dénaturation des protéines qui expose leurs régions hydrophobes. Ces dernières s'associent alors de manière aléatoire ; les agrégats protéiques formés sont perçus comme une menace pour le fonctionnement du métabolisme cellulaire. Directement après le choc thermique, un grand nombre de protéines chaperonnes et de protéases sont produites fortement. Leur fonction cellulaire est d'assister le repliement des protéines, l'assemblage des macromolécules, le transport ou encore la dégradation des protéines tout le long de la croissance cellulaire et particulièrement lors de conditions de stress (Gur *et al.*, 2011). Leur rôle consiste à nettoyer le contenu cellulaire des protéines inactivées par la chaleur en améliorant leur repliement ou en les séquestrant pour les guider vers les protéases qui s'occuperont de leur dégradation (**figure 10**). Après cette courte phase d'ajustement physiologique qui ne dure que quelques minutes, les cellules sont mieux armées pour faire face au stress : la synthèse des chaperonnes et des protéases diminue et, 20 à 30 minutes après le choc, atteint un état stationnaire.



Figure 10 : Vue d'ensemble du contrôle de la qualité des protéines cellulaires opéré par les protéines chaperonnes et par les protéases après un choc thermique (inspiré de Gur *et al.*, 2011) Les protéines dénaturées deviennent accessibles aux protéases après leur désagrégation par les chaperonnes cellulaires. Les produits de dégradation peuvent être par la suite réutilisés pour la synthèse de protéines *de novo*.

De l'activation du facteur sigma 32 (ou RpoH) découle l'induction de la synthèse des protéines de réponse au choc thermique (+)

Chez *E. coli*, la rapidité de l'induction des protéines du choc (+) est majoritairement liée à une accumulation rapide et forte du facteur  $\sigma^{32}$ : en s'associant à l'ARN polymérase au niveau des

opérateurs, il va la guider vers la transcription préférentielle des gènes de son régulon *id est* qui codent majoritairement des protéines chaperonnes et des protéases. L'accumulation du facteur  $\sigma^{32}$  en réponse à un choc thermique est contrôlée à plusieurs niveaux (Morita *et al.*, 2000) :

<u>Au niveau de la conformation de son transcrit *rpoH*: Deux régions ayant une structure en épingle à cheveux à l'intérieur de la séquence codante se structurent de manière à ce que le ribosome ne puisse y accéder (figure 11). Après un choc thermique, la déstabilisation des structures permet au ribosome d'avancer sur le transcrit *rpoH* (Klinkert and Narberhaus, 2009).
</u>

- <u>Au niveau de sa stabilité ( $t_{1/2} = 8 \min versus 1 \min avant le choc</u>) : En conditions normales, les protéines chaperonnes DnaK-DnaJ et GrpE séquestrent le facteur <math>\sigma^{32}$ ; cette rétention serait responsable de la dégradation du  $\sigma^{32}$  par la protéase FtsH, le temps de demi-vie de  $\sigma^{32}$  est alors d'1 minute. Après un choc thermique, les protéines DnaK et DnaJ sont titrées par les agrégats protéiques ; le facteur  $\sigma^{32}$  est libéré et son temps de demi-vie est transitoirement multiplié par 10 (**figure 12**).</u>



**Figure 11 : Le transcrit** *rpoH* **synthétisé par** *E. coli* **est un ARN thermomètre** (inspiré de Kortmann and Narberhaus, 2012)

A. Deux structures en épingle à cheveux (II et III) se forment par appariement de base à l'intérieur même de la séquence codante, et non pas en 5'UTR comme il le sera décrit ultérieurement pour l'ARN thermosenseur *lcrF*. Cet agencement de l'ARN bloque l'accès du ribosome au site d'initiation de la traduction (SD : Shine-Dalgarno). Toutefois, lorsque l'ARN polymérase synthétise le transcrit *rpoH*, le ribosome peut se fixer avant que les structures II et III ne se forment : ceci pourrait favoriser le maintien d'un niveau basal de RpoH ( $\sigma^{32}$ ) et/ou l'accumulation très rapide du facteur  $\sigma^{32}$  après un choc thermique (+).

**B.** Après un choc thermique (+), les structures sont déstabilisées et le brin d'ARN s'ouvre comme une fermeture éclair. Le ribosome déjà présent sur le site d'initiation de la traduction peut avancer sur le transcrit *rpoH*. Par ailleurs, le site d'initiation de la traduction devient accessible aux ribosomes pour la traduction. Par conséquent, le facteur  $\sigma^{32}$  est synthétisé activement en réponse au choc thermique.

Par ailleurs, les protéines DnaK et/ou DnaJ libérées de leur complexe avec le facteur  $\sigma^{32}$  pourraient représenter un complexe thermosenseur dont la formation serait modulée par la température (Siegenthaler and Christen, 2005). L'augmentation de la température, en réduisant l'affinité de l'une et/ou de l'autre de ces protéines pour  $\sigma^{32}$ , favoriserait leur affinité pour les agrégats protéiques. Par la suite, la production des chaperonnes et des protéases cellulaires est induite par le facteur  $\sigma^{32}$ ; les agrégats cellulaires sont résorbés. Finalement, DnaK et DnaJ sont libérées et peuvent séquestrer à

nouveau le facteur  $\sigma^{32}$  dont le niveau de stabilité retourne rapidement à son niveau de base (*id est* 1 min) quelques minutes après le choc.



Figure 12 : Modèle schématique de la réponse au choc thermique (+) chez *E. coli* Dans des conditions non stressantes, les facteurs  $\sigma^{24}$  et  $\sigma^{32}$  sont retenus respectivement par les protéines RseA et DnaK-DnaJ. Après un choc thermique, des agrégats protéiques se forment dans les compartiments cellulaires ce qui aboutit à l'accumulation cytoplasmique de ces deux facteurs sigmas. Chacun de ces facteurs va ainsi réguler la transcription des gènes  $\sigma^{24}$  et  $\sigma^{32}$  dépendants. Par ailleurs, la transcription du facteur  $\sigma^{32}$  pourrait être favorisée par la fixation du facteur  $\sigma^{24}$  au niveau de son opérateur. De manière intéressante, la réponse au choc thermique (+) est largement contrôlée par les facteurs  $\sigma$ .

### Les transcrits des protéines de choc thermique (+) sont aussi des ARN thermomètres

Il est important de noter que de nombreux verrous moléculaires existent : les transcrits de certains gènes du régulon  $\sigma^{32}$  sont aussi des ARN thermomètres. Ils forment des structures secondaires qui sont altérées par la température : celles-ci empêchent la traduction à une température « normale ». Ces structures contiennent des éléments appelés ROSE pour « Repression Of heat-Shock gene Expression » et « FourU » (succession de 4 bases U) (Kortmann and Narberhaus, 2012). L'élément ROSE fait partie d'une structure secondaire constituée généralement de 2 à 4 domaines en épingle à cheveux. Il s'agit d'une séquence nucléotidique conservée (UYGCU, où Y est une pyrimidine) localisée dans la région 5' non traduite de certains transcrits des gènes  $\sigma^{32}$ -dépendants. L'élément FourU est caractérisé par la présence de quatre uridines enfermées dans une structure en épingle à cheveux. Les éléments ROSE et FourU induisent tous deux le blocage de l'accès des ribosomes à leur site de fixation ; l'augmentation de la température aux alentours de 42°C induit un réarrangement structural et libère la séquence de fixation du ribosome. Le positionnement du ribosome permet la traduction des protéines de choc thermique concernées. A titre d'exemple chez *E. coli*, l'ARNm *ibpA* 

pour « inclusion body binding protein A » porte un élément ROSE (Waldminghaus *et al.*, 2009). L'élément thermosensible « Four U » a été identifié pour la première fois dans le gène  $\sigma^{32}$ -dépendant *agsA* pour « agregation-suppression protein A » chez *Salmonella enterica* Typhimurium (Waldminghaus *et al.*, 2007) et plus récemment dans le gène *lcrF* responsable de l'activation de la virulence chez les *Yersinia* infectant l'homme (Böhme *et al.*, 2012). Les protéines IbpA et AgsA ainsi traduites peuvent alors remplir leur fonction : éliminer les agrégats protéiques accumulés anormalement après un choc thermique.

### Libération et accumulation du facteur sigma 24 (ou RpoE) après un choc thermique (+)

Chez *E. coli*, un second mécanisme dépendant d'un facteur sigma différent de RpoH, le  $\sigma^{24}$ , est activé en réponse à une température élevée. De la même manière que le mécanisme précédemment décrit, le point de départ est la présence anormale d'agrégats protéiques localisés dans ce cas dans le périplasme. L'activité du facteur  $\sigma^{24}$  est modulée par l'anti-sigma RseA : il s'agit d'une protéine qui piège le facteur  $\sigma^{24}$  au niveau de la membrane interne et l'empêche de s'associer à l'ARN polymérase. Après un choc thermique, la protéase DegS perçoit les porines mal repliées dans le périplasme et provoque le clivage du domaine périplasmique de RseA (Sohn *et al.*, 2007 ; Walsh *et al.*, 2003). La protéase membranaire RseP est alors recrutée et induit le clivage du domaine cytoplasmique de RseA (Yan and Shi, 2007). L'anti-sigma RseA ainsi dégradé, le facteur  $\sigma^{24}$  est libéré dans le cytoplasme et peut alors s'associer à l'ARN polymérase (Chaba *et al.*, 2007) (**figure 12**). Cette dernière est dirigée vers la transcription des gènes du régulon  $\sigma^{24}$  qui codent, entre autres, des protéines périplasmiques (chaperonnes et protéases) et, de manière intéressante, la protéine RpoH (Bury-Moné *et al.*, 2009).

### Et chez les bactéries à Gram positif ?

Chez les bactéries à Gram positif, des réponses similaires sont déclenchées afin de résoudre la menace que représentent les agrégats cellulaires ; toutefois celles-ci ne font pas intervenir les mêmes acteurs. En effet, chez *Bacillus subtilis*, une augmentation rapide de la température induit 5 régulons de gènes qui codent pour la plupart des chaperonnes moléculaires et des protéases ATP-dépendantes et qui sont contrôlés par 5 systèmes moléculaires différents (Thi Tam *et al.*, 2006 ; Elshoz *et al.*, 2010 ; Voigt *et al.*, 2013) :

- <u>Les régulateurs HrcA et CtsR</u> répriment la synthèse de protéines de choc thermique (+) telles que les chaperonnes DnaK, GroES et GroEL et les protéases ATP-dépendantes ClpC, ClpP et ClpE lors de conditions de croissance standards ;
- Après un choc thermique, <u>le facteur sigma alternatif σ<sup>B</sup></u> est responsable de l'activation de la synthèse de diverses protéines favorisant la résistance à de nombreux stress (carence nutritionnelle, stress osmotique); c'est le régulon le plus important avec environ 150 gènes ;

- <u>Le système à deux composantes CssS/CssR</u> est induit après un choc thermique (+), la transduction du signal par le régulateur transcriptionnel CssR aboutit *in fine* à l'activation de protéases ancrées à la membrane cytoplasmique ;
- <u>La chaperonne HtpG</u> qui active l'expression de son gène suite à un choc thermique (+) ; cette dernière est également retrouvée chez *E. coli*.

### b. La réponse au choc thermique (-)

Lorsque la température ressentie par des cellules d'*E. coli* passe brusquement de  $37^{\circ}$ C à  $10^{\circ}$ C, ces dernières arrêtent de se diviser jusqu'à 4 heures environ après le choc. La croissance reprend ensuite avec un taux de multiplication dépendant de la température imposée aux cultures. Que se passe-t-il lors de cette phase de transition ?

### La phase de latence précoce

Tout d'abord, la synthèse des protéines cellulaires qui ne sont pas indispensables à la résistance au choc est arrêtée. En effet, la traduction réalisée par les ribosomes est bloquée par les structures secondaires stables qu'adoptent les ARNm cellulaires à de basses températures : cet évènement cause l'arrêt de la croissance cellulaire. Parallèlement, la production de protéines indispensables à la réadaptation cellulaire est induite : les CSPs pour « Cold-Shock Proteins » (**figure 13**).



Figure 13 : Evolution de la synthèse protéique après un choc thermique (-) chez E. coli

Les CSPs « Cold-Shock Proteins » regroupent les protéines très peu produites à  $37^{\circ}$ C dont le taux de synthèse est très élevé après un choc thermique (au minimum ×10). Les CAPs « Cold-Acclimation Proteins » regroupent les protéines produites à  $37^{\circ}$ C dont le taux de synthèse est supérieur lors d'un choc thermique (au maximum ×10). Les non-CSPs/CAPs sont les protéines cellulaires dont la stabilité est fortement affectée après un choc

thermique et dont la traduction est mise en attente en faveur de celle des CSPs et des CAPs (Requena, 2012). Quand la physiologie cellulaire s'est ajustée aux conditions, la synthèse des non-CSPs/CAPs est de nouveau induite alors que celle des CSPs et des CAPs diminue (à un niveau dépendant de la température du milieu).

La protéine CspA, la première historiquement identifiée, est considérée comme une protéine essentielle de la réponse au choc thermique (-). En effet, directement après un choc, (i) son accumulation cellulaire est 100 fois plus élevée qu'en conditions normales et (ii) elle représente en moyenne 10% du contenu protéique total des cellules (Thieringer *et al.*, 1998). A titre d'exemple, chez les bactéries à Gram positif *B. subtilis* et *L. monocytogenes*, trois CSPs ont été jusqu'à présent identifiées (CspA, CspB et CspD (Schmid *et al.*, 2009)). Chez *E. coli*, CspA et ses homologues (CspB, CspG et CspI) sont des chaperonnes à ARN qui favorisent la déstabilisation des structures secondaires des ARNm et, en conséquence, facilitent leur traduction à basses températures.

La synthèse des CSPs est favorisée par la transcription plus intense de leur gène après un choc thermique : à titre d'exemple, celle de *cspA* est 4 à 5 fois plus élevée (Jones *et al.*, 1996). Toutefois, l'induction de leur synthèse à basse température est majoritairement liée à la stabilité accrue de leur transcrit (Fang *et al.*, 1997) : le temps de demi-vie du transcrit *cspA* est d'environ 20 min à basses températures (15°C) alors qu'il n'est que de 12 s à 37°C (Phadtare and Severinov, 2010). Ceci est lié à une plus longue région 5'UTR des ARNm *csp* qui se structure de manière à défavoriser leur dégradation et à favoriser la fixation des ribosomes à basses températures (Goldenberg *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1996). Par ailleurs, deux éléments qui améliorent les mécanismes de traduction des CSPs sont présents en 5' de ces ARNm : ils sont appelés UB « Upstream Box » et DB « Downstream Box » (Etchegaray and Inouye, 1999 ; Yamanaka *et al.*, 1999). Ces éléments UB et DB, d'une dizaine de paires de bases, sont situés avant le site de fixation du ribosome et après le site d'initiation de la traduction, respectivement (Mitta *et al.*, 1997) ; des études ont montré que leur présence améliore la traduction des ARNm (Etchegaray and Inouye, 1999 ; Mitta *et al.*, 1997 ; Yamanaka *et al.*, 1999).

Par ailleurs, afin d'améliorer l'activité traductionnelle à basse température, l'hélicase CsdA, conjointement avec le facteur de maturation RbfA, vont aider à la biogenèse de ribosomes mieux adaptés aux basses températures. Leur action est primordiale dans la résistance cellulaire au froid car l'inactivation de l'une ou de l'autre chez *E. coli* induit une grande sensibilité cellulaire vis-à-vis de basses températures. En effet, les sous-unités ribosomales 30S et 50S des riboomes sont incapables de s'associer et le nombre de ribosomes est réduit de manière dramatique (Shajani *et al.*, 2011). RbfA participe à la maturation de la petite sous-unité ribosomale 30S à basse température (Shajani *et al.*, 2011) alors que CsdA contribue à celle de la grande sous-unité 50S (Iost *et al.*, 2013). Finalement, la forte synthèse de ces deux dernières protéines après un choc thermique confère aux bactéries de nouvelles capacités traductionnelles à basses températures ce qui permet de traduire de nouvelles protéines qui vont favoriser les mécanismes d'acclimatation.

#### La phase de latence tardive, un chemin vers l'acclimatation cellulaire

Grâce à la mise en place d'une machinerie de traduction mieux adaptée, une cinquantaine de protéines supplémentaires sont synthétisées deux heures après le choc ; parmi ces protéines se trouvent les protéines CAPs pour « Cold-Acclimation Proteins » (**figure 13**). Leur synthèse n'était pas requise juste après le choc mais elles sont primordiales pour la persistance des cellules, particulièrement lorsque les conditions sont stressantes. En voici une liste non exhaustive (Golovlev, 2003) :

- <u>Le facteur TF pour « Trigger Factor »</u>: Bien que produit à 37°C, sa synthèse est augmentée après un choc thermique (-). Il s'associe avec la sous-unité 50S du ribosome et les polypeptides en cours de synthèse. Sa présence augmente l'affinité de la chaperonne GroEL pour les protéines non repliées. Le facteur TF est donc un accompagnateur du ribosome qui favorise le repliement des protéines en cours de synthèse *via* le recrutement de protéines chaperonnes telles que GroEL.

<u>La protéine Hsc66 (HscA)</u>: De manière intéressante, cette chaperonne est membre de la famille des protéines Hsp70 pour « Heat-shock proteins ». Pourtant sa production n'est pas affectée par un choc thermique (+) alors qu'elle est fortement induite environ 3 heures après un choc thermique (-). Cette protéine joue un rôle majeur dans la biogenèse des centres fer-soufre *via* la protéine IcsU (Bonomi *et al.*, 2011). Toutefois son rôle précis en tant que chaperonne demeure non élucidé dans la réponse au choc thermique (-).

- <u>Le facteur de recombinaison RecA</u> : La protéine RecA a un rôle clé lors de conditions de stress car elle permet de limiter l'accumulation d'erreurs lors de la réplication. En effet, lorsqu'une lésion est détectée sur l'ADN, cette dernière peut être éliminée par le système de recombinaison bactérien RecABCD afin que l'ADN polymérase ne soit pas arrêtée dans son activité réplicative (Singleton *et al.*, 2004).

- <u>La sous-unité  $\alpha$  de l'ADN gyrase (GyrA) et la protéine associée au nucléoïde H-NS</u> : Des études ont montré que CspA contrôle positivement et de manière directe la transcription des gènes *gyrA* et *hns* (Brandi *et al.*, 1994 ; Giangrossi *et al.*, 2001 ; Jones *et al.*, 1992 ; La Teana *et al.*, 1991) : CspA, en se fixant sur l'ADN simple brin lors de l'ouverture des brins d'ADN pour la transcription, augmente l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase des gènes codant les protéines H-NS et GyrA (Giangrossi *et al.*, 2001). Bien que l'action de ces deux protéines soit différente (voir les parties **II.2** et **II.3** de la section bibliographique), la finalité de leur intervention est identique : conserver un niveau d'enroulement de l'ADN en cohérence avec la physiologie cellulaire.

- <u>La PNPase du dégradosome</u> : En effet, le gène *pnp* qui code la PNPase est plus exprimé après un choc thermique ; toutefois, l'accumulation de cette enzyme n'est notable qu'à la fin de la phase d'acclimatation. La PNPase, et aussi la RNaseE, sont deux protéines essentielles au fonctionnement du dégradosome ; leur activité est également assistée par des protéines accessoires. La PNPase, qui agit sur l'ARN simple brin, dégraderait plus favorablement les transcrits *csp* qui sont déstabilisés à la fin de la phase d'acclimatation ce qui *in fine* réduirait fortement la quantité des CSPs (Polissi *et al.*, 2003).

Par ailleurs, à la suite d'un choc thermique (-), l'hélicase RhlB, généralement associée au dégradosome en conditions « normales » de croissance, est remplacée et/ou assistée par l'hélicase CsdA : ces deux hélicases agissent soit coopérativement (une population de dégradosome) soit additionnellement (deux populations de dégradosome) et la finalité de leur action est certainement de renforcer l'efficacité du dégradosome sur les ARNm *csp* qui sont particulièrement stables à basses températures (Iost *et al.*, 2013).

Finalement, l'action conjointe des CSPs et des CAPs permet de résister activement au stress en réadaptant totalement le métabolisme cellulaire. Lorsque les processus cellulaires vitaux se sont acclimatés et que la synthèse des CSPs est arrêtée (Yamanaka and Inouye, 2001), une partie de l'énergie métabolique est de nouveau allouée pour la division cellulaire.

# c. Les réponses au choc thermique (-) et (+) comme une ouverture vers l'adaptation aux températures extrêmes

Une étude récente menée chez la bactérie psychrophile *L. monocytogenes* (Durack *et al.*, 2013) a montré que les basses températures et le choc hyperosmotique induisaient le même type de gènes (dont les produits sont impliqués dans les mécanismes de traduction, dans la division cellulaire et aussi dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne). Ces réponses induites pourraient expliquer la forte capacité de survie de cette bactérie dans des habitats anthropisés tels que les les aliments périssables stockés à basses températures.

Connaissant les possibilités évolutives des bactéries, il n'est pas illogique de penser que les protéines de choc thermique aient pu permettre une adaptation des bactéries mésophiles vers des milieux à températures plus extrêmes. Leur présence pourrait donc revêtir un caractère fondamental dans la colonisation d'autres habitats (Feller and Gerday, 2003). Ainsi, l'inactivation de la protéine CspA chez *L. monocytogenes* bloque sa croissance à basses températures (Schmid *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été montré que la surproduction de la protéine CspA de la bactérie psychrophile *Psychromonas artica* chez *E. coli* (i) cause une élongation des cellules et un retard de croissance cellulaire et (ii) multiplie par 10 fois la résistance d'*E. coli* au froid. Ces données suggèrent que la protéine CspA de *P. artica* a évolué de manière à lui conférer des capacités de survie au froid exceptionnelles (Jung *et al.*, 2010).

Les protéines de choc thermique sont donc importantes dans l'optimisation de la tolérance visà-vis de la température et probablement dans l'acclimatation voire l'adaptation à des habitats ayant diverses températures. Cette caractéristique pourrait être un aspect fondamental de l'excellente adaptation de certains des organismes de l'environnement à des niches écologiques à températures variées.

# 3. La thermorégulation de la virulence chez les espèces du genre *Yersinia* : un modèle complexe

### a. Pourquoi choisir les Yersinia spp.?

Dans cette partie, nous illustrerons les mécanismes qui peuvent être utilisés par une bactérie pour intégrer un signal thermique de manière à ajuster finement sa virulence. Le modèle *Yersinia* a été retenu pour plusieurs raisons :

- De nombreuses études ont été réalisées chez les espèces pathogènes du genre *Yersinia* dans lequel les différents niveaux de régulation évoqués dans la figure 9 sont intégrés ;
- Des travaux tendent à montrer une proximité phylogénétique des *Yersinia* spp. et des *Dickeya* spp. (Nykyri *et al.*, 2012), notre modèle d'étude au laboratoire : ces genres contiennent des Entérobactéries pathogènes (des animaux pour le premier genre et des végétaux pour le second) qui peuvent se rencontrer dans leurs niches écologiques accessoires (sol, eau). Par ailleurs, les espèces *Yersinia pestis* et *Dickeya dadantii* peuvent toutes les deux être transmises par les insectes, la puce et le puceron, respectivement (Barnes, 1982 ; Grenier *et al.*, 2006).

Parmi les *Yersinia* spp., seulement trois espèces ont un pouvoir infectieux chez l'homme : *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Alors que *Y. pestis* mène un mode de vie plus abrité en se logeant alternativement chez les puces et chez les mammifères (Stenseth *et al.*, 2008) -bien qu'elle puisse survivre dans le sol (Eisen *et al.*, 2008)-, les deux autres espèces sont fréquemment trouvées dans des réservoirs environnementaux tels que les sols humides ou l'eau impropre à la consommation. L'homme se contamine par voie orale et développe une adénite mésentérique ou une entérite aiguë se traduisant cliniquement par de la fièvre, des diarrhées et des douleurs abdominales (Bottone, 1997).

# b. L'initiation de la transcription : un point critique de l'expression génique hautement régulé

Les espèces pathogènes *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterolitica* portent un plasmide de virulence appelé pYV pour « Yersinia Virulence » (Cornelis *et al.*, 1998). Sur ce plasmide se trouvent les gènes *yop* qui codent des effecteurs protéiques variés, les « Yersinia outer proteins » et les gènes *ysc* et *lcr* qui codent le système de sécrétion de type III, nécessaire à l'injection des Yops dans les cellules eucaryotes (Cornelis *et al.*, 1998). Ces effecteurs sont indispensables à la survie du pathogène dans les cellules animales : ils perturbent les défenses de l'hôte en induisant, entre autres, l'apoptose des macrophages. Ces facteurs de virulence sont considérés comme essentiels chez les espèces pathogènes de *Yersinia*, c'est pourquoi leur régulation est très étudiée (Hueck, 1998).

L'expression de tous les facteurs de virulence portés par le plasmide pYV est contrôlée par l'activateur transcriptionnel LcrF (Straley and Perry, 1995). LcrF est lui-même contrôlé par la NAP YmoA, un homologue du régulateur Hha présent chez *E. coli* et *S. enterica* (Fass and Groisman, 2009 ; Madrid *et al.*, 2007 ; Silphaduang *et al.*, 2007). Les protéines de la famille Hha/YmoA sont connues pour former des hétérodimères avec H-NS (Nieto *et al.*, 2002). Lorsque la température est proche de 30°C, YmoA bloque la synthèse des facteurs de virulence essentiellement *via* un mécanisme indirect en réprimant la synthèse de l'activateur LcrF (Böhme *et al.*, 2012). A 37°C, température de l'hôte mammifère, l'expression de *lcrF* est déréprimée : LcrF s'accumule et active l'expression des facteurs de virulence nécessaires pour l'infection (Rohde *et al.*, 1999) (**figure 14A**).

Comme précédemment évoqué, chez les protéobactéries, la protéine H-NS (et ses homologues) est un régulateur sensible aux variations des conditions environnementales (Dorman, 2004). Chez les Entérobactéries pathogènes animales telles que *Escherichia coli* mais aussi certaines espèces des genres *Shigella* et *Salmonella*, H-NS est très souvent mise en cause dans la thermorégulation de la virulence (Madrid *et al.*, 2002 ; Beloin *et al.*, 2003 ; Prosseda *et al.*, 1998 ; Ono *et al.*, 2005). En accord avec les résultats précédemment obtenus pour les régulateurs de la famille Hha/YmoA (Nieto *et al.*, 2002), il a été montré que l'interaction de YmoA avec la région promotrice de *lcrF* dépend de la présence de la protéine H-NS (Böhme *et al.*, 2012). En effet, des expériences d'interactions protéiques réalisées entre la protéine H-NS et YmoA ont montré que :

- YmoA seule n'interagit pas avec la région promotrice du gène *lcrF* ;
- H-NS seule interagit avec la région promotrice du gène *lcrF* ;
- L'hétérodimère YmoA-H-NS interagit avec la région promotrice du gène lcrF.

Ceci indique clairement que l'interaction directe de YmoA avec cette région opératrice nécessite la présence préalable de la protéine H-NS au niveau de cette même région (Böhme *et al.*, 2012). Le modèle de régulation présenté pour le moment, bien que non validé *in vivo*, repose sur la formation d'un complexe nucléoprotéique stable à basse température qui réprimerait l'expression de l'activateur des gènes de virulence majeurs. Suite à une augmentation de la température, la déstabilisation du complexe induirait la cascade d'activation de la virulence *via* l'action de LcrF. Sachant que la région promotrice de *lcrF* est riche en bases AT, il est vraisemblable qu'à des températures plus élevées, la fixation de YmoA sur la région promotrice de *lcrF* pourrait être défavorisée d'une part par la faible efficacité de H-NS à former des oligomères et d'autre part par la diminution du nombre des sites de fixation préférentiels de H-NS (Rohde *et al.*, 1999).

### c. La stabilité du répresseur YmoA est dépendante de la température

Il a été montré que la protéine YmoA, responsable de la répression de l'activateur majeur de la virulence LcrF, a un caractère instable à 37°C (Jackson *et al.*, 2004). En effet, YmoA est rapidement dégradée à 37°C mais reste stable à des températures inférieures (**figure 14A**). Cette protéolyse,

opérée par les protéases ClpXP et Lon, joue un rôle important dans la thermorégulation de l'expression du système de sécrétion de type III (SST3) (Jackson *et al.*, 2004). Le signal induisant la dégradation de YmoA par ce complexe enzymatique n'est toutefois pas encore élucidé. Plusieurs mécanismes ont été proposés par Jackson *et al.* (2004) afin d'expliquer sa dégradation plus prononcée à 37°C :

- Une synthèse ou une activité plus forte des protéases Lon et ClpXP ;
- Une modification structurale intrinsèque à YmoA qui la rend plus propice à la dégradation ;
- Une modification structurale extrinsèque à YmoA telle que l'ajout d'un signal par une protéine accessoire qui attire les protéines Lon et ClpXP.

Chez *E. coli*, la protéine StpA, apparentée à H-NS, est capable de former des homodimères et des hétérodimères avec H-NS : alors que la première forme est rapidement dégradée, la seconde est plus stable (Johansson and Uhlin, 1999). Considérant cet exemple, il est envisageable que YmoA, sous une forme non complexée à H-NS, ait un caractère instable et soit rapidement dégradée quand la température augmente (Jackson *et al.*, 2004).



Figure 14 : Modèle schématique de la réponse à la température par les protéines régulatrices LcrF (A) et RovA (B) chez les bactéries du genre *Yersinia*.

A. Chez les Yersinia spp.: A 25°C, la protéine YmoA, assistée par la protéine H-NS au niveau du promoteur, réprime l'expression de l'activateur LcrF : sa transcription est faible et la conformation adoptée par le transcrit est défavorable à sa traduction. L'augmentation de la température à 37°C induit certainement une diminution de l'affinité de H-NS pour l'ADN (via la diminution des sites de courbures) et la dégradation de la protéine YmoA par les protéases ClpP et Lon. L'expression du transcrit lcrF en est favorisée et par ailleurs sa conformation est remaniée de manière favorable pour sa traduction. LcrF active la transcription des gènes codant les principaux facteurs de virulence tels que l'adhésine YadA, les protéines Yops et le système de sécrétion de type 3.



un changement de conformation et perd son affinité pour l'ADN. Par ailleurs, l'inactivation du répresseur YmoA favorise la synthèse de RovM : l'expression du gène *rovA* est réduite *via* la perte d'affinité de l'activateur RovA mais aussi l'activation du répresseur RovM.

### d. L'ARNm lcrF est un ARN thermomètre

Environ 120 pb en amont du gène *lcrF* se trouve le gène yscW: ces 2 gènes sont organisés en un opéron dont la transcription est initiée à partir d'un unique promoteur situé en 5' de yscW. Sa transcription est faible et le transcrit yscW-*lcrF* est instable à une température inférieure à 30°C (Böhme *et al.*, 2012 ; Hoe and Goguen, 1993). Toutefois, son accumulation cellulaire, bien que faible à basse température, serait un moyen utilisé par les bactéries pour émettre une réponse cellulaire rapide lorsque les conditions d'infection deviennent plus favorables.

Par ailleurs, le transcrit *yscW-lcrF* serait un ARN thermomètre : en effet, à 25°C la région non codante située entre les gènes *yscW* et *lcrF* s'organiserait en deux domaines en épingle à cheveux (**figure 15**).



**Figure 15 : Structure de l'ARN thermomètre** *yscW-lcrF* synthétisé par les *Yersinia* spp. à 25°C (prédite par le programme Mfold Zuker, 1989)

L'élément FourU porté par le domaine II, signalé en rouge, s'apparie avec le site de fixation du ribosome (RBS). Les deux petites boucles internes (fléchées en vert) et les appariements inexacts (fléchées en violet) augmentent la thermolabilité de la molécule d'ARNm. L'augmentation de la température facilite la séparation des brins au niveau de ces structures ce qui libère le RBS. Le ribosome avance sur le transcrit et initie la traduction de LcrF.

A l'intérieur du domaine II, précisément de la 26<sup>ème</sup> à la 29<sup>ème</sup> base avant le codon initiateur, se trouve une séquence de quatre uraciles -communément appelée élément FourU (Waldminghaus *et al.*, 2007)- qui s'apparie avec le site de fixation du ribosome (AGGA) (Böhme *et al.*, 2012). La présence dans le domaine II de deux petites boucles internes au niveau des positions -5;-6/-38 et -12/-31;-32 et de 3 appariements incorrects (-19/-24 ; -15/-29 ; -16/-28) sont favorables à la thermolabilité de la molécule d'ARNm synthétisé. Lorsque la température augmente (à 37°C), le domaine II a tendance à s'ouvrir plus facilement au niveau de ces sites plus lâches ce qui libère le site de fixation du ribosome pour la traduction (Böhme *et al.*, 2012). La protéine LcrF ainsi traduite exerce alors son action d'activateur transcriptionnel au niveau des gènes de virulence (**figure 14A**).

# e. RovA, un autre facteur transcriptionnel qui répond à la température chez *Y*. *pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*

L'injection des effecteurs Yops est dépendante d'un contact intime entre les bactéries et les cellules eucaryotes. En ce qui concerne les macrophages, les cibles majoritaires du SST3, l'injection des effecteurs ne nécessite pas forcément la synthèse de molécules adhésives additionnelles. Toutefois, la présence d'adhésines est requise pour l'amarrage aux autres cellules cibles (Casutt-Meyer *et al.*, 2010). Deux adhésines majeures, absentes chez *Y. pestis*, sont synthétisées par *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* : l'adhésine YadA et l'invasine Inv (Cowan *et al.*, 2000). Le gène *yadA* est localisé sur le plasmide de virulence et la production de la protéine YadA est régulée par le système thermosenseur impliquant la protéine LcrF, sa régulation est donc identique à celle des Yops et du SST3 (Böhme *et al.*, 2012). Le gène *inv* est localisé sur le chromosome et la synthèse de l'invasine Inv en fonction de la température est inversement proportionnelle à celle de YadA et des Yops (Cornelis *et al.*, 1998). Cette thermorégulation différentielle s'explique principalement par l'intervention de ces adhésines à deux étapes distinctes de l'infection. L'invasine est un facteur de virulence très précoce permettant l'internalisation primaire de *Yersinia* et la survie dans les tissus de l'hôte au tout début de l'infection. Sa synthèse à des températures inférieures à 37°C est donc nécessaire pour cette première étape de la colonisation de l'hôte (Herbst *et al.*, 2009).

Cette régulation fait intervenir le facteur transcriptionnel RovA : en se fixant sous sa forme homodimérique à la région promotrice du gène *inv*, il active la transcription de ce gène à 25°C (Herbst *et al.*, 2009). L'augmentation de la température induit un changement de conformation des homodimères de RovA qui (i) perdent leur affinité pour l'ADN (Heroven *et al.*, 2007) et (ii) sont dégradés par les protéases ClpXP et Lon (Herbst *et al.*, 2009) (**figure 14B** ; **figure 10**).

Par ailleurs, des études récentes ont montré que la protéine YmoA a un rôle indirect dans l'activation de la transcription de *rovA* à des températures plus modérées. YmoA réprime la synthèse de RovM, qui lui-même réprime la synthèse du régulateur RovA (Heroven *et al.*, 2007) (**figure 14B**). Il est intéressant de noter que RovM est un homologue des protéines HexA/PecT trouvées chez les bactéries phytopathogènes *Pectobacterium carotovorum* (ex *Erwinia carotovora*) et *Dickeya dadantii* (ex *Erwinia chrysanthemi*) (Heroven *et al.*, 2007).

Ainsi, la thermorégulation des fonctions de virulence chez les espèces pathogènes du genre *Yersinia* est un processus complexe faisant intervenir les trois classes de thermosenseurs biologiques (topologie de l'ADN, ARN, protéines). Qu'en est-il des bactéries phytopathogènes dont les hôtes n'ont pas une température fixe et qui subissent donc d'importantes variations de température journalières et saisonnières ?

### 4. La thermorégulation de la virulence chez les bactéries phytopathogènes

Comme précédemment évoqué, la perception des variations de l'habitat par un organisme pathogène est primordiale pour l'expression des facteurs de virulence au moment adéquat (dans un hôte). Il est donc compréhensible que les bactéries pathogènes des plantes modulent également leur virulence en fonction de la température ; toutefois, la notion de valeur seuil, évidente dans le cas des pathogènes des mammifères, semble beaucoup moins stricte pour les pathogènes des végétaux. En effet, dans ce cas, la température n'est pas un signal spécifique de l'entrée dans un hôte. Bien que les données disponibles sur ce sujet soient rares, la majorité des cas répertoriés montrent que la synthèse des facteurs de virulence est plus importante à une température inférieure à celle requise pour une croissance optimale chez les bactéries phytopathogènes (Jin et al., 1993; Smirnova et al., 2008). Il a ainsi été observé que les basses températures induisent le transfert de l'ADN-T chez Agrobacterium, le système de sécrétion de type III et la synthèse de l'amylovoran chez Erwinia amylovora, la production d'alginate et de la phaséolotoxine chez Pseudomonas syringae pv. phaseolicola, et la synthèse des enzymes dégradatives des parois végétales chez Dickeya dadantii (Fullner and Nester, 1996; Wang et al., 2010 ; Arvizu-Gómez et al., 2013 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1992). Jusqu'à présent, le modèle le plus documenté chez les bactéries phytopathogènes est celui de la coronatine synthétisée par Pseudomonas syringae pv. glycinea (PG4180) lorsqu'elle infecte ses hôtes végétaux (figure 16).

La coronatine mime l'hormone végétale de stress, l'acide jasmonique, et possède plusieurs activités induisant la pathogénie de cette bactérie. D'une part, elle stimule une ouverture naturelle des stomates créant ainsi une porte d'entrée ce qui permet aux bactéries d'envahir les espaces intercellulaires de l'hôte (Zheng et al., 2012). D'autre part, la coronatine antagonise la mise en place des réactions de défense de la plante notamment la voie dépendante de l'acide salicylique. La production de la coronatine est maximale à 18°C et diminue à 28°C, la température optimale de croissance de P. syringae. La transcription des gènes des opérons cma et cfa responsables de la biosynthèse de la coronatine est thermorégulée par un système à deux composantes original (figure 16) faisant intervenir (i) un régulateur CorR, (ii) une histidine kinase CorS et (ii) un troisième composant nommé CorP (Ullrich et al., 1995). La fonction exacte de cette dernière protéine reste encore non élucidée bien qu'elle ressemble fortement à CorR (Braun et al., 2009 ; Ullrich et al., 1995). Lorsque la température est de 18°C, CorS s'autophosphoryle et met en place une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation du régulateur CorR : ce dernier va ainsi induire fortement la transcription des gènes de biosynthèse de la phytotoxine COR (Rangaswamy and Bender, 2000). Lorsque la température est de 28°C, les domaines transmembranaires de CorS subissent des réarrangements engendrant une perte de la capacité de CorS soit à s'autophosphoryler soit à transférer le groupement phosphate vers le régulateur CorR (Smirnova et al., 2008). Le régulateur CorR non phosphorylé perd son affinité pour l'ADN ; l'expression des gènes de biosynthèse de la coronatine est faible. La production des facteurs de virulence est optimisée lorsque la température diminue ; cette modulation pourrait jouer un rôle important dans les étapes précoces de l'infection. En effet, les bactéries qui se trouvent à la surface des plantes ont tendance à s'entourer de films hydriques. Ces pellicules d'eau abaissent la température locale qui est de ce fait légèrement inférieure à celle de l'air ambiant. Les bactéries produisent alors de la coronatine qui leur permet de pénétrer dans leur hôte et de le coloniser efficacement. Finalement, cette régulation se rapproche de celle décrite pour l'invasine chez *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*, dont la synthèse est nécessaire aux étapes précoces lors de l'adhésion à la surface des animaux.



#### A. Basses températures





### Figure 16 : Modèle schématique de la régulation de la synthèse de la coronatine par le système à deux composantes CorS/CorR-CorP chez *Pseudomas syringae* pv. *glycinea*

A. A basses températures, la protéine transmembranaire CorS est sous une forme phosphorylée (CorS~P) ; le signal de phosphorylation est transduit directement vers la protéine CorR ou indirectement *via* CorP vers CorR. La forme phosphorylée de CorR (CorR~P) se fixe efficacement à l'ADN et active l'expression de l'opéron en aval qui contient les gènes impliqués dans la biosynthèse de la coronatine (gènes *cfa* et *cma*). La coronatine est constituée par un acide coronafacique (CFA) et un acide coronamique (CMA) reliés par une liaison peptidique.

**B.** A hautes températures, la protéine CorS est soit sous une forme inactive, bien que phosphorylée, soit sous une forme non phosphorylée ; dans les deux cas, le transfert du groupement phosphate n'a pas lieu. La protéine CorR sous sa forme non phosphorylée perd son affinité pour l'ADN et la transcription des gènes de biosynthèse de la coronatine est faible. En raison de la faible synthèse de coronatine dans ces conditions de température, la virulence de *P. syringae* sur son hôte végétal est réduite.

En comparaison des systèmes de thermorégulation décrits chez les bactéries colonisant les mammifères (tels que les *Yersinia* pathogènes), celui utilisé chez *P. syringae* s'avère relativement simple étant donné qu'il ne met en jeu qu'un système à 2 (ou 3) composantes. De ce fait, au début de nos travaux, une question légitime s'est imposé, à savoir : cette simplicité de la thermorégulation des fonctions de virulence est-elle particulière aux bactéries phytopathogènes ? Une étude approfondie d'autres systèmes employés par les bactéries phytopathogènes s'est donc avérée nécessaire afin de pouvoir établir une comparaison objective de la thermorégulation des fonctions de virulence chez les bactéries zoopathogènes et phytopathogènes. La bactérie pathogène des plantes *D. dadantii* offre des avantages certains en raison de sa relative proximité taxonomique avec des pathogènes de mammifères et des connaissances déjà acquises sur la régulation de ses fonctions de virulence.

# IV. *Dickeya dadantii*, une bactérie phytopathogène ayant une capacité d'adaptation aux contraintes environnementales

### 1. Ancienne taxonomie et caractéristiques générales des Dickeya spp.

### a. Taxonomies ancienne et actuelle

La classification des Entérobactéries phytopathogènes a été revue à plusieurs reprises. Initialement regroupées en un seul genre appelé *Erwinia* (Winslow *et al.*, 1920), une nouvelle sousdivision basée sur des critères de virulence a été adoptée (DYE, 1969; Samson *et al.*, 2005) ; celle-ci les différenciait en 4 groupes : les *Erwiniae* nécrosantes, les *Erwiniae* pectinolytiques, les *Erwiniae* à pigments jaunes et les *Erwiniae* atypiques. A la fin des années 1990, des études phylogénétiques menées sur différentes espèces d'*Erwinia* (Hauben *et al.*, 1998) ont conduit à l'éclatement de ce genre en 4 nouveaux genres :

- (1) Le genre Erwinia qui contient les Erwiniae nécrotiques ;
- (2) Le genre *Pectobacterium*, dont *Erwinia chrysanthemi* (syn. *Pectobacterium chrysanthemum*) faisait partie, qui contient les espèces à forte activité pectinolytique sur les tissus végétaux ;
- (3) Le genre *Brenneria* qui rassemble des espèces responsables de bactérioses sur les plantes lignifiées ;
- (4) Le genre *Pantoea* qui contient les espèces produisant un pigment jaune.

De nombreuses controverses persistaient au sujet de l'intégration d'*Erwinia chrysanthemi* dans le genre *Pectobacterium*. La dernière étude menée par Samson *et al.* (2005) sur une collection de 75 souches différentes d'*E. chrysanthemi* a permis d'y mettre un terme. Les résultats obtenus, fondés sur le couplage de méthodes génotypiques et phénotypiques (comparaison des séquences du 16S, hybridation ADN-ADN et utilisation de différentes sources de carbone), ont conduit à la création du genre *Dickeya*. Six espèces apparentées à ce nouveau genre ont été différenciées : *D. zeae, D. dieffenbachiae, D. paradisiaca, D. dianthicola, D. dadantii, D. chrysanthemi*. Une nouvelle souche isolée pour la première fois en 2005 a été ajoutée à cette liste et nommée *D. solani* (Toth *et al.*, 2011) : toutefois la reconnaissance de cette souche en tant que nouvelle espèce n'est pas encore admise par la communauté scientifique.

### b. Expansion mondiale : les causes et les conséquences

Cette division récente implique que la majorité des recensements réalisés jusqu'à présent se réfèrent aux *Dickeya* spp.. Il est donc pour l'instant difficile d'établir une cartographie mondiale de chacune des espèces. Toutefois, les bactérioses liées aux *Dickeya* spp. étaient auparavant localisées

dans les régions à climat tropical et humide. Depuis maintenant plus d'une dizaine d'années, les régions à climat plus tempéré comme les contrées européennes sont de plus en plus touchées par les infections impliquant les *Dickeya* spp. (Toth *et al.*, 2011). Plusieurs hypothèses, qui ne s'excluent pas les unes des autres, sont avancées pour expliquer leur expansion géographique quasi-mondiale. Dans un premier temps, l'augmentation des échanges commerciaux et l'exportation de graines ou de tubercules de pomme de terre contaminées favoriseraient l'émergence des *Dickeya* spp. dans des habitats sains. Dans un second temps, les modifications climatiques régionales couplées à une forte adaptabilité de ce genre bactérien aideraient à l'implantation des espèces importées involontairement par l'homme. Finalement, les populations bactériennes bien adaptées s'acclimateraient efficacement aux conditions du milieu et à ses variations. Par ailleurs, leur persistance pourrait être favorisée (i) par le large spectre d'hôte des *Dickeya* spp. (**tableau V**) mais aussi (ii) par de mauvaises pratiques agricoles comme la monoculture, l'utilisation de graines ou de tubercules infectées ou l'absence de méthodes prophylactiques (aération des terres, désinfection des outils...).

<i>Dickeya</i> spp.	Famille concernée : plantes hôtes infectées				
	Plantes Monocotylédones	Plantes Dicotylédones			
D. dianthicola	Asteraceae : endive, artichaut, <i>Dahlia</i> Caryophyllaceae : <i>Dianthus</i> spp. Crassulaceae : <i>Kalanchoe</i> Solanaceae : pomme de terre, tomate	-			
D. dadantii	Caryophyllaceae : <i>Dianthus</i> spp. Convolvulaceae : patate douce Euphorbiaceae : <i>Euphorbia</i> Geraniaceae : <i>Pelargonium</i> Gesneriaceae : <i>Saintpaulia</i> Solanaceae : pomme de terre	Bromeliaceae : ananas Musaceae : banane Poaceae : maïs Araceae : <i>Philodendron</i>			
D. zeae	Asteraceae : <i>Chrysanthemum</i> spp. Solanaceae : pomme de terre, tabac	Bromeliaceae : ananas Musaceae : banane Poaceae : maïs, riz, <i>Brachiaria</i>			
D. chrysanthemi bv. chrysanthemi <sup>1</sup> bv. parthenii <sup>2</sup>	Asteraceae : <i>Chrysanthemum</i> spp. <sup>1</sup> , endive <sup>1</sup> , tournesol <sup>1</sup> , <i>Parthenium</i> <sup>2</sup> , artichaut <sup>2</sup> Solanaceae : pomme de terre <sup>1</sup> , tomate <sup>1</sup>	Araceae : <i>Philodendron</i> <sup>2</sup>			
D. paradisiaca	Solanaceae : pomme de terre	Musaceae : banane Poaceae : maïs			
D. dieffenbachiae	Solanaceae : tomate	Araceae : <i>Dieffenbachia</i> Musaceae : banane			

Tableau V : L	es différentes	espèces o	de <i>Dickeya</i>	spp. et	leurs	hôtes	végétaux	identifiés	(adapté de
(Toth et al., 201	11)								

bv. : biovar

Le symptôme majeur d'une infection est la pourriture molle des racines qui peut aussi se propager aux tiges et aux feuilles (**figure 17**). Les *Dickeya* spp. sont désormais bien implantées dans les climats européens (Czajkowski *et al.*, 2009 ; Hélias, 2008 ; Laurila *et al.*, 2008) : depuis quelques années, les producteurs d'endive et de pomme de terre du nord de la France font face à la multiplication des infections causées par les *Dickeya* spp. (**figure 18**). La contamination d'une récolte peut engendrer des pertes économiques élevées étant donnée la facilité de propagation de ces bactéries (Toth *et al.*, 2011) ; c'est pourquoi la surveillance des *Dickeya* spp. et la maîtrise des infections engendrées sont primordiales.



Figure 17: Symptômes caractéristiques de la maladie de la pourriture molle sur différents végétaux infectés par les *Dickeya* spp. (Reverchon and Nasser, 2013)



### Figure 18 : Incident de dissémination d'une infection par les *Dickeya* spp. lors de la culture hydroponique des endives

Afin de développer leur système racinaire, les endives subissent un premier cycle de culture en champ. Elles sont ensuite récoltées puis placées en chambre climatisée à l'abri de la lumière. La taille volumineuse de l'appareil racinaire des endives leur conférant un support suffisant, elles sont cultivées hors du sol avec un flux constant d'une solution nutritive (culture hydroponique).Cette image, qui permet de mesurer les pertes économiques potentielles liées à une infection par *Dickeya*, a été fournie par la Fédération Nationale des Producteurs d'Endive (FNPE).

### c. Cycle de vie des Dickeya spp.

Les bactéries pathogènes des plantes sont continuellement exposées aux changements environnementaux. Elles doivent s'armer contre l'exposition aux rayons ultra-violets, la disponibilité en eau, les variations de pH ou de température. Localement, la réémergence annuelle des infections impliquant des bactéries du genre Dickeya lorsque les conditions deviennent plus favorables montre que ces bactéries peuvent résister dans le sol en association avec des déchets végétaux (Hélias, 2008). Par ailleurs, les Dickeya spp. sont capables d'infecter les insectes, ces derniers représentant ainsi une niche écologique accessoire favorisant la dissémination des bactéries (Grenier et al., 2006). La figure **19** présente le cycle d'infection de la pomme de terre par les bactéries du genre *Dickeya*. Trois étapes se succèdent lors de l'infection : (i) l'adhésion à la surface des plantes et la pénétration intra-tissulaire via une blessure pré-existante ou une ouverture naturelle (stomates) ou encore lors du pompage de la sève par un puceron infecté ; (ii) l'invasion de l'apoplaste (ensemble des interstices cellulaires qui sert au transport radial de l'eau et des solutés); et (iii) la dégradation des parois cellulaires végétales. Les bactéries peuvent aussi attendre dans l'apoplaste, en se servant des ressources nutritives de la plante, et causer une infection latente id est asymptomatique (Lebeau et al., 2008 ; Reverchon and Nasser, 2013). Par la suite, l'infection peut exploser lorsque les conditions deviennent plus favorables (température ambiante de 30°C, humidité élevée et disponibilité en oxygène faible).

Par ailleurs, il a été suggéré que les bactéries phytopathogènes aident à la persistance voire même à la prolifération des bactéries pathogènes animales sur les tissus végétaux (Brandl, 2008). Cette collaboration faciliterait leur attente dans des niches qui sont des « sas » vers un hôte animal. Ainsi, des études ont montré que Dickeya dadantii influence la persistance de bactéries zoopathogènes telles que Salmonella enterica (Goudeau et al., 2013) ou E. coli O157:H7 (Yamazaki et al., 2011). En effet, la population de S. enterica sur des tissus végétaux blessés est multipliée par 50 lorsqu'elle est inoculée avec D. dadantii ; de la même manière, celle d'E. coli O157:H7 est 27 fois plus élevée. Chez S. enterica, les conditions anaérobies, telles que celles rencontrées dans les tissus végétaux macérés, induisent la voie de synthèse du propanediol, à partir du fucose et du rhamnose. Ces dernières molécules étant des constituants des cellules végétales, la raison avancée est que S. enterica profite de la dégradation des cellules végétales par D. dadantii pour former du propanediol qui est ensuite utilisé dans le métabolisme bactérien (cycle de Krebs). Le contrôle de la virulence des bactéries phytopathogènes telles que D. dadantii revêt donc un caractère primordial, non seulement parce qu'elle infecte les plantes, mais aussi parce qu'elle aide au maintien dans la phyllosphère d'autres Entérobactéries ayant un potentiel infectieux élevé pour l'homme. Il serait intéressant de regarder si les Dickeya, consommées avec les aliments végétaux, se maintiennent également chez les mammifères avec l'aide de S. enterica, d'E. coli ou de toute autre bactérie commensale.



### Figure 19 : Cycle de la pourriture molle lors de l'infection des plants de pomme de terre par les bactéries du genre *Dickeya* (adapté de Reverchon and Nasser, 2013)

Pendant l'été, les *Dickeya* présentes sur les germes de tubercules infectés colonisent les tissus racinaires et les jeunes tiges. Les bactéries se développent dans les espaces intercellulaires, dégradent les tissus végétaux et liquéfient le tubercule mère. Les bactéries peuvent se disséminer aux nouveaux tubercules s'ils se forment à la fin de l'été ou au début de l'automne. Elles peuvent aussi infecter des plants sains par transmission (i) à travers le sol par les eaux d'infiltration ou (ii) *via* l'action des insectes infectés. Les blessures causées lors des manipulations techniques (arrachage, récolte, tri) fournissent également des voies d'entrée à l'intérieur des tubercules ; l'infection peut ainsi se transmettre aux tubercules sains lors du stockage. Pendant l'hiver et le printemps, les *Dickeya* peuvent survivre dans les déchets racinaires ou d'autres organes végétaux présents dans le sol. L'utilisation de germes de tubercules apparemment sains mais en phase de latence de contamination peut aussi favoriser l'émergence de la maladie. Les insectes peuvent être impliqués tout le long du cycle de la maladie (i) parce qu'ils fournissent une porte d'entrée aux bactéries en se nourrissant de la sève ou en déposant leurs œufs contaminés (ii) ou parce qu'ils transportent indirectement des bactéries vers un organe sain après être passés sur un organe végétal déjà infecté.

## d. *Dickeya dadantii* 3937, une référence dans l'étude de la régulation des fonctions de virulence des bactéries pathogènes des plantes

La souche de référence 3937, affiliée à l'espèce *Dickeya dadantii* (Samson *et al.*, 2005), a été initialement isolée d'un plant infecté de violette africaine (*Saintpaulia ionanthia*) abritée sous serre

(Kotoujansky *et al.*, 1982).. Le fort pouvoir pectinolytique de *D. dadantii* combiné aux données génomiques, génétiques et biochimiques accumulées depuis plus de 25 ans sur cette bactérie en ont fait un organisme de référence pour la communauté scientifique internationale. Elle est par ailleurs classée en  $9^{eme}$  position (*ex-aequo* avec *D. solani*) dans le « top 10 » des bactéries phytopathogènes (Mansfield *et al.*, 2012). *D. dadantii* 3937 est capable d'infecter une large gamme d'espèces végétales, parmi lesquelles la pomme de terre et l'endive (**Tableau V**). Elle induit les symptômes caractéristiques de « pourriture molle » sur les tissus végétaux et de « jambe noire » au niveau des racines et à la base des tiges (**figure 17**). Ces symptômes visibles sont liés à la synthèse et à la sécrétion par *D. dadantii* de tout un arsenal d'enzymes qui dégradent les parois des cellules végétales. Toutefois, l'interaction entre *D. dadantii* et ses hôtes est un processus complexe impliquant la production de facteurs de virulence multiples.

### 2. Le pouvoir pathogène de Dickeya dadantii est multifactoriel

Des facteurs de virulence additionnels, ubiquitaires à de nombreuses bactéries pathogènes, sont requis pour une colonisation efficace des hôtes (figure 20) : la mobilité (Antunez-Lamas et al., 2009a), les exopolysaccharides de surface (EPS) (Condemine et al., 1999 ; Prigent-Combaret et al., 2012), les systèmes d'acquisition du fer (Enard et al., 1988; Franza and Expert, 2013; Franza et al., 2002) ou encore les systèmes de protection contre les réactions de défense de l'hôte (Reverchon et al., 2002 ; Santos et al., 2001). Les facteurs d'adhésion tels que les EPS ou les biosurfactants sont synthétisés dans les premières étapes d'infection (Charkowski et al., 2012 ; Prigent-Combaret et al., 2012). Ces composés permettent aux bactéries d'adhérer à la surface des végétaux tout en les protégeant de la dessiccation. Lors d'une blessure, la plante produit localement de l'acide jasmonique qui sert de chemoattractant pour D. dadantii (Antunez-Lamas et al., 2009b). Les bactéries peuvent alors pénétrer à l'intérieur des tissus végétaux dans les fluides intercellulaires. Cet espace intercellulaire ou apoplaste se caractérise par une certaine acidité et une faible disponibilité en fer et en nutriments. Par conséquent, durant les étapes précoces de l'infection, les facteurs permettant la survie et la multiplication cellulaire sont mis en place : afin de résister au stress acide, l'import de protons lié à l'activité des flagelles est réduit ; pour compenser la carence en fer, la production de sidérophores qui sont des chélateurs du fer est induite (Expert et al., 2008). De plus, en réponse à la colonisation de l'apoplaste par D. dadantii, la plante va chercher à se défendre : elle produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des molécules hautement toxiques endommageant les structures cellulaires (végétales et animales) et également des peptides antimicrobiens. Le but est de bloquer la propagation du pathogène dans la plante en perturbant son métabolisme (la plante sacrifie dans le même temps quelques-unes de ses cellules). Pour contrer ces réactions de défense de l'hôte, D. dadantii produits de nombreux facteurs permettant de résister au stress oxydant tels que l'indigoïdine qui chélate les ERO (Reverchon et al., 2002) ou encore les superoxyde dismutases SodA et SodC et les catalases KatE et KatG qui sont des enzymes réductrices des ERO (Miguel *et al.*, 2000 ; Reverchon *et al.*, 2010 ; Santos *et al.*, 2001). Elle produit également le système SAP « Sensitivity to Antimicrobial Peptides » qui lui permet de dégrader les peptides anti-microbiens (Lopez-Solanilla *et al.*, 1998).



Figure 20 : Le pouvoir pathogène de D. dadantii est multifactoriel

L'attachement de *D. dadantii* aux tissus végétaux est facilité par la présence des lipolysaccharides (LPS), des exopolysaccharides (EPS), des biofilms ou encore des biosurfactants exportés dans le milieu extérieur. Les sidérophores tels que la chrysobactine et l'achromobactine qui se complexent au  $Fe^{3+}$  insoluble et le ramène sous une forme utilisable par la bactérie ( $Fe^{2+}$ ) permettent à *D. dadantii* de survivre à la carence en fer, une condition rencontrée après l'entrée dans l'hôte végétal. Les molécules ayant une action antioxydante tels que la réductase MsrA, la superoxyde dismutase SodA ou l'indigoïdine permettent à *D. dadantii* de résister au stress oxydant généré par les réactions de défense de la plante. Par ailleurs, des protéines effectrices (la harpine et la toxine DspE) qui perturbent le métabolisme de la plante hôte sont injectées directement dans les cellules végétales *via* un système de sécrétion de type 3. Quant aux systèmes de sécrétion de type 1 et 2, ils sont impliqués dans la sécrétion des enzymes qui dégradent les parois végétales : les protéases (SST1), les pectinases et la cellulase (SST2).

Lorsque les bactéries se sont acclimatées aux conditions de l'hôte et se sont suffisamment multipliées pour lancer l'attaque, elles produisent en grande quantité un arsenal d'enzymes qui dégradent les parois végétales (composées majoritairement de pectine et de cellulose) : des pectinases, des cellulases et des protéases. La sécrétion des pectinases (Robert-Baudouy *et al.*, 2000) et de la cellulase CelZ (Py *et al.*, 1991) est réalisée par le système de sécrétion de type II « Out » (Condemine *et al.*, 1992 ; Gu *et al.*, 2012). L'inactivation du système de sécrétion Out induit une perte de la

virulence, illustrant ainsi le caractère primordial des pectinases dans la macération des tissus végétaux. Quant à la sécrétion des protéases, elle est réalisée par le système de sécrétion de type I « PrtDEF » (Letoffe *et al.*, 1990). Etant donné que la synthèse massive des pectinases est déterminante à la déstructuration des cellules végétales et que ces enzymes purifiées sont capables de reproduire le symptôme de pourriture molle, elles sont considérées comme le facteur de virulence majeur chez *D. dadantii* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996).

### 3. La dégradation des parois végétales

### a. Composition des parois végétales et diversité des pectines

Les parois végétales sont constituées de matrices polysaccharidiques complexes qui forment une armature rigide : la pectine, la cellulose et l'hémicellulose (**figure 21A**). La région externe de la paroi, ou lamelle moyenne, cimente les cellules entre elles : cette propriété est due aux polymères de pectine qui la composent. Comme précédemment expliqué, *D. dadantii* envahit les espaces intercellulaires ou apoplaste. Elle se trouve donc en contact direct avec la lamelle moyenne composée de pectines.



### Figure 21 : Paroi végétale (A) et structure biochimique de la pectine (B)

La pectine est un polymère d'acides galacturoniques (GA) liés en  $\alpha$  1-4 qui peuvent être méthylés sur le carbone 6 ou acétylés sur les carbones 2 et/ou 3. Ce polymère contient aussi des régions ramifiées riches en rhamnose, liés en  $\beta$  1-2 avec les GA. Les rhamnoses introduisent des courbures dans le squelette de la pectine et servent d'ancrage à des chaînes osidiques riche en arabinose et en galactose. Des ions calcium Ca<sup>2+</sup> viennent interagir avec les groupements COO<sup>-</sup> des GA des chaînes principales et favorisent ainsi leur empilement.

La pectine est un polymère polysaccharidique constitué d'une chaîne principale d'acides galacturoniques qui peuvent être acétylés et/ou méthylés (**figure 21B**). Des molécules de rhamnose s'intercalent occasionnellement dans la chaîne principale : elles génèrent des coudes structuraux et servent d'ancrage à d'autres chaînes d'acides uroniques (Harholt *et al.*, 2010). Ces niveaux de complexité, portés par le nombre de ramifications, de méthylations ou d'acétylations, expliquent (i) la grande diversité des pectines végétales et de ce fait (ii) la nécessité pour une bactérie pathogène des plantes de posséder des pectinases dont l'action biochimique est complémentaire.

### b. Action des pectinases synthétisées par Dickeya dadantii

Le panel enzymatique que possède *D. dadantii*, est présumé pour être, au moins en partie, responsable de son large spectre d'hôtes végétaux. En effet, les nombreuses pectinases qu'elle produit ont des propriétés biochimiques complémentaires et se distinguent par leur spécificité de substrat (selon la taille des chaînes pectiques, leur degré de méthylation...). Elles agissent de manière synergique et coordonnée afin de cataboliser des pectines de composition variable (les différentes étapes sont représentées schématiquement dans la **figure 22**).

Le processus de macération nécessite en premier lieu la dépolymérisation de la pectine des parois végétales. Deux groupes d'enzymes sont majoritairement impliqués dans la dégradation des longs polymères pectiques (Kazemi-Pour *et al.*, 2004) :

- Les pectines estérases, à activité méthylestérase ou acétylestérase, qui coupent les groupements méthyles et acétyles présents sur les acides galacturoniques des chaînes de pectine, respectivement ;
- Les dépolymérases qui coupent les chaînes au niveau des acides galacturoniques. Parmi ces enzymes se trouvent les endo-pectate lyases PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL et PelZ dont l'activité de clivage est interne à la chaîne pectique. L'activité de ces enzymes produit des oligomères pectiques de petite taille qui sont ensuite pris en charge par la cellule.

A l'intérieur des compartiments cellulaires (périplasme et cytoplasme), d'autres pectinases s'engagent dans la dégradation de ces petits composés : ces enzymes, majoritairement des polygalacturonases et des pectate lyases, ont une activité de clivage limitée aux extrémités des chaînes (Shevchik *et al.*, 1999a ; Shevchik *et al.*, 1999b ; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2002). Ainsi, tous les oligomères pectiques qui se trouvent dans le cytoplasme cellulaire sont catabolisés en dimères d'acides galacturoniques, le digalacturonate. Par la suite, les dimères sont catabolisés en une molécule de galacturonate (GA) et une molécule de 4-Désoxy-5-Kéto-uronate (DKI). Celles-ci peuvent être transformées en 2-kéto-3-désoxygluconate (KDG) qui lui-même génère du pyruvate et du 3-phosphoglycéraldéhyde, deux molécules qui intègrent le métabolisme bactérien *via* le cycle de Krebs (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). *D. dadantii* peut donc utiliser les composés pectiques comme source de carbone pour sa croissance.





PGA « PolyGalacturonic Acid » : polygalacturonate ; UGA « Unsaturated Galacturonic Acid » : oligalacturonate insaturé ; DiGA « Di-Galacturonic Acid » : digalacturonate ; DiUGA « Di-Unsaturated Galacturonic Acid » : digalacturonate insaturé ; GA « Galacturonic Acid » : Galacturonate ; DKI : 4-Désoxy-5-Kéto-uronate. Les carrés et les ronds colorés en vert et en rouge désignent les groupements acétyls et méthyls.

La lipoprotéine PemB reste ancrée dans la membrane et son activité extracellulaire est plus spécifiquement dirigée vers les composés pectiques de petite taille. Le catabolisme de la pectine est initié par l'action des estérases et des pectines lyases. Les produits de dégradation obtenus sont ensuite clivés par les pectate lyases pour générer des composés pectiques de petite taille (UGA). Ces oligomères pectiques rentrent dans la cellule et leur dégradation est finalisée par l'action de diverses pectinases (polygalacturonase, pectate lyase, oligogalacturonase) qui clivent les UGA à leur extrémité. Finalement, une molécule de galacturonate (GA) et une molécule de 4-Désoxy-5-Kéto-uronate (DKI) sont obtenues.

### c. Spécificité d'action des pectinases

Les endo-pectate lyases ont été étudiées plus en détail pour tenter d'expliquer leur redondance chez *D. dadantii*. De manière intéressante, des souches inactivées dans chacune des endo-pectate

lyases sécrétées dans le milieu extérieur ont une agressivité diminuée lors de la colonisation de l'hôte (**figure 23**). Ainsi, bien que l'activité de PelA, PelD, PelE semble essentielle à l'infection de la plante, il apparaît de manière nette que les Pels sont des enzymes complémentaires dont l'action permet d'optimiser la macération des tissus végétaux par *D. dadantii*.



Figure 23 : Rôle des différentes pectinases dans le pouvoir pathogène de *Dickeya* sur des plants de *Saintpaulia ionanthia*.

Le pourcentage de plants présentant une infection généralisée 15 jours après inoculation est représenté en rouge. Le pourcentage de plants ne présentant pas de symptômes ou présentant une macération localisée est représenté en bleu (Boccara *et al.*, 1988).

D'une part, des différences remarquables dans les propriétés catalytiques des Pels ont été rapportées, notamment en termes de :

- Taux de méthylation de la pectine (Tardy *et al.*, 1997) : PelA, PelD et PelE ont une activité maximale sur la pectine totalement déméthylée alors que les autres Pels ont une activité maximale sur la pectine partiellement méthylée avec un degré d'estérification d'environ 30 %. Par ailleurs, PelI et PelL conserve une forte activité sur la pectine plus fortement méthylée (50 à 70%) (figure 24A).
- Concentration en calcium (Lojkowska *et al.*, 1995 ; Shevchik and Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997 ; Tardy *et al.*, 1997) : toutes les Pels ont besoin d'une concentration en calcium de l'ordre de 0,1 mM sauf PelI qui nécessite une concentration 10 fois plus forte.
- Gamme de pH d'action (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996 ; Lojkowska *et al.*, 1995 ;
   Shevchik and Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997) : l'ensemble des Pels agit à pH basique cependant PelA, PelE et PelD agissent à des pH plus bas que les autres Pels.

D'autre part, ces enzymes possèdent différents modes de reconnaissance du substrat (Roy *et al.*, 1999). En effet, PelD et PelE reconnaissent un motif tétramérique ; par conséquent elles libèrent majoritairement des dimères. Les pectate lyases PelB, PelC et PelZ reconnaissent un motif

hexamérique et produisent majoritairement des trimères. Pour finir, PelA, PelI et PelL reconnaissent des motifs plus longs et libèrent de ce fait une plus large gamme de produits (**figure 24B**).



Figure 24 : Propriétés catalytiques (A et B) et modèle schématique d'action des Pels au niveau de la paroi végétale (C)

La figure **A** est un histogramme représentant la préférence d'activité des pectate lyases en fonction du degré de méthylation de la pectine. La figure **B** explique schématiquement les modes de reconnaissance du substrat par les différentes Pels et la localisation du site de clivage dans la chaîne d'acides galacturoniques. A titre d'exemple, PelE et PelD agissent préférentiellement sur la pectine faiblement méthylée (dont le taux de méthylation est au moins inférieure à 20%) ; de plus, elles reconnaissent des motifs tétramériques et donnent naissance à des dimères. La figure **C** modélise l'action des différentes Pels au niveau de la pectine de la paroi végétale.

L'ensemble de ces résultats suggère que seule l'action conjointe des Pels permet une dégradation complète de la pectine. Un modèle simpliste, prenant en compte les exigences d'activité des Pels et la répartition hétérogène de la pectine dans la paroi végétale, peut être proposé (**figure 24C**). Au niveau de la lamelle moyenne, la région la plus en riche pectine, l'action de PelA, PelD et PelE serait plus favorable en raison du faible degré de méthylation de la pectine. Par contre, plus les membranes cytoplasmiques sont proches, plus le degré de méthylation de la pectine s'accroît : ceci pourrait favoriser la mise en place d'un gradient d'action des Pels où (i) PelB, PelC et PelZ et (ii) PelI et PelL s'attaquent à la pectine partiellement et fortement méthylée, respectivement. Par ailleurs, la concentration en calcium au niveau des jonctions intercellulaires est généralement plus forte ; étant donné que PelI a une exigence en calcium élevée, cette enzyme pourrait s'attaquer de manière préférentielle à ces régions pectiques.

Il est important de noter que les oligogalacturonides libérés par les Pels sont eux-mêmes des éliciteurs des réactions de défense de la plante. Toutefois, leur activité élicitrice requiert un degré de polymérisation minimum *id est* au moins 10 résidus d'acides galacturoniques. Par conséquent, seules les protéines PelA, PelI et PelL sont capables de libérer des oligogalacturonides suffisamment longs pour avoir une activité élicitrice. Toutefois, le pH relativement acide (entre 5 et 6) des espaces intercellulaires végétaux limite l'activité des Pels ; ceci favorise la formation d'oligomères plus long ayant une activité élicitrice plus efficace. Par la suite, les réactions de défense de la plante s'accompagnent de la fuite d'électrolytes qui induisent une alcalinisation des espaces intercellulaires (Mathieu *et al.*, 1998 ; Nachin and Barras, 2000). L'action dégradative des Pels est ainsi améliorée.

# d. Les gènes codant les pectinases sont distribués tout le long du chromosome de *D*. *dadantii*

Les gènes de pectinases se répartissent en quatorze *loci* sur le chromosome bactérien (**figure 25**). Certains contiennent seulement un gène comme *pelI*, *pelL* ou *pelZ*, d'autres en regroupent plusieurs. Les gènes codant les pectinases PelA, PelB, PelC, PelD et PelE, qui sont responsables de 95% de l'activité pectate lyases en culture *in vitro*, sont divisés en deux *loci* (*pelA-pelE-pelD* et *pelB-pelC*) éloignés par environ 1000 kilobases. Tous ces gènes sont des unités transcriptionnelles indépendantes : ils portent leurs propres signaux de transcription (opérateur et terminateur). Ainsi, des régulations différentielles au niveau de leur expression pourraient permettre aux bactéries de répondre à diverses conditions spécifiques rencontrées pendant l'infection (Charkowski *et al.*, 2012 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996).



### Figure 25 : Localisation chromosomique des gènes codant les différentes pectinases

La direction des flèches indique le sens de la transcription sur le chromosome et les chiffres correspondent à la position en kb par rapport à l'origine de réplication OriC.

# 4. Importance de la perception des signaux et de leur intégration dans le réseau de régulation des Pels

L'expression finale de la virulence est fortement dépendante de la capacité de *D. dadantii* à percevoir les différents paramètres du contexte environnemental. Dans les étapes précoces de l'infection, la synthèse des enzymes de dégradation des parois végétales doit être mise en veille afin (i) de privilégier la production des systèmes permettant de faire face aux différents stress rencontrés dans la plante et (ii) d'éviter le déclenchement prématuré des réactions de défense de l'hôte. Dans les phases avancées de l'infection, l'initiation de la transcription des gènes *pel* est une étape clé pour l'invasion de l'hôte par *D. dadantii*.

Plusieurs régulateurs (Fis, H-NS, KdgR, PecS, PecT, ExpR, Fur...) contrôlent la synthèse des Pels en réponse à divers signaux de nature environnementale ou physiologique (figure 26) : la présence de pectine (KdgR, Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996), le stress oxydant (PecS, Reverchon et al., 2002), la répression catabolique (CRP, Reverchon et al., 1997), la densité cellulaire (Vfm, (Nasser et al., 2013), la carence en fer (Fur, Franza et al., 2002), la phase de croissance (Fis, Lautier et al., 2007). Ces régulateurs sont organisés en un réseau complexe et agissent de manière coordonnée pour moduler finement la synthèse des Pels (Sepulchre et al., 2007). Les NAPs Fis et H-NS jouent un rôle important dans ce réseau de régulation (Sepulchre et al., 2007 ; Lautier T., thèse 2007, Univ. Claude Bernard, Lyon). Plusieurs d'entre eux contrôlent la synthèse d'autres facteurs de virulence. Ainsi, H-NS et PecT contrôlent la synthèse de protéines impliquées dans la mobilité et la production d'EPS (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996; Nasser and Reverchon, 2002), tandis que Fis contrôle la synthèse de systèmes impliqués dans la neutralisation des peptides antimicrobiens, la mobilité, le système de sécrétion de type 3 et la formation de biofilms (Lautier and Nasser, 2007; Prigent-Combaret et al., 2012). Par conséquent, la synthèse des Pels est couplée à celle d'autres fonctions importantes pour la survie de la bactérie dans la plante. Récemment, il a été montré que le relâchement affectait la synthèse des Pels et que les NAPs, Fis et H-NS, interviennent dans ce contrôle s'exercant sur les gènes pel. Fis n'aurait qu'un rôle architectural qui consisterait à atténuer l'impact des conditions physiologiques et environnementales sur le relâchement de l'ADN. En revanche, H-NS s'est avéré être le régulateur dont l'action est modulée par le niveau d'enroulement de l'ADN. Son action répressive directe sur l'expression des gènes *pel* est d'autant plus forte que l'ADN est relâché et insignifiante sur des matrices d'ADN ayant des niveaux d'enroulement prononcés (Ouafa et al., 2012). Par ailleurs, les mutants inactivés pour chacune de ces deux NAPs ont une virulence fortement atténuée en comparaison de celle de la souche parentale (Lautier and Nasser, 2007 ; Nasser et al., 2001).

L'existence d'un tel réseau de régulation pourrait permettre à *D. dadantii* de moduler finement la synthèse des Pels en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique. Par ailleurs, étant donné que la plupart des acteurs de ce réseau contrôlent d'autres facteurs de virulence en plus des Pels, cette organisation pourrait permettre une bonne coordination des fonctions requises aux différents stades de l'infection.



Figure 26 : Intégration des signaux environnementaux et physiologiques au niveau de l'expression des gènes *pel* majeurs

Les gènes *pelAED* et *pelBC* sont représentés par une flèche dont le sens indique celui de la transcription. Les signaux de transcription (promoteur et terminateur) sont figurés en jaune. Les régulateurs, dont les formes actives et inactives sont indiquées en violet et en gris respectivement, sont organisés en un réseau complexe : seules les principales connexions sont représentées par souci de clarté (flèches fines). Les régulations positives et négatives sont fléchées en vert et en rouge, respectivement.

<sup>1</sup>La synthèse du régulateur VfmE est dépendante de l'activation du système à 2 composantes VfmH/VfmI, laquelle est induite par un signal de quorum sensing dont la nature est encore inconnue.

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique ;  $Fe^{2+}$  : ion ferreux ; KDG : 2-kéto-3-désoxygluconate.

De manière remarquable, la NAP H-NS joue un rôle important dans le réseau de régulation des gènes *pel* (Sepulchre *et al.*, 2007). En effet, en plus de son action répressive directe sur ces gènes, H-NS module également la synthèse de CRP et de PecT, activateur principal et répresseur fort des

gènes *pel*, respectivement (Reverchon *et al.*, 1997; Surgey *et al.*, 1995). Ainsi la surproduction de PecT dans le mutant H-NS se traduit par une diminution drastique de l'expression des gènes *pel* (Nasser and Reverchon 2002) (**figure 27**). H-NS a donc un phénotype d'activateur sur la synthèse des Pels. En revanche, les actions de H-NS et de PecT sont cumulatives sur les autres gènes cibles communs impliqués dans la biosynthèse des EPS et dans la mobilité de *D. dadantii* (**figure 27**).



### Figure 27 : Modèle schématique de la régulation de la synthèse des facteurs de virulence par le régulateur global H-NS et place du répresseur PecT dans ce contrôle

Les lignes se terminant par un trait symbolisent un mécanisme répressif ; leur épaisseur signale l'intensité de la régulation. La protéine associée au nucléoïde H-NS réprime la synthèse du régulateur PecT, qui lui-même réprime fortement l'expression des gènes codant les pectate lyases, les exopolysaccharides de surface, les flagelles et celle de son propre gène. En plus de cette action positive par l'intermédiaire de PecT, H-NS a une action négative directe sur la synthèse de ces facteurs de virulence. Toutefois cette dernière est minime par comparaison à celle exercée *via* PecT.

### **OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Comme précédemment évoqué, les *Dickeya* spp. sont des entérobactéries pectinolytiques infectant de nombreuses plantes d'intérêt agronomique ou ornemental. Les pertes économiques associées à ces bactéries varient en fonction du climat, mais aussi des pratiques culturales. Les infections liées à *Dickeya* spp., autrefois localisées dans des régions à climats tropical et subtropical, sont désormais en nette progression dans les pays tempérés (Hélias, 2008 ; Laurila *et al.*, 2008). De nombreux facteurs pourraient avoir favorisé leur implantation dans les régions froides, toutefois leur persistance est très certainement liée à leur bonne capacité d'adaptation aux variations de température. Au début de ma thèse, très peu d'informations portant sur la thermorégulation des fonctions de virulence de ces bactéries étaient disponibles dans la littérature. Il avait été rapporté que chez *D. dadantii*, la synthèse des Pels était thermorégulée (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992) mais les mécanismes mis en jeu n'avaient jamais été explorés.

L'objectif principal de cette thèse était de clarifier les mécanismes moléculaires liés à la thermorégulation de la synthèse des Pels chez la souche de référence 3937, régulation qui pourraient avoir favorisé l'émergence des *Dickeya* spp. en climat tempéré. La thermorégulation des facteurs de virulence de nombreuses entérobactéries zoopathogènes (telles que *E. coli* et certaines espèces des genres *Shigella* et *Salmonella*) implique le régulateur global H-NS (Beloin *et al.*, 2003 ; Dillon *et al.*, 2010 ; Madrid *et al.*, 2002 ; Ono *et al.*, 2005 ; Prosseda *et al.*, 2004). De ce fait, nous avons commencé ces investigations en nous intéressant en premier lieu à ce régulateur ainsi qu'à PecT : en effet, comme précédemment évoqué, l'action de H-NS sur la synthèse des Pels se fait essentiellement *via* un mécanisme indirect impliquant PecT (Nasser and Reverchon, 2002) (**figure 27**).

Le premier axe de travail a donc consisté à apprécier le rôle de ces deux protéines dans la thermorégulation de la synthèse des Pels et à caractériser les éventuels mécanismes moléculaires mis en jeu. Le second axe de travail a consisté à rechercher d'autres acteurs qui pourraient intervenir dans la thermorégulation de la virulence chez *D. dadantii*. La dynamique de la structure globale de chromatine ayant un rôle primordial dans l'acclimatation et/ou l'adaptation bactérienne, une attention particulière a été portée sur les NAPs majeures Fis et IHF en raison du rôle homéostatique de Fis sur les promoteurs des gènes *pel* (Ouafa *et al.*, 2012) et de la présence de séquences consensus de fixation de la protéine IHF dans les régions régulatrices des gènes *pecT* et *pel*.

Ces différents travaux pourraient apporter des informations originales sur les mécanismes utilisés par une bactérie pathogène des plantes afin de percevoir les variations de la température et d'ajuster, en retour, l'expression de ses facteurs de virulence.
### I. Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés lors de cette étude sont décrits dans le tableau A.I (voir la section « Annexe »). Les souches d'E. coli et de D. dandatii ont été cultivées, sous agitation, en milieu riche Luria-Bertani (LB) ou en milieu minimum M63 (Miller, 1972) supplémenté en une source de carbone (glycérol à 2 g/L (V/V); saccharose à 2 g/L (V/V); PGA à 4 g/L (W/V)). Les milieux solides équivalents ont été obtenus par ajout d'agar à 12 g/L (W/V). D'une manière générale, les souches d'E. coli ont été incubées à 37°C et celles de D. dadantii à 30°C avec une agitation constante (220 rpm). Pour l'analyse de la thermorégulation de la synthèse des Pels, les souches de D. dadantii ont été incubées à 21,5°C, 30°C et 37,5°C. La densité bactérienne a été suivie par mesure de la turbidité, exprimée en unités d'absorption à 600 nm (DO<sub>600</sub>). Si nécessaire, des antibiotiques ont été ajoutés aux milieux selon les concentrations suivantes : ampicilline 100 µg/mL, kanamycine 50 µg/mL, chloramphenicol 25 µg/mL. Les souches d'E. coli ont été conservées à -20°C dans du glycérol 20% (V/V) et celles de D. dadantii à -80°C dans du glycérol 40% (V/V). Chez D. *dadantii*, une concentration finale de 100  $\mu$ g/mL de novobiocine a été utilisée pour inhiber pendant 15 min l'ADN gyrase bactérienne. A cette concentration, la novobiocine n'a pas d'impact significatif sur la croissance cellulaire (Ouafa et al., 2012). Pour l'analyse de la stabilité des protéines et des transcrits, la traduction et la transcription cellulaire ont été bloquées par l'ajout de chloramphénicol et de rifampicine aux cultures à une concentration finale de 200  $\mu$ g/mL et 500  $\mu$ g/mL, respectivement.

### II. Techniques de biologie moléculaire et de génétique

# 1. Extraction plasmidique, digestion, ligation, électrophorèse, purification, transformation de l'ADN

Les méthodes d'extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline, de digestion par des enzymes de restriction, de ligature de l'ADN et d'électrophorèse sur gel d'agarose ont été effectuées selon Sambrook and Russell (2001). Les extractions de plasmides en grande quantité ont été réalisées avec le kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen, Hilden, Germany) en suivant les instructions du fournisseur. Les plasmides soumis au séquençage ont été extraits avec le kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Dans le cas de l'extraction des topoisomères plasmidiques, le kit

Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Hilden, Germany) a été utilisé. La purification de l'ADN à partir d'un gel d'agarose a été réalisée avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany).

Les transformations d'*E. coli* ont été réalisées par choc thermique sur des cellules rendues compétentes après traitement au CaCl<sub>2</sub> (Sambrook and Russell, 2001). Etant donné la sensibilité au froid de *D. dadantii*, les transformations de cette bactérie ont été réalisées par électroporation : cette technique consiste à appliquer des impulsions électriques sur des bactéries rendues électrocompétentes après plusieurs lavages successifs à l'eau. Ces lavages ont pour but d'éliminer les sels présents dans les milieux de culture qui en favorisant la formation d'arcs électriques diminuent l'efficacité de la transformation. De la même manière que pour le choc thermique, les impulsions électriques provoquent la formation de pores microscopiques dans la membrane plasmique des bactéries qui devient transitoirement perméable à l'ADN.

### 2. Transfert d'ADN par la technique de la transduction

La transduction est un mécanisme de transfert d'information génétique d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse par l'intermédiaire d'un phage dit transducteur. Chez D. dadantii, le phage qEC2 est utilisé selon le protocole décrit par Résibois et al. (1984). Le lysat de phage a été réalisé sur des bactéries donneuses en phase exponentielle de croissance. Ces bactéries ont été cultivées en milieu riche Luria-Bertani pendant environ 7 h puis infectées par les phages φEC2. Pour ce faire, un volume de 200 µL de cette culture a été ajouté à un volume équivalent de phages de manière à avoir une multiplicité d'infection de 0,1 (id est 1 phage / 10 bactéries). Après 20 min d'incubation à température ambiante, 5 mL de milieu riche Luria-Bertani semi-solide contenant de l'agar en surfusion à une concentration de 4 g/L (W/V) a été ajouté à la suspension cellulaire. Le mélange, vigoureusement agité afin de rompre les interactions phages-bactéries, a ensuite été versé sur un milieu riche solide Luria-Bertani enrichi en glucose et en calcium. Après 16 h d'incubation à 30°C, la surcouche d'agar contenant les lysats de phages a été récupérée à l'aide de 5 mL de milieu riche Luria-Bertani. Le lysat a été stérilisé par l'ajout de quelques gouttes de chloroforme afin d'éliminer les bactéries non lysées. Celui-ci a été vortexé puis les débris cellulaires et l'agar ont été éliminés par une centrifugation de 10 min à 5000 rpm. Le surnageant contenant les phages a été récupéré puis stocké à 4°C.

La transduction au sens strict a été réalisée en mélangeant 200  $\mu$ L d'une suspension de bactéries réceptrices avec 200  $\mu$ L de lysat de phages ayant infecté la souche donneuse. Après 20 min d'adsorption à température ambiante sans agitation, un volume de 2 mL de milieu riche Luria-Bertani a été ajouté et la suspension cellulaire a été incubée pendant 2 à 3 h à 30°C afin de favoriser la multiplication des cellules transduites. Les bactéries ont par la suite été concentrées par une centrifugation de 5 min à 6000 rpm à température ambiante. Les culots obtenus ont été suspendus dans 200  $\mu$ L de LB puis étalés sur un milieu riche Luria-Bertani solide additionné de la pression de

sélection adéquate. D'une manière générale, les bactéries transduites apparaissent après deux à trois jours d'incubation à 30°C.

### 3. Construction de souches génétiquement modifiées chez D. dadantii

La méthode utilisée afin d'invalider un gène est basée sur le principe de la recombinaison homologue entre un vecteur de clonage portant un gène de *D. dadantii* inactivé et l'allèle sauvage porté par le chromosome bactérien.

La première étape consiste en la construction du vecteur recombinant portant le gène inactivé. Pour la construction du mutant *himD* chez *D. dadantii*, une région encadrant de manière large la séquence codante de *himD* (-800 pb à +200 pb) a été amplifiée et clonée dans le plasmide pGEM-T (pGEM-T Vector System I, Promega, Madison, WI, U.S.A.), qui porte un gène de résistance à l'amplicilline. Les programmes d'amplification et les couples d'amorces utilisés sont décrits dans les **tableaux A.I** (voir la section « Annexe ») et **VI**, respectivement. La cassette pKD-3, qui porte la résistance au chloramphénicol, a été insérée à l'intérieur de la séquence codante du gène *himD* comprise dans le fragment d'ADN cloné dans le pGEM-T. Ce vecteur recombinant pGEM-T-himD::pKD-3 Ap<sup>R</sup> Cm<sup>R</sup> a été introduit par électroporation dans la souche sauvage de *D. dadantii*. Les cellules transformées ont été sélectionnées après étalement sur un milieu solide additionné de chloramphénicol (25 µg/mL).

La seconde étape consiste en la recombinaison homologue entre le chromosome et le vecteur plasmidique. Pour ceci, les bactéries transformées ont été mises en culture dans un milieu nutritionnel carencé en phosphate « Bas-Phosphate » additionné de glucose à une concentration finale de 2 g/L (V/V) et de chloramphénicol (25 µg/mL); les cultures ont été incubées à 30°C avec une agitation continuelle de 220 rpm puis utilisées quotidiennement pour ensemencer de nouvelles cultures. En raison notamment de la carence en phosphate du milieu, la réplication du plasmide représente un coût énergétique important lors de la multiplication bactérienne. La présence constante de l'antibiotique dont la résistance est codée par la cassette, elle-même insérée dans le gène porté par le plasmide, favorise la recombinaison homologue entre le gène modifié et l'allèle sauvage chromosomique. Lorsque cet évènement s'est réalisé, la conservation du plasmide devient inutile et sa perte est facilitée lors de la division des cellules bactériennes en culture. Afin de sélectionner et d'identifier les cellules qui ont subi la recombinaison tout en ayant perdu le plasmide, un volume de 100  $\mu$ L d'une culture de la nuit diluée de manière appropriée (généralement  $10^5$  ou  $10^6$  fois) a été étalé sur un milieu riche solide Luria-Bertani contenant du chloramphénicol (25 µg/mL). Après une incubation de 24 à 48 heures à 30°C, les boîtes contenant des colonies isolées ont été répliquées parallèlement sur deux milieux solides additionnés pour l'un de chloramphénicol et pour l'autre d'ampicilline. Après une incubation de 24 heures à 30°C, la présence de colonies résistantes au chloramphénicol et sensibles à l'ampicilline est recherchée. Afin de vérifier la présence effective de la cassette au niveau du gène *himD*, ces colonies ont été isolées et analysées par une réaction de PCR en utilisant des amorces qui encadrent le site d'insertion.

Par la suite, la technique de transduction décrite ci-dessus (Résibois *et al.*, 1984) a été utilisée pour transférer la mutation obtenue dans le génome de la souche sauvage de *D. dadantii* et dans d'autres souches mutantes. La transduction de la mutation dans la souche sauvage a pour but de se débarrasser des erreurs de réplication potentiellement intervenues dans le génome de la souche utilisée pour la recombinaison lors des cultures successives en milieu « Bas-Phosphate ».

PCR classique		PCR quantitative	
Etapes successives	Durée, température et nb de cycles	Etapes successives	Durée, température et nb de cycles
Dénaturation ADN db	4 min à 94°C	Dénaturation cDNA	10 min à 95°C
Dénaturation ADN db	1 min à 94°C   23	Dénaturation cDNA	15 sec à 95°C
Hybridation amorces	1 min à 55°C/58°C <sup>1</sup> $\times$ ou 25 <sup>2</sup>	Hybridation amorces	15 sec à T°C var. $\times$ 45
Elongation	1 min à 72°C	Elongation	20 sec 72°C
Elongation finale	10 min à 72°C	Dénaturation cDNA	1 sec à 95°C
		Hybridation cDNA <sup>3</sup>	1 min à 65°C
		Refroidissement	30 sec à 40°C

Tableau VI : Programmes d'amplifications utilisés lors des expériences de PCR

<sup>1</sup>La température d'hybridation varie selon le couple d'amorces utilisé lors de la réaction d'amplification. <sup>2</sup>Le nombre de cycles est fixé à  $23\pm1$  et à 35 pour une amplification semi-quantitative et non quantitative, respectivement. <sup>3</sup>Cette étape supplémentaire mesure la température de renaturation du fragment amplifié : l'obtention d'un pic unique de renaturation signifie que l'hybridation des amorces a été spécifique.

# 4. Amplification de séquences spécifiques d'ADN par réaction de polymérase en chaîne

La PCR est une méthode qui permet d'amplifier *in vitro* des fragments d'ADN. Elle requiert une paire d'oligonucléotides qui s'hybrident de manière antiparallèle à la matrice d'ADN. Ces derniers sont utilisés comme amorces par une ADN polymérase thermostable pour la synthèse des brins complémentaires à ceux de la matrice d'ADN. La Taq polymérase (ThermoFisher Scientific, Lithuania) a été couramment utilisée pour les amplifications analytiques de colonies bactériennes ou de l'ADN purifié.

Les régions régulatrices des gènes *pelE* et *pelD* ont été amplifiées à l'aide de la Pfu polymérase (ThermoFisher Scientific, Lithuania) par une réaction de PCR sur l'ADN génomique de la souche A350 de *D. dadantii*. Les programmes d'amplification et les couples d'amorces utilisés (*Eco*RI-*pelE*/*Hin*dIII-*pelE* et *Eco*RI-*pelD*/*Hin*dIII-*pelD*) sont décrits dans les **tableaux A.I** (voir la section « Annexe ») et **VI**, respectivement. Les amplicons obtenus sont orientés. Les fragments

d'ADN synthétisés par la Pfu polymérase ont l'avantage d'être extrêmement fidèles à la séquence d'origine. En effet, cette enzyme possède une activité exonucléase  $3' \rightarrow 5'$  qui lui permet de corriger les erreurs survenues lors de l'élongation du brin complémentaire. Les fragments d'ADN obtenus ont été clonés dans le plasmide pBSK<sup>Ap</sup> (**figures 28A**, **28B** et **28C**) après digestion par les enzymes *Eco*RI et *Hin*dIII et purification sur gel d'agarose.

(A) Amplification par PCR des régions promotrices des gènes *pelE* et *pelD* (fragments *Eco*RI-*Hin*dIII)



- (C) Ligation des extrémités libres EcoRI et HindIII du vecteur avec celles des fragments pelE et pelD
- (D) Transformation, extraction, purifications des clonages réalisés
- (E) **Digestion** des clonages par *Eco*RI-*Hin*dIII ; **Marquage** de l'extrémité *Hin*dIII des régions régulatrices *pelE* et *pelD* avec le  $[\alpha^{-32}P]$ -dCTP



(F) Utilisation pour les **expériences d'interaction ADN-protéine** suivies d'une étape de révélation par autoradiographie

### Figure 28 : Etapes de clonage et de marquage des régions régulatrices des gènes *pelE* et *pelD* utilisées lors de l'interaction ADN-protéine en conditions non dénaturantes

A. Les amorces gauche et droite utilisées portent à leur extrémité 5'un site *Eco*RI et *Hin*dIII, respectivement. La taille des fragments amplifiés *pelE* et *pelD* est d'environ 520 et 560 pb, respectivement ; **B.** Le site multiple de clonage (MCS) permet l'insertion de fragments d'ADN exogène via de nombreux sites de restriction. Les positions indiquées sur les fragments se réfèrent au +1 de transcription. Le plasmide pBSK porte le gène *bla* qui code la résistance à l'ampicilline ; **E.** Le  $[\alpha^{-32}P]$ -dCTP possède à son extrémité 5' triphosphate un isotope radioactif du phosphore, le <sup>32</sup>P. L'enzyme de Klenow (figurée en gris) est le grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* qui porte l'activité polymérase de 5' vers 3'.

En ce qui concerne l'analyse des échantillons d'ADN récupérés lors des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine en PCR classique, la présence de la région régulatrice du gène *pelE* a été recherchée par une réaction de 23 cycles ( $\pm$  1 cycle) d'amplification à l'aide de la Taq polymérase (ThermoFisher Scientific, Lithuania). Afin d'estimer la quantité de cette région amplifiée dans les différents échantillons analysés, la PCR a été arrêtée lorsque la cinétique d'amplification est encore en phase exponentielle et où les conditions réactionnelles sont encore non limitantes. Le couple d'amorce utilisé et le programme d'amplification suivi sont décrits dans les **tableaux A.I** (voir la section « Annexe ») et **VI**, respectivement. La quantité des fragments d'ADN amplifiés dans chaque réaction a ensuite été analysée après migration sur un gel d'agarose à 1,5%.

### 5. Extraction des ARN : méthode du « phénol chaud »

Des milieux de cultures ont été ensemencés à partir de précultures de la souche parentale A350 et de son dérivé pecT A2148 incubées à 30°C de manière à atteindre une DO finale de 0.02 pour les cultures incubées à 30°C et à 37,5°C et de 0,03 pour les cultures incubées à 21,5°C. Des volumes correspondants environ à 4x10<sup>9</sup> bactéries ont été prélevés des cultures pour l'extraction des ARN cellulaires. Pour l'analyse de la thermorégulation de l'expression des gènes, les prélèvements ont été réalisés à un stade avancé de la phase de croissance exponentielle ( $DO_{600} \approx 0.6$  à 21,5°C et 0.8 à 30°C et à 37,5°C) permettant d'avoir une forte quantité de transcrits des gène pel de bonne qualité (Hommais et al., 2008) (figure 29A). Pour l'analyse de la stabilité des transcrits pel vis-à-vis de la température de croissance, les prélèvements ont été réalisés aux mêmes DO<sub>600</sub> que précédemment puis 5 et 15 min après l'ajout de la rifampicine (figure 29B). Dans le cas de l'analyse de la stabilité des transcrits vis-à-vis d'un choc thermique, un premier prélèvement a été réalisé à 30°C ( $DO_{600} \approx 0.8$ ); les cultures ont été ensuite séparées en trois aliquotes puis transférées à 21,5°C, 30°C ou 37,5°C pour chaque souche (parentale et *pecT*). Trois prélèvements consécutifs (5 min, 10 min, 15 min) ont été réalisées dans chaque aliquote après leur transfert (figure 29C). Par ailleurs, afin de mesurer l'activité Pels des cultures au moment des prélèvements, un volume de 1 mL de suspension cellulaire a été prélevé et traité comme expliqué par la suite (voir la partie III.2 de la section « Matériel et Méthode »).

Chaque échantillon de culture ainsi prélevé a aussitôt été centrifugé pendant 4 min à 6000 rpm à une température identique à celle des cultures. Le culot bactérien obtenu a été immédiatement congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C en attendant l'extraction des ARN.





Des cultures de la souche parentale et du mutant pecT ont été réalisées aux températures indiquées dans chaque expérience schématisée en A, B, C et D. Les acronymes « Rf » et « Cm » indiquent le traitement des cultures à la rifampicine et au chloramphenicol, respectivement.

A. Expérimentation suivie en vue de la quantification des transcrits *pel* et *pecT* aux différentes températures ; B. Cultures réalisées pour la quantification de la stabilité des transcrits *pel* et *pecT* aux différentes températures ; C. Expérimentation suivie pour la quantification de la stabilité des transcrits *pel* et *pecT* après un choc thermique ;
D. Cultures réalisées pour la quantification de la stabilité des Pels et de PecT aux différentes températures.

Les ARN ont été extraits suivant le protocole du phénol acide (pH 5,2) chaud (Schmitt *et al.*, 1990). Cette méthode repose sur une solubilité différentielle des composés cellulaires : l'ADN et les protéines sont insolubles à pH acide alors que les ARN restent solubles dans la phase aqueuse.

Les culots bactériens ont été repris par 500  $\mu$ L de tampon de lyse (AcNa 50 mM pH 5,2; EDTA 10 mM) froid puis transférés directement dans des tubes Eppendorf auxquels a été ajouté 60  $\mu$ L d'une solution de SDS 10%. Un volume de 600  $\mu$ L de phénol pH 5,2 préalablement chauffé à 65°C pendant 1 heure a été ajouté aux tubes contenant les suspensions bactériennes lysées : ce mélange a été incubé à 65°C pendant 5 min dans un bain « Eppendorf Thermomixer comfort » (Eppendorf) avec une agitation maximale (1400 rpm). Les tubes ont ensuite été transférés à -80°C pendant 5 min pour achever la lyse bactérienne et finalement centrifugés à une vitesse de 13000 rpm pendant 10 min à 12°C. Les surnageants ont été récupérés puis soumis à deux extractions par un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) ajouté à un volume équivalent de celui du surnageant puis à une extraction au chloroforme (0,8 volume pour 1 volume de surnageant) afin d'éliminer les traces résiduelles de phénol. La précipitation des acides nucléiques a ensuite été réalisée à -20°C après l'ajout de 3 volumes d'éthanol 100% et de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M. Après 45 min d'incubation à -20°C, les culots d'ARN ont été recueillis par une centrifugation de 10 min à 13000 rpm à 4°C puis lavés à l'éthanol 70%. Les culots ont ensuite été séchés à 42°C pendant 10 min puis solubilisés par 60  $\mu$ L d'eau « Nuclease-free » (Sigma).

La qualité des ARN obtenus a été analysée sur un gel d'agarose 1% contenant du BrEt à 0,5  $\mu$ g/mL révélé sous la lumière UV (**figure 30**). Les échantillons de qualité convenable ont été soit conservés à -80°C soit directement soumis à une digestion à la DNase I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, U.S.A.) pour éliminer les traces d'ADN contaminant. Dans ce dernier cas, environ 2 unités d'enzyme ont été utilisées par  $\mu$ g d'ARN en suivant les instructions du fournisseur. Après digestion, une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) a été réalisée afin d'éliminer la DNase I.



## Figure 30 : Exemple représentatif d'un profil électrophorétique d'échantillons d'ARN de bonne qualité

Une quantité de 1  $\mu$ g d'ARN a été analysée par migration électrophorétique sur un gel d'agarose 1% coloré au BrEt. Des profils similaires ont été obtenus lors des diverses analyses impliquant la manipulation d'ARN cellulaires. Ces échantillons correspondent à des ARN extraits de cultures de *D. dadantii* aux différentes températures d'étude (**figure 29A**) : de gauche à droite, souche parentale et mutant *pecT* à 21,5°C, 30°C et 37,5°C. Les bandes observées correspondent, du haut vers le bas, aux ARN ribosomaux 23S (2300 nt), 16S (1500 nt) et 5S (120 nt).

Pour vérifier l'absence d'ADN après le traitement, une réaction de PCR a été effectuée sur 0,2 à 0,5 µg d'ARN en présence des amorces du gène de ménage *rpoA* qui code la sous-unité  $\alpha$  de l'ARN polymérase de *D. dadantii*. Les échantillons pour lesquels une amplification d'ADN a été observée ont subi un traitement supplémentaire en utilisant le kit DNA-free<sup>TM</sup> Ambion (Ambion RNA by Life Technologies, U.S.A.). Cette enzyme, qui comporte une étiquette à l'une de ses extrémités, est particulièrement adaptée pour la dégradation d'ADN présent en faible quantité dans des échantillons. A la fin de la digestion, l'enzyme a été précipitée par adsorption sur une résine par l'intermédiaire de son étiquette ; cette dernière a été éliminée des échantillons d'ARN après une rapide centrifugation. Une nouvelle réaction de PCR a été réalisée pour vérifier l'efficacité de ce nouveau traitement. La concentration en ARN des échantillons obtenus a été mesurée spectrophotométriquement au ND-2000 (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific). Leur qualité a été par la suite vérifiée sur un gel d'agarose à 1% coloré au BrEt à 0,5 µg/mL.

### 6. Rétrotranscription

Une quantité équivalente (2,10<sup>4</sup> copies/µL) de l'ARN de synthèse pAW («Applied Biosystems GeneAmp pAW109 RNA Control Template » by Life Technologies, U.S.A.) a été ajoutée à tous les échantillons d'ARN. Cet ARN sert de contrôle endogène et permet de normaliser les variations d'efficacité de la transcription inverse liées à la qualité des échantillons. Les ARN ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide du kit « RevertAid First Strand cDNA Synthesis » (ThermoFisher Scientific, Lithuania) en suivant les instructions du fournisseur. La M-MuLV rétrotranscriptase utilisée est une ADN polymérase ARN dépendante isolée du rétrovirus de la leucémie murine. Les amorces sont des hexamères qui se fixent aléatoirement sur les matrices ARN. A la fin de la rétrotranscription, les échantillons ont été incubés à 70°C pendant 15 min pour dégrader les ARN engagés dans les complexes ARN-ADNc. En effet, les ARN deviennent instables à haute température en présence de fortes concentrations en ions magnésium (dans ce cas, 5 mM). Les ADNc néosynthétisés ont été aliquotés et conservés à -20°C.

### 7. PCR quantitative en temps réel (Q-PCR)

La PCR quantitative est basée sur le même principe que la réaction de PCR classique (**tableau VI**) mais présente l'intérêt supplémentaire de quantifier précisément et rapidement (environ 1h30) l'expression de gènes même faiblement exprimés. La quantification est basée sur la mesure, à chaque cycle, de la fluorescence émise par le SYBR Green qui s'est intercalé dans la double hélice d'ADN.

Le kit « LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master » (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) a été utilisé. Pour chaque gène étudié par PCR quantitative en temps réel, une gamme étalon a été établie à partir de différentes dilutions de l'ADN génomique de la souche sauvage 3937 de *D*.

*dadantii* purifié (de 1 à  $10^{-5}$  ng/µL d'ADN). Elle permet d'évaluer l'efficacité de l'amplification mais aussi de quantifier les transcrits du gène d'intérêt présents dans les différents échantillons. La purification de l'ADN génomique de la souche sauvage 3937 de *D. dadantii* a été réalisée avec le kit « Wizard Genomic DNA Purification » (Promega, Madison, WI, U.S.A.) en suivant les instructions du fournisseur. La concentration de l'ADN génomique extrait a été déterminée par mesure de l'absorption à 260 nm à l'aide du ND-2000 (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific). La qualité et la pureté de l'ADN génomique ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN génomique a été conservé à - 20°C.

Les amorces utilisées et le programme d'amplification suivi sont présentés dans les **tableaux A.I** (voir la section « Annexe ») et **VI**, respectivement. Les milieux réactionnels ont été préparés selon les instructions du fournisseur. Chaque réaction est effectuée sur 1  $\mu$ L d'échantillon (gamme étalon et ADNc) dans un volume final réactionnel de 10  $\mu$ L. Le logiciel calcule ensuite, pour chaque échantillon, le nombre de cycles nécessaire à la détection de la fluorescence dans la zone propice à la quantification (début de la phase linéaire d'émission de la fluorescence). Ce nombre de cycle correspond au Crossing Point (Cp). La comparaison des seuils de détection des ADNc avec les Cp de la gamme étalon permet de calculer leur concentration et de ce fait la quantité de transcrits du gène amplifié. Ces expressions « brutes » ont ensuite été normalisées en se référant à l'expression d'un gène à déterminer. L'expression de ce gène doit être stable dans les conditions de l'étude. Le rapport Q, calculé selon la formule Q = [ADNc] gène d'intérêt / [ADNc] gène de référence a été le résultat exploité.

# 8. Séparation des topoisomères plasmidiques par migration électrophorétique sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de séparation des acides nucléiques selon leur masse moléculaire lorsque l'ADN est linéaire mais aussi selon leur encombrement stérique lorsque l'ADN est circulaire. Sous l'effet d'un champ électrique, les acides nucléiques chargés négativement sont attirés de la borne négative (la cathode) vers la borne positive (l'anode) dans un tampon à pH 8,3.

La séparation des topoisomères plasmidiques a été réalisée sur un gel d'agarose 1% (W/V) contenant de la chloroquine à 2,5  $\mu$ g/mL (W/V). La chloroquine est un agent intercalant de l'ADN qui s'intercale principalement entre les bases nucléotidiques de l'ADN relâché dont l'accès est facilité par comparaison à celui de l'ADN superenroulé. Cette insertion engendre un étirement de la molécule d'ADN qui ralentit sa vitesse de migration à l'intérieur du gel. La migration électrophorétique a été effectuée dans une cuve de 20 cm de long contenant du tampon Tris-Borate EDTA (TBE) 1X pH 8,3 et également de la chloroquine à 2,5  $\mu$ g/mL pendant 16 h à voltage constant (2,5 V/cm). La présence d'une quantité équivalente de chloroquine à la fois dans le gel d'agarose et dans le tampon de

migration est nécessaire à la conservation d'un équilibre. Dans ces conditions, l'ADN superenroulé migre plus vite que l'ADN relâché. Après la migration électrophorétique, la chloroquine a été éliminée du gel d'agarose par des lavages successifs à l'eau distillée pendant 2 h toutes les 30 min puis pendant 3 h toutes les heures. Le gel d'agarose a été coloré pendant 30 min dans une solution de bromure d'éthidium (BrEt) à 1,6 µg/mL (V/V) puis décoloré pendant 15 min dans de l'eau distillée et finalement révélé sous la lumière UV. La répartition des topoisomères du plasmide permet d'estimer le niveau de surenroulement global de l'ADN.

Afin d'obtenir une quantité suffisante de plasmide pour ces expériences, il est nécessaire d'utiliser un plasmide à fort nombre de copies, tel que le plasmide pUC18. Pour l'analyse de l'impact de la température sur le niveau de surenroulement de l'ADN, les cellules de *D. dadantii* portant le plasmide pUC18 ont été cultivées aux mêmes températures et dans les mêmes conditions de culture que celles utilisées pour l'extraction des ARN. L'extraction des plasmides aux différentes températures a été réalisée durant la phase exponentielle de croissance avancée (DO<sub>600</sub>  $\approx$  0,6 à 21,5°C et 0,8 à 30°C et à 37,5°C). Pour vérifier l'impact de la novobiocine sur le niveau d'enroulement de l'ADN, le plasmide pUC18 a été extrait des cellules de *D. dadantii* cultivées comme précédemment consécutivement à un traitement de 15 min avec une concentration finale de 100 µg/mL de novobiocine.

### **III.** Techniques biochimiques

# 1. Détection d'activité enzymatique sur milieux solides : pectinase, cellulase et protéase

Le test pectinase est réalisé sur une boîte de milieu minimum solide M63 contenant du saccharose à 2 g/L (V/V) et du PGA à 4 g/L (W/V). Les souches à tester ont été préalablement disposées en "patches" sur un milieu riche solide puis incubé à 30°C pendant environ 16 h. Les colonies obtenues ont par la suite été répliquées à l'aide d'un tissu en velours sur les milieux additionnés de PGA. Après 24 h de croissance à 30°C, les boîtes ont été recouvertes par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 10 % (W/V) qui précipite le polygalacturonate non dégradé. Un halo translucide sur fond bleu, qui correspond à la zone de dégradation du polygalacturonate, apparaît autour des colonies secrétant les pectinases.

Le test cellulase est réalisé, après réplique, sur une boîte de milieu minimum solide M63 contenant du saccharose à 2 g/L (V/V) et du CarboxyMéthylCellulose (CMC) à 2 g/L (W/V). Après 24 h de croissance à 30°C, les boîtes ont été recouvertes par une solution aqueuse de rouge congo à 2 g/L (V/V) qui se fixe préférentiellement sur le CMC non dégradé. Les boîtes ont ensuite été rincées

par une solution de NaCl 1M qui élimine le rouge congo fixé aspécifiquement sur le milieu gélosé. Un halo translucide sur fond rouge, qui correspond à la zone de dégradation du CMC, apparaît autour des colonies secrétant la cellulase.

Le test protéase est réalisé, après réplique, sur une boîte de milieu riche Luria Bertani solide contenant de la poudre de lait à 12,5 g/L (W/V). Ce dernier est choisi en raison de sa forte teneur en protéines. Après 24 h de croissance à 30°C, un halo translucide correspondant à la dégradation des protéines du lait apparaît autour des colonies qui sécrètent les protéases.

### 2. Dosage de l'activité pectate lyase totale

Le dosage a été réalisé sur des toluénisats de cultures : 2 gouttes de toluène ont été ajoutées à 1 mL de culture, l'ensemble a été mélangé durant 10 sec à l'aide d'un vortex puis le toluène a été éliminé par évaporation lors d'une incubation d'1 h environ sous une hotte aspirante. L'ajout de toluène à des cultures bactériennes induit la perméabilisation des membranes cellulaires et de ce fait permet l'accès des enzymes périplasmiques au substrat. Ainsi, le dosage prend en compte les enzymes extracellulaires (majoritaires) et les enzymes périplasmiques (minoritaires). Les Pels dégradent le PGA en oligogalacturonides insaturés qui présentent un maximum d'absorption à 230 nm. Le dosage repose donc sur la détermination spectrophotométrique des oligogalacturonides libérés au cours du temps. Le mélange réactionnel est composé de toluénisat de culture bactérienne (50  $\mu$ L au maximum) et de tampon Pel (Tris-HCl 100 mM pH 8, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, PGA (Sigma) 0,05% (W/V)) ajouté à un volume suffisant pour atteindre 1 mL (entre 950  $\mu$ L et 999  $\mu$ L). L'activité spécifique Pel a ensuite été calculée selon la formule suivante : AS<sub>Pel</sub> = 0,412 ×  $\Delta$  DO<sub>230</sub>/min × V / DO<sub>600</sub>. Cette formule tient compte du coefficient d'extinction molaire des oligogalacturonides (capacité d'absorption du faisceau lumineux) et de la correspondance entre poids sec bactérien et densité optique à 600 nm, de l'activité mesurée ( $\Delta$  DO<sub>230</sub>/min) et du volume d'échantillon dosé.

### **3.** Dosage de l'activité β-glucuronidase totale

Le dosage a été réalisé sur des toluénisats de culture. La  $\beta$ -glucuronidase (GUS) dégrade le *p*nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide (PNPU) en un composé chromogène, le *p*-nitrophénol (PNP) qui présente un maximum d'absorption à 405 nm. Le dosage repose donc sur la détermination spectrophotométrique du PNP libéré au cours du temps. Le mélange réactionnel est composé de toluénisat de culture bactérienne (100 µL au maximum), de PNPU à 1 mM final (100 µL d'une solution à 10 mM) et de milieu minimum M63 ajouté à un volume suffisant pour atteindre 1 mL (entre 800 µL et 899 µL). L'activité spécifique GUS a ensuite été calculée selon la formule suivante : AS<sub>GUS</sub> = 476,2 ×  $\Delta$  DO<sub>405</sub>/min × V / DO<sub>600</sub>. Cette formule tient compte du coefficient d'extinction molaire du PNP (capacité d'absorption du faisceau lumineux) et de la correspondance entre poids sec bactérien et densité optique à 600 nm, de l'activité mesurée ( $\Delta$  DO<sub>405</sub>/min) et du volume d'échantillon dosé.

### 4. Surproduction et purification de la protéine PecT

Le système de surproduction pQE70-ORF<sub>pecT</sub> / *E. coli* M15 a été utilisé pour surproduire la protéine PecT (**figure 31**). Les plasmides de type pQE portent le gène de résistance à l'ampicilline et le promoteur du phage T5, reconnu avec une forte spécificité par l'ARN polymérase bactérienne. Ce promoteur, placé en amont du gène d'intérêt, est associé à la séquence nucléique *lacO* sur laquelle se fixe le répresseur de l'opéron lactose LacI. La souche M15 d'*E. coli* porte un plasmide à faible nombre de copies (pREP4) qui contient le gène codant LacI. De ce fait, en l'absence d'IPTG, l'inducteur de l'opéron lactose, l'expression du gène codant la protéine d'intérêt porté par le plasmide pQE est *quasi* nulle.



## Figure 31 : Induction de la surproduction de la protéine PecT-6His chez *E. coli* M15 pREP4 transformée par le plasmide recombinant pQE70-*pecT*

Le promoteur du phage T5 (noté  $P_{T5}$ ), associé à l'opérateur *lacO*, est reconnu efficacement par l'ARN polymérase bactérienne. En absence d'IPTG (à gauche), l'accès au  $P_{T5}$  est bloqué par la fixation du répresseur LacI sur *lacO*. La transcription du gène *pecT* cloné dans le plasmide pQE70 est réprimée. Après l'ajout de l'IPTG (à droite), ce dernier se complexe avec LacI : cette rétention empêche *in fine* la fixation de LacI à l'opérateur *lacO*. L'ARN polymérase bactérienne peut alors se fixer de manière efficace sur le  $P_{T5}$  et initier la transcription du gène en aval, dans ce cas *pecT*.

Le plasmide pQE70 (Qiagen, Hilden, Germany) permet de construire une protéine recombinante pourvue, à son extrémité C-terminale, d'une queue poly-histidine. Cette caractéristique permet de purifier la protéine sur une résine d'affinité au nickel car ce dernier interagit spécifiquement avec « l'étiquette polyhistidine ». L'ajout d'imidazole, compétiteur pour la fixation au nickel, permet ensuite de décrocher la protéine liée à la résine. La purification a été réalisée à 4°C et à 15°C en

suivant les instructions du fournisseur (Qiagen). Les fractions finales contenant la protéine pure ont été rassemblées et soumises à une dialyse pour éliminer l'imidazole. La composition des tampons utilisés lors des étapes de purification et de dialyse est précisée ci-dessous :

- Tampon de lyse et de charge sur la colonne : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazole variable 10 mM / 20 mM / 50 mM, PMSF 1 mM, NP40 0,1% (V/V) ;
- Tampon d'élution : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazole 250 mM, PMSF 1 mM, NP40 0,1% (V/V);
- Tampon de dialyse : Tris 20 mM pH 7,9, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, glycérol 10% ;
- Tampon de conservation : Tris 20 mM pH 7,9, NaCl 300 mM, EDTA 1mM DTT 1mM, glycérol 50%, NP40 0,1% (V/V).

Grâce à l'ajout de glycérol 50% (V/V) dans le dernier tampon, les solutions protéiques ont été conservables à -20°C. Leur concentration a été évaluée selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976) à l'aide d'une gamme étalon établie avec la BSA « Bovin Serum Albumin » (ThermoFisher Scientific, Lithuania).

### 5. Electrophorèse en conditions dénaturantes ou SDS-PAGE

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire (Laemmli, 1970). Les protéines, réduites par le β-mercaptoéthanol, sont dénaturées par le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Les molécules de SDS se lient aux acides aminés et confèrent aux chaînes protéiques une charge globale négative. Les monomères protéiques migrent de ce fait vers l'anode, la migration à travers les mailles du réseau d'acrylamide étant facilitée pour les petites molécules. Les gels de concentration et de séparation contiennent 4% et 12% d'acrylamide, respectivement. La polymérisation des gels a été catalysée par l'ajout de persulfate d'ammonium et de TEMED. La migration a été réalisée dans du tampon TGS (Tris 25 mM pH 8,3, Glycine 190 mM, SDS 0,1% (W/V)) à voltage constant (30 min à 50 V puis 1h30 à 100 V). Après migration, les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie.

# 6. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et révélation par immunodétection (Western-blot)

L'objectif de cette technique semi-quantitative est de détecter la présence de protéines d'intérêt et d'estimer leur concentration lorsque ceci est requis. Pour cela, les protéines sont d'abord séparées les unes des autres par électrophorèse SDS-PAGE et sont ensuite transférées sur une membrane : elles sont alors susceptibles d'être révélées de manière spécifique par une réaction immunogène impliquant des anticorps couplés à la peroxidase.

La membrane « Immobilon-P Transfer Membrane » (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) a été préalablement équilibrée quelques minutes dans du tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, méthanol 20%, 0,0375% SDS, pH 8,2). Le gel de polyacrylamide a été également équilibré dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du fabricant. Selon la protéine d'intérêt à révéler (Fis ou PecT), le transfert a été effectué à raison de 2 mA/cm<sup>2</sup> de gel (environ 100 mA, 16V) pendant 12 ou 20 min à partir d'échantillons cellulaires séparés sur un gel SDS-PAGE 17% ou 12%, respectivement. En effet, les protéines dont la masse moléculaire est plus faible sont plus rapidement transférées que celles dont la masse moléculaire est plus importante. Après lavage dans du tampon TBS 1X - Tween 20 0,1% (V/V), la membrane a été incubée pendant 3 h dans du tampon de blocage (TBS 1X - Tween 20 0,1% (V/V) + Gélatine 3% (W/V)) afin de saturer les sites aspécifiques. Les membranes sont ensuite lavées trois fois avant d'être incubées pendant 2 h avec les anticorps primaires préalablement épuisés et dilués dans du tampon TBS 1X - Tween 20 0,1% (V/V). Toutes ces étapes d'immunodétection ont été réalisées à température ambiante sous agitation. Après incubation, les membranes ont été lavées trois fois dans du tampon TBS 1X - Tween 20 0,1% (V/V) puis incubées pendant 1 h avec les anticorps secondaires polyclonaux anti-IgG conjugués à la peroxydase dilués au 1/10000 dans du tampon TBS 1X - Tween 20 0,1% (V/V). La peroxydase catalyse en présence de peracide l'oxydation du luminol qui s'accompagne d'émission de lumière détectable par une exposition courte sur un film d'autoradiographie. Afin d'éliminer l'excès des anticorps secondaires, les membranes sont rincées par le tampon de lavage. La révélation a été réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le système « Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate » (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) et les membranes ont été exposées à un film autoradiographique (Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare Life Sciences) selon les recommandations du fabricant.

### 7. Obtention d'un sérum polyclonal et enrichissement en anticorps spécifiques de PecT

Une quantité de 200  $\mu$ g de protéine PecT purifiée a été injectée trois fois, en respectant un intervalle de deux semaines entre chaque dose, à un lapin dont le sang est régulièrement prélevé afin d'évaluer le niveau de production des anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, une saignée est effectuée et le sérum polyclonal est récupéré et conservé à -20°C.

Pour augmenter la spécificité d'un sérum polyclonal, il peut être nécessaire d'épuiser ce dernier en utilisant des extraits cellulaires ne contenant pas la protéine d'intérêt. Dans le cas des protéines PecT et Fis, les séra obtenus ont été dilués 5000 et 500 fois dans une solution de TBS 1X - Tween 20 0,1% contenant des extraits cellulaires lysés du mutant *pecT* et du mutant *fis*, respectivement. Après une incubation de 60 min, la solution a été centrifugée et le surnageant, qui contient majoritairement les anticorps anti-PecT et anti-Fis, a été utilisé pour révéler la présence des

protéines PecT et Fis dans des échantillons cellulaires dont les protéines ont été séparées et transférées tel que précédemment décrit (voir les parties **III.5** et **III.6** de la section « Matériel et Méthode »).

Une méthode alternative consistant en la purification des anticorps spécifiques a été également utilisée. La méthode employée (Sakakibara et al., 1991) consiste à mettre en contact le sérum brut avec la protéine d'intérêt et à récupérer les anticorps qui s'y sont fixés. Pour ceci, une quantité d'environ 200 µg de protéines purifiées a été transférée sur une membrane de nitrocellulose après une électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. Les membranes ont été colorées au rouge ponceau S 0,1% (dans une solution d'acide acétique 7% (V/V)) afin d'identifier précisément les parties de la membrane comportant les protéines d'intérêt. Les bandes ont été ensuite découpées et décolorées quelques minutes dans une solution d'acide acétique 7% (V/V) puis lavées pendant 10 min dans du tampon TBS 1X. Afin d'éviter les interactions non spécifiques avant la mise en contact avec les anticorps, les bandes de nitrocellulose ont été saturées sous agitation à 30°C pendant 3 h dans du TBS 1X – gélatine 3% (W/V). Les bandes ont été lavées dans du tampon TBS 1X – Tween 20 0,1% (V/V) puis mises en contact avec le sérum polyclonal dilué 20 fois dans un volume de 12 mL de TBS 1X – Tween 20 0,1% – gélatine 1% (W/V) pendant une nuit à température ambiante. La membrane a ensuite été lavée 4 fois pendant 10 min dans du TBS 1X – Tween 20 0,1% (V/V). Les anticorps fixés à la membrane ont ensuite été élués par un choc acide en la recouvrant par un volume de 4 mL de tampon glycine-HCl 0,2 M à pH 2,2 pendant 30 sec. Un volume de 170 µL d'une solution de Tris-HCl 1 M pH 8,8 a été immédiatement ajouté à l'éluat afin de neutraliser la réaction. Les solutions d'anticorps purifiés anti-PecT et anti-Fis ont été aliquotées et conservées à -20°C et à +4°C, respectivement.

### 8. Technique de l'immunoprécipitation de la chromatine

Cette technique repose sur plusieurs étapes consécutives dont la finalité est de récupérer des complexes ADN – protéines formés à un instant précis de la croissance cellulaire. Les complexes nucléoprotéiques de cellules en culture sont pontés de manière covalente avec du formaldéhyde ; après une lyse cellulaire, l'ADN est fragmenté par sonication. Les régions d'ADN liées à la protéine d'intérêt sont ensuite récupérées par une réaction immunologique spécifiquement dirigée contre cette dernière ; les pontages sont supprimés par chauffage et l'ADN, préalablement purifié, est quantifié par des techniques basées sur la réaction de PCR (**figure 32**).

Des milieux de cultures ont été ensemencés de la même manière que précédemment réalisés pour l'extraction des ARN cellulaires. Des volumes correspondants environ à  $3x10^9$  bactéries ont été prélevés des cultures pour le pontage des protéines à l'ADN. Concernant l'analyse de l'influence de la température sur la fixation de PecT, les pontages ont été effectués à un stade avancé de la phase de croissance exponentielle (DO<sub>600</sub>  $\approx$  0,6 à 21,5°C et 0,8 à 30°C et à 37,5°C). Pour l'analyse de l'influence du niveau de surenroulement de l'ADN sur la fixation de PecT, les pontages ont été réalisés sur des cultures à 21,5°C ayant été soumises à un traitement de 15 min à la novobiocine à une concentration de 100  $\mu$ g/mL. Afin de mesurer l'activité Pel des différents échantillons, un volume de 1 mL de suspension cellulaire a été prélevé à toutes les étapes de traitement (formaldéhyde ; novobiocine) et traité comme précédemment indiqué (voir la partie **III.2** de la section « Matériel et Méthode »).



Figure 32 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la technique de l'immunoprécipitation de la chromatine

Le pontage des nucléoprotéines a été initié par l'ajout du formaldéhyde (CH<sub>2</sub>O) aux cultures. Par la suite, les cellules ont été lysées et l'ADN fragmenté. Lors de l'immunoprécipitation, la liaison des anticorps anti-PecT à PecT et leur fixation à la protéine A ont permis de récupérer les complexes formés par PecT avec l'ADN. Les échantillons « T » contiennent l'ADN total alors que les échantillons « IP » contiennent seulement l'ADN auquel PecT était fixé au moment du traitement. Avant l'analyse quantitative de l'ADN contenu dans ces échantillons, les pontages des complexes nucléoprotéiques ont été eliminés par un traitement thermique et l'ADN a été purifié.

Le pontage des protéines liées à l'ADN des cellules a été initié par l'ajout de formaldéhyde à une concentration finale de 1% (V/V). Cet agent pontant a été privilégié car il permet de fixer les protéines physiquement très proches de l'ADN. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la réaction a été arrêtée par l'ajout d'une solution de glycine à 250 mM final (W/V). Après 15 min d'incubation, trois lavages successifs sont effectués avec du tampon Tris-Buffer Saline 1X (TBS 1X) afin d'éliminer le formaldéhyde résiduel. Lors d'un dernier lavage au TBS 1X, les cellules ont été réparties en plusieurs échantillons d'environ 10<sup>9</sup> bactéries ; après une centrifugation de 5 min à 6000 rpm et élimination du surnageant, ces échantillons cellulaires ont été soit conservés à -80°C soit

directement resuspendus dans 1 mL de tampon de lyse (Hepes-KOH pH 7,9 20 mM; KCl 50 mM; DTT 0,5 mM; glycérol 10% (V/V)) additionné d'un cocktail inhibiteur de protéase (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). L'ADN des cellules est morcelé par sonication de manière à obtenir des fragments d'une taille moyenne de 500 pb. La composition des lysats cellulaires a été ajustée à celle du tampon de lavage utilisé par la suite (Tris-HCl pH 8 10 mM; NaCl 150 mM; NP40 0,1%) puis ceux-ci ont été centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires. Un volume de 50  $\mu$ L de surnageant a été conservé : celui-ci contient tous les fragments d'ADN présents avant immunoprécipitation (échantillons « T »).

L'immunoprécipitation est initiée par l'ajout des anticorps anti-PecT purifiés, dilués au 1/200, à 800  $\mu$ L du surnageant. Après 4 h d'incubation à 4°C, chaque réaction a été mise en contact avec 50  $\mu$ L de billes de protéine A - Sépharose (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) préalablement lavées et équilibrées par le tampon de lavage. Après une incubation d'une nuit à 4°C, les billes de protéine A, sur lesquelles se sont fixés les anticorps, ont été récupérées par centrifugation puis lavées 4 fois avec 1 mL de tampon de lavage (Tris-HCl pH 8 10 mM ; NaCl 150 mM ; NP40 0,1%) et 2 fois avec du tampon Tris-EDTA 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM). Les complexes ADN-protéines immunoprécipités ont ensuite été détachés des billes par un traitement de 15 min à 65°C avec du tampon d'élution (Tris-HCl pH 8 50 mM ; EDTA 10 mM ; SDS 1%). Les pontages ADN-protéines des échantillons immunoprécipités « IP » et non immunoprécipités « T » ont été dissociés lors d'une incubation d'une nuit à 65°C. L'ADN de ces échantillons a été purifié en utilisant le kit de purification des acides nucléiques « PCR purification Kit » (Qiagen, Germany) et solubilisé dans 40  $\mu$ L de Tris-EDTA 0,5X. Du matériel plastique à faible rétention (DNA Lobind Tube, Eppendorf, Germany) a été utilisé lors de toutes ces étapes afin d'optimiser la quantité d'ADN finalement obtenue.

Consécutivement, un volume de 5  $\mu$ L des échantillons d'ADN « IP » et « T » purifiés (« T » dilués 10 fois par rapport à « IP ») a été analysé par une réaction de PCR classique avec un nombre de cycles écourté comme précédemment évoqué. Alternativement, 1  $\mu$ L de ces mêmes échantillons a été analysé par la technique de la Q-PCR quantitative. Les couples d'amorce utilisés et le programme d'amplification suivi sont décrits dans les **tableaux A.I** (voir la section « Annexe ») et **VI**, respectivement. Les couples d'amorces amplifient de courts fragments d'ADN (de 100 à 150 pb) compris dans la région régulatrice des gènes ciblés.

### 9. Préparation des sondes radioactives

Les régions régulatrices des gènes *pelE* et *pelD* de *D. dadantii* ont été isolées du plasmide pBSK par digestion avec le couple d'enzymes de restriction *Eco*RI-*Hin*dIII générant chacune une extrémité protubérante. L'extrémité 5' générée par *Hin*dIII a été marquée avec le [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mM) (Perkin Elmer) qui est incorporé par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase d'*E. coli* (Promega) (**figure 28E**). Après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant du BrEt (0,5  $\mu$ g/mL), les fragments marqués ont été purifiés avec le kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen). La radioactivité contenue dans les sondes a ensuite été quantifiée par un compteur à scintillation (Packard Tri-Carb 2100TR).

### 10. Retard de migration sur gel de polyacrylamide (band-shift)

Cette méthode permet de révéler de manière relativement simple les complexes ADNprotéines. Elle repose sur le fait qu'en conditions non dénaturantes la migration de ces complexes sur un gel de polyacrylamide est plus lente que celle de fragments d'ADN libres. Les expériences d'interaction ont été réalisées dans un volume de 20  $\mu$ L de composition : Hepes-NaOH pH 7,9 12 mM, Tris-HCl pH 7,9 4 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, BSA 2  $\mu$ g, glycérol 10%, poly(dI-dC)-poly(dI-dC) (GE-Healthcare) 0,5  $\mu$ g, 50000 cpm de sonde radioactive et PecT en concentration variable (0 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M). Après 20 min d'incubation, les échantillons ont été analysés sur un gel de polyacrylamide à 4 % avec un tampon Tris-Acétate (Tris-HCl 6,75 mM pH 7,9, Acétate de sodium 3,3 mM pH 7,9) pour l'électrophorèse. Les complexes ADN-protéines et la sonde libre ont ensuite été révélés après une exposition à un film autoradiographique (Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare Life Sciences).

#### IV. Analyses bio-informatique et statistique

La recherche de séquences consensus correspondant aux sites de fixation des protéines régulatrices dans les régions régulatrices des gènes *pel* et *pecT* a été réalisée en utilisant la base de données « Virtual Footprint » hébergée par le serveur « Prodoric » (<u>http://www.prodoric.de/</u>). L'analyse se fait en ligne, la fiabilité des sites de fixation de la (des) protéine(s) concernée(s) par l'analyse est établie par comparaison aux consensus de fixation répertoriés sur la base de données qui ont déjà été identifiés chez d'autres espèces bactériennes.

La recherche de structures secondaires potentielles à l'intérieur des séquences transcrites non codantes des ARNm a été réalisée en utilisant le serveur « RNAfold » (<u>http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi</u>). La probabilité d'existence de ces structures est calculée par le serveur en tenant compte de la complémentarité des bases nucléotidiques et de la stabilité énergétique de la molécule.

D'une manière générale, le test de Student (*t* test) a été utilisé pour les analyses statistiques. Ce test de comparaison permet de savoir si la différence observée entre deux moyennes est réellement significative ou bien si elle est liée à une forte variance des échantillons. Lorsque la *P*-value obtenue est inférieure à 0,05, les deux moyennes sont dites « significativement différentes » : ceci signifie que la probabilité d'émettre une conclusion inexacte est inférieure à 5% (*id est* qu'en vérité, les moyennes ne sont pas différentes).

# AXE I : L'action de PecT, un régulateur de la famille LysR, est modulée par la température chez *D. dadantii*

### I. PecT thermorégule la virulence chez D. dadantii

### 1. PecT est un acteur important de la thermorégulation de la production des Pels

Les études précédentes réalisées sur la souche de référence 3937 de *Dickeya dadantii* avaient montré que la synthèse des pectate lyases (Pels), facteurs de virulence essentiels, est modulée par la température (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992). En effet, ces travaux faisaient état d'une production de Pels particulièrement élevée à basses températures. Toutefois, le mécanisme impliqué dans l'intégration de ce signal restait inexpliqué. En raison de l'implication fréquente de H-NS dans la thermorégulation de la virulence des bactéries pathogènes des mammifères (voir la partie **II.3** de la section bibliographique), nous nous sommes intéressés à ce régulateur chez *D. dadantii*. Il avait précédemment été rapporté que H-NS agissait à deux niveaux sur la synthèse des Pels : une action répressive directe mineure et une action activatrice majeure *via* le répresseur fort PecT (**figure 27**). J'ai donc analysé l'impact de ces deux régulateurs sur la thermorégulation de la synthèse des Pels. Pour ce faire, j'ai comparé l'impact de différentes températures sur la production des Pels par la souche parentale A350 à celle des mutants *hns, pecT* et *hns-pecT*.

Les études précédemment menées au laboratoire avaient été réalisées en milieu minimum synthétique M63 supplémenté en glycérol et en polygalacturonate (PGA), un dérivé de la pectine. Le glycérol, contrairement au glucose, est une source de carbone qui présente l'avantage d'interférer peu avec le catabolisme des sucres complexes tels que le PGA. J'ai retenu (i) le glycérol comme source de carbone, (ii) le PGA comme inducteur de la synthèse des Pels et (iii) les températures suivantes :  $30^{\circ}$ C, température optimale de croissance de *D. dadantii*,  $21,5^{\circ}$ C et  $37,5^{\circ}$ C, températures minimale et maximale pour lesquelles une croissance convenable et reproductible est observée. Dans ces conditions de croissance, les temps de doublement de la souche parentale et du mutant *pecT* à  $21,5^{\circ}$ C,  $30^{\circ}$ C et  $37,5^{\circ}$ C sont de  $135 \pm 10$  min,  $70 \pm 6$  min et  $80 \pm 6$  min, respectivement ; à ces mêmes températures, ceux du mutant *hns* sont de  $155 \pm 15$  min,  $90 \pm 10$  min et  $110 \pm 10$  min, respectivement.

37,5°C) ont été utilisées pour quantifier l'activité Pel car la production des Pels atteint son maximum à ce stade de la croissance dans les souches étudiées (Castillo and Reverchon, 1997 ; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992 ; Nasser *et al.*, 2001 ; Surgey *et al.*, 1996). Ces expériences ont montré que (**figure 33A** ; **tableau VII**) :

- La synthèse des Pels est plus forte à basse température puis diminue quand la température augmente chez la souche parentale et chez le mutant *hns*, bien que la synthèse des Pels soit fortement réduite chez ce dernier (Nasser *et al.*, 2001);
- En revanche, la synthèse des Pels chez le mutant *pecT* est très forte à 30°C et diminue à 21,5°C et 37,5°C : le profil de synthèse des Pels en fonction de la température dans cette souche est donc différent de celui de la souche parentale et du mutant *hns*.



## Figure 33 : Production des pectate lyases (Pels) en fonction de la température de croissance chez la souche parentale (PS) de *D. dadantii* et les mutants dérivés *pecT*, *hns* et *hns-pecT*

A. Les cellules bactériennes ont été cultivées aux trois températures indiquées en milieu minimum M63 additionné de glycérol (2 g/L) et de PGA (4 g/L). L'activité spécifique Pel (Pel SA) est exprimée en µmol d'oligogalacturonides libérés par min et par mg de poids sec bactérien ; une échelle logarithmique de base 2 a été utilisée en ordonnée afin de mieux représenter les variations de l'activité spécifique Pel dans les différentes souches.

Chaque valeur représente la moyenne de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. Les activités spécifiques Pel obtenues dans chaque contexte génétique (*pecT*, *hns*, *pecT-hns* et souche parentale) à 21,5°C et 37,5°C sont différentes de celles obtenues à 30°C (*P*-values < 0,05).

**B.** Activité spécifique Pel du mutant *pecT* comparée à celle de la souche parentale. Les rapports aux différentes températures de croissance sont calculés en divisant l'activité spécifique Pel obtenue chez le mutant *pecT* par celle obtenue chez la souche parentale.

Chaque valeur représente la moyenne de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'activité spécifique Pel obtenue chez le mutant *pecT* est différente de celle obtenue chez la souche parentale (P-values < 0,05).

Nom	Activité spécifique Pel				
_	21,5°C	30°C	37,5°C		
PS	2,19 ± 0,07 [1,0]	1,13 ± 0,40 [1,0]	0,04 ± 0,01 [1,0]		
pecT	4,54 ± 0,76 [+ 2,1]	13,97 ± 0,89 [+ 12,3]	2,46 ± 0,12 [+ 66,3]		
hns	0,06 ± 0,003 [- 36,5]	0,03 ± 0,002 [- 37,7]	$0,001 \pm 3.10^{-4}$ [-36,2]		
hns-pecT	$9,16 \pm 0,49 [+4,2]$	33,85 ± 8,68 [+ 29,9]	$4,60 \pm 0,13$ [+ 124,0]		

 Tableau VII : Impact de la température de croissance sur la synthèse des Pels dans les différents

 mutants dérivés de la souche parentale A350 de *D. dadantii*

L'activité spécifique Pel a été mesurée pour chaque souche aux différentes températures en milieu minimum M63 additionné de glycérol (2 g/L) et de PGA (4 g/L). L'activité spécifique Pel est exprimée en µmol d'oligogalacturonides libérés par min et par mg de poids sec bactérien. Le niveau de variation de l'activité spécifique Pel induit par l'inactivation des protéines H-NS et/ou PecT est indiqué entre parenthèse pour chaque température de croissance. Celui-ci représente le niveau d'induction (indiqué par un signe +) ou de répression (indiqué par un signe -) de l'activité spécifique Pel mesurée chez le mutant considéré par comparaison à celle mesurée chez la souche parentale.

Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. Les activités spécifiques Pel obtenues dans chaque contexte génétique (*pecT*, *hns*, *pecT-hns* et souche parentale) à 21,5°C et 37,5°C sont différentes de celles obtenues à 30°C (*P*-values < 0,05). De plus, les résultats obtenus pour chaque mutant aux trois températures étudiées sont différentes de ceux obtenus chez la souche parentale (*P*-values < 0,05).

Ainsi et de manière surprenante, dans nos conditions expérimentales, le régulateur H-NS ne s'est pas avéré impliqué dans la thermorégulation : la différence de synthèse des Pels entre le mutant *hns* et la souche parentale est en effet constante aux trois températures (**figure 33A** ; **tableau VII**). En revanche, la différence observée entre l'activité spécifique Pel du mutant *pecT* et celle de la souche parentale est faible à 21,5°C puis croît lorsque la température augmente (**figure 33B** ; **tableau VII**). De ce fait, le répresseur PecT semble avoir une action de plus en plus marquée sur la synthèse des Pels quand la température augmente. Par ailleurs, le profil de synthèse du double-mutant *hns-pecT* s'est révélé similaire à celui du mutant *pecT* (**figure 33A** ; **tableau VII**) confirmant ainsi le fait que c'est l'absence de PecT qui est responsable de la modification du profil de synthèse des Pels et que cette modification ne fait pas intervenir H-NS. De plus, dans ce double-mutant, une légère dérépression de la synthèse des Pels et que cette l'asynthèse des Pels et cuelle-ci est liée à l'effet cumulé de l'inactivation des 2 répresseurs H-NS et PecT (**figure 27**).

### 2. L'expression des gènes pel est thermorégulée

Afin de savoir si la thermorégulation observée sur la synthèse des Pels et l'implication de PecT dans ce contrôle s'exercent au niveau de la transcription, nous avons retenu l'approche de la PCR quantitative (Q-PCR). Cette technique présente l'avantage de mesurer directement l'expression de plusieurs gènes dans un même contexte génétique.

Des cultures de la souche parentale et du mutant *pecT* ont été réalisées aux trois températures retenues (21,5°C, 30°C et 37,5°C). Les ARN ont été extraits à partir de cellules en phase de croissance exponentielle avancée (DO600 = 0,6-0,65 à 21,5°C ; 0,8-0,9 à 30°C et 0,7-0,8 à 37,5°C), stade requis pour l'obtention de transcrits de bonne qualité chez *D. dadantii* (Hommais *et al.*, 2008). Avant la synthèse des ADNc, la qualité des ARN a été analysée électrophorétiquement et spectrophotométriquement comme indiqué dans la section « Matériel et Méthodes ». L'ajout d'un ARN de synthèse (« Applied Biosystems GeneAmp pAW109 RNA Control Template », Life Technologies, U.S.A.) en quantité identique dans les différents échantillons permet de vérifier l'efficacité et l'homogénéité des rétrotranscriptions. Les concentrations des ADNc obtenus étant comprises entre 3,6.10<sup>-8</sup> et 5,3.10<sup>-8</sup> ng/µL, nous avons pu considérer que la rétrotranscription a été relativement homogène.

Afin de pouvoir réaliser une analyse comparative efficace entre les quantifications de l'expression d'un gène donné dans les différents échantillons testés, nous avons recherché un gène normalisateur dont l'expression devrait idéalement rester stable dans les conditions et contextes génétiques de l'étude. Des analyses réalisées au laboratoire sur l'expression du génome de *D. dandatii* dans une cinquantaine de conditions de culture différentes (source de carbone variable, stress pH, choc osmotique, phases de croissance,...) avaient permis d'identifier plusieurs gènes stables vis-à-vis de ces multiples exigences (Hommais *et al.*, 2011). L'expression de certains de ces gènes tels que *hemF*, *rraA* et *lpxC* a été analysée dans les conditions de notre étude. Ceux-ci codent une coproporphyrinogène III oxidase, une protéine inhibitrice de la RNase E et une N-Acétyl-Glucosamine Déacétylase, respectivement. Parmi ces gènes de référence candidats, *lpxC* s'est révélé particulièrement adapté pour la normalisation des résultats de Q-PCR de nos expériences, l'accumulation de ses transcrits étant stable dans les conditions de notre étude (**figure 34**).





Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

Pour l'analyse de l'expression des gènes *pel*, nous avons sélectionné les gènes *pelB*, *pelC*, *pelD* et *pelE* qui codent, 4 des 5 Pels majeures de *D. dadantii*. Ces enzymes agissent de manière complémentaire afin de dégrader les différents types de pectine répartis de manière hétérogène dans la plante (voir la partie **IV.3** de la section bibliographique ; Lebeau *et al.*, 2008). Le niveau d'expression de ces gènes dans les deux contextes génétiques s'est révélé cohérent avec les variations observées pour la synthèse des Pels en fonction de la température ; la différence d'expression des *pel* entre le mutant *pecT* et la souche parentale augmentant avec la température (**figure 35A**, par comparaison à la **figure 33A**). L'action principale de PecT dans la thermorégulation s'exercerait donc au niveau transcriptionnel : la répression de l'expression des gènes *pel* par PecT augmente avec la température.



Figure 35 : Influence de la température de croissance sur l'expression des gènes *pel* et *pecT* et sur l'accumulation de PecT

**A.** Les cellules de la souche parentale (PS « Parental Strain ») et du mutant *pecT* ont été cultivées de la même manière que mentionné dans la légende de la **figure 34**. Le gène lpxC a été choisi comme référence pour la normalisation lors de la quantification des transcrits par la technique de la Q-RT-PCR.

Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'expression des gènes *pel* et *pecT* obtenues dans chaque contexte génétique à  $21,5^{\circ}$ C et  $37,5^{\circ}$ C est différente de celle obtenue à  $30^{\circ}$ C (*P*-values < 0.05).

**B.** (a) Quantité cellulaire de la protéine PecT aux différentes températures d'étude chez la souche parentale. 10  $\mu$ g d'extraits protéiques totaux ont été utilisés afin d'estimer le contenu cellulaire de la protéine PecT par la technique du Western-blot dans chaque condition analysée. (b) Une quantité identique d'extraits protéiques (10  $\mu$ g) a été analysée par une électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide à 12% afin de s'assurer que des quantités similaires de protéine aient été utilisées. Après l'électrophorèse, les protéines ont été révélées par une coloration au Bleu de Coomassie. Des résultats similaires ont été obtenus lors de trois expériences indépendantes. (c) Quantité cellulaire de la protéine PecT aux différentes températures de l'étude mesurée par le logiciel ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. La quantité de PecT mesurée à 30°C est significativement différente de celle obtenue à 30°C et à 37,5°C (*P*-values < 0.05).

# 3. La thermorégulation exercée par PecT n'est pas limitée aux gènes *pel* (résultats non publiés).

Comme précédemment évoqué dans la partie IV de la section bibliographique, PecT contrôle également d'autres fonctions de virulence en plus de son action sur les Pels. PecT réprime notamment la mobilité et la production des exopolysaccharides de surface (EPS) (Castillo and Reverchon, 1997 ; Condemine *et al.*, 1999). Nous nous sommes donc demandé si la synthèse des EPS et la mobilité chez *D. dadantii* étaient soumises à une thermorégulation. Pour répondre à cette question, j'ai étendu les expériences de quantification des transcrits aux gènes *weaP*, impliqué dans la biosynthèse des EPS, et *fliC*, codant le constituant essentiel du flagelle, la flagelline. L'expression de ces deux gènes s'est révélée être thermorégulée de manière similaire à celle des gènes *pel* chez la souche parentale et chez le mutant *pecT* (**figure 36**). Dans le cas du gène *weaP*, une expression particulièrement forte est observée dans le mutant *pecT* à 37,5°C. La signification de cette particularité n'a pas été approfondie dans le cadre de cette étude. PecT semble donc globalement utiliser le même mécanisme pour thermoréguler l'expression de ses différents gènes cibles.





Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'expression des gènes *fliC* et *weaP* obtenues dans chaque contexte génétique à  $21,5^{\circ}$ C et  $37,5^{\circ}$ C est différente de celle obtenue à  $30^{\circ}$ C (*P*-values < 0.05).

### 4. Le mutant pecT conserve un pouvoir pathogène à hautes températures

Afin d'analyser l'importance de PecT dans la thermorégulation de la virulence chez *D*. *dadantii*, nous avons réalisé des tests d'infection sur feuilles d'endive aux 3 températures de l'étude (**figure 37**). L'endive a été retenue pour ces tests car des bulbes de bonne qualité sont disponibles dans le commerce toute l'année. En raison de la croissance plus lente des souches à  $21,5^{\circ}$ C, les organes végétaux infectés ont été incubés 32 h à  $21,5^{\circ}$ C et 16 h à  $30^{\circ}$ C et  $37,5^{\circ}$ C.



## Figure 37 : Influence de la température sur la virulence de la souche sauvage (3937) et du mutant pecT de *D. dadantii*

Les feuilles d'endive ont été inoculées avec  $2,5 \times 10^6$  bactéries et incubées aux différentes températures indiquées. En raison de la croissance réduite de ces deux souches à  $21,5^{\circ}$ C (par comparaison à celle à  $30^{\circ}$ C et à  $37,5^{\circ}$ C), les organes végétaux ont été placés à  $30^{\circ}$ C et à  $37,5^{\circ}$ C durant 16 heures et à  $21,5^{\circ}$ C durant 32 heures.

A. Symptômes typiques obtenus aux différentes températures après inoculation de feuilles d'endives par la souche sauvage et le mutant pecT dérivé.

**B.** Poids de tissus végétaux macérés par la souche parentale et par le mutant *pecT* aux différentes températures indiquées. Les rapports entre les poids de tissus macérés par le mutant *pecT* et par la souche sauvage à chacune des températures de l'étude sont indiqués sur la figure (FC).

Chaque valeur présentée est la moyenne de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. La quantité de tissus macérés par le mutant *pecT* à 30°C et à 37,5°C est significativement différente de la quantité de tissus macérés par la souche sauvage (*P*-values < 0.05).

**C.** Dénombrement des bactéries présentes à l'intérieur des tissus macérés. Chaque valeur représente la moyenne de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

Les résultats obtenus ont montré une cohérence par rapport à la synthèse des Pels et à l'expression des gènes *fliC* et *weaP* observée chez la souche parentale A350 et le mutant *pecT* dérivé (figures 37A, 37B et 37C) :

### La macération des tissus végétaux par la souche sauvage est forte à 21,5°C, diminue à 30°C et est indétectable à 37,5°C ;

- La macération des tissus végétaux par le mutant *pecT* est similaire à celle réalisée par la souche sauvage à 21,5°C ;
- De manière cohérente aux études précédemment rapportées (Castillo and Reverchon, 1997), la macération des tissus végétaux par le mutant *pecT* est environ 6 fois plus importante que celle réalisée par la souche sauvage à 30°C ;

La macération des tissus végétaux liée à l'infection du mutant *pecT* est plus faible à 37,5°C qu'à 21,5°C ; toutefois, contrairement à la souche sauvage, ce mutant conserve un pouvoir de macération non négligeable à 37,5°C.

PecT serait donc un acteur important du caractère avirulent de *D. dadantii* à hautes températures.

## 5. L'inactivation de PecT n'a pas un impact appréciable sur la stabilité des transcrits *pel* ou des Pels vis-à-vis de la température de croissance

La stabilité des ARN joue un rôle déterminant dans la thermorégulation de certaines fonctions de virulence bactérienne (Böhme *et al.*, 2012 ; Caldelari *et al.*, 2013 ; Hoe and Goguen, 1993 ; Johansson *et al.*, 2002). Afin de savoir si ce paramètre pourrait aussi contribuer à la thermorégulation exercée par PecT, j'ai analysé le niveau de synthèse des transcrits *pel* et *lpxC* après ajout de rifampicine à des cultures réalisées selon les conditions mentionnées précédemment. La rifampicine est un antibiotique qui, en se fixant sur l'ARN polymérase bactérienne, empêche cette dernière d'initier la transcription. L'évolution de la stabilité des ARN transcrits / en cours de transcription au moment du traitement est représentée en fonction du temps dans la **figure 38**.

J'ai ainsi remarqué que, dans le temps de l'expérience, la stabilité des transcrits *pelB*, *pelC*, *pelD* et *pelE* diminue quand la température augmente : leur dégradation est très rapide à 37,5°C et relativement lente à 21,5°C. Toutefois, PecT ne semble pas impliqué dans ce mécanisme car la même tendance dans la stabilité des transcrits vis-à-vis de la température est observée dans les deux contextes génétiques. Une différence est toutefois remarquable à 37,5°C entre la stabilité des transcrits *pelB* et *lpxC* et celle des transcrits *pelD* et *pelE* : ces deux derniers sont en effet plus rapidement dégradés alors que la stabilité des transcrits *pelB* est similaire à celle des transcrits du gène de référence *lpxC*.

Afin de trouver une explication à cette différence de stabilité à hautes températures entre les transcrits *pelB* et ceux des gènes *pelD* et *pelE*, j'ai analysé la séquence nucléotidique comprise entre les sites d'initiation de la transcription et de la traduction de ces gènes (voir la partie **IV** de la section « Matériel et Méthode » ; **figure 39A**). De manière intéressante, des séquences palindromiques non négligeables sont localisées entre ces sites dans les cas de *pelD* et *pelE*. Leur présence pourrait favoriser la formation de structures secondaires plus ou moins thermolabiles ayant un lien avec la stabilité des transcrits de *pelD* et *pelE* à hautes températures (**figure 39B**). Celles-ci pourraient par exemple être clivées par des ribonucléases telles que la RNase III qui a une spécificité pour les portions double brins de l'ARN (De la Fuente *et al.*, 2012).



## Figure 38 : Stabilité des transcrits *pel*, *pecT* et *lpxC* en fonction de la température de croissance dans la souche parentale et le mutant *pecT* dérivé

La transcription cellulaire a été bloquée à la fin de la phase exponentielle de croissance en ajoutant de la rifampicine (0 min) aux cultures à une concentration finale de 500  $\mu$ g/mL. Des échantillons ont été prélevés aux différents temps indiqués afin de quantifier les transcrits par la technique de la Q-RT-PCR. Le gène *lpxC* a été utilisé comme référence pour la normalisation. Une valeur arbitraire de 1 a été prise pour la valeur de transcrits quantifiée au moment du traitement (t = 0 min). Le niveau de transcrits restant après l'ajout de la rifampicine a été exprimé en fonction du temps. Le profil de stabilité des transcrits obtenu chez la souche parentale n'est pas apparu significativement différent de celui obtenu chez le mutant *pecT*. Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

- A. *pelD* GCCAAAGGACAAAATGGCGTTTCATTTTTTTCACAAAACACTTTTCA GTCAACAAAATTGGATTAGCGCAGATAGCGCAAGGAACCAGTCTATG
  - *pelE* AGACACACATGTAACAAATGGACACCATTTGGATCGCTCACTGAGC ACACAAGGAAAATTGCCATG
  - *pelB* GGCTACCGACATACTTTGATATTCCTTACCAATGCATGCCGTTTTCA GCCTCAATACGGGCGCAGGGAATAACACATGCCCACAACATATTTA TGGTTTAGAGAAAAGGAACACACACTATG



# Figure 39 : Séquence nucléotidique de l'ADN correspondant aux régions 5' non traduites de l'ARNm des gènes *pelD*, *peE* et *pelB* (A) et structures secondaires putatives de ces régions 5'UTR des ARNm *pelD* (B) et *pelE* (C)

A. Les paires de séquences palindromiques présentes dans les régions de l'ADN correspondants aux 5'UTR des transcrits *pelD*, *pelE* et *pelB* sont surlignées d'une couleur identique. Le +1 de transcription et le codon initiateur de la traduction sont encadrés en noir.

**B** et C. La base de données RNAfold (<u>http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi</u>) a été utilisée afin de rechercher des structures secondaires putatives au regard de la complémentarité des bases et de la stabilité énergétique. Le site d'initiation de la transcription est indiqué par un « +1 » et le codon initiateur de la traduction AUG est précisé en rose. Les régions encadrées en pointillés correspondent aux palindromes indiqués en (A) et qui ont une forte probabilité de formation. Dans le cas du transcrit *pelB*, une structure secondaire a été recherchée dans la portion transcrite non codante en 5' ; toutefois celle-ci n'est pas indiquée en raison de sa faible vraisemblance (de nombreux mésappariements sont engendrés). Dans le cas des transcrits *pelD* et *pelE*, les structures secondaires putatives de la région 5'UTR sont figurées en B et C, respectivement.

La stabilité des Pels en fonction de la température dans les deux souches a par la suite été évaluée en substituant la rifampicine par le chloramphénicol. Cet antibiotique, en inhibant l'activité peptidyl transférase du ribosome, arrête la synthèse des protéines. L'évolution de la stabilité des Pels présentes au moment du traitement est représentée en fonction du temps dans la **figure 40A**. Cette analyse a confirmé la grande stabilité des Pels précédemment observée (taux de dégradation =  $4,94 \times 10^{-2}$  / heure (Kepseu *et al.*, 2010)). Aucune différence notable dans la stabilité de ces enzymes n'a été observée entre la souche parentale et le mutant *pecT*. Ainsi, ni la stabilité des transcrits *pel* ni celle des Pels vis-à-vis de la température n'intervient dans la thermorégulation exercée par PecT.



Time post-chloramphenicol treatment (hours)

### Figure 40 : Influence de la température sur la stabilité de l'activité Pel et sur celle de l'accumulation de la protéine PecT

La souche parentale et le mutant *pecT* ont été cultivées comme indiqué sur la **figure 38**. Le chloramphénicol a été ajouté aux cultures à une concentration finale de 200  $\mu$ g/mL pour bloquer la traduction (t = 0 min). Des échantillons ont été prélevés à différents temps afin de mesurer l'activité Pel (A) et la quantité de PecT (B) restant après le traitement.

A. Une valeur arbitraire de 1 a été prise pour l'activité Pel mesurée à t = 0 min. Le niveau d'activité spécifique Pel mesurée aux différents temps après l'ajout de la rifampicine a été exprimé par comparaison au niveau d'activité spécifique Pel initialement mesuré. Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

**B.** Evolution de la quantité cellulaire de la protéine PecT, mesurée par la technique du Western-blot, en fonction du temps après blocage de la traduction cellulaire (t = 0 min). 10 µg d'extraits protéiques totaux ont été utilisés pour chaque condition analysée. Des résultats similaires ont été obtenus lors de trois expériences indépendantes.

# 6. L'intégration du changement de température au niveau de la transcription des gènes *pel* est réalisée par PecT de manière rapide

Dans le but d'évaluer la réactivité de la protéine PecT vis-à-vis de la température, j'ai analysé le niveau d'expression des gènes *pel* après une augmentation brutale de la température de  $30^{\circ}$ C à  $37,5^{\circ}$ C ou une diminution soudaine de  $30^{\circ}$ C à  $21,5^{\circ}$ C par comparaison à des cultures maintenues à  $30^{\circ}$ C. Ce choc thermique a été réalisé lors de la phase de croissance exponentielle avancée précédemment défini à  $30^{\circ}$ C. Les transcrits *pelB*, *pelD*, *pelE* et ceux du gène de référence *lpxC* ont été

quantifiés chez les deux souches analysées. Les rapports présentés dans la **figure 41** ont été obtenus en divisant la quantité obtenue dans le mutant pecT par celle obtenue dans la souche parentale dans les différentes conditions de l'étude. Cette représentation permet de visualiser l'impact de l'absence de PecT sur la transcription des gènes ciblés (*pelB*, *pelD*, *pelE* et le gène de référence *lpxC*) en réponse au choc thermique.



### Figure 41 : Impact d'un choc thermique sur l'efficacité de la répression de l'expression des gènes *pel* par PecT

La souche parentale et le mutant pecT ont été initialement cultivés à 30°C jusqu'à ce que les cellules atteignent la phase exponentielle avancée de croissance. A ce stade, les cultures ont été divisées en trois : un des trois aliquotes a été maintenu à 30°C alors que les deux autres ont été transférés à 21,5°C et à 37.5°C. Des échantillons ont été prélevés 0, 5, 10 et 15 min après le choc thermique pour quantifier les transcrits par la technique de la Q-RT-PCR. Les rapports présentés ont été calculés en divisant la quantité de transcrits obtenue chez le mutant pecT par celle obtenue chez la souche parentale pour chacun des quatre gènes (lpxC, pelB, pelD et pelE). Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. Les résultats obtenus à 30 °C aux différents temps de l'analyse (5 min, 10 min et 15 min) sont significativement différents de ceux obtenus à 21,5°C et 37,5°C à ces mêmes temps (Pvalues < 0.05).

Par comparaison au rapport calculé pour *lpxC* qui reste stable dans les différentes conditions, nous avons observé que :

- Consécutivement à une diminution drastique de la température, le rapport des transcrits des trois gènes *pel*:
  - N'est pas significativement modifié 5 min après le choc ;
  - Diminue remarquablement 10 et 15 min après le choc.

Ainsi, l'absence de PecT induit une diminution de la transcription de ces trois gènes *pel* au cours du temps : son action chez la souche parentale semble s'amoindrir consécutivement à une diminution drastique de la température.

- Suite à une augmentation drastique de la température, le rapport des transcrits :
  - Des gènes *pelB* et *pelD* atteint un maximum 5 min après le choc et cette valeur reste constante 10 et 15 min après le choc ;
  - Du gène *pelE* est élevé et continue d'augmenter jusqu'à 15 min, au moins, après le choc.

L'absence de PecT induit une forte augmentation de la transcription de ces trois gènes *pel* et ceci de manière rapide : son action chez la souche parentale est plus prononcée consécutivement à une augmentation drastique de la température.

Le rapport transcriptionnel des trois gènes *pel* quantifiés dans des cellules non confrontées au choc thermique reste stable (*pelB*) voire augmente (*pelD* et *pelE*) au cours du temps. Ceci dénote que, dans les conditions standards de croissance, l'action de PecT sur les gènes *pel* augmente au fur et à mesure de la croissance.

En conclusion, il apparaît que la thermorégulation de PecT sur les gènes *pel* se met rapidement en place en réponse à des variations de température. Le délai plus long observé pour le passage de 30°C à 21,5°C est certainement lié à la relative forte stabilité des transcrits *pel* dans des cellules cultivées à basses températures.

Par la suite, sachant que PecT exerce une régulation négative sur l'expression de son propre gène (Castillo and Reverchon, 1997), nous nous sommes demandé si pecT était soumis à une thermorégulation comme observé pour tous les gènes cibles de PecT analysés lors de cette étude.

### 7. La production de PecT est thermorégulée

La quantification de l'expression du gène pecT chez la souche parentale a révélé une évolution similaire à celle des gènes *pel* avec toutefois une amplitude de variation moindre (**figure 35A**). L'expression de *pecT* est donc thermorégulée. Par ailleurs, des expériences de quantification *via* la technique du Western-blot ont révélé que l'accumulation de la protéine PecT est thermorégulée de manière cohérente à l'accumulation de ses transcrits (**figure 35B et 35C**). Ainsi, bien que la quantité de PecT soit moins élevée à fortes températures, l'action négative qu'il exerce sur l'expression de ses de ses gènes cibles (*pel, pecT, fliC* et *weaP*) est plus forte. Toutefois, la thermorégulation de l'expression du gène *pecT* semble moins prononcée que celle des gènes *pel*. Une organisation génétique différente de la région promotrice des gènes *pel* pourrait expliquer le contrôle plus fort exercé par PecT sur l'expression de ces gènes.

La stabilité des transcrits de pecT et de la protéine PecT a par la suite été analysée comme précédemment mentionné. Les résultats obtenus ont montré que :

- La stabilité des transcrits *pecT* en fonction de la température est similaire à celle précédemment observée pour les transcrits *pel* et *lpxC* (figure 38) : celle-ci diminue proportionnellement à l'augmentation de la température.
- De même, la protéine PecT s'est révélée relativement stable étant donné qu'une diminution significative de sa quantité n'a été observée aux trois températures de l'étude que 9 heures après l'arrêt de la traduction des protéines cellulaires (figure 40B).

Par conséquent, ni la stabilité des transcrits *pecT*, ni la stabilité de PecT ne semblent avoir un rôle prépondérant dans la thermorégulation impliquant la protéine PecT.

# 8. Influence de la température sur la fixation de PecT aux régions promotrices des gènes *pel*

Afin de savoir si la température influence la fixation de PecT sur ses gènes cibles, nous avons utilisé la technique de l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pour comparer l'efficacité de la formation des complexes entre PecT et l'ADN aux températures précédemment sélectionnées. Ces complexes ont été récupérés en utilisant des anticorps dirigés contre PecT ; la technique de la PCR quantitative a ensuite été utilisée pour quantifier précisément l'ADN contenu dans les différents échantillons.

Nous avons tout d'abord réalisé une première analyse semi-quantitative par la technique de la PCR classique selon les conditions évoquées dans la section « Matériel et Méthode » afin d'évaluer l'impact de l'immunoprécipitation dirigée contre PecT sur l'enrichissement de la région régulatrice du gène *pelE*. La quantité de fragments amplifiés pour *pelE*, après migration sur gel d'agarose, s'est révélée plus faible à 21,5°C puis en augmentation graduelle à 30°C et à 37,5°C dans les échantillons cellulaires « IP » de la souche parentale ayant subi une immunoprécipitation (**figure 42A**). Aucun signal d'amplification significatif n'a en revanche été détecté dans le mutant *pecT* aux trois températures. L'enrichissement obtenu avec la région régulatrice du gène *lpxC* dans la souche parentale, région sur laquelle PecT ne semble pas se fixer spécifiquement, a été utilisée comme référence pour normaliser les résultats concernant les amplifications des régions régulatrices des gènes *pel* et *pecT*.

Les résultats obtenus en Q-PCR quantitative ont montré que PecT interagit plus fortement avec les régions promotrices des gènes *pelB*, *pelD*, *pelE* et *pecT* quand la température augmente (**figure 42B**). En revanche, aucune fixation de PecT sur les régions régulatrices du gène de référence *lpxC* n'a été détectée dans les mêmes conditions. Ces données tendent à montrer que la thermorégulation par PecT se fait *via* une interaction directe avec l'ADN des promoteurs des gènes *pel* et *pecT*. Pour valider ces résultats *in vitro*, il était nécessaire de disposer de la protéine PecT purifiée sous une forme stable.



## Figure 42 : Influence de la température sur la fixation de PecT aux régions promotrices des gènes *pelB*, *pelD*, *pelE*, *pecT* et *lpxC*

La technique de l'immunoprécipitation de la chromatine a été utilisée sur des cellules de la souche parentale et du mutant *pecT* cultivées à 21,5°C, 30°C et 37,5°C. Les fragments d'ADN récupérés avant et après l'étape d'immunoprécipitation dirigée spécifiquement contre PecT ont ensuite été quantifiés en utilisant les techniques basées sur la PCR. La comparaison de ces deux résultats (avant et après immunoprécipitation) permet de représenter le niveau d'enrichissement de la région d'ADN ciblée (*pelB*, *pelD*, *pelE*, *pecT*, *lpxC*). Les couples d'oligonucléotides utilisés ciblent des régions plus ou moins éloignées du site d'initiation de la transcription : de -320 à -115, -340 à -145, -350 à -190, -235 à -75 et -180 à -60 pour les gènes *pelB*, *pelD*, *pelE*, *pecT* et le normalisateur *lpxC*, respectivement.

A. Analyse par migration électrophorétique sur gel d'agarose des amplifiats de la région régulatrice de *pelE* en PCR classique (23 cycles  $\pm 1$ ). Les bandes d'ADN visualisées correspondent aux amplifications obtenues en utilisant comme matrice l'ADN des échantillons non immunoprécipités et l'ADN des échantillons immunoprécipités (T et IP, respectivement) dans les deux contextes génétiques (souche parentale et mutant *pecT*). Le signal observé dans l'échantillon IP à 30°C chez le mutant *pecT* pourrait être dû à un défaut lors de l'immuno-précipitation ; pour corriger cette fixation aspécifique, l'enrichissement obtenu avec la région régulatrice de *lpxC* aux différentes températures a été utilisé pour normaliser les résultats obtenus en Q-PCR.

**B.** Quantification de la fixation de PecT aux régions promotrices des gènes indiqués par la technique de la Q-PCR.

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois résultats obtenus lors d'expériences indépendantes ; les barres d'erreur indiquent l'erreur standard. La fixation de PecT sur les promoteurs des gènes *pel* et *pecT* à 30°C est significativement différente de celle obtenue à 21,5°C et 37,5°C (*P*-values < 0.05).

### **II.** Production et purification de PecT sous une forme stable

### 1. PecT est un régulateur de la famille LysR (LTTR)

L'homodimère protéique PecT, synthétisé par *D. dadantii*, fait partie des régulateurs de la famille LysR (LTTRs) et possède divers homologues chez d'autres espèces bactériennes : RovM chez *Y. pseudotuberculosis*, HexA chez *P. carotovorum* ou encore LrhA chez *E. coli*. Ces protéines partagent en moyenne 65% d'identité et jusqu'à 90% de similarité avec PecT (Lehnen *et al.*, 2002 ; Mukherjee *et al.*, 2000 ; Quade *et al.*, 2011). Les membres de la famille des LTTRs sont organisés en deux domaines : le premier comporte le motif hélice-tour-hélice (HTH) impliqué dans l'interaction avec l'ADN et le deuxième est impliqué dans la liaison à un effecteur/inducteur. Ces deux domaines sont connectés par une longue hélice flexible elle-même impliquée dans la formation d'oligomères protéiques (**figures 43A et 43B**).



1 ... Domaine impliqué dans la fixation à l'ADN (environ 90 aa)

2 ... Région « linker » impliquée dans la dimérisation de la protéine (environ 30 aa)

**3**... Domaine impliqué dans la liaison d'un effecteur (environ 200 aa)

Figure 43 : Prédiction de la structure secondaire de PecT (A) et identification de ses domaines fonctionnels comparativement aux autres régulateurs de la famille des LTTRs (B)

A. La base de données hébergée sur le site de l'institut Max Planck permet de collecter et de compiler les données fournies par différents serveurs d'analyse (<u>http://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2\_d/</u>). Les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  sont surlignés en rose et en bleu, respectivement : les 4 lignes d'analyses proviennent de résultats obtenus par 4 serveurs différents (PSIPRED, JNET, Prof « Ouali », Prof « Rost »). Les signes + signifient que la protéine est prédite pour se localiser dans le compartiment cytoplasmique. Certains domaines protéiques, en raison de leur inaptitude à former des interactions inter-résiduelles, ont une structure tridimensionnelle instable dans des conditions natives. Le serveur IUPred est capable de prédire l'occurrence de ces régions dites « désordonnées », signalées par « D ».

**B.** Les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  sont représentées par les formes cylindriques et les flèches, respectivement. La représentation schématique n'est toutefois pas à l'échelle.

La résolution de la conformation tridimensionnelle du domaine de liaison de l'effecteur de RovM, qui partage environ 85% de similarité avec PecT, a montré que les feuillets  $\beta$  et les hélices  $\alpha$  de ce domaine de liaison ont une localisation interne et externe, respectivement : en effet, les feuillets  $\beta$ sont entourés par les hélices  $\alpha$  (**figure 44**). Quant au motif HTH, il est porté par 95% des protéines de fixation à l'ADN chez les Procaryotes et 100% des régulateurs membres de la famille des LTTRs. Il est formé de 3 hélices empaquetées ; leur interaction avec les groupements phosphates de l'ADN est favorisée par la charge positive des acides aminés qui les constituent.



## Figure 44 : Structure du domaine de liaison de l'effecteur de RovM, l'homologue de PecT chez *Y. pseudotuberculosis*

La structure cristallographique de la protéine RovM de *Y. pseudotuberculosis* a été résolue avec une précision de 2,4 Å (Quade *et al.*, 2011). Celle-ci commence 100 résidus après le premier codon de la traduction ; le domaine de fixation à l'ADN et le linker ne sont donc pas représentés. La flèche indique la cavité occupée par l'effecteur ( $10,5 \times 7,0 \times 6,5$  Å). Ce dernier reste encore non identifié. Il est intéressant de noter que cette protéine membre des LTTRs possède environ 85% de similarité avec la protéine PecT de *D. dadantii*.
#### 2. Optimisation de la production et de la purification PecT sous une forme stable

Afin de pouvoir réaliser des expériences d'interactions entre l'ADN des régions régulatrices des gènes *pel* et la protéine PecT comme précédemment évoqué, nous nous sommes attachés à purifier cette protéine sous une forme stable. La protéine PecT avait déjà été surproduite grâce à un système d'expression pT7.7/K38 et purifiée (Castillo et al., 1998). Cependant, la protéine obtenue était instable et n'a permis qu'une caractérisation relativement limitée du mécanisme d'action de PecT. C'est pourquoi l'utilisation d'un autre système de surproduction s'est avérée nécessaire. Le système pQE/M15 (Qiagen, Hilden, Germany) a été choisi car celui-ci présente l'avantage d'être très adaptable et permet de ce fait de faire varier les différents paramètres connus pour agir sur le repliement de la protéine surproduite, essentiellement la concentration de l'inducteur (IPTG) et la température de croissance. De plus celui-ci utilise l'ARN polymérase bactérienne, moins rapide que la T7 polymérase précédemment utilisée, permettant de mieux contrôler les niveaux de surproduction. Nous avons réalisé des constructions dans les vecteurs pQE32 et pQE70, permettant l'ajout d'une queue polyhistidine en N-terminal et C-terminal, respectivement. Seule la construction dans le plasmide pQE70 a permis de détecter une protéine surproduite, après ajout de l'inducteur, dont la masse moléculaire correspondait à celle du monomère de PecT (environ 35 kDa). Avec la construction dans le plasmide pQE32, nous avons souvent observé des bandes intenses, après ajout de l'inducteur, de taille plus petite que celle de PecT (environ 10 à 12 kDa) ; ceci même après l'ajout d'un cocktail inhibiteur de protéases (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Applied Science). Nous avons donc conclu que l'ajout de la queue poly-histidine à l'extrémité N-terminale de PecT engendrait une protéine recombinante très instable. La construction réalisée dans le plasmide pQE70 a été retenue pour la purification de PecT.

Dans les conditions standards préconisées par le fournisseur (concentration en inducteur (IPTG) de 1 mM et température de croissance de 37°C), une forte quantité de PecT surproduite a été obtenue, mais essentiellement sous forme insoluble. Différents essais ont permis de trouver des conditions de surproduction d'une quantité moindre de PecT mais soluble et stable : température de croissance de 21°C et concentration en IPTG de 0,5 mM. En effet, à basses températures, la traduction par les ribosomes est plus lente, la synthèse des protéases est réduite et la production des protéines chaperonnes est plus importante ; le repliement des protéines est donc plus favorable dans ces conditions. La protéine PecT ainsi surproduite a ensuite été purifiée sur une résine d'affinité au nickel en utilisant le protocole du fournisseur (Qiagen) légèrement modifié par ajout de Nonidet P40 à 0,1% (V/V) (**figure 45**). Ce détergent doux limite la formation d'agrégats protéiques. La présence de ce détergent et la salinité relativement forte du tampon (NaCl 300 mM) ont permis de purifier une proportion raisonnable (environ 40 %) de la protéine surproduite.





Profils électrophorétiques d'extraits cellulaires sur un gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes après coloration au bleu de Coomassie. L'échelle de poids moléculaire (M) est indiquée sur la gauche. La bande de migration correspondant à PecT est signalée par une flèche.

1 : Non induit = fraction cellulaire avant induction ; 2 : Induit = fraction cellulaire après induction ; 3 : Surnageant = fraction cellulaire soluble ; 4 : Culot = fraction cellulaire insoluble ; 5 : Non fixée = fraction soluble non fixée à la résine ; 6 et 7 : 20 mM et 50 mM = fractions solubles fixées aspécifiquement (éluées après 2 traitements successifs avec l'imidazole 20 mM et 50 mM) ; 8 et 9 : Eluats 1 et 2 = fractions pures de PecT obtenues après deux traitements successifs à l'imidazole 250 mM.

#### 3. Etude fonctionnelle de la protéine PecT purifiée

#### a. En utilisant la protéine obtenue via la méthode de purification mise au point

Des résultats antérieurs avaient montré que PecT interagissait spécifiquement *in vitro* avec les régions régulatrices des gènes *pel* de *D. dadantii* et avec celle de son propre gène (Castillo and Reverchon, 1997 ; Castillo *et al.*, 1998). Toutefois, ces études avaient été réalisées avec des régions promotrices des gènes *pel* de taille relativement courte. En effet, ces fragments ne s'étendaient pas, dans la plupart des cas, au-delà de -200 bases du site d'initiation de la transcription. Or les travaux réalisés par la suite sur les protéines de la famille des LTTRs ont montré que ces régulateurs se fixent généralement sur plusieurs sites s'étendant sur de larges portions d'ADN localisés en amont du site d'initiation de la transcription des gènes cibles : leur fixation, qui couvre ainsi plusieurs centaines de bases, favorise la formation de structures en boucles (Belitsky *et al.*, 1995 ; Lochowska *et al.*, 2001 ; Porrúa *et al.*, 2007 ; Viswanathan *et al.*, 2007). Par ailleurs, aucun consensus de fixation n'a jusqu'à présent été clairement identifié pour les régulateurs de type LysR. Toutefois, ces derniers reconnaissent des séquences partiellement dyadiques d'environ 15 paires de bases riches en bases A/T et portant en leur cœur un motif conservé T-N<sub>11</sub>-A (Heroven and Dersch, 2006).

Ces informations prises en compte, nous avons cloné pour les gènes *pelD* et *pelE* des régions régulatrices plus étendues, allant jusqu'à environ -400 bases du site d'initiation de la transcription. Des expériences de retard de migration sur gel, réalisées *in vitro*, ont par la suite été entreprises dans le but

d'évaluer la capacité de la protéine PecT purifiée, selon le protocole établi dans le cadre de cette étude, à interagir avec les deux nouvelles régions opératrices ainsi qu'avec celles déjà disponibles au laboratoire.

Les résultats obtenus avec la protéine fraichement purifiée sont présentés sur la **figure 46**. Ils nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- La fixation de PecT est plus forte sur les grands opérateurs, laissant présager l'existence de site(s) supplémentaire(s) de fixation du régulateur entre les positions -200 bases et -400 bases.
- L'affinité de la protéine PecT est plus élevée pour la région promotrice de *pelD*; ce dernier résultat concorde avec les études antérieures (Castillo *et al.*, 1998).

Malheureusement, les lots de protéines purifiées se sont avérés très instables, des agrégats étant observés 24 h après purification quelle que soit la méthode de conservation : à 4°C ou à température ambiante dans du tampon de purification, à -20°C dans du tampon de purification contenant du glycérol 40 % (V/V).





Migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide à 4% en conditions non dénaturantes et révélation par autoradiographie à l'aide d'un film (Hyperfilm MP Amersham).

0: sonde seule ; de 1 à 5 : sonde en mélange avec PecT à une concentration de 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM et 1  $\mu$ M, respectivement. Les sondes complexées par PecT sont indiquées par un astérisque sur la droite des radiographies obtenues après révélation des gels de polyacrylamide.

#### b. Essais d'optimisation de la stabilisation de PecT

Dans le but d'améliorer la qualité de la protéine PecT, divers ajustements du protocole initial ont été effectués. L'objectif principal résidait en la réduction de la tendance de PecT à former des agrégats, un phénomène certainement favorisé par la présence de quatre acides aminés cystéines dans sa séquence protéique. En effet, dans un contexte cellulaire, la formation des ponts disulfure entre les résidus SH des cystéines est guidée de manière appropriée par les chaperonnes cytoplasmiques. Au contraire, dans les conditions de purification, qui ne sont pas natives, la formation singulière de ponts disulfures peut empêcher une structuration protéique conforme. De ce fait, l'agrégation des protéines est favorisée par l'exposition anormale de résidus hydrophobes qui devraient normalement être « cachés » à l'intérieur de la protéine. Les tentatives d'amélioration de la méthode initialement employée sont récapitulées dans le **tableau VIII** et résident principalement dans :

- L'abaissement de la température de culture afin de réduire plus fortement la vitesse de la traduction, d'optimiser le repliement des protéines traduites et leur prise en charge par les chaperonnes cellulaires;
- L'augmentation de la concentration en sels des tampons de purification et de dialyse qui permet de résoudre la formation d'agrégats protéiques en équilibrant au mieux les charges ioniques de la protéine ;
- L'augmentation de la concentration en agents réducteurs en raison de leur action antioxydante qui défavorise la formation spontanée de ponts disulfure entre les résidus SH de deux cystéines.

Paramètres	Initialement	Changements réalisés
T°C des cultures	21°C	19 ; 16°C
NaCl	300 mM	500 mM ; 600 mM (tampons de purification et de dialyse)
β-mercaptoéthanol	-	2 mM (tampons de purification)
DTT	1 mM	2,5 mM ; 3mM ; 4 mM (tampons de dialyse)
Tampon NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	рН 8	pH 7 et 8 (tampons de purification)
Tris	рН 7,9	pH 7 et 7,9 (tampons de dialyse)

#### Tableau VIII : Récapitulatif des modifications réalisées dans les étapes de purification de PecT dans le but d'améliorer la stabilité de la protéine

Toutes ces modifications ont permis de récupérer une forte quantité de la protéine PecT-6His après les étapes de purification et de dialyse. Toutefois, et ceci de manière inflexible, les tests d'interactions de ces différents lots de protéines avec l'ADN des régions régulatrices des gènes *pel* ont tous abouti à un échec. En effet, dès l'ajout de la protéine PecT, les régions régulatrices restaient bloquées au niveau des puits de dépôt dénotant ainsi la formation d'agrégats de PecT. Les divers changements effectués n'ont apporté aucune amélioration notable voire même ont augmenté l'agrégation. C'est pourquoi, dans le temps imparti, nous avons été contraints d'abandonner ce projet. Nous nous sommes donc penchés sur le second axe du travail qui consiste à rechercher d'autres acteurs impliqués dans la thermorégulation de l'expression des gènes *pel*.

# AXE II : Recherche d'autres molécules impliquées dans la thermorégulation de la virulence chez D. dadantii

III. L'ADN de *D. dadantii* ressent les variations de température et sa dynamique module la fixation de régulateurs transcriptionnels

#### 1. Le niveau de surenroulement de l'ADN est influencé par la température

Chez les Entérobactéries pathogènes des mammifères, la température de croissance est un facteur connu pour influencer le niveau de surenroulement de l'ADN (Hurme and Rhen, 1998 ; Eriksson *et al.*, 2002). Afin de savoir si, chez *D. dadantii*, les températures retenues pour cette étude influencent le niveau d'enroulement de l'ADN, des cellules de la souche parentale portant le plasmide pUC18 ont été cultivées selon les conditions précédemment indiquées. Les plasmides ont été extraits lors d'un stade avancé de la phase exponentielle ( $DO_{600} = 0,6-0,65$  à 21,5°C ; 0,8-0,9 à 30°C et 0,7-0,8 à 37,5°C). La distribution des différents topoisomères extraits des cultures à chaque température a été analysée après séparation par migration électrophorétique sur un gel d'agarose contenant de la chloroquine. Les résultats ont montré que lorsque la température augmente, les topoisomères migrent moins rapidement dans le gel en raison de leur encombrement stérique plus élevé (**figure 47A**). En d'autres termes, des températures élevées ont tendance à relâcher plus fortement l'ADN. La même expérience réalisée chez le mutant *pecT* a montré des niveaux d'enroulement similaires des plasmides extraits à chacune des températures de croissance (**figure 47B**). PecT n'est donc pas impliqué dans la structuration globale de l'ADN.



# Figure 47 : Influence de la température de croissance sur le niveau d'enroulement de l'ADN de *D. dadantii*

Les topoisomères du plasmide pUC18 ont été (i) extraits de cultures de la souche parentale et du mutant *pecT* dérivé réalisées aux trois températures indiquées en milieu minimum M63 supplémenté en glycérol et en PGA puis (ii) séparés par migration électrophorétique sur un gel d'agarose contenant 2,5  $\mu$ g/mL de chloroquine.

A cette concentration de chloroquine, les topoisomères les plus surenroulés négativement migrent plus rapidement dans le gel. Des résultats similaires ont été obtenus lors de trois expériences indépendantes. Le marqueur de taille « GeneRuler 1 kb DNA ladder » (ThermoFisher Scientific, Lithuania) a été utilisé pour visualiser la distribution des topoisomères dans le gel.

#### 2. La fixation de PecT est influencée par le niveau de surenroulement de l'ADN

Etant donné que (i) la fixation de PecT est influencée par la température (voir la partie **I.8** de la section « Résultats ») et que (ii) la température influence le niveau d'enroulement de l'ADN, nous nous sommes questionnés sur l'influence possible du niveau d'enroulement de l'ADN sur la fixation de PecT. Nous trouvant dans l'incapacité de répondre à cette question *in vitro*, nous avons cherché à la clarifier *in vivo*. Pour ceci, nous nous sommes attachés à mimer l'effet de la température sur le niveau d'enroulement de l'ADN, *id est* un relâchement, pour une température constante. Pour ce faire, nous avons utilisé la novobiocine, un antibiotique qui inhibe l'ADN gyrase bactérienne et qui induit par conséquent un relâchement de l'ADN (Maxwell, 1997). Préalablement, nous avons vérifié l'effet de la novobiocine sur le niveau d'enroulement de l'ADN chez la souche parentale et chez le mutant *pecT* aux températures extrêmes de l'étude (21,5°C et 37,5°C) (**figure 48**).

bec7 that is the second state of the second st

#### Figure 48 : Effet de la novobiocine sur le niveau d'enroulement de l'ADN chez la souche parentale et le mutant *pecT*

Des cultures de la souche parentale et du mutant *pecT* portant le plasmide pUC18 ont été réalisées en milieu minimum M63 supplémenté en glycérol et en PGA aux températures indiquées jusqu'à une phase de croissance exponentielle avancée (DO d'environ 0,6 à 21,5°C et 0,8 à 37,5°C). Une partie des cultures cellulaires a été traitée pendant 15 min avec une concentration sublétale de novobiocine (100 µg/mL) et l'autre partie a conservé des conditions de croissance standard. Les topoisomères des plasmides ont été extraits des cellules traitées (+) et non traitées (-) et séparés par migration électrophorétique sur un gel d'agarose contenant 2,5 µg/mL de chloroquine. A cette concentration de chloroquine, les topoisomères les plus surenroulés négativement migrent plus rapidement dans le gel. Des résultats similaires ont été obtenus lors de trois expériences indépendantes. Le marqueur de taille « GeneRuler 1 kb DNA ladder » (ThermoFisher Scientific, Lithuania) a été utilisé pour visualiser la distribution des topoisomères dans le gel.

Comme prévu, l'ajout de novobiocine induit un relâchement important de l'ADN cellulaire à  $21,5^{\circ}$ C. Toutefois celui-ci est moindre à  $37,5^{\circ}$ C, certainement en raison d'un relâchement déjà prononcé de l'ADN à cette température. En raison de la fixation moins propice de PecT à  $21,5^{\circ}$ C (par comparaison à  $30^{\circ}$ C et à  $37,5^{\circ}$ C) et du niveau de surenroulement négatif plus important de l'ADN dans cette condition, nous nous sommes restreints à la température de  $21,5^{\circ}$ C pour l'analyse de l'impact du relâchement de l'ADN sur la fixation de PecT. La souche parentale et le mutant *pecT* cultivés à cette température ont été soumis à un traitement par la novobiocine durant 15 min. Des échantillons ont par la suite été prélevés pour l'extraction des transcrits et pour l'immunoprécipitation de la chromatine.

Dans un premier temps, j'ai utilisé la RT-Q-PCR pour évaluer l'impact du relâchement de l'ADN sur la répression de l'expression des gènes *pel* par PecT (**figure 49A**). Dans un second temps, j'ai évalué l'impact du relâchement de l'ADN sur la fixation de PecT aux promoteurs des gènes *pel* en utilisant la technique de la Q-PCR pour quantifier les fragments spécifiquement immunoprécipités avec les anticorps anti-PecT (**figure 49B**).



Figure 49 : Influence du niveau d'enroulement de l'ADN sur la répression exercée par PecT sur l'expression des gènes *pel* 

A. Impact de l'inhibition de l'ADN gyrase sur la répression de l'expression des gènes régulés par PecT. Les bactéries ont été cultivées à 21,5°C jusqu'à un stade avancée de la phase de croissance exponentielle. Les cultures ont été traitées avec une concentration sublétale de novobiocine (100  $\mu$ g/mL) et des échantillons ont été récupérés 15 min après le traitement afin de quantifier les transcrits par la méthode de la RT-Q-PCR. Le gène *lpxC* a été utilisé comme référence pour la normalisation. Pour chaque gène, les expressions relatives ont été calculées en divisant la valeur de quantification obtenue dans le mutant *pecT* sur celle obtenue dans la souche parentale.

Chaque valeur représente la moyenne de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. La répression exercée par PecT sur l'expression des gènes *pel* consécutivement au relâchement de l'ADN est différente de celle exercée sur l'expression de ces gènes dans des conditions standards de croissance (P-values < 0,05).

**B.** Impact de l'inhibition de l'ADN gyrase sur la fixation de PecT sur les promoteurs de ses gènes cibles. La quantification de la fixation de PecT a été réalisée en utilisant la technique de l'immunoprécipitation de la chromatine 15 min après l'ajout de novobiocine (100  $\mu$ g/mL) couplée à la Q-PCR. Les niveaux d'enrichissement ont été calculés relativement aux niveaux d'enrichissement de la région régulatrice du gène *lpxC*.

Chaque valeur représente la moyenne de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. La fixation de PecT aux promoteurs des gènes *pel* et *pecT* consécutivement au relâchement de l'ADN est différente de celle réalisée dans des conditions standards de croissance (*P*-values < 0.05).

Tout d'abord, les quantifications en RT-Q-PCR ont révélé que la différence d'expression des trois gènes *pel* analysés (*pelD*, *pelE* et *pelB*) entre la souche parentale et le mutant *pecT* augmente après une induction du relâchement de l'ADN, par comparaison à une situation standard *id est* sans relâchement (**figure 49A**). En d'autres termes, la répression exercée par PecT sur l'expression de ces trois gènes *pel* est renforcée par le relâchement de l'ADN alors que l'expression du gène de référence *lpxC* ne varie pas significativement. De manière complémentaire, la quantification en Q-PCR quantitative des fragments d'ADN complexés à PecT a révélé que PecT se fixe plus efficacement aux régions régulatrices des gènes *pelB*, *pelD* et *pecT* lorsque l'ADN est relâché, par comparaison à la région régulatrice du gène *lpxC* (**figure 49B**). Ainsi, le relâchement de l'ADN augmente la fixation de PecT sur les régions promotrices des gènes *pel* ce qui conduit à une plus forte répression de leur expression (**figure 50**). Par conséquent, les variations du niveau de surenroulement induites par la température modulent la fixation de PecT sur ses gènes cibles.



# Figure 50 : Modèle de la régulation de la synthèse des pectate lyases par la température chez *D. dadantii*.

Les lignes se terminant par un trait symbolisent un mécanisme répressif ; les flèches en pointillées et pleines situées sous les gènes signalent un faible et un fort taux de transcription, respectivement. Les formes inactive et active du répresseur PecT sont indiquées par un «i» et un «a» en indice aux températures basse et élevée, respectivement. А basses températures, la fixation de PecT est défavorisée, au moins en partie, par

le fort niveau d'enroulement de l'ADN. De manière additionnelle, son inactivation à basses températures pourrait diminuer son affinité aux régions promotrices des gènes *pel*. Par conséquent, la synthèse des Pels est élevée lorsque la température de l'environnement dans lequel *D. dadantii* se trouve est faible. Des températures plus élevées induisent un relâchement de la structure de l'ADN bactérien et certainement une activation de la protéine PecT : PecT se fixe alors de manière efficace aux régions promotrices des gènes *pel* et réprime fortement leur expression.

## IV. Influence des protéines associées au nucléoïde dans la réponse à la température et dans la virulence chez *D. dadantii* (résultats non publiés)

Comme précédemment indiqué (**figures 35A** et **36**), l'expression des gènes cibles de PecT continue de varier en fonction de la température dans le mutant *pecT*. Ainsi la thermorégulation de ces gènes n'est pas totalement abolie dans le mutant *pecT*. Ce constat nous a incités à rechercher d'autres éventuels acteurs de ce contrôle. Nous avons focalisé notre attention sur les NAPs majeures Fis et IHF en raison de leur implication dans la dynamique de la chromatine bactérienne. Ce choix a été dicté par le rôle essentiel de Fis dans l'homéostasie de la topologie des promoteurs des gènes *pel* (Ouafa *et al.*, 2012) et par la présence de sites de fixation de IHF dans les régions régulatrices de *pecT* et des gènes *pel* (Castillo A., thèse 1997, Univ. Paris 7-Denis Diderot, Paris).

## 1. La répression de la synthèse des Pels par Fis est plus importante à basses températures

En plus des gènes *pel*, Fis réprime la synthèse de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire (EPS, cellulose) (Lautier and Nasser, 2007 ; Prigent-Combaret *et al.*, 2012). L'inactivation de Fis induit par conséquent la formation d'agrégats par les cellules en culture. Cette agrégation particulièrement prononcée en présence de glycérol est incommodante pour le suivi de la croissance cellulaire. Nous avons donc substitué le glycérol par du saccharose qui induit moins la formation d'agrégats que le glycérol pour les études avec le mutant *fis* (Lautier and Nasser, 2007). Comme précédemment décrit, Fis est impliqué dans la régulation phase de croissance-dépendante des gènes *pel* (Lautier *et al.*, 2007). Afin d'analyser l'impact de Fis dans la thermorégulation de la synthèse des Pels, des cultures de la souche sauvage et du mutant *fis* ont été incubées aux mêmes températures que celles précédemment retenues et des échantillons cellulaires ont été prélevés au début, au milieu et à la fin de la phase exponentielle de croissance :

- Pour le stade précoce : 0,2-0,25 à 21,5°C ; 0,3-0,4 à 30°C ; 0,3-0,35 à 37,5°C ;
- Pour le stade intermédiaire : 0,6-0,65 à 21,5°C ; 0,8-0,9 à 30°C ; 0,7-0,8 à 37,5°C ;
- Pour le stade tardif : 0,9-1 à 21,5°C ; 1,4-1,5 à 30°C ; 1,3-1,4 à 37,5°C.

La quantification de l'activité Pel de ces échantillons a montré que, comme précédemment observé en présence de glycérol, la synthèse des Pels diminue chez la souche sauvage de *D. dadantii* quand la température augmente et ceci pour chacun des stades de croissance analysés : la **figure 51A** présente le niveau de synthèse des Pels mesuré lors du stade intermédiaire à chaque température de croissance. De la même manière, la synthèse des Pels diminue chez le mutant *fis* avec l'augmentation de la température et reste toujours supérieure à celle de la souche sauvage dans chacune des conditions de l'analyse. Cette dérépression est expliquée par l'inactivation de Fis qui exerce un contrôle négatif

sur la synthèse des Pels (Lautier and Nasser, 2007). La **figure 51B** présente les rapports obtenus en divisant l'activité Pel du mutant *fis* par celle de la souche sauvage dans les différentes conditions. Ce rapport permet d'apprécier l'évolution de la répression réalisée par Fis chez la souche sauvage (i) en fonction de la température mais aussi (ii) selon le stade de la croissance.



#### Figure 51 : Influence de la température sur la synthèse des Pels chez la souche sauvage de *D*. *dadantii* et le mutant *fis* dérivé

Les cellules bactériennes de la souche sauvage (WT) et du mutant *fis* dérivé ont été cultivées aux trois températures indiquées en milieu minimum M63 additionné de saccharose (2 g/L) et de PGA (4g/L). L'activité spécifique Pel (AS Pel) d'extraits cellulaires prélevés à différents stades de la croissance exponentielle a été quantifiée chez les deux souches aux trois températures de l'étude. Ces stades sont dits précoce, intermédiaire et tardif et sont définis par les DO moyennes suivantes : 0,2 à 21,5°C et 0,3 à 30°C et 37,5°C ; 0,6 à 21,5°C et 0,8 à 30°C et à 37,5°C ; 1 à 21,5°C et 1,4 à 30°C et 37,5°C, respectivement.

**A.** AS Pel de la souche sauvage et du mutant *fis* aux différentes températures lors de la phase exponentielle intermédiaire de croissance. L'AS Pel est exprimée en µmol d'oligogalacturonides libérés par min et par mg de poids sec bactérien.

Chaque valeur représente la moyenne de deux expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. Les AS Pel obtenues dans chaque contexte génétique (souche sauvage et mutant *fis*) à 21,5°C et 37,5°C sont différentes de celles obtenues à 30°C (*P*-values < 0,05).

**B.** Evolution de l'AS Pel du mutant *fis* par comparaison à celle de la souche sauvage au cours de la croissance exponentielle bactérienne. Les rapports aux différentes températures et aux différents stades de la croissance exponentielle sont calculés en divisant l'AS Pel obtenue chez le mutant *fis* par celle obtenue chez la souche parentale. La valeur de rapport obtenue permet d'estimer la variabilité de l'action exercée par Fis sur la synthèse des Pels selon le stade de croissance et la température.

Chaque valeur représente la moyenne de deux expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'AS Pel obtenue chez le mutant *fis* est significativement différente de celle obtenue chez la souche parentale (*P*-values < 0,05), exceptée lors de la phase exponentielle tardive de croissance à 30°C et à  $37,5^{\circ}$ C (*P*-values > 0,05).

Les résultats obtenus montrent que globalement la répression par Fis est plus prononcée à 21,5°C et que les niveaux de répression observés à 30 et 37°C sont sensiblement équivalents. L'action

moindre de Fis dans la phase exponentielle tardive est certainement due à la diminution de sa concentration cellulaire à ce stade de la croissance. Ainsi contrairement à PecT qui était plus actif à hautes températures, Fis agit plus fortement à basses températures.

De ce fait, nous nous sommes demandé quels sont les mécanismes utilisés par Fis pour moduler l'expression des gènes *pel* à basses températures.

## 2. L'expression du gène *fis* est plus favorable à basses températures lorsque le niveau de surenroulement de l'ADN est élevé

Pour répondre à cette question, j'avais prévu d'utiliser la même approche que celle mise en œuvre pour PecT *id est* évaluer simultanément et l'impact de Fis sur l'expression des gènes *pel* et sa fixation sur leur région promotrice dans des cellules cultivées aux différentes températures de croissance. Préalablement à ces expériences, j'ai testé la spécificité des 2 lots d'anticorps dirigés contre la protéine Fis d'*E. coli* que nous a gracieusement fourni notre collaborateur Allemand (G. Muskhelishvili, Jacobs Univ. Bremen, Germany). Les 2 lots d'anticorps testés ne se sont pas avérés de qualité suffisante pour des expériences de ChIP, même après leur purification *via* la protéine Fis. Nous avons donc décidé d'arrêter momentanément ces expériences et d'initier la production d'anticorps dirigés contre la protéine Fis de *D. dadantii* qui a été purifiée dans notre laboratoire.

Disposant des ADNc précédemment utilisés pour la caractérisation du mécanisme d'action de PecT, je me suis intéressée à l'impact de la température sur l'expression du gène *fis* dans la souche parentale et dans le mutant *pecT*. Il est apparu que l'expression de *fis* est induite à basses températures dans les 2 contextes génétiques mais avec toutefois une intensité plus forte dans la souche parentale que dans le mutant *pecT*. Par contre, aucune différence significative n'a été observée dans les transcrits *fis* quantifiés à 30 et à 37,5°C (**figure 52A**). La forte expression de *fis* à 21,5°C serait certainement liée au fort niveau d'enroulement de l'ADN observé à cette température. Cette hypothèse est confortée par la diminution de l'expression de *fis*, notamment dans la souche parentale, après l'induction du relâchement de l'ADN par la novobiocine à 21,5°C (**figure 52B**). De plus, il a été montré chez *E. coli* que l'expression de *fis* était induite par de l'ADN superenroulé (Schneider *et al.*, 2000). La synthèse plus importante des Pels dans le mutant *fis* à 21,5°C pourrait être due à une action plus importante de Fis, directement liée à sa concentration cellulaire plus élevée, sur l'expression des gènes *pel*. Par ailleurs, l'inactivation de PecT diminue sensiblement l'expression de *fis* à 21,5°C ; toutefois le mécanisme impliqué dans cette régulation positive de l'expression de *fis* a 21,5°C ; toutefois le mécanisme impliqué dans cette régulation positive de l'expression de *fis* a 21,5°C ; toutefois le mécanisme impliqué dans cette régulation positive de l'expression de *fis* est certainement indirect car PecT n'a jusqu'à présent été identifié qu'en tant que répresseur transcriptionnel chez *D. dadantii*.



#### Figure 52 : Dépendance transcriptionnelle du gène *fis* vis-à-vis de la température, de PecT et du niveau de surenroulement de l'ADN

A. Les cellules de la souche parentale et du mutant *pecT* ont été cultivées aux trois températures indiquées en milieu minimum M63 additionné de glycérol (2 g/L) et de PGA (4g/L). Lors de la phase exponentielle de croissance (DO environ de 0, 6 pour les cultures à 21,5°C et 0,8 pour les cultures à 30°C et à 37,5°C), des échantillons cellulaires ont été prélevés afin de quantifier les transcrits par la technique de Q-RT-PCR. Le gène *lpxC* a été choisi comme gène référence pour la normalisation.

Les données présentées sont les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'expression du gène *fis* obtenue à 21,5°C dans chaque contexte génétique est différente de celle obtenue à 30°C et à 37,5°C (*P*-values < 0.05). Par ailleurs, l'expression du gène *fis* obtenue à 30°C et à 37,5°C dans la souche parentale n'est pas différente de celle obtenue aux mêmes températures dans le mutant *pecT* (*P*-values > 0.05)

**B.** Impact de l'inhibition de l'ADN gyrase sur l'expression du gène *fis* chez la souche parentale et chez le mutant *pecT*. Les bactéries ont été cultivées à 21,5°C jusqu'à un stade avancée de la phase de croissance exponentielle. Les cultures ont été traitées avec une concentration sublétale de novobiocine (100  $\mu$ g/mL) et des extraits ont été récupérés 15 min après le traitement afin de quantifier les transcrits par la méthode de la RT-Q-PCR. Le gène *lpxC* a été utilisé comme référence pour la normalisation (**figure 49**).

Chaque valeur représente la moyenne de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'expression du gène *fis* quantifiée dans les cellules de la souche parentale traitées à la novobiocine est différente de celle quantifiée dans les cellules non traitées (*P*-values < 0,05).

## 3. Action de Fis dans la modulation du niveau d'enroulement de l'ADN par la température

Comme précédemment évoqué, des études récentes (Ouafa *et al.*, 2012) ont montré que, chez *D. dadantii*, Fis a un rôle primordial dans l'homéostasie du niveau de surenroulement de l'ADN des gènes *pel* : ceci permettrait de tamponner les variations structurales des promoteurs de ces gènes pour optimiser leur expression. Afin d'évaluer l'action de Fis sur le niveau d'enroulement de l'ADN à basses températures, des cellules de la souche sauvage et du mutant *fis* dérivé portant le plasmide pUC18 ont été cultivées aux trois températures de l'étude. Les plasmides ont ensuite été extraits lors d'un stade avancé de la phase exponentielle (DO600 = 0,6-0,65 à  $21,5^{\circ}$ C; 0,8-0,9 à  $30^{\circ}$ C et 0,7-0,8 à  $37,5^{\circ}$ C). La distribution des différents topoisomères extraits à chaque température de culture a été analysée comme précédemment effectué (séparation par migration électrophorétique sur un gel d'agarose contenant de la chloroquine). Lors de cette analyse, la qualité des plasmides extraits s'est révélée faible ; celle-ci n'a pu être améliorée malgré plusieurs essais. Toutefois, l'analyse des résultats obtenus a montré que (**figure 53**) :

- De manière comparable à ce qui a été observé chez la souche parentale A350, le relâchement de l'ADN s'intensifie quand la température de croissance augmente chez la souche sauvage ;
- Chez le mutant *fis* dérivé, le niveau d'enroulement de l'ADN, qui semble similaire à celui de la souche sauvage à 37,5°C et sensiblement plus surenroulé à 30°C, paraît plus relâché à 21,5°C.





Les topoisomères du plasmide pUC18 ont été (i) extraits de cultures de la souche sauvage (WT) et du mutant *fis* dérivé réalisées aux trois températures indiquées en milieu minimum M63 supplémenté en saccharose et en PGA puis (ii) séparés par migration électrophorétique sur un gel d'agarose contenant 2,5 µg/mL de chloroquine. A cette concentration de chloroquine, les topoisomères les plus surenroulés négativement migrent plus rapidement dans le gel. Bien que de moindre qualité, des résultats semblant similaires ont été obtenus lors de deux expériences indépendantes. Le marqueur de taille « GeneRuler 1 kb DNA ladder » (ThermoFisher Scientific, Lithuania) a été utilisé pour visualiser la distribution des topoisomères dans le gel.

Ainsi, Fis, en augmentant le surenroulement de l'ADN à basses températures augmenterait l'expression de son propre gène de manière à limiter en retour la production des Pels dans ces conditions (**figure 54**).



#### Figure 54 : Modèle de l'action des régulateurs Fis et PecT en réponse aux variations de la température chez *D. dadantii*

A basses températures (gauche), le niveau de surenroulement négatif est (i) fa vorable à l'expression du gène *fis* et donc à la synthèse de Fis et (ii) défavorable à la fixation de PecT sur ses gènes cibles. Afin de compenser l'absence de répression de l'expression des gènes *pel* par PecT, Fis pourrait aussi réprimer plus fortement l'expression de ces derniers de manière à prévenir un emballement de la production des Pels.

A fortes températures (droite), le relâchement de l'ADN est plus intense ; la transcription de *fis* en est défavorisée et de ce fait l'accumulation de Fis est plus faible. Dans ce contexte, le régulateur PecT se fixe fortement sur ses promoteurs cibles et réprime l'expression des gènes correspondants (tels que les gènes *pel*).

## 4. La protéine IHF de *D. dadantii* active la mobilité et la synthèse des enzymes dégradatives extracellulaires

Parallèlement aux travaux sur l'implication de *fis* dans la thermorégulation des gènes *pel*, j'ai initié la caractérisation génétique des mutants *him* de *D. dadantii*. Un mutant *himA*, inactivé pour la sous-unité HimA de la protéine IHF, nous avait été auparavant fourni par l'équipe de M. Faelen (Univ. Libre de Bruxelles, Belgique) mais n'avait toutefois pas été caractérisé. J'ai dans un premier temps transduit cette mutation dans la souche 3937 utilisée au laboratoire. J'ai parallèlement essayé de construire le mutant *himD*, inactivé pour la sous unité HimD. Malgré plusieurs tentatives en utilisant des méthodes variées, le mutant *himD* n'a pu être obtenu. La difficulté pour obtenir ce mutant pourrait

certainement être liée à l'implication de HimD dans des fonctions importantes pour la croissance de D. dadantii. En effet il avait été rapporté par M. Faelen et son équipe (Douillie et al., 1994) que les mutants himA et himD de D. dadantii avaient une croissance très ralentie par rapport à celle de la souche parentale. A l'opposé, chez E. coli ou Salmonella enterica, l'inactivation de HimA et de HimD n'a que peu d'impact sur la croissance cellulaire (Douillie et al., 1994 ; Mangan et al., 2006). Une méthode consistant à introduire dans la souche sauvage 3937 deux plasmides, l'un à fort nombre de copies portant le gène himD inactivé et l'autre à faible nombre de copies portant l'allèle sauvage, est actuellement testée au laboratoire. La présence de l'allèle sauvage de himD sur un plasmide pourrait faciliter l'inactivation de la copie chromosomique par recombinaison homologue avec l'allèle inactivé porté par le plasmide à haut nombre de copies, instable chez D. dadantii. Cette stratégie a précédemment été utilisée pour la construction des mutants hns et fur de D. dadantii (Franza et al., 1999 ; Nasser et al., 2001). Etant donné que le mutant himA précédemment construit n'avait été analysé que pour la croissance (taux de croissance plus faible que celui de la souche parentale) et pour sa sensibilité au phage Mu (Douillie et al., 1994), j'ai analysé l'impact de cette mutation sur les fonctions de virulence de D. dadantii. J'ai dans un premier temps comparé sur milieux solide et semisolide la mobilité et la synthèse des enzymes dégradatives de la souche parentale et du mutant himA (figure 55).





A. Cultures de la souche parentale et du mutant *himA* réalisées en milieu minimum M63 à 30°C. Les petits points blancs visualisés dans les cultures du mutant *himA* correspondent aux agrégats bactériens. Lors de leur incubation, les cultures sont agitées à une vitesse de 220 rpm ; lorsque l'agitation est arrêtée, les agrégats sédimentent et ont tendance à former des pelotes. **B** ; **C**. Réduction de la motilité liée à l'absence de IHF $\alpha$ , codée par *himA*. Une colonie de chaque souche est piquée au centre d'un milieu riche Luria Bertani semi-solide (4 g/L) et incubée pendant environ 16 heures à 30°C. Dans ce milieu à faible concentration en agar, les bactéries sont capables de se déplacer. Le diamètre des surfaces colonisées par la souche sauvage et le mutant *himA* a été mesuré et les moyennes obtenues ont été reportées graphiquement. Chaque valeur représente la moyenne de

quatre expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. La motilité du mutant *himA* est différente de celle de la souche sauvage (*P*-values < 0,05). **D**. Des colonies de la souche parentale et du mutant *himA* ont été « patchées » sur une boîte « matrice » et incubées pendant environ 24 heures à 30°C. La boîte matrice a ensuite été répliquée sur différents milieux : milieu minimum M63 additionné de CarboxyMéthyl-Cellulose (CMC) (**a** et **b**), de PGA (**c**) et sur milieu riche Luria-Bertani additionné de lait en raison de sa forte teneur en protéines (**d**). **a**. Production de composés biologiques de surface. En raison de la forte hygroscopie du CMC, *D. dadantii* produit des molécules de surface (signalées par une flèche) lui permettant de s'entourer de films hydriques **b** ; **c**. Tests des activités cellulase et pectinase. La dégradation de la CMC et du PGA est remarquée par la présence d'un halo contrasté autour des « patches » après révélation par recouvrement du milieu solide avec une solution de rouge congo et d'acétate de cuivre, respectivement. **d**. Test de l'activité protéase. La dégradation des protéines du lait est remarquée par la présence d'un halo translucide autour des « patches ». Des résultats similaires ont été obtenus lors de quatre expériences indépendantes.

Ce mutant se caractérise par une mobilité réduite (**figures 55B** et **55C**) et par une très forte diminution de la synthèse des pectinases, cellulases et protéases (**figures 55Db**, **55Dc** et **55Dd**). Comme précédemment évoqué pour *fis*, le mutant *himA* présente également une forte capacité d'agrégation dans les cultures en milieu liquide et une faible capacité de rétention en eau, laissant présager une répression de la synthèse de polymères de surface tels que la cellulose ou les exopolysaccharides (**figures 55A** et **55Da**). La protéine IHF aurait donc un rôle clé dans l'activation de la mobilité et la synthèse d'enzymes dégradatives extracellulaires. En revanche, elle serait un répresseur de structures impliquées dans l'agrégation de *D. dadantii*.

Afin de quantifier l'impact de l'inactivation de HimA sur la synthèse des Pels, la souche sauvage et le mutant *himA* ont été cultivées à 30°C en milieu minimum additionné de saccharose (2 g/L) et de PGA (4 g/L) et des échantillons ont été prélevés à différents niveaux de la croissance (phase exponentielle précoce et tardive et phase stationnaire de croissance). Ces analyses ont révélé que l'inactivation de HimA induit une diminution de la synthèse des Pels de 10 fois, durant la phase de croissance exponentielle avancée, à 2 fois durant la phase stationnaire avancée par comparaison à la souche sauvage (**figure 56**).



#### Figure 56 : Production des Pels à différents stades de croissance chez la souche sauvage et le mutant *himA*

Les cellules bactériennes ont été cultivées à 30°C en milieu minimum M63 additionné de saccharose (2 g/L) et de PGA (4 g/L). L'activité spécifique Pel (AS Pel) est exprimée en µmol d'oligogalacturonides libérés par min et par mg de poids sec bactérien. L'AS Pel d'échantillons cellulaires prélevés à différents stades de la croissance a été quantifiée chez les deux souches ; ceux-ci correspondent à des phases exponentielles précoce et tardive et à une phase stationnaire tardive de la croissance bactérienne.

Les phases exponentielles (PE) sont définies par les DO moyennes suivantes : 0,1-0,2 et 1,1-1,4 pour le mutant *himA* et la souche sauvage respectivement ; la phase stationnaire (PS) tardive a été mesurée à partir d'extraits de

cultures prélevés après 24 heures de multiplication cellulaire. La valeur du rapport AS Pels WT / himA ( $\Delta$ ) est indiquée sur la figure.

Chaque valeur représente la moyenne de deux expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'activité spécifique Pel du mutant *himA* obtenue lors des phases exponentielle tardive et stationnaire est différente de celle de la souche sauvage lors des mêmes phases (P-values < 0,05).

J'ai par la suite évalué l'impact de HimA dans la capacité de *D. dadantii* à former des structures de type biofilm en milieu liquide. Pour ce faire, les souches ont été cultivées avec une très faible agitation, condition favorable à la formation de ces structures en raison, entre autres, de la relative faible oxygénation du milieu. Après 48 h environ de culture, il a été constaté que le mutant *himA* produisait 4 fois plus de biofilm que la souche parentale (**figure 57A et 57B**). Chez *D. dadantii*, la protéine HimA s'avère donc impliquée dans la régulation de la synthèse des enzymes dégradatives mais aussi dans celle des fonctions de colonisation des surfaces.



# Figure 57 : Impact des protéines PecT et IHF dans la formation de structures d'adhérence lors de cultures liquides de *D. dadantii*

**A.** Les cellules de la souche sauvage 3937 et des mutants *himA*, *pecT* et *himA-pecT* ont été cultivées en milieu minimum M63 Sac et incubées à 30°C pendant 48 h avec une agitation lente (environ 80 rpm).

**B.** Pourcentage de cellules en biofilms. Les cellules engagées dans les biofilms et les cellules sessiles ont été séparées délicatement ; les biofilms ont été resuspendus dans un volume de milieu équivalent et la densité cellulaire de chacune des fractions a été quantifiée par mesure de l'absorbance à 600 nm. Chaque valeur représente la moyenne de deux expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. Le pourcentage d'adhérence de chacune des souches analysées diffère de celui de la souche sauvage (*P*-values < 0,05).

#### 5. IHF module l'expression du gène *pecT*

Des analyses antérieures avaient suggéré la présence de sites de fixation de IHF dans les régions régulatrices des gènes *pecT* et *pel* (Castillo A., thèse 1997, Univ. Paris 7-Denis Diderot, Paris). Cette analyse a été améliorée via le serveur « Prodoric » dont la base de données recense les consensus de fixation de plus de 150 protéines de fixation aux promoteurs procaryotes. De manière intéressante, les régions régulatrices des gènes *pecT* et *pel* possèdent plusieurs sites de fixation putatifs pour IHF. Dans le cas du gène *pecT*, un de ces sites est localisé entre les régions d'ADN appelées R1 et R2

jouant un rôle déterminant dans l'autorégulation négative de PecT (**figure 58**). En effet, la suppression de l'une ou de l'autre de ces régions annule totalement la répression exercée par PecT sur son propre gène (Castillo and Reverchon, 1997). En raison d'une part de la courbure induite par la fixation de IHF (jusqu'à 180°C) et d'autre part de la capacité des régulateurs de type LysR à se fixer sur de larges segments d'ADN, nous nous sommes demandé si la fixation de IHF ne pourrait pas favoriser la formation d'une boucle *via* des contacts entre les régions R1 et R2. Une telle structure pourrait expliquer la nécessité de la présence de ces 2 régions pour la répression de PecT sur son propre gène (Castillo and Reverchon, 1997).





Pour analyser l'impact de la mutation *himA* sur l'expression de *pecT*, j'ai transduit la fusion transcriptionnelle du mutant *pecT::uidA*-Cm (*D. dadantii* 4116) dans le mutant *himA*. La comparaison de l'activité ß-glucuronidase, codée par le gène *uidA*, dans les contextes de la souche sauvage et du mutant *himA*, a révélé une augmentation d'environ 2 fois de cette activité enzymatique durant la phase exponentielle précoce de croissance (**figure 59A**). Ainsi, IHF réprimerait sensiblement l'expression de *pecT* de manière précoce lors de la croissance bactérienne. L'analyse de l'activité Pel de ces deux souches a révélé que la synthèse des Pels du double mutant *himA-pecT* était similaire à celle du mutant *himA* (**figure 59B**). Ces résultats suggèrent que l'action de IHF sur la synthèse des Pels est dominante par rapport à celle de PecT bien que la possibilité d'une action indirecte *via* la répression de la synthèse de PecT reste envisageable (**figure 60**).



Figure 59 : Influence de l'inactivation de HimA sur l'activité transcriptionnelle du gène pecT

La souche sauvage et les mutants *himA*, *pecT* et *himA-pecT* ont été cultivés et des échantillons ont été prélevés de la même manière que mentionné dans la légende de la **figure 57**. Les activités spécifiques Pel (AS Pel) et GUS (AS GUS) sont exprimées en  $\mu$ mol d'oligogalacturonides / de p-nitrophénol libérés par min et par mg de poids sec bactérien, respectivement. Concernant les mutants *himA-pecT* et *pecT*, les prélèvements ont été réalisés de manière identique à ceux indiqués dans la légende de la **figure 57** pour le mutant *himA* et la souche sauvage, respectivement.

A. AS GUS des mutants *pecT* et *himA-pecT*. Le gène *pecT* est en fusion transcriptionnelle avec le gène codant la  $\beta$ -glucuronidase (*uidA*). Chaque valeur représente la moyenne de deux expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'AS GUS du mutant *pecT* obtenue lors de la phase exponentielle précoce de croissance est différente de celle du mutant *himA-pecT* à ce stade (*P*-values < 0,05).

**B.** AS Pel de la souche sauvage et des mutants simples et double *pecT*, *himA* et *himA-pecT*. Chaque valeur représente la moyenne de deux expériences indépendantes ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard. L'AS Pel du mutant *pecT* obtenue à tous les stades de croissance est différente de celle de la souche sauvage et des mutants *himA* et *himA-pecT* (*P*-values < 0,05). L'AS Pel du mutant *himA* quantifiée à tous les stades de croissance n'est pas différente de celle du mutant *himA-pecT* aux mêmes stades (*P*-values > 0,05). Les AS Pel des mutants *himA* et *himA-pecT* obtenues lors des phases exponentielle tardive et stationnaire sont différentes de celles obtenues pour la souche sauvage aux mêmes phases (*P*-values < 0,05).

Le mutant *pecT* forme des agrégats lors des cultures en milieu liquide (Surgey *et al.*, 1996) mais aucune implication de ce régulateur dans la formation des structures de type biofilm de *D. dadantii* n'a été rapportée dans la littérature. J'ai constaté au cours de ce travail que le double mutant *himA-pecT* avait une capacité d'agrégation particulièrement forte. J'ai donc voulu regarder si PecT était également impliqué dans la formation de structure de type biofilm. Les cultures réalisées dans les conditions de faible agitation ont effectivement montré que le mutant *pecT* produisait environ 3 fois plus de biofilm que la souche parentale (**figures 57A et 57B**). L'action de HimA et de PecT sur la

formation de ces structures semble additive au vu de la quantité plus forte de biofilm produit par le double mutant *himA-pecT* (6 fois plus que la souche parentale) que celles obtenues dans les mutants simples *himA* et *pecT* (figure 57A et 57B).

Dans un second temps, j'ai cherché à évaluer l'implication de IHF dans la thermorégulation des gènes *pel*. Les résultats obtenus n'ont pas fait apparaître de profils de synthèse Pels divergents entre la souche sauvage et le mutant *himA* en fonction de la température, tel que précédemment observé avec le mutant *pecT*. Par ailleurs, aux trois températures analysées, la synthèse des Pels mesurée s'est révélée plus faible. Toutefois, la croissance des mutants *himA* et *himA-pecT* est très affectée par les conditions de culture et ces souches s'agrégeaient très fortement, notamment à basses températures. Ainsi, une incertitude non négligeable était associée aux mesures de DO des souches *himA* et *himA-pecT* dans ces conditions de culture. Les prochaines investigations consisteront à confirmer (ou à infirmer) l'absence d'implication de IHF dans la thermorégulation de la synthèse des Pels. Par la suite, le rôle de IHF dans la mise en place du pouvoir infectieux *in planta* sera analysé de la même manière que précédemment réalisé pour PecT et Fis.



Figure 60 : Modèle spéculatif de la régulation exercée par IHF sur l'expression des gènes *pecT* et *pel* 

La fixation de IHF entre les régions R1 et R2 de la région promotrice de PecT pourrait engendrer la formation d'une boucle qui favoriserait leur rapprochement et de ce fait la formation d'un complexe nucléoprotéique répresseur bloquant totalement l'accès de l'ARN polymérase. La synthèse du répresseur PecT pourrait alors en être extrêmement réduite. Dans ce cas, la synthèse des Pels serait plus favorisée en raison de l'absence de PecT au niveau des promoteurs des gènes *pel*. Par ailleurs, IHF pourrait avoir un rôle positif directement au niveau de la transcription des gènes *pel* en favorisant le rapprochement d'un activateur transcriptionnel, qui, à titre d'exemple, pourrait être CRP, et de l'ARN polymérase au niveau de l'opérateur.

La température est un important facteur environnemental auquel les organismes vivants doivent s'acclimater et/ou s'adapter. Les bactéries pathogènes subissent d'importantes fluctuations de température aussi bien durant leur cycle de vie saprophytique que pathogénique. L'objectif majeur de ce travail était d'élucider les mécanismes de la thermorégulation s'exerçant sur l'expression des gènes *pel*, codant un facteur de virulence essentiel de *D. dadantii*. Des travaux antérieurs avaient montré que la synthèse des Pels était soumise à une thermorégulation (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992) mais les mécanismes de ce contrôle n'avaient pas été élucidés. J'ai identifié au cours de ce travail deux acteurs de la thermorégulation de la synthèse des Pels, PecT et Fis. J'ai montré que PecT agit essentiellement à hautes températures alors que l'action de Fis est plus prononcée à basses températures. Fis stabilise également le niveau de superenroulement de l'ADN à basses températures. Le mécanisme d'action de PecT a été approfondi et j'ai montré qu'il transduit les variations de température sur l'expression des gènes *pel via* son action répressive sur leur promoteur. Enfin, il s'est avéré que PecT utilise les variations topologiques de l'ADN, induites par les changements de température, pour ajuster son action répressive sur les promoteurs des gènes *pel*.

## I. H-NS n'est pas impliqué dans la thermorégulation des gènes *pel* malgré son action sur la synthèse de PecT, pourquoi ?

Nous avons précédemment montré que l'expression du gène *pecT* est fortement réprimée par la NAP H-NS, souvent impliquée dans la thermorégulation des fonctions de virulence chez les bactéries pathogènes des mammifères (Falconi *et al.*, 1998 ; Hurme and Rhen, 1998 ; Steinmann and Dersch, 2013). Chez ces microorganismes, l'action de H-NS résulte d'un mécanisme indirect *via* une répression de la synthèse d'activateur(s) des fonctions de virulence. Ainsi l'inactivation ou la diminution de l'action de H-NS, à des températures proches de celles de l'hôte (35 à 41°C), se traduit par une augmentation de la production de l'activateur des fonctions de virulence et donc en retour par l'induction de la synthèse des facteurs de virulence. Nous avons montré que la synthèse de PecT est thermorégulée *via* l'autorégulation de PecT sur son propre gène, mais que la régulation de l'expression des gènes *pel* par la température alors que son activité répressive est moindre dans ces conditions. Ces observations sont contraires aux mécanismes décrits chez les pathogènes de mammifère, chez lesquels la concentration des régulateurs des fonctions de virulence agissant de concert avec H-NS est

déterminante pour leur action (Hurme and Rhen, 1998 ; Herbst *et al.*, 2009 ; Steinmann and Dersch, 2013). Cette différence notable pourrait expliquer l'absence de l'implication de H-NS dans la thermorégulation des gènes *pel* chez *D. dadantii*. En effet, H-NS étant traditionnellement plus actif à basses températures, son inactivation induite par l'élévation de la température devrait se traduire par une augmentation de la quantité de PecT. Par ailleurs, comme précédemment rapporté (voir la partie **I.1** de la section « Résultats »), H-NS réprime également de manière directe l'expression des gènes *pel* à 30°C. L'action de H-NS sur les promoteurs de ces gènes s'est toutefois révélée être fortement dépendante du niveau d'enroulement de l'ADN : son activité répressive est très forte sur de l'ADN relâché et significativement diminuée sur des matrices d'ADN ayant un fort niveau de surenroulement (Ouafa *et al.*, 2012). Ainsi, chez *D. dadantii*, l'absence d'implication de H-NS dans la thermorégulation pourrait s'expliquer par un équilibre existant entre le niveau d'enroulement et la capacité d'oligomérisation de H-NS. A basses températures, sa forte capacité à former des oligomères serait compensée par un niveau de surenroulement de l'ADN défavorable à sa fixation ; inversement, à fortes températures, la faible oligomérisation de H-NS serait compensée par une topologie de l'ADN favorable à sa fixation. Cette hypothèse reste toutefois à valider expérimentalement.

Une autre possibilité pouvant expliquer l'absence d'implication de H-NS dans la thermorégulation des gènes *pel*, pourrait être le résultat d'une complémentation fonctionnelle par des protéines apparentées. En effet, le séquençage du génome de *D. dadantii* a révélé la présence de deux copies de gènes codant des protéines de la famille H-NS, H-NS2 et H-NS3, ayant 97% d'identité entre elles et 62% d'identité avec H-NS (**figure 61**).

H-NS2 H-NS3 H-NS1	MIMSEALKILNNIRTLRAQARETDLPTLEEMLEKLTAIVEDRREEEASAQQQNAERQAKI MIMSEALKILNNIRTFRAQARETDLATLEEMLEKLTAIVEERRGEEASAQQQNAERQAKI MSEALKILNNIRTLRAQARECSLETLEEMLEKLEVVVNERREEENQAQAEIEERTRKL ************************************	60 60 58
H-NS2 H-NS3 H-NS1	EALRAKLLEDGIDPSELLGAVVTSKTA-KTKRTPRPAKYKYTDENGNEQTWTGQGRTPKA EALRAKLLEDGIDPSELLGAVVTSKTA-KTKRTPRPAKYKYTDENGNEQTWTGQGRTPKA QQYREMLIADGIDPNELLQSLGSSKVAGKAKRAARPAKYQYTDENGELKTWTGQGRTPAV : * *: *****.*** :: :**.* *:***********	119 119 118
H-NS2 H-NS3 H-NS1	IAAALE-SGKTLETFAI 135 IAAALE-SGKTLETFAI 135 IKKAIEEQGKSLDDFLL 135 * *:* .**:*: * :	

### Figure 61 : Alignement des séquences des protéines H-NS1, H-NS2 et H-NS3 identifiées dans le génome de *D. dadantii*

Les séquences protéiques des protéines H-NS, H-NS2 et H-NS3 ont été comparées en utilisant le serveur « Clustal Omega » (url : http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Les résidus identiques sont indiqués par le signe « \* ». Les résidus permettant de conserver une similarité de fonction sont indiqués par le signe « : ». L'analyse a révélé une identité de 97% entre les protéines H-NS2 et H-NS3 et de 62% entre ces deux protéines et H-NS. Les gènes codant H-NS2 et H-NS3 sont localisés dans deux îlots génomiques différents acquis par transfert horizontal. L'analyse du transcriptome de *D. dadantii* dans différentes conditions de culture proches de celles rencontrées lors du cycle infectieux (résultats non publiés) a révélé que l'expression des gènes *hns2* et *hns3* était très sensible aux variations des conditions environnementales (choc osmotique, stress acide et oxydant) alors que celle du gène *hns* ne l'était pas. Ainsi, chez le mutant *hns*, une complémentation fonctionnelle par les protéines H-NS2 et/ou H-NS3 pourrait être envisagée dans certaines conditions telles que la variation de température à l'instar des précédentes observations sur H-NS et StpA chez *E. coli* ou *Pseudomonas* (Castang *et al.*, 2008 ; Muller *et al.*, 2006 ; Sonnenfield *et al.*, 2001). Jusqu'à présent, les tentatives de quantification de l'expression des gènes *hns2* et *hns3* dans des conditions de stress par la technique de la RT-Q-PCR se sont soldées par des échecs en raison de la forte similarité qui existe entre ces 2 gènes.

## II. PecT une protéine de la famille LysR sensible à la topologie de l'ADN, une originalité ?

PecT réprime l'expression de ses gènes cibles à hautes températures en interagissant directement avec leur région régulatrice. Par ailleurs, la température module la topologie de l'ADN chez *D. dadanti* et l'interaction entre PecT et les régions promotrices des gènes *pel* varie en fonction du niveau d'enroulement de l'ADN. Ces données indiquent que PecT perçoit les modifications topologiques des promoteurs des gènes *pel*, une caractéristique associée essentiellement aux NAPs jusqu'à un passé récent (Dillon and Dorman, 2010). En effet, une étude réalisée chez *S. enterica* a montré que la topologie de l'ADN module la fixation de OmpR, un régulateur global sensible aux conditions de stress, sur les promoteurs des gènes des îlots de pathogénie SPI-1 et SPI-2 (Cameron and Dorman, 2012). Ainsi, ces dernières années, nous assistons à une accumulation de preuves qui tendent à montrer que, en plus des NAPs, des régulateurs spécialisés peuvent utiliser les variations de la topologie de l'ADN, un mécanisme global de la régulation de l'expression génique (Travers and Muskhelishvili, 2005a), pour moduler spécifiquement l'expression de leurs gènes cibles. Une analyse de la fixation de PecT sur le génome de *D. dadantii* dans des conditions connues pour moduler la topologie de l'ADN devrait permettre d'apprécier la contribution de la topologie de l'ADN dans la régulation de l'expression génique par PecT.

Toutefois, la modulation de la fixation de PecT par la topologie de l'ADN ne semble pas être le seul paramètre qui ajuste l'activité régulatrice de PecT en fonction de la température (**figure 42** *vs* **figure 49**). Comme suggéré sur la **figure 50**, un second mécanisme agissant en conjonction avec les modifications de la topologie de l'ADN est possible. Celui-ci consisterait en une transition structurale de PecT, en réponse aux variations de température, agissant sur sa capacité à se fixer à l'ADN. Un tel mécanisme a été précédemment décrit pour divers régulateurs impliqués dans la thermorégulation de

fonctions de virulence : TlpA chez S. enterica (Hurme et al., 1997), RovA chez Yersinia (Herbst et al., 2009) et RheA chez Streptomyces albus (Servant et al., 2000). Dans le cas de RovA, une protéine de la famille MarR, l'activité thermosenseur est assurée par (i) une petite boucle située entre deux structures en hélices  $\alpha$  impliquées dans la dimérisation, et (ii) des résidus présents dans l'hélice adjacente au domaine C-terminal (Herbst et al., 2009; Quade et al., 2012). Ces éléments modifient partiellement la structure de RovA suite à une augmentation de la température, ce qui résulte en une incapacité de la protéine à se fixer correctement sur son site (Herbst et al., 2009 ; Quade et al., 2012 ; Steinmann and Dersch, 2013). Chez S. enterica, la protéine TplA présente une forte homologie avec des protéines impliquées dans la partition des plasmides et la ségrégation des chromosomes bactériens; chez S. albus, la protéine RheA réprime l'expression d'un gène dont l'expression est sensible au choc thermique. Le domaine de dimérisation de ces deux protéines est caractérisé par la présence d'une structure en hélices embobinées (ou « coiled-coil ») dont la conformation est affectée par la température. Ainsi, la transition structurale induite par les variations de température entraine le passage de la forme inactive vers la forme active des dimères RheA et TlpA, et inversement. En tenant compte de cet exemple, PecT pourrait également adopter une conformation dite « coiled-coil » via un segment en hélice embobinée de 13 acides aminés localisés entre les positions 40 et 53 (SAVSQQMQRLEQLI). De manière intéressante, ce segment est localisé dans le domaine de fixation à l'ADN de PecT et correspond, à un résidu près, à une des hélices  $\alpha$  prédites dans ce domaine (figure **43**) (Hérault *et al.*, 2013). La probabilité d'existence de cette structure « coiled-coil » a été calculée en utilisant le programme COILS (Lupas et al., 1991). De ce fait, en affectant la conformation de cette structure « coiled-coil » potentielle de PecT, la température pourrait influencer le repliement correct du motif HTH ce qui interférerait avec la fixation de PecT à l'ADN, de la même manière que précédemment expliqué pour RovA (Hérault et al., 2013 ; Quade et al., 2012). Jusqu'à présent, la forte tendance de PecT à former des agrégats a représenté un obstacle conséquent pour la validation de cette hypothèse.

#### III. La virulence de D. dadantii est régulée par PecT et la totoplogie de l'ADN

Comme observé pour la synthèse des fonctions de virulence (Pels, EPS et FliC), l'évolution du pouvoir pathogène du mutant *pecT* en fonction de la température est différente de celle de la souche parentale. La corégulation de la mobilité et de la synthèse des Pels par PecT pourrait favoriser l'invasion de l'hôte lors de l'infection. Pour le moment, la signification de la thermorégulation des fonctions de virulence chez les bactéries phytopathogènes reste assez mal comprise. Cependant, étant donné que ces bactéries doivent ajuster l'expression de leur virulence en fonction des variations de température (liées aux alternances diurne et saisonnière), il semble évident que les mécanismes impliqués dans la thermorégulation soient importants pour les pathogènes de plante.

En ce qui concerne D. dadantii, la thermorégulation des fonctions de virulence pourrait être un paramètre important pour l'infection de l'hôte. Ainsi PecT, la topologie de l'ADN et éventuellement Fis pourraient constituer un système efficace pour sentir les variations de température et ajuster en retour la virulence de cette Entérobactérie pathogène. Par exemple, à basses températures, conditions défavorables pour la croissance, D. dadantii pourrait utiliser la NAP Fis pour stabiliser la superhélicité de l'ADN de manière à empêcher la fixation de PecT sur ses gènes cibles. L'action de ce répresseur fort ainsi bloquée par celle de Fis, la production des Pels s'en trouverait alors augmentée ce qui permettrait de générer des nutriments utilisables pour le métabolisme bactérien via la dégradation de la pectine et/ou d'initier efficacement la macération de l'hôte lorsque les conditions redeviennent plus favorables à la croissance (températures voisines de 30°C et forte humidité). Dans ces nouvelles conditions, le relâchement de l'ADN favoriserait la fixation de PecT à l'ADN qui se traduirait alors par une diminution de la production des Pels. Cette diminution de la synthèse spécifique des Pels, *id* est la quantité de Pels produite par cellule, pourrait être compensée par la forte capacité de croissance de D. dadantii. Au final, la quantité totale de Pels produite dans des conditions favorables à la croissance serait au moins équivalente, sinon supérieure, à celle produite à basses températures ; ainsi, l'efficacité de l'infection ne serait que peu affectée. Par ailleurs, la production des Pels consommant beaucoup d'énergie, sa limitation pourrait permettre à D. dadantii d'équilibrer la synthèse des fonctions de virulence avec les besoins du métabolisme de base. L'homéostasie cellulaire ainsi respectée, l'infection de l'hôte végétal ne pourra en être qu'optimisée.

#### **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La température a un effet prononcé sur de nombreux processus cellulaires ; de ce fait les organismes vivants ont développé différents systèmes leurs permettant de détecter les variations de température pour ajuster en retour leur expression génique. Chez les bactéries pathogènes des mammifères, l'augmentation de la température représente généralement un signal d'induction de la virulence. En effet, la température des mammifères est relativement stable et généralement supérieure à celle de leur environnement, faisant de ce paramètre un bon signal pour l'induction de la virulence des pathogènes. En revanche, jusqu'à un passé récent, peu d'information était disponible sur la thermorégulation des bactéries phytopathogènes. *D. dadantii* s'est avérée être un modèle intéressant pour entreprendre ce genre d'étude : la régulation de ses fonctions de virulence était très avancée et la majorité des régulateurs clés de ses fonctions de virulence ont des homologues impliqués dans le contrôle de la virulence des pathogènes de mammifères.

Nous avons montré que la NAP majeure H-NS, qui joue un rôle prépondérant dans la thermorégulation des fonctions de virulence chez les pathogènes de mammifères, n'est pas impliquée dans la régulation de la synthèse des Pels en fonction de la température. En revanche PecT, dont la synthèse est réprimée par H-NS, joue un rôle déterminant dans la régulation de la synthèse de ces enzymes, notamment à hautes températures. L'action de PecT dans la thermorégulation des gènes *pel* serait médiée par des variations topologiques de l'ADN et certainement une transition de sa conformation protéique en réponse aux changements de la température. En plus de PecT, la NAP Fis s'est révélée impliquée dans la thermorégulation des gènes *pel*, notamment à basses températures. L'action de Fis impliquerait également des modifications topologiques de l'ADN. Ainsi PecT, Fis et la topologie de l'ADN coopéreraient pour thermoréguler les fonctions de virulence de *D. dadantii* (figure 55).

Des points restent toutefois à éclaircir avant de comprendre parfaitement la thermorégulation des fonctions de virulence, notamment des Pels, chez *D. dadantii*. La différence notable par rapport à la thermorégulation des fonctions de virulence des bactéries pathogènes des mammifères est l'absence de l'implication de H-NS dans la thermorégulation des gènes *pel*. Ce résultat est d'autant plus surprenant que H-NS réprime directement l'expression de ces gènes (Nasser and Reverchon, 2002; Ouafa *et al.*, 2012). Une hypothèse basée sur une compensation entre capacité d'oligomérisation (plus prononcée à bases températures) et capacité de fixation de H-NS sur les gènes *pel* (plus prononcée à hautes températures en raison du relâchement de l'ADN) a été proposée pour expliquer ce résultat surprenant. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en quantifiant *in vivo* la fixation de H-NS sur les

promoteurs des gènes *pel* dans des cellules cultivées à différentes températures comme précédemment réalisé pour PecT. Des expériences d'interaction ADN-protéines réalisées *in vitro* (empreinte à la DNase I et transcription *in vitro*) pourraient également être entreprises pour évaluer l'impact de la topologie de l'ADN et de la température sur l'activité de H-NS au niveau des promoteurs des gènes *pel*. Une autre hypothèse avancée pour expliquer la similarité des profils de synthèse des Pels de la souche parentale et du mutant *hns* serait une complémentation fonctionnelle de H-NS par les protéines apparentées H-NS2 ou H-NS3. Cette hypothèse pourra être vérifiée par la construction des mutants *hns2*, *hns3*, *hns-hns2*, *hns-hns3* et si possible *hns-hns2-hns3*.

Concernant PecT, il serait intéressant de valider l'hypothèse de la transition conformationnelle induite par les variations de température *via* le segment « coiled-coil » qui chevauche le motif HTH de liaison à l'ADN. En raison de la forte capacité d'agrégation de la protéine PecT entière, cette hypothèse pourrait être testée sur le domaine N-terminal qui comporte le segment « coiled-coil » et le motif HTH. Une telle stratégie a déjà été utilisée pour caractériser les mécanismes de liaison à l'ADN de certains régulateurs transcriptionnels bactériens dont FruR d'*E. coli* (Scarabel *et al.*, 1995) et ExsA de *Pseudomonas* (Thibault J., thèse 2008, Univ. J. Fourier, Grenoble). Il faudra analyser l'impact des variations de la température sur la capacité de fixation à l'ADN de ce domaine N-terminal. Des analyses biophysiques telles que celles reposant sur la mesure du dichroïsme circulaire permettraient de fournir des informations relatives aux différentes conformations adoptées par ce domaine afin de savoir si la température affecte son repliement.

Une des originalités de ce travail est la mise en évidence de la modulation de l'activité régulatrice de PecT par la topologie de l'ADN. Il serait intéressant de comparer l'expression du génome de la souche parentale et du mutant *pecT* en réponse à un relâchement de leur ADN (par rapport à des conditions standards de croissance). Ainsi il sera possible de définir le régulon de PecT et également d'apprécier l'impact de la topologie sur la régulation des différentes cibles de PecT. Par ailleurs, cette approche pourrait permettre d'identifier de nouveaux acteurs de la thermorégulation des fonctions de virulence ou de la thermoadaptation de *D. dadantii* (parmi les gènes dont l'expression est modulée par les variations de températures).

La protéine Fis s'est avérée être impliquée dans la thermorégulation de la synthèse des Pels en limitant notamment leur production à basses températures. Le mécanisme d'action de Fis devra être approfondi *in vivo* en utilisant l'approche décrite pour PecT. Ces travaux *in vivo* pourront être complétés *in vitro* comme précédemment évoqué pour H-NS. Ainsi il sera possible de voir si l'action de Fis résulte uniquement d'une action sur la topologie des promoteurs des gènes *pel* ou met également en jeu une modification de son activité régulatrice.

La caractérisation fonctionnelle de la NAP IHF devra être poursuivie et son implication dans la thermorégulation des fonctions de virulence de *D. dadantii* sera à étudier.

Enfin, pour le cas où cela s'avérerait nécessaire, une méthode sans *a priori* pourrait être envisagée pour la recherche d'acteurs de la thermorégulation des fonctions de virulence. Celle-ci

pourrait consister en la mise en œuvre d'une immunoprécipitation quantitative sur des cultures de la souche sauvage réalisées à différentes températures *via* les anticorps anti-PecT. L'ensemble des protéines immunoprécipitées pourraient ensuite être caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight mass spectrometry ». Cette technique permettrait d'identifier les protéines dont la fixation à l'ADN est spécifique à une température donnée.

Après avoir caractérisé ces différents régulateurs, il serait intéressant de comprendre comment leurs actions s'intègrent dans le réseau de régulation des gènes *pel* de *D. dadantii* et ainsi de décrypter les mécanismes qu'elle utilise pour coordonner la synthèse de ses fonctions de virulence en réponse aux changements environnementaux. Cette approche pourrait également permettre d'établir une comparaison rigoureuse avec les systèmes de thermorégulation de la virulence décrits chez les bactéries pathogènes des mammifères.

Par ailleurs, les *Dickeya* spp., qui induisaient traditionnellement des bactérioses dans les régions tropicales et subtropicales, sont désormais considérées comme des pathogènes émergents en Europe. En effet, les cultures de pomme de terre et d'endive sont périodiquement attaquées par ce genre bactérien (Hélias, 2008 ; Laurila *et al.*, 2008 ; Toth *et al.*, 2011). Ce constat soutient l'idée que ces bactéries auraient de bonnes capacités d'adaptation et/ou d'acclimatation aux variations de température et également de survie dans les climats froids. De ce fait, il serait judicieux de s'intéresser aux mécanismes de résistance mis en place par *D. dadantii* lorsque les températures environnementales sont très stressantes. Par exemple, l'analyse des systèmes de réponse au choc thermique présents chez *D. dadantii* pourrait permettre d'évaluer leur importance dans les mécanismes de survie chez les *Dickeya* spp.. Ainsi, les travaux réalisés pourraient fournir des informations sur le rôle potentiel des mécanismes de thermorégulation caractérisés chez la souche de référence *D. dadantii* dans l'émergence des *Dickeya* spp. dans les régions froides.

- Allen, M.A., Lauro, F.M., Williams, T.J., Burg, D., Siddiqui, K.S., De Francisci, D., Chong, K.W.Y., Pilak, O., Chew, H.H., De Maere, M.Z., *et al.* (2009). The genome sequence of the psychrophilic archaeon, *Methanococcoides burtonii*: the role of genome evolution in cold adaptation. *ISME J.* **3**, 1012–1035.
- Antunez-Lamas, M., Cabrera-Ordonez, E., Lopez-Solanilla, E., Raposo, R., Trelles-Salazar, O., Rodriguez-Moreno, A., and Rodriguez-Palenzuela, P. (2009a). Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiol.* 155, 434–442.
- Antunez-Lamas, M., Cabrera, E., Lopez-Solanilla, E., Solano, R., Gonzalez-Melendi, P., Chico, J.M., Toth, I., Birch, P., Prichard, L., Liu, H., *et al.* (2009b). Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through wounded tissues. *Mol. Microbiol.* 74, 662-671
- Arvizu-Gómez, J.L., Hernández-Morales, A., Aguilar, J.R.P., and Álvarez-Morales, A. (2013). Transcriptional profile of *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 at low temperature: physiology of phytopathogenic bacteria. *BMC Microbiol.* 13, 81.
- Atlung, T., and Ingmer, H. (1997). H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 24, 7–17.
- Azam, T.A., and 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.
- Bakermans, C., Tsapin, A.I., Souza-Egipsy, V., Gilichinsky, D.A., and Nealson, K.H. (2003). Reproduction and metabolism at - 10 degrees C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environ. Microbiol.* 5, 321– 326.
- Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R., and Rouviere-Yaniv, J. (2001). The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol. Microbiol.* **39**, 1069–1079.
- Barnes AM. (1982). Conference proceedings: surveillance and control of bubonic plague in the United States. *Symposium of the Zoological Society of London* **50**, 237–70.
- Bauer, W.R., Ressner, E.C., Kates, J., and Patzke, J.V. (1977). A DNA nicking-closing enzyme encapsidated in vaccinia virus: partial purification and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1841–1845.
- Belitsky, B.R., Janssen, P.J., and Sonenshein, A.L. (1995). Sites required for GltC-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase expression. *J. Bacteriol.* 177, 5686–5695.
- Beloin, C., Deighan, P., Doyle, M., and Dorman, C.J. (2003). *Shigella flexneri* 2a strain 2457T expresses three members of the H-NS-like protein family: characterization of the Sfh protein. *Mol. Genet. Genomics* 270, 66–77.
- Bergerat, A., De Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**, 414–417.

Boccara, M., Diolez, A., Rouve, M., and Kotoujansky, A. (1988). The role of the individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saintpaulia plants. *Physiol. Mol. Plant Path.* **33**, 95–104.

- Böhme, K., Steinmann, R., Kortmann, J., Seekircher, S., Heroven, A.K., Berger, E., Pisano, F., Thiermann, T., Wolf-Watz, H., Narberhaus, F., *et al.* (2012). Concerted Actions of a Thermo-labile Regulator and a Unique Intergenic RNA Thermosensor Control *Yersinia* Virulence. *PLoS Pathog* 8, e1002518.
- Bonomi, F., Iametti, S., Morleo, A., Ta, D., and Vickery, L.E. (2011). Facilitated transfer of IscU-[2Fe2S] clusters by chaperone-mediated ligand exchange. *Biochem.* **50**, 9641–9650.
- Bottone, E.J. (1997). Yersinia enterocolitica: the charisma continues. Clin. Microbiol. Rev. 10, 257-276.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brandi, A., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (1994). Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of hns. *Biochimie* **76**, 1090–1098.

- Brandl, M.T. (2008). Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5285–5289.
- Braun, Y., Smirnova, A.V., Weingart, H., Schenk, A., and Ullrich, M.S. (2009). Coronatine Gene Expression In Vitro and In Planta, and Protein Accumulation During Temperature Downshift in *Pseudomonas syringae*. *Sensors (Basel)* **9**, 4272–4285.
- Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A., and Bouloc, P. (2009). Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **5**, e1000651.
- Caldelari, I., Chao, Y., Romby, P., and Vogel, J. (2013). RNA-Mediated Regulation in Pathogenic Bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a010298.
- Cameron, A.D., and Dorman, C.J. (2012). A fundamental regulatory mechanism operating through OmpR and DNA topology controls expression of Salmonella pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2. *PLoS Genet.* **8**, e1002615.
- Casanueva, A., Tuffin, M., Cary, C., and Cowan, D.A. (2010). Molecular adaptations to psychrophily: the impact of "omic" technologies. *Trends Microbiol.* **18**, 374–381.
- Cases, I., and de Lorenzo, V. (2005). Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 105–118.
- Castang, S., McManus, H.R., Turner, K.H., and Dove, S.L. (2008). H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 18947–18952.
- Castillo, A., and Reverchon, S. (1997). Characterization of the *pecT* control region from *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **179**, 4909–4918.
- Castillo, A., Nasser, W., Condemine, G., and Reverchon, S. (1998). The PecT repressor interacts with regulatory regions of pectate lyase genes in *Erwinia chrysanthemi*. *Biochim. Biophys. Acta* **1442**, 148–160.
- Casutt-Meyer, S., Renzi, F., Schmaler, M., Jann, N.J., Amstutz, M., and Cornelis, G.R. (2010). Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword. *PLoS ONE* 5, e15159.
- Chaba, R., Grigorova, I.L., Flynn, J.M., Baker, T.A., and Gross, C.A. (2007). Design principles of the proteolytic cascade governing the  $\sigma$ E-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev.* **21**, 124–136.
- Champoux, J.J., and Dulbecco, R. (1972). An Activity from Mammalian Cells That Untwists Superhelical DNA—A Possible Swivel For DNA Replication. *PNAS* **69**, 143–146.
- Charkowski, A., Blanco, C., Condemine, G., Expert, D., Franza, T., Hayes, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lopez Solanilla, E., Low, D., Moleleki, L., *et al.* (2012). The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot Enterobacteriaceae Pathogenicity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, in press.
- Chintalapati, S., Kiran, M.D., and Shivaji, S. (2004). Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell. Mol. Biol.* **50**, 631–642.
- Claret, L., and Rouviere-Yaniv, J. (1996). Regulation of HU alpha and HU beta by CRP and FIS in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 263, 126–139.
- Condemine, G., Dorel, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Robert-Baudouy, J. (1992). Some of the out genes involved in the secretion of pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi* are regulated by kdgR. *Mol. Microbiol.* 6, 3199–3211.
- Condemine, G., Castillo, A., Passeri, F., and Enard, C. (1999). The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 45–52.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., and Stainier, I. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. Microbiol. *Mol. Biol. Rev.* **62**, 1315–1352.
- Cowan, C., Jones, H.A., Kaya, Y.H., Perry, R.D., and Straley, S.C. (2000). Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis*-specific invasin. *Infect. Immun.* **68**, 4523–4530.
- Czajkowski, R., Grabe, G.J., and Wolf, J.M. van der (2009). Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium* carotovorum subsp. carotovorum in naturally infected seed potatoes. Eur. J. Plant Pathol. 125, 263–275.

- Dame, R.T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R., and 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.
- Dame, R.T. (2005). The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol. Microbiol.* **56**, 858–870.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6640–6645.

- De la Fuente, M., Valera, S., and Martínez-Guitarte, J.L. (2012). ncRNAs and thermoregulation: a view in prokaryotes and eukaryotes. *FEBS Lett.* **586**, 4061–4069.
- DeLong, E.F., Preston, C.M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S.J., Frigaard, N.-U., Martinez, A., Sullivan, M.B., Edwards, R., Brito, B.R., *et al.* (2006). Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science* **311**, 496–503.
- Dillon, S.C., and Dorman, C.J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 185–195.
- Dillon, S.C., Cameron, A.D.S., Hokamp, K., Lucchini, S., Hinton, J.C.D., and Dorman, C.J. (2010). Genomewide analysis of the H-NS and Sfh regulatory networks in *Salmonella Typhimurium* identifies a plasmidencoded transcription silencing mechanism. *Mol. Microbiol.* 76, 1250–1265.
- Dorman, C.J., and Deighan, P. (2003). Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 179–184.
- Dorman, C.J., Bhriain, N.N. and Higgins, C.F. (1990). DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri. Nature 344, 789-792.
- Dorman, C.J. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. Nat. Rev. Microbiol. 2, 391-400.
- Dorman, C.J. (2006). DNA supercoiling and bacterial gene expression. Sci. Prog. 89, 151-166.
- Dorman, C.J. (2008). Regulation of Transcription in Bacteria by DNA Supercoiling. *In Bacterial Physiology*, W. El-Sharoud, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 155–178.
- Douillie, A., Toussaint, A., and Faelen, M. (1994). Identification of the integration host factor genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Biochimie* **76**, 1055–1062.
- Durack, J., Ross, T., Bowman, J. P. (2013). Characterisation of the Transcriptomes of Genetically Diverse *Listeria monocytogenes* Exposed to Hyperosmotic and Low Temperature Conditions Reveal Global Stress-Adaptation Mechanisms. *PLoS ONE* 8(9): e73603.
- Dye, D. W. (1968). A taxonomic studiy of the genus Erwinia. I. The "amylovora" group. *New Zealand Journal* of Science 11, 590-607.
- Dye, D. W. (1969a). A taxonomic studiy of the genus Erwinia. II. The "carotovora" group. *New Zealand Journal of Science* **12**, 81-87.
- Dye, D. W. (1969b) A taxonomic studiy of the genus Erwinia. III. The "herbicola" group. *New Zealand Journal* of Science **12**, 223-236.
- Dye, D. W. (1969c) A taxonomic studiy of the genus Erwinia. IV. The "Atypical" Erwinias. *New Zealand Journal of Science* **12**, 833-839.
- Eisen, R.J., Petersen, J.M., Higgins, C.L., Wong, D., Levy, C.E., Mead, P.S., Schriefer, M.E., Griffith, K.S., Gage, K.L., and Beard, C.B. (2008). Persistence of *Yersinia pestis* in soil under natural conditions. *Emerging Infect. Dis.* 14, 941–943.
- Elsholz, A. K. W., Michalik, S., Zühlke, D., Hecker, M., Gerth, U. (2010). CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. *EMBO J.* **29**, 3621–3629.
- Enard, C., Diolez, A., and Expert, D. (1988). Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J. Bacteriol.* **170**, 2419–2426.

- Eriksson, S., Hurme, R., and Rhen, M. (2002). Low-temperature sensors in bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 357, 887–893.
- Etchegaray, J.-P., and Inouye, M. (1999). Translational Enhancement by an Element Downstream of the Initiation Codon in *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **274**, 10079–10085.
- Expert, D., Boughammoura, A., and Franza, T. (2008). Siderophore-controlled iron assimilation in the enterobacterium *Erwinia chrysanthemi*: evidence for the involvement of bacterioferritin and the Suf ironsulfur cluster assembly machinery. J. Biol. Chem. 283, 36564–36572.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G., and Gualerzi, C.O. (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. *EMBO J.* 17, 7033–7043.
- Falconi, M., Prosseda, G., Giangrossi, M., Beghetto, E., and Colonna, B. (2001). Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of virF gene of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 42, 439–452.
- Fang, L., Jiang, W., Bae, W., and Inouye, M. (1997). Promoter-independent cold-shock induction of cspA and its derepression at 37°C by mRNA stabilization. *Mol. Microbiol.* 23, 355–364.
- Fass, E., and Groisman, E.A. (2009). Control of Salmonella pathogenicity island-2 gene expression. Curr. Opin. Microbiol. 12, 199–204.
- Feller, G., and Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 200–208.
- Felsenfeld, G., and McGhee, J.D. (1986). Structure of the 30 nm chromatin fiber. Cell 44, 375–377.
- Forterre, P., Mirambeau, G., Jaxel, C., Nadal, M., and Duguet, M. (1985). High positive supercoiling in vitro catalyzed by an ATP and polyethylene glycol-stimulated topoisomerase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *EMBO J.* **4**, 2123–2128.
- Franza, T., and Expert, D. (2013). Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: an "à la carte" menu. *Mol. Plant Pathol.* 14, 429–438.
- Franza, T., Sauvage, C., and Expert, D. (1999). Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 119–128.
- Franza, T., Michaud-Soret, I., Piquerel, P., and Expert, D. (2002). Coupling of iron assimilation and pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 1181–1191.
- Free, A., and Dorman, C.J. (1995). Coupling of *Escherichia coli* hns mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control. *Mol. Microbiol.* **18**, 101–113.
- Fullner, K.J., and Nester, E.W. (1996). Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. **178**, 1498–1504.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., and Nash, H.A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *PNAS* **73**, 3872–3876.
- Giangrossi, M., Gualerzi, C.O., and Pon, C.L. (2001). Mutagenesis of the downstream region of the *Escherichia coli hns* promoter. *Biochimie* **83**, 251–259.
- Goldberg, M.D., Johnson, M., Hinton, J.C., and Williams, P.H. (2001). Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**, 549–559.
- Goldenberg, D., Azar, I., and Oppenheim, A.B. (1996). Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**, 241–248.
- Golovlev, E.L. (2003). Bacterial Cold Shock Response at the Level of DNA Transcription, Translation, and Chromosome Dynamics. *Microbiol.* **72**, 1–7.
- Goudeau, D.M., Parker, C.T., Zhou, Y., Sela, S., Kroupitski, Y., and Brandl, M.T. (2013). The *Salmonella* Transcriptome in Lettuce and Cilantro Soft Rot Reveals a Niche Overlap with the Animal Host Intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 250–262.

- Grenier, A.M., Duport, G., Pages, S., Condemine, G., and Rahbe, Y. (2006). The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1956–1965.
- Grove, A., and Saavedra, T.C. (2002). The role of surface-exposed lysines in wrapping DNA about the bacterial histone-like protein HU. *Biochemistry* **41**, 7597–7603.
- Gu, S., Rehman, S., Wang, X., Shevchik, V.E., and Pickersgill, R.W. (2012). Structural and functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system. *PLoS Pathog.* **8**, e1002531.
- Guipaud, O., Marguet, E., Noll, K.M., de la Tour, C.B., and Forterre, P. (1997). Both DNA gyrase and reverse gyrase are present in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10606–10611.
- Gur, E., Biran, D., and Ron, E.Z. (2011). Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria--how and when? *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 839–848.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., and Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of Pectin1. *Plant Physiol.* **153**, 384–395.
- Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Syst. Appl. Microbiol. 21, 384–397.
- Hélias, V. *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. *Agricultures* **17**, 349–354.
- Hérault, E., Reverchon, S., and Nasser, W. (2013). Role of the LysR-type transcriptional regulator PecT and DNA supercoiling in the thermoregulation of pel genes, the major virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Environ. Microbiol.*, in press.
- Herbst, K., Bujara, M., Heroven, A.K., Opitz, W., Weichert, M., Zimmermann, A., and Dersch, P. (2009). Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog.* 5, e1000435.
- Heroven, A.K., and Dersch, P. (2006). RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **62**, 1469–1483.
- Heroven, A.K., Böhme, K., Tran-Winkler, H., and Dersch, P. (2007). Regulatory elements implicated in the environmental control of invasin expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **603**, 156–166.
- Higgins, C.F., Dorman, C.J., Stirling, D.A., Waddell, L., Booth, I.R., May, G. and Bremer, E. (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in Salmonella typhimurium and Escherichia coli. Cell 52, 569-584.
- Higgins, C.F. (1990). DNA supercoiling, chromatin structure and the regulation of gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**, 155.
- Hoe, N.P., and Goguen, J.D. (1993). Temperature sensing in Yersinia pestis: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. J. Bacteriol. 175, 7901–7909.
- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Ligori, S., Expert, D., Nasser, W., and Reverchon, S. (2008). PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 190, 7508–7522.
- Hommais, F., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Pineau-Chapelle, E., Van Gijsegem, F., Nasser, W., and Reverchon, S. (2011). *lpxC* and *yafS* are the most suitable internal controls to normalize real time RT-qPCR expression in the phytopathogenic bacteria *Dickeya dadantii*. *PLoS One* **6**, e20269.
- Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379–433.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Charaoui-Boukerzaza, S. (2009). Catabolism of raffinose, sucrose, and melibiose in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **191**, 6960–6967.

- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Dominguez, H., and Robert-Baudouy, J. (1992). Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **174**, 7807–7818.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., and Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi. Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 213–257.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Shevchik, V.E., and Nasser, W. (2002). PehN, a polygalacturonase homologue with a low hydrolase activity, is coregulated with the other *Erwinia chrysanthemi* polygalacturonases. *J. Bacteriol.* **184**, 2664–2673.
- Hurme, R., and Rhen, M. (1998). Temperature sensing in bacterial gene regulation what it all boils down to. *Mol. Microbiol.* **30**, 1–6.
- Hurme, R., Berndt, K.D., Normark, S.J., and Rhen, M. (1997). A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* **90**, 55–64.
- Iost, I., Bizebard, T., and Dreyfus, M. (2013). Functions of DEAD-box proteins in bacteria: current knowledge and pending questions. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 866–877.
- Jackson, M.W., Silva-Herzog, E., and Plano, G.V. (2004). The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Mol. Microbiol.* **54**, 1364–1378.
- Jacobs, M.B. (1957). Dictionary of Microbiology (Van Nostrand).
- Jacquet, M., Cukier-Kahn, R., Pla, J. and Gros, F. (1971). A thermostable protein factor acting on in vitro DNA transcription. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1597–1607.
- Jiang, W., Fang, L., and Inouye, M. (1996). The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation. *J. Bacteriol.* **178**, 4919–4925.
- Jin, S., Song, Y.N., Deng, W.Y., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1993). The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* **175**, 6830–6835.
- Johansson, J., and Uhlin, B.E. (1999). Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **96**, 10776–10781.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. Cell 110, 551–561.
- Jones, P.G., Krah, R., Tafuri, S.R., and Wolffe, A.P. (1992). DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **174**, 5798–5802.
- Jones, P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., and Inouye, M. (1996). Cold shock induces a major ribosomalassociated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 76–80.
- Jung, Y.H., Yi, J.-Y., Jung, H.J., Lee, Y.K., Lee, H.K., Naicker, M.C., Uh, J., Jo, I.S., Jung, E.J., and Im, H. (2010). Overexpression of cold shock protein A of Psychromonas arctica KOPRI 22215 confers coldresistance. *Protein J.* 29, 136–142.
- Kane, K.A., and Dorman, C.J. (2012). VirB-mediated positive feedback control of the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. **194**, 5264–5273.
- Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55, 288–302.
- Kasho, K. and Katayama T. (2013). DnaA binding locus datA promotes DnaA-ATP hydrolisis to enable cell cycle-coordinated replication initiation. *PNAS* **110**, 936–941.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., and Suzuki, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli. Cell* **63**, 393–404.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004). The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics* **4**, 3177–3186.

- Kepseu, W.D., Sepulchre, J.A., Reverchon, S., and Nasser, W. (2010). Toward a quantitative modeling of the synthesis of the pectate lyases, essential virulence factors in *Dickeya dadantii*. J. Biol. Chem. 285, 28565– 28576.
- Keweloh, H., and Heipieper, H.J. (1996). Trans unsaturated fatty acids in bacteria. Lipids 31, 129-137.
- Kikuchi, A., and Asai, K. (1984). Reverse gyrase--a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature* **309**, 677–681.
- Klinkert, B., and Narberhaus, F. (2009). Microbial thermosensors. Cell. Mol. Life Sci. 66, 2661–2676.
- Konkel, M.E., and Tilly, K. (2000). Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect.* **2**, 157–166.
- Kortmann, J., and Narberhaus, F. (2012). Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 255–265.
- Kotoujansky, A., Lemattre, M., and Boistard, P. (1982). Utilization of a thermosensitive episome bearing transposon TN10 to isolate Hfr donor strains of *Erwinia carotovora* subsp. *chrysanthemi*. J. Bacteriol. **150**, 122–131.
- Kozyavkin, S.A., Pushkin, A.V., Eiserling, F.A., Stetter, K.O., Lake, J.A., and Slesarev, A.I. (1995). DNA enzymology above 100 degrees C. Topoisomerase V unlinks circular DNA at 80-122 degrees C. J. Biol. Chem. 270, 13593–13595.
- La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C.L., and Gualerzi, C.O. (1991). Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10907–10911.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lang, B., Blot, N., Bouffartigues, E., Buckle, M., Geertz, M., Gualerzi, C.O., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pon, C.L., Rimsky, S., *et al.* (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.
- Laurila, J., Ahola, V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A., and Pirhonen, M. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology* 122, 213–225.
- Lautier, T., and Nasser, W. (2007). The DNA nucleoid-associated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **66**, 1474–1490.
- Lautier, T., Blot, N., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. (2007). Integration of two essential virulence modulating signals at the *Erwinia chrysanthemi pel* gene promoters: a role for Fis in the growth-phase regulation. *Mol. Microbiol.* **66**, 1491–1505.
- Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Côte, E., Nasser, W., and Van Gijsegem, F. (2008). The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environ. Microbiol.* 10, 545–559.
- Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., Wendisch, V.F., and Unden, G. (2002). LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 45, 521–532.
- Letoffe, S., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1990). Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *EMBO J.* **9**, 1375–1382.
- Li, M., Rosenshine, I., Tung, S.L., Wang, X.H., Friedberg, D., Hew, C.L., and Leung, K.Y. (2004). Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their ihf and ler mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5274–5282.
- Liu, I.-F., Annamalai, T., Sutherland, J.H., and Tse-Dinh, Y.-C. (2009). Hydroxyl Radicals Are Involved in Cell Killing by the Bacterial Topoisomerase I Cleavage Complex. *J. Bacteriol.* **191**, 5315–5319.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochocka, D., and Hryniewicz, M.M. (2001). Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. Regions important for DNA binding, inducer response, oligomerization, and positive control. J. Biol. Chem. 276, 2098–2107.
- Loh, E., Memarpour, F., Vaitkevicius, K., Kallipolitis, B.H., Johansson, J., and Sondén, B. (2012). An unstructured 5'-coding region of the *prfA* mRNA is required for efficient translation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1818–1827.
- Lojkowska, E., Masclaux, C., Boccara, M., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1995). Characterization of the *pelL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* 16, 1183–1195.
- López-García, P. (1999). DNA supercoiling and temperature adaptation: A clue to early diversification of life? J. Mol. Evol. 49, 439–452.
- López-García, P., and Forterre, P. (2000). DNA topology and the thermal stress response, a tale from mesophiles and hyperthermophiles. *Bioessays* 22, 738–746.
- Lopez-Solanilla, E., Garcia-Olmedo, F., and Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Inactivation of the *sapA* to *sapF* locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell* **10**: 917–924.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**: 1162–1164.
- Madrid, C., Nieto, J.M., Paytubi, S., Falconi, M., Gualerzi, C.O., and Juárez, A. (2002). Temperature- and H-NS-Dependent Regulation of a Plasmid-Encoded Virulence Operon Expressing *Escherichia coli* Hemolysin. J. Bacteriol. **184**, 5058–5066.
- Madrid, C., Balsalobre, C., García, J., and Juárez, A. (2007). The novel Hha/YmoA family of nucleoidassociated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins. *Mol. Microbiol.* **63**, 7–14.
- Mangan, M.W., Lucchini, S., Danino, V., Croinin, T.O., Hinton, J.C., and Dorman, C.J. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 59, 1831–1847.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., *et al.* (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629.
- Mathieu, Y., Guern, J., Spiro, M.D., O'Neill, M.A., Kates, K.A., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1998). The transient nature of the oligogalacturonide-induced ion fluxes of tobacco cells is not correlated with fragmentation of the oligogalacturonides. *The Plant Journal* **16**, 305–311.
- Maxwell, A. (1997). DNA gyrase as a drug target. Trends Microbiol. 5, 102-109.
- Mhedbi-Hajri, N., Malfatti, P., Pedron, J., Gaubert, S., Reverchon, S., and Van Gijsegem, F. (2011). PecS is an important player in the regulatory network governing the coordinated expression of virulence genes during the interaction between *Dickeya dadantii* 3937 and plants. *Environ. Microbiol.* **13**, 2901–2914.
- Miguel, E., Poza-Carrion, C., Lopez-Solanilla, E., Aguilar, I., Llama-Palacios, A., Garcia-Olmedo, F., and Rodriguez-Palenzuela, P. (2000). Evidence against a direct antimicrobial role of H2O2 in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 421–429.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics (New York).
- Mirkin, B.G., Fenner, T.I., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (2003). Algorithms for computing parsimonious evolutionary scenarios for genome evolution, the last universal common ancestor and dominance of horizontal gene transfer in the evolution of prokaryotes. *BMC Evolutionary Biology* **3**, 2.
- Mitta, M., Fang, L., and Inouye, M. (1997). Deletion analysis of cspA of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction. *Mol. Microbiol.* **26**, 321–335.
- Morita, M.T., Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T. (2000). Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the sigma 32 level in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5860–5865.

- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., and Łabuzek, S. (2004). Changes in whole cell-derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas*. *Microbiol. Res.* **159**, 87–95.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Ma, W., Liu, Y., and Chatterjee, A.K. (2000). *hexA* of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strain Ecc71 negatively regulates production of RpoS and rsmB RNA, a global regulator of extracellular proteins, plant virulence and the quorum-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Environ. Microbiol.* **2**, 203–215.
- Muller, C.M., Dobrindt, U., Nagy, G., Emody, L., Uhlin, B.E., and 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.
- Mykytczuk, N.C.S., Foote, S.J., Omelon, C.R., Southam, G., Greer, C.W., and Whyte, L.G. (2013). Bacterial growth at -15 °C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J.* 7, 1211–1226.
- Nachin, L., and Barras, F. (2000). External pH: an environmental signal that helps to rationalize *pel* gene duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 882–886.
- Nasser, W., and Reverchon, S. (2002). H-NS-dependent activation of pectate lyases synthesis in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* is mediated by the PecT repressor. *Mol. Microbiol.* **43**, 733–748.
- Nasser, W., Faelen, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Reverchon, S. (2001). Role of the nucleoid-associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 10–20.
- Nasser, W., Dorel, C., Wawrzyniak, J., Van Gijsegem, F., Groleau, M.-C., Déziel, E., and Reverchon, S. (2013). Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*. *Environ. Microbiol.* 15, 865–880.
- Nieto, J.M., Madrid, C., Miquelay, E., Parra, J.L., Rodríguez, S., and Juárez, A. (2002). Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *J. Bacteriol.* **184**, 629–635.
- Nykyri, J., Niemi, O., Koskinen, P., Nokso-Koivisto, J., Pasanen, M., Broberg, M., Plyusnin, I., Törönen, P., Holm, L., Pirhonen, M., *et al.* (2012). Revised phylogeny and novel horizontally acquired virulence determinants of the model soft rot phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLoS Pathog.* 8, e1003013.
- O Croinin, T., Carroll, R.K., Kelly, A., and Dorman, C.J. (2006). Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **62**, 869–882.
- Ono, S., Goldberg, M.D., Olsson, T., Esposito, D., Hinton, J.C., and Ladbury, J.E. (2005). H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation. *Biochem. J.* **391**, 203–213.
- Ouafa, Z.-A., Reverchon, S., Lautier, T., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. (2012). The nucleoid-associated proteins H-NS and FIS modulate the DNA supercoiling response of the pel genes, the major virulence factors in the plant pathogen bacterium *Dickeya dadantii*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4306–4319.
- Owen-Hughes, T., Pavitt, G., Santos, D., Sidebotham, J., Hulton, C., Hinton, J. and Higgins C. (1992) The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. Cell 71, 255–265.
- Pan, C.Q., Johnson, R.C., and Sigman, D.S. (1996). Identification of new Fis binding sites by DNA scission with Fis-1,10-phenanthroline-copper(I) chimeras. *Biochemistry* **35**, 4326–4333.
- Parekh, B.S., and Hatfield, G.W. (1996). Transcriptional activation by protein-induced DNA bending: evidence for a DNA structural transmission model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1173–1177.
- Peter, B.J., Arsuaga, J., Breier, A.M., Khodursky, A.B., Brown, P.O., and Cozzarelli, N.R. (2004). Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* **5**, R87.
- Phadtare, S., and Severinov, K. (2010). RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. RNA *Biol* 7, 788–795.

- Polissi, A., De Laurentis, W., Zangrossi, S., Briani, F., Longhi, V., Pesole, G., and Dehò, G. (2003). Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature. *Res. Microbiol.* **154**, 573–580.
- Porrúa, O., García-Jaramillo, M., Santero, E., and Govantes, F. (2007). The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Mol. Microbiol.* 66, 410–427.
- Prigent-Combaret, C., Zghidi-Abouzid, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S., and Nasser, W. (2012). The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. Mol. Microbiol. 86, 172–186.
- Prosseda, G., Fradiani, P.A., Di Lorenzo, M., Falconi, M., Micheli, G., Casalino, M., Nicoletti, M., and Colonna, B. (1998). A role for H-NS in the regulation of the *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli. Res. Microbiol.* 149, 15–25.
- Prosseda, G., Falconi, M., Nicoletti, M., Casalino, M., Micheli, G., and Colonna, B. (2002). Histone-like proteins and the *Shigella* invasivity regulon. *Res. Microbiol.* 153, 461–468.
- Prosseda, G., Falconi, M., Giangrossi, M., Gualerzi, C.O., Micheli, G., and Colonna, B. (2004). The virF promoter in Shigella: more than just a curved DNA stretch. *Mol. Microbiol.* **51**, 523–537.
- Py, B., Bortoli-German, I., Haiech, J., Chippaux, M., and Barras, F. (1991). Cellulase EGZ of *Erwinia chrysanthemi*: structural organization and importance of His98 and Glu133 residues for catalysis. *Protein Eng.* 4, 325–333.
- Quade, N., Dieckmann, M., Haffke, M., Heroven, A.K., Dersch, P., and Heinz, D.W. (2011). Structure of the effector-binding domain of the LysR-type transcription factor RovM from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 67, 81–90.
- Quade, N., Mendonca, C., Herbst, K., Heroven, A.K., Ritter, C., Heinz, D.W., and Dersch, P. (2012). Structural Basis for Intrinsic Thermosensing by the Master Virulence Regulator RovA of *Yersinia*. J. Biol. Chem. 287, 35796–35803.
- Rangaswamy, V., and Bender, C.L. (2000). Phosphorylation of CorS and CorR, regulatory proteins that modulate production of the phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 13–18.
- Requena, J.M. (2012). Stress Response in Microbiology (Horizon Scientific Press).
- Résibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, E., and Toussaint, A. (1984). Phi-Ec2, a New Generalized Transducing Phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology* **137**, 102–112.
- Reverchon, S., and Nasser, W. (2013). Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ. Microbiol. Reports* 5, 622–636.
- Reverchon, S., Expert, D., Robert-Baudouy, J., and Nasser, W. (1997). The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. 179, 3500–3508.
- Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D., and Nasser, W. (2002). Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J. Bacteriol.* **184**, 654–665.
- Reverchon, S., Van Gijsegem, F., Effantin, G., Zghidi-Abouzid, O., and Nasser, W. (2010). Systematic targeted mutagenesis of the MarR/SlyA family members of *Dickeya dadantii* 3937 reveals a role for MfbR in the modulation of virulence gene expression in response to acidic pH. *Mol. Microbiol.* 78, 1018–1037.
- Rimsky, S., Zuber, F., Buckle, M., and Buc, H. (2001). A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Mol. Microbiol.* **42**, 1311–1323.
- Robert-Baudouy, J., Nasser, W., Condemine, G., Reverchon, S., Shevchik, V.E., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2000). Pectic enzymes of *Erwinia chrysanthemi*, regulation and role in pathogenesis. (St. Paul, Minnesota.: The American Phytopathological Society).
- Rochman, M., Blot, N., Dyachenko, M., Glaser, G., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2004). Buffering of stable RNA promoter activity against DNA relaxation requires a far upstream sequence. *Mol. Microbiol.* 53, 143–152.

- Rodrigues, D.F., Ivanova, N., He, Z., Huebner, M., Zhou, J., and Tiedje, J.M. (2008). Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3 million year old permafrost: a genome and transcriptome approach. *BMC Genomics* **9**, 547.
- Rohde, J.R., Luan, X.S., Rohde, H., Fox, J.M., and Minnich, S.A. (1999). The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. J. Bacteriol. **181**, 4198–4204.
- Rouvière-Yaniv, J., and Gros, F. (1975). Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3428–3432.
- Roy, C., Kester, H., Visser, J., Shevchik, V., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Robert-Baudouy, J., and Benen, J. (1999). Modes of action of five different endopectate lyases from *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 181, 3705–3709.
- Ruiz, N., Kahne, D., and Silhavy, T.J. (2009). Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 677–683.
- Sakakibara, H., Watanabe, M., Hase, T., and Sugiyama, T. (1991). Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. J. Biol. Chem. 266, 2028–2035.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., and Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1415–1427.
- Santos, R., Franza, T., Laporte, M.L., Sauvage, C., Touati, D., and Expert, D. (2001). Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 758–767.
- Scarabel, M., Penin, F., Bonod-Bidaud, C., Nègre, D., Cozzone, A.J., and Cortay, J.C. (1995). Overproduction, purification and structural characterization of the functional N-terminal DNA-binding domain of the fru repressor from *Escherichia coli* K-12. *Gene* 153, 9–15.
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M. J., Stephan, R., and Tasara, T. (2009). Role of cold shock proteins in growth of Listeria monocytogenes under cold and osmotic stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1621–1627.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3091–3092.
- Schneider, R., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2000). The expression of the *Escherichia coli fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol. Microbiol.* **38**, 167–175.
- Schneider, R., Lurz, R., Luder, G., Tolksdorf, C., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2001). An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Res.* **29**, 5107–5114.
- Schröder, O., and Wagner, R. (2002). The bacterial regulatory protein H-NS--a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biol. Chem.* **383**, 945–960.
- Sepulchre, J.A., Reverchon, S., and Nasser, W. (2007). Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *J. Theor. Biol.* **244**, 239–257.
- Servant, P., Grandvalet, C., and Mazodier, P. (2000). The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 3538–3543.
- Shajani, Z., Sykes, M.T., and Williamson, J.R. (2011). Assembly of bacterial ribosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 501–526.
- Shcherbakova, V.A., Chuvilskaya, N.A., Rivkina, E.M., Pecheritsyna, S.A., Laurinavichius, K.S., Suzina, N.E., Osipov, G.A., Lysenko, A.M., Gilichinsky, D.A., and Akimenko, V.K. (2005). Novel psychrophilic

anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov. *Extremophiles* **9**, 239–246.

- Shevchik, V.E., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* 24, 1285–1301.
- Shevchik, V.E., Condemine, G., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1999a). The exopolygalacturonate lyase PelW and the oligogalacturonate lyase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **181**, 3912–3919.
- Shevchik, V.E., Kester, H.C., Benen, J.A., Visser, J., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1999b). Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **181**, 1652–1663.
- Shindo, H., Iwaki, T., Ieda, R., Kurumizaka, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., Morikawa, S., Nakamura, H., and 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.
- Shivaji, S., and Prakash, J.S.S. (2010). How do bacteria sense and respond to low temperature? *Arch. Microbiol.* **192**, 85–95.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 7, 671-675
- Siegenthaler, R.K., and Christen, P. (2005). The importance of having thermosensor control in the DnaK chaperone system. J. Biol. Chem. 280, 14395–14401.
- Silphaduang, U., Mascarenhas, M., Karmali, M., and Coombes, B.K. (2007). Repression of intracellular virulence factors in Salmonella by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 3669–3673.
- Simon, C., Wiezer, A., Strittmatter, A.W., and Daniel, R. (2009). Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7519–7526.
- Singer, S.J. (1974). The Molecular Organization of Membranes. Annual Review of Biochemistry 43, 805–833.
- Singleton, M.R., Dillingham, M.S., Gaudier, M., Kowalczykowski, S.C., and Wigley, D.B. (2004). Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* **432**, 187–193.
- Smirnova, A.V., Braun, Y., and Ullrich, M.S. (2008). Site-directed mutagenesis of the temperature-sensing histidine protein kinase CorS from *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **283**, 231–238.
- Sohn, J., Grant, R.A., and Sauer, R.T. (2007). Allosteric activation of DegS, a stress sensor PDZ protease. *Cell* **131**, 572–583.
- Sonnenfield, J.M., Burns, C.M., Higgins, C.F., and Hinton, J.C. (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.
- Steinmann, R., and Dersch, P. (2013). Thermosensing to adjust bacterial virulence in a fluctuating environment. *Future Microbiol.* **8**, 85–105.
- Stenseth, N.C., Atshabar, B.B., Begon, M., Belmain, S.R., Bertherat, E., Carniel, E., Gage, K.L., Leirs, H., and Rahalison, L. (2008). Plague: past, present, and future. *PLoS Med.* **5**, e3.
- Steven, B., Léveillé, R., Pollard, W.H., and Whyte, L.G. (2006). Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles* **10**, 259–267.
- Stonehouse, E., Kovacikova, G., Taylor, R.K., and Skorupski, K. (2008). Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae. J. Bacteriol.* **190**, 4736–4748.
- Straley, S.C., and Perry, R.D. (1995). Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia. Trends Microbiol.* **3**, 310–317.
- Surgey, N., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G. (1996). The *Erwinia chrysanthemi pecT* gene regulates pectinase gene expression. J. Bacteriol. **178**, 1593–1599.
- Tansley, A.G. (1935). The Use and Abuse of Vegetational Concepts and Terms. Ecology 16, 284–307.

- Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. J. *Bacteriol.* 179, 2503–2511.
- Thi Tam, L., Antelmann, H., Eymann, C., Albrecht, D., Bernhardt, J., Hecker, M. (2006). Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. *Proteomics* **6**, 4665-4585
- Thieringer, H.A., Jones, P.G., and Inouye, M. (1998). Cold shock and adaptation. *Bioessays* 20, 49–57.
- Toth, I., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsror, L., and Elphinstone, J. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol.* **60**, 385–399.
- Tran, C.N., Giangrossi, M., Prosseda, G., Brandi, A., Di Martino, M.L., Colonna, B., and Falconi, M. (2011). A multifactor regulatory circuit involving H-NS, VirF and an antisense RNA modulates transcription of the virulence gene *icsA* of Shigella flexneri. *Nucleic Acids Res.* 39, 8122–8134.
- Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2005a). Bacterial chromatin. Curr. Opin. Genet. Dev. 15, 507-514.
- Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2005b). DNA supercoiling a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 157–169.
- Travers, A., Schneider, R., and Muskhelishvili, G. (2001). DNA supercoiling and transcription in *Escherichia coli*: The FIS connection. *Biochimie* **83**, 213–217.
- Ullrich, M., Peñaloza-Vázquez, A., Bailey, A.M., and Bender, C.L. (1995). A modified two-component regulatory system is involved in temperature-dependent biosynthesis of the Pseudomonas syringae phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* **177**, 6160–6169.
- Ussery, D.W., Higgins, C.F., and Bolshoy, A. (1999). Environmental influences on DNA curvature. J. Biomol. Struct. Dyn. 16, 811–823.
- Ussery, D., Larsen, T.S., Wilkes, K.T., Friis, C., Worning, P., Krogh, A., and Brunak, S. (2001). Genome organisation and chromatin structure in *Escherichia coli*. *Biochimie* **83**, 201–212.
- Van Noort, J., Verbrugge, S., Goosen, N., Dekker, C., and Dame, R.T. (2004). Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6969–6974.
- Venkatesh, B., Babujee, L., Liu, H., Hedley, P., Fujikawa, T., Birch, P., Toth, I., and Tsuyumu, S. (2006). The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants. J. Bacteriol. 188, 3088–3098.
- Viswanathan, P., Ueki, T., Inouye, S., and Kroos, L. (2007). Combinatorial regulation of genes essential for *Myxococcus xanthus* development involves a response regulator and a LysR-type regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7969–7974.
- Vollmers, J., Voget, S., Dietrich, S., Gollnow, K., Smits, M., Meyer, K., Brinkhoff, T., Simon, M., and Daniel, R. (2013). Poles apart: Arctic and Antarctic *Octadecabacter* strains share high genome plasticity and a new type of xanthorhodopsin. *PLoS ONE* 8, e63422.
- Voigt, B., Schroeter, R., Jürgen, B., Albrecht, D., Evers, S., Bongaerts, J., Maurer, K.-H., Schweder, T. and Hecker, M. (2013). The response of *Bacillus licheniformis* to heat and ethanol stress and the role of the SigB regulon. Proteomics, 13: 2140–2161.
- Waldminghaus, T., Heidrich, N., Brantl, S., and Narberhaus, F. (2007). FourU: a novel type of RNA thermometer in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* **65**, 413–424.
- Waldminghaus, T., Gaubig, L.C., Klinkert, B., and Narberhaus, F. (2009). The *Escherichia coli ibpA* thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. *RNA Biol.* **6**, 455–463.
- Walsh, N.P., Alba, B.M., Bose, B., Gross, C.A., and Sauer, R.T. (2003). OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113, 61–71.
- Wang, D., Korban, S.S., and Zhao, Y. (2010). Molecular signature of differential virulence in natural isolates of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **100**, 192–198.

Wang, J.C. (1971). Interaction between DNA and an Escherichia coli protein (a. J. Mol. Biol. 55, 523-IN16.

- Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 430–440.
- Winslow, C.-E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Rogers, L.A., and Smith, G.H. (1920). The Families and Genera of the Bacteria. *J. Bacteriol.* **5**, 191–229.
- Yamanaka, K., and Inouye, M. (2001). Induction of CspA, an E. coli major cold-shock protein, upon nutritional upshift at 37 degrees C. Genes Cells 6, 279–290.
- Yamanaka, K., Mitta, M., and Inouye, M. (1999). Mutation Analysis of the 5' Untranslated Region of the Cold Shock *cspA* mRNA of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **181**, 6284–6291.
- Yamazaki, A., Li, J., Hutchins, W.C., Wang, L., Ma, J., Ibekwe, A.M., and Yang, C.H. (2011). Commensal effect of pectate lyases secreted from *Dickeya dadantii* on proliferation of *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 on lettuce leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 156–162.
- Yan, N., and Shi, Y. (2007). Allosteric Activation of a Bacterial Stress Sensor. Cell 131, 441-443.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M., and Cozzarelli, N.R. (2000). Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 275, 8103–8113.
- Zheng, X.-Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., He, S.Y., and Dong, X. (2012). Coronatine promotes Pseudomonas syringae virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* **11**, 587–596.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. Science 244, 48-52.

### Tableau AI : Souches bactériennes, plasmides, phages et oligonucléotides utilisés

Nom	Génotype et/ou description	Source	
Escherichia coli			
NM522	$\Delta(lac-proAB), thi, \Delta(hsdSM-mcrB)5, supE,$	Collection du laboratoire	
	$/[F' proAB+, lacI^Q, lacZ\Delta M15]$		
M15	[ <i>thi</i> , <i>lac</i> , <i>rtl</i> , <i>F</i> -] /pREP4 Kan <sup>R</sup>	Qiagen	
DH5a	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lac</i> ZΔM15 Δ( <i>lac</i> ZYA- <i>arg</i> F) U169 <i>rec</i> A1	Life Technology	
	endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 $\lambda^-$ thi-1		
	gyrA96 relA1		

### Dickeya dadantii

3937	Souche sauvage isolée de la violette africaine ( <i>Saintpaulia ionanthia</i> )	(Kotoujansky et al., 1982)
A4116	3937 <i>pecT∷uidA</i> Cm <sup>R</sup>	(Lebeau et al., 2008)
A4474	$3937 fis::Cm^{R}$	(Lautier et al., 2007)
A4407	3937 <i>himA</i> ::Sm <sup>R</sup>	Collection du laboratoire
A350	3937 rafR, ganB	(Hugouvieux-Cotte-Pattat and Charaoui-Boukerzaza, 2009)
A2148	A350 $pecT$ :: $uidA$ Cm <sup>R</sup>	(Surgey et al., 1996)
A3379	A350 <i>hns</i> ::Km <sup>R</sup>	(Nasser et al., 2001)
A3381	A350 <i>pecT::uidA</i> Cm <sup>R</sup> , <i>hns</i> ::Km <sup>R</sup>	(Nasser and Reverchon, 2002)
A4374	A350 fis::Cm <sup>R</sup>	(Lautier et al., 2007)
<b>Plasmides</b> pBluescript <sup>Ap</sup>	Vecteur de clonage à haut nombre	Stratagène

de copies, Ap<sup>R</sup>, *lacZ'*::MCS

pUC18	Vecteur de clonage à haut nombre de copies, Ap <sup>R</sup>	Collection du laboratoire
pQE32	Vecteur de clonage à expression inductible, $PT_5$ - <i>lacO</i> , $Ap^R$	Qiagen
pQE70	Vecteur de clonage à expression inductible, $PT_5$ - <i>lacO</i> , $Ap^R$	Qiagen
pGEM-T	Vecteur de clonage linéaire, Ap <sup>R</sup>	Promega
pKD-3	Vecteur suicide portant une cassette de résistance au chloramphénicol	(Datsenko and Wanner, 2000)
pBSK <sup>Ap</sup> -RR <sub>L</sub> pelE	Vecteur recombinant portant la région régulatrice du gène <i>pelE</i>	Ce travail
pBSK <sup>Ap</sup> -RR <sub>C</sub> pelE	Vecteur recombinant portant une séquence plus courte de la région régulatrice du gène <i>pelE</i>	Collection du laboratoire
pBSK <sup>Ap</sup> -RR <sub>L</sub> pelD	Vecteur pBSK recombinant portant la région régulatrice du gène <i>pelD</i>	Ce travail
pBSK <sup>Ap</sup> -RR <sub>C</sub> pelD	Vecteur pBSK recombinant portant une séquence plus courte de la région régulatrice du gène <i>pelD</i>	Collection du laboratoire
pGEM-T- <i>himD</i> ::pKD-3	Vecteur pGEM-T recombinant portant un long segment d'ADN contenant la séquence codante du gène <i>himD</i> à l'intérieur de laquelle est insérée la cassette chloramphénicol du plasmide pKD-3	Ce travail
<b>Phages</b> PhiEC2	Vecteur de la transduction chez Dickeya dadantii	(Résibois <i>et al.</i> , 1984)
Oligonucleotides		

<i>Eco</i> RI <i>-pelE</i> fw	5'- CCGAATTCTTTCCCGTTCTTTTGTTCCCAAC -3'	Ce travail
<i>Hin</i> dIII <i>-pelE</i> rv	5'- CCAAGCTTTTTGGTTCCCAAGGCAGAACG -3'	Ce travail

<i>Eco</i> RI <i>-pelD</i> fw	5'- CCGAATTCTTTCCCGCCCAGCGTAAAG -3'	Ce travail
HindIII-pelD rv	5'- CCAAGCTTTTGGTACCTACGGAAGACAC -3'	Ce travail
himD fw	5'- TGGACCAACAAGAACATCCA -3'	Ce travail
<i>himD</i> rv	5'- ATCCGACTGTGCACATACCA -3'	Ce travail
pAW qPCR fw	5'- CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC -3'	Applied Biosystems
pAW qPCR rv	5'- TGACCACCCAGCCATCCTTC -3'	Applied Biosystems
pelA qPCR fw	5'- AGGACGGAACCATTGTCGGAGAAA -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelA qPCR rv	5'- AAACCATGCTGATTGGTCACAGCG -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelB qPCR fw	5'- TCCGCCAACTTCGGTATCTGGATT -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelB qPCR rv	5'- TGACGTCGTTGTAGCGGTTATGGT -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelC qPCR fw	5'- CACTTCCGGTGGTAACGTG -3'	(Venkatesh et al., 2006)
<i>pelC</i> qPCR rv	5'- ACCTTTGGAATCGACTTTGG -3'	(Venkatesh et al., 2006)
<i>pelE</i> qPCR fw	5'- AGCGAATTCAAAGCAGCACT -3'	(Lautier et al., 2007)
<i>pelE</i> qPCR rv	5'- GGCGTTTCGATGTACAGGTT -3'	(Lautier et al., 2007)
pelD qPCR fw	5'- TTGTGGAAGGTAACGCGCAGTTTG -3'	(Lautier et al., 2007)
pelD qPCR rv	5'- ATGGCAAATTCACCAACGGCTCTC -3'	(Lautier et al., 2007)
<i>pecT</i> qPCR fw	5'- ATACAAGTCGCCCTGTCCTC -3'	(Mhedbi-Hajri et al., 2011)
<i>pecT</i> qPCR rv	5'- AGGCCTCATCGTTAAACTGC -3'	(Mhedbi-Hajri et al., 2011)
<i>fliC</i> qPCR fw	5'- CCCAGACCAACCTGAACAAA -3'	Ce travail
<i>fliC</i> qPCR rv	5'- TACCTTCAGCGGTCTGAACC -3'	Ce travail
weaP qPCR fw	5'- TGGGTTGGTTCTGTGTACGA -3'	Ce travail
weaP qPCR rv	5'- TTGTTAAGTCCCCGTTTTGC -3'	Ce travail
fis qPCR fw	5'- TGACGTACTGACCGTTTCCA -3'	(Lautier et al., 2007)
fis qPCR rv	5'- GTTGATGCCCATCATCAGAG -3'	(Lautier et al., 2007)
<i>lpxC</i> qPCR fw	5'- ACGGTAAGCGCATTCTGGTA -3'	(Hommais et al., 2011)

<i>lpxC</i> qPCR rv	5'- CATCCAGCAGCAGGTAGACA -3'	(Hommais <i>et al.</i> , 2011)
<i>pecT</i> ChIP fw	5'- TCAAGCAAACGGAGAATCAA -3'	(Hérault et al., 2013)
<i>pecT</i> ChIP rv	5'- AAAACCAGCCATCTCACTCG -3'	(Hérault et al., 2013)
pelD ChIP fw	5'- GCCACTCAATACGGTTCAGG -3'	(Hérault et al., 2013)
<i>pelD</i> ChIP rv	5'- CGTTTTTATCTGAAATAACCCAAA -3'	(Hérault et al., 2013)
pelE ChIP fw	5'- CGTTTTTACGTCTAGCCCACA -3'	(Hérault et al., 2013)
<i>pelE</i> ChIP rv	5'- CGATGATTGGAACGGTGATA -3'	(Hérault et al., 2013)
<i>pelB</i> ChIP fw	5'- CAGCGATAAAGGCAGGGTAA -3'	(Hérault et al., 2013)
<i>pelB</i> ChIP rv	5'- ACGGAAGCAGGAGTGACTGT -3'	(Hérault et al., 2013)
<i>lpxC</i> ChIP fw	5'- CAAAGTGGTGAACGACCAGA -3'	(Hérault et al., 2013)
<i>lpxC</i> ChIP rv	5'- CAAAGAGCGGAGATTCCAAC -3'	(Hérault et al., 2013)

Les symboles génotypiques sont annotés selon Berlyn (1998). *lacl<sup>Q</sup>* signifie que la synthèse du répresseur LacI est constitutive.  $\text{Km}^{R}$ ;  $\text{Cm}^{R}$ ;  $\text{Ap}^{R}$ ;  $\text{Sm}^{R}$ : résistance à la kanamycine, au chloramphénicol, à l'ampicilline et à la streptomycine, respectivement. Les sigles  $\text{RR}_{L}$  et  $\text{RR}_{C}$  correspondent à une longue région régulatrice du gène, allant jusqu'à -400 bases du site d'initiation de la transcription, et à une région régulatrice plus courte allant jusqu'à environ -250 bases en amont du site d'initiation de la transcription, respectivement.

ORF : Open Reading Frame ; MCS = Multiple Cloning Site ; PT5 = promoteur du phage T5.

Les oligonucléotides utilisés pour la quantification des transcrits et pour la quantification des régions promotrices immunoprécipitées sont annotés « qPCR » et « ChIP », respectivement.

# Congrès international de la FEMS "Federation of European Microbiologists Societies" : 21-25 juillet 2013 à Leipzig (Allemagne)

### Résumé (en anglais) déposé pour la participation à une session « Poster » :

*Dickeya dadantii* is a Gram-negative pathogen infecting a wide range of plant species. Soft rot, the visible symptom, is mainly due to the production of pectate lyases (Pels) that can destroy the plant cell walls. Production of Pels is controlled by a complex regulation system and responds to various stimuli, such as the presence of pectin or plant extracts, growth phase, iron concentration and also temperature. Although many studies have been carried out, the mechanisms of control of Pels production by temperature have not yet been elucidated.

We show that PecT, a previously identified repressor of the Pels regulation system, is involved in the thermoregulation of the *pel* gene expression. Using *in vivo* Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) coupled to quantitative RT-PCR (qRT-PCR), we reveal that PecT binding to the *pel* gene promoters is modulated by temperature. In parallel, DNA topology analysis leads us to establish that this environmental factor modifies DNA supercoiling state in *D. dandatii*. Then, by manipulating the DNA topology *in vivo*, we further show that DNA supercoiling state is involved in the binding capacity of PecT. In addition, we show that the development of the pathogenicity of the *pecT* mutant according to changes in temperature is different from that of the parental strain.

This report presents, at the first time, an example of how plant pathogenic bacteria use transcription factor and DNA topology to adjust synthesis of virulence factors in response to temperature variation.

#### « Poster » présenté lors du congrès FEMS 2013 à Leipzig :



herault.el@gmail.com; sylvie.reverchon-pescheux@insa-lyon.fr; william.nasser@insa-lyon.fr

### environmental microbiology



### Role of the LysR-type transcriptional regulator PecT and DNA supercoiling in the thermoregulation of *pel* genes, the major virulence factors in *Dickeya dadantii*

# Elodie Hérault,<sup>1,2,3</sup> Sylvie Reverchon<sup>1,2,3</sup> and William Nasser<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne, France. <sup>2</sup>INSA de Lyon, F-69621 Villeurbanne, France. <sup>3</sup>CNRS UMR5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, F69622, Villeurbanne, France.

#### Summary

Bacteria are colonizers of various environments and host organisms, and they are often subjected to drastic temperature variations. Dickeya dadantii is a pathogen infecting a wide range of plant species. Soft rot, the visible symptom, is mainly due to the production of pectate lyases (Pels) that destroy plant cell walls. The production of Pels is controlled by a complex regulation system that responds to various stimuli, such as the presence of pectin, growth phase and temperature. Despite numerous regulatory studies, the thermoregulation mechanism of Pel production remains unexplained. Here, we show that PecT, a previously identified repressor, modulates pel gene expression in a temperature-dependent manner, and we demonstrate that PecT binding on pel promoters increases concomitantly with temperature. High temperatures relax the DNA in D. dadantii, and remarkably, artificial relaxation of DNA at low temperatures increases PecT binding to DNA. Deletion of pecT augmented the capacity of D. dadantii to initiate soft-rot symptoms at high temperatures. These results reveal that DNA topology and PecT act in concert to fine-tune D. dadantii virulence in response to temperature. This novel combination between DNA topology and a conventional transcriptional regulator extends our understanding of the thermoregulation mechanisms involved in bacterial virulence.

#### Introduction

Temperature has a profound effect on many cellular processes, and therefore, organisms need to have molecular

Received 21 March, 2013; revised 10 June, 2013; accepted 13 June, 2013. \*For correspondence. E-mail William.nasser@insa-lyon.fr; Tel. (+33) 47 243 2695; Fax (+33) 47 243 2686.

© 2013 John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology

thermosensing devices in order to adjust to any changes in temperature. In bacterial pathogens of mammals, a shift in temperature represents a cue that can trigger virulence gene expression (Hurme and Rhen, 1998). At least three biological thermometers are involved in thermoregulation in bacteria: RNA, protein and DNA. RNA thermometers often act post-transcriptionally, either by inhibiting or enhancing translation (Klinkert and Narberhaus, 2009). Protein thermometers are diverse and include DNAbinding transcriptional regulators, sensor kinases, chaperones and proteases (Klinkert and Narberhaus, 2009; Kamp and Higgins, 2011). DNA thermometers often involve specific Adenosine-Thymine-rich DNA sequences that alter DNA structure in response to changes in temperature. When these temperature-sensitive DNA sequences are strategically located within promoter regions, the binding of regulators and RNA polymerase is modulated by fluctuations in temperature and can result in a temperature-dependent transcriptional response (Falconi et al., 1998; Hurme and Rhen, 1998; Eriksson et al., 2002; Prosseda et al., 2004). Global DNA topology is also sensitive to temperature and could constitute a rapid and efficient cellular mechanism for adjusting virulence gene expression during pathogenesis (Dorman, 1991; Dorman and Corcoran, 2009; Cameron and Dorman, 2012). The abundant nucleoid-associated protein H-NS is at the crossroads of thermoregulation in various bacterial pathogens of mammals(Shigella species, enteroinvasive Escherichia coli, Listera monocytogenes and Yersinia species) where it represses virulence gene expression at non-permissive temperatures (below 30°C).

Concerning plant-associated bacteria, little is known about the signalling pathways or the mechanism of thermoregulation. The majority of the studies performed in these bacteria show an increased expression of genes coding for virulence determinants or biocontrol factors at low temperatures (16–24°C), although the optimal growth temperatures for bacteria usually range from 25 to 30°C (Smirnova *et al.*, 2001; Humair *et al.*, 2009). The rationale for this is far from being understood, but one of the most widely accepted hypotheses relates to the fact that most plant pathogenic bacteria require water films or aerosols for an efficient infection of their hosts (Smirnova *et al.*, 2001). Such water films and high humidity mainly occur

#### 2 E. Hérault, S. Reverchon and W. Nasser

when the air temperature or the temperature of the plant surface is low. To date, only the thermoregulation of phytotoxin coronatine (COR) synthesis via a twocomponent system CorS-CorR has been described in Pseudomonas syringae (Smirnova et al., 2008; Braun et al., 2009). At low temperatures, the membraneassociated sensor kinase CorS autophosphorylates and transduces the signal to the response regulator CorR, which in turn activates COR gene transcription. At high temperatures, rearrangements of CorS transmembrane domains prevent autophosphorylation and phosphorylation from responding to the regulator CorR. Low temperature also significantly induces T-DNA transfer in Agrobacterium tumefaciens, alginate and phaseolotoxin production in P. syringae, the Hrp type III secretion system and amylovoran synthesis in Erwinia amylovora, and the production of plant cell wall degrading enzymes, mainly pectate lyases (Pels), in D. dadantii (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1992; Smirnova et al., 2001). A recent study, performed in D. dadantii, also showed that expression of the pel genes is strongly decreased when chromosomal DNA is relaxed. Furthermore, it was shown that H-NS modulates transcription from the pel promoters in response to changes in the DNA supercoiling state (Ouafa et al., 2012). These results led us to investigate further the effects of temperature on DNA topology and pel gene expression. Here, we report the first thermosensing mechanism involving both a transcriptional regulator and DNA topology in plant pathogenic bacteria.

*Dickeya dadantii* is described as a necrotrophic Gramnegative bacteria that causes disease in a wide range of plant species (Perombelon, 2002; Dellagi *et al.*, 2005; Lebeau *et al.*, 2008). Soft rot, the visible symptom, is mainly due to the production of Pels that destroy the plant cell wall (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). *Dickeya dadantii* synthesizes multiple isoforms of Pels, including five major isoenzymes (PelA, B, C, D and E) (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Expression of the *pel* genes is under the control of a complex regulation system (Sepulchre *et al.*, 2007; Lautier *et al.*, 2007; Reverchon *et al.*, 2010; Hommais *et al.* 2011; Ouafa *et al.*, 2012).

We have already demonstrated that in *D. dadantii*, H-NS displays an unusual activator phenotype in Pel production because its absence leads to a drastic reduction in enzyme synthesis (Nasser *et al.*, 2001). The reduced synthesis of Pels in the *hns* mutant mainly results from a negative control, exerted by H-NS, on the production of the strong repressor PecT, which belongs to the LysR family of transcriptional regulators. In addition to its indirect action on Pels production via PecT, H-NS also represses the expression of *pel* genes by binding to extended regions of their regulatory regions (Nasser and Reverchon, 2002). PecT is a direct repressor of its own gene and of the *pel* promoters (Castillo and Reverchon, 1997; Castillo et al., 1998), but the signal modulating the regulatory activity of PecT has not yet been elucidated. In this study, we determined the temperature-dependent transcriptional mechanisms required for the transcription of pel genes in D. dadantii. Surprisingly, we found that changes in temperature had no detectable effect on the action of H-NS on the expression of the pel genes, while PecT repressed more efficiently the expression of pel genes at high temperatures. Furthermore, we show that DNA is relaxed at high temperatures in D. dadantii and that the artificial relaxation of DNA supercoiling at low temperatures, with novobiocin, caused an increase in PecT binding on the pel gene promoters. Thus, our results reveal an interplay between PecT and DNA topology in the thermoregulation of pel gene expression in D. dadantii.

#### Results

# *PecT modulates thermoregulation of pectate lyase production*

It has been previously demonstrated that in the wild-type (WT) D. dadantii 3937 strain, the synthesis of Pels increases at low temperatures (21-22°C) (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1992). However, the regulatory mechanism that integrates this signal has remained enigmatic. Because H-NS was shown to be involved in the thermoregulation of virulence genes in various mammalian pathogens, we hypothesized that H-NS, and perhaps, PecT might form part of the regulatory device employed by D. dadantii for modulating Pel production in response to changes in temperature. To test this hypothesis, we analysed the impact of temperature on Pel production in the D. dadantii parental strain, A350 (PS), and in its hns and pecT derivatives (Fig. 1A and Table S1). We used the optimal growth temperature (30°C) and two suboptimal growth temperatures, 21.5 and 37.5°C, at which significant growth was observed. The doubling times for both the parental and the pecT strains during growth at 21.5, 30 and 37.5°C, in minimal M63 medium supplemented with glycerol and polygalacturonate (PGA), were  $135 \pm 10$  min,  $70 \pm 6$  min and  $80 \pm 6$  min, respectively. The doubling times for the hns mutant, in the same conditions, were 155  $\pm$  15 min, 90  $\pm$  10 min and 110  $\pm$  10 min, respectively (data not shown). Pel activity was quantified during the early stationary phase [optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) = 0.9 at 21.5°C, 1.4 at 30°C and 1.2 at 37.5°C], this being the growth stage at which the production of Pels is at a maximum in these strains (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1992; Surgey et al., 1996; Castillo and Reverchon, 1997; Nasser et al., 2001). The parental strain and the hns mutant displayed a similar pattern of Pel production: higher levels at a low temperature (21.5°C) followed by a gradual

#### Dickeya dadantii PecT protein and virulence thermoregulation 3



**Fig. 1.** A. Temperature-dependent production of pectate lyases (Pels) in the *D. dadantii* A350 parental strain (PS) and in its *pecT*, *hns* and *pecT-hns* derivatives. Bacteria were grown, at the indicated temperature, in minimal M63 medium containing glycerol (2 g l<sup>-1</sup>) and polygalacturonate (4 g l<sup>-1</sup>). Pel specific activity (Pel SA) is expressed as  $\mu$ mol of unsaturated product liberated per min per mg of bacterial dry weight; a log2 scale was used for the *y*-axis in order to visualize clearly any variations of Pel activity in the different strains. Each value represents the mean of three independent experiments. Bars indicate the standard deviation. The Pel specific activities obtained in each genetic background (*pecT*, *hns*, *pecT-hns* and parental strain) at 21.5 and 37.5°C are different from those obtained at 30°C, (*P* values < 0.05). B. Fold changes of Pel activity in the *pecT* mutant relative to the parental strain (PS). Fold changes at the different growth temperatures are expressed as the ratio of Pel specific activity obtained in the *pecT* mutant versus that obtained in the parental strain. Each value represents the mean of three independent experiments. Bars indicate the standard deviation. The Pel specific activity measured in the *pecT* mutant is significantly different to that obtained in the parental strain (*P* values < 0.05).

decrease as the temperature increases (Fig. 1A and Table S1). Hence, it appeared that in our experimental conditions, H-NS is not involved in the thermoregulation of Pel production in D. dadantii. By contrast, under the same conditions, the pecT mutant produced more Pels at 30°C than at 21.5°C or at 37.5°C (Fig. 1A and Table S1). Furthermore, the difference in Pel production between the pecT mutant and the parental strain increased concomitantly with the temperature (Fig. 1B and Table S1). The repression of Pel synthesis by PecT, which is visible at 30°C and even more so at 37.5°C, is almost not detectable at 21.5°C (Fig. 1B). These data strongly suggest that the effect of PecT is temperature-dependent and is more efficient at high temperatures. The Pel production pattern of the *hns-pecT* double mutant was similar to that of the *pecT* mutant (Fig. 1A and Table S1). A higher production of Pels in the *hns-pecT* double mutant is consistent with a repression by both H-NS and PecT of pel gene expression (Nasser and Reverchon, 2002). These observations eliminate a possible involvement of H-NS in the thermoregulation of Pel synthesis.

# PecT transduces temperature changes at the transcriptional level

To test whether the impact of PecT on the thermoregulation of Pel production can be observed at the transcriptional level, we analysed the impact of temperature on *pel* gene expression, using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), in parental and *pecT* backgrounds. We selected, for analysis, the *pelB*, *pelC*, *pelD* and *pelE* genes encoding four of the five major Pels. For these experiments, we used D. dadantii cells in late exponential growth phase  $(OD_{600} = 0.6-0.65)$  for 21.5°C, 0.8–0.9 for 30°C and 0.7–0.8 for 37.5°C) where a significant quantity of good quality pel gene transcripts can usually be obtained (Hommais et al., 2008). The levels of the four pel gene transcripts correspond with the variation of Pel activity observed, both in the parental and pecT genetic backgrounds (Fig. 2A; Table S2). Under the same conditions, the amount of IpxC mRNA, used as a reference gene for gRT-PCR normalization (Hommais et al., 2011), did not vary significantly (Fig. 2A). Finally, and in accordance with observations made of Pel activity, it appeared that the difference in pel gene expression between the pecT mutant and the parental strain increases concomitantly with temperature (Table S3). Thus, the difference in the levels of Pels could be attributed to the levels of pel gene transcripts.

To determine whether a change in mRNA stability contributed to the thermoregulation exerted by PecT, the decay of *pel* and *lpxC* mRNAs was monitored in cultures of *D. dadantii* grown after the addition of rifampicin. This antibiotic inhibits transcription initiation. Stability of the *pelB*, *pelD*, *pelE* and *lpxC* transcripts decreased when temperature increased (Fig. S1). The higher stability of the transcripts at low temperatures might be due to slower degradation. Moreover, the stability of *pel* and *lpxC* mRNAs was quite similarly affected by a change in temperature in both the parental strain and the *pecT* mutant. Similar experiments performed in the presence of the protein biosynthesis inhibitor, chloramphenicol (Cm), showed no significant variation in Pel activity during the experimental period, at the different temperatures, in both





**Fig. 2.** A. Influence of growth temperature on gene expression in the parental strain and its *pecT* derivative. Cultures were performed as in Fig. 1, and samples were taken, in the late expontial growth phase  $(OD_{600} = 0.6 \text{ for cultures at } 21.5^{\circ}\text{C} \text{ and } OD_{600} = 0.8 \text{ for cultures at } 30 \text{ and } 37.5^{\circ}\text{C})$  for gene expression analysis using qRT-PCR. The *lpxC* gene was used as a reference for normalization. Each value represents the mean of three independent experiments, and bars indicate the standard deviation. Two different scales were used for the *y*-axis, in the case of *pel* gene expression, in order to visualize clearly any variations of the different genes. The expression of *pel* and *pecT* genes obtained in each genetic background (*pecT* mutant and parental strain) at 21.5 and 37.5^{\circ}\text{C} are different from those obtained at 30^{\circ}\text{C} (*P* values < 0.05). B. (a) PecT cellular content estimated by Western blot experiments on 10  $\mu$ g of total protein extracts from the *D*. *dadantii* parental strain grown at the indicated temperature; (b) analysis of the same cellular protein extracts (10  $\mu$ g) on a 12% SDS-PAGE gel was used as a loading control for the Western blot experiments in panel (a). Proteins were revealed after electrophoresis by staining with coomassie Brilliant Blue. Similar results were obtained in three independent experiments.

C. PecT quantification using the Image J software. Results are the means of three independent experiments. Bars indicate the standard deviation. The PecT level measured at  $30^{\circ}$ C is significantly different to those measured at 21.5 and 37.5°C, (*P* values < 0.05).

strains (Fig. S2A). This is probably due to the high stability of Pels (degradation rate =  $4.94 \times 10^{-2} h^{-1}$ ) previously reported (Kepseu *et al.*, 2010). These results, therefore, suggest that the stability of the transcripts and proteins does not significantly contribute to the thermoregulation exerted by PecT on *pel* genes.

In order to investigate the action speed of PecT on *pel* gene transcription following changes in temperature, levels of the *pelB*, *pelD*, *pelE* and *lpxC* transcripts were examined after a shift in growth temperature from 30 to 21.5°C and from 30 to 37.5°C (Fig. S3). The *pel* expression ratio between the *pecT* mutant and the parental strain decreased over time at 21.5°C, whereas it increased both at 30 and 37.5°C. In addition, the *pel* expression ratio between the two strains was higher at 37.5°C than at 30°C (Fig. S3). Under the same conditions,

the amount of *lpxC* mRNA did not vary significantly between the two strains, following both a decrease and an increase in temperature. From these results, we infer that thermoregulation of the *pel* gene expression by PecT occurs rapidly after a change in temperature. The slower reaction times observed after a temperature decrease compared with a temperature increase (10 versus 5 min, respectively) could be related to the slower turnover of transcripts at low temperatures.

#### Production of PecT is thermoregulated

To test whether the expression of *pecT* is also thermoregulated, we first used qRT-PCR analysis. The level of *pecT* mRNAs evolves in a similar way as that of the *pel* genes as regards changes in temperature

#### Dickeya dadantii PecT protein and virulence thermoregulation 5



Fig. 3. PecT binding to DNA promoters. Independent ChIP experiments using PecT antibodies were performed with the parental strain and its pecT derivative grown at 21.5, 30 and 37.5°C. gPCR was then used to quantify the fold enrichment of regions immediately upstream of the pelB, pelD, pelE and pecT genes. A. Agarose gel analysis of pelE PCR products obtained from input samples (T) and immunoprecipited samples (IP). Similar results were obtained in four independent experiments. The faint band observed with the IP at 30°C in the pecT mutant is probably due to a non-specific immunoprecipitation of a protein bound to the regulatory regions of pelE by the anti-PecT antibodies. For this reason, this DNA has not been quantified by qPCR experiments (Fig. 3B) and was therefore not taken into consideration when calculating the quantities of DNA immunoprecipitated by PecT. B. Quantification of PecT binding to DNA promoters, by immunoprecipitation using qPCR analysis. ChIP fold enrichment scores are calculated relative to the non-target IpxC. These scores were averaged across four biological replicates. Bars indicate the standard deviation. Binding of PecT on pel and pecT promoters at 30°C was significantly different to those obtained at 21.5 and 37.5°C (P values < 0.05).

(Fig. 2A), although the decrease in *pecT* expression from 21.5 to 37.5°C is generally less pronounced than that observed for the pel genes (Table S2). This difference may be linked to the organization of the pecT promoter region or a transcriptional control different from that of the pel genes. Quantitative Western blot experiments revealed that the cellular concentration of PecT in the parental strain decreased as the temperature increased (Fig. 2B and C). These findings indicate that production of PecT is thermoregulated at the level of transcription and, although made at lower levels at 37.5°C, mediates a greater effect. It thus appears that the level of PecT produced at 37.5°C is sufficient to provide an efficient repression of Pel synthesis. Furthermore, in the parental strain, the stability of pecT and pel mRNAs showed similar patterns in response to temperature (Fig. S1). Cm chase experiments also revealed that PecT is relatively stable at the three selected temperatures because no significant decrease in the cellular content of this protein was observed for up to 5 h after Cm treatment (Fig. S2B).

#### Impact of temperature on promoter occupancy

To determine whether PecT directly regulates target gene expression in response to changes in temperature, we used the chromatin immunoprecipitation (ChIP) technique to compare *in vivo* PecT-DNA complex formation at the three selected temperatures (21.5, 30 and 37.5°C). PecT

antibodies were used to quantify the occupancy of PecT at target promoters compared with a control region (regulatory region of *lpxC*) not expected to bind PecT. At 37.5°C, PecT strongly interacts with the target promoters *pelB*, *pelD*, *pelE* and *pecT* (Fig. 3). These interactions increased as the temperature increased (Fig. 3). Under the same conditions, no significant specific binding of PecT on *lpxC* was observed. These data support a direct involvement of PecT in the thermoregulation of *pel* and *pecT* genes.

To test this conclusion more directly *in vitro*, a stable purified PecT is required. However, no such stable PecT derivatives are available because of the intrinsic tendency of PecT to aggregate, particularly at low temperatures.

#### Impact of DNA supercoiling state on PecT activity

It has been shown, in mammalian pathogens, that growth temperature impacts on the DNA supercoiling state (Hurme and Rhen, 1998; Eriksson *et al.*, 2002). We used the plasmid pUC18, transformed in *D. dadantii* cells, to monitor the effect of temperature on DNA topology in exponentially growing cells. The distribution of plasmid topoisomers was analysed by high-resolution chloroquine-agarose gel electrophoresis. Increasing the growth temperature from 21.5 to 37.5°C led to a relaxation of the plasmid DNA, both in the parental strain and in the *pecT* mutant (Fig. S4). To test whether the modulation of PecT



Fig. 4. Effect of DNA relaxation on PecT activity.

A. Impact of DNA gyrase inhibition on PecT target gene expression. Bacteria grown to late exponential phase at 21.5°C were treated with a sublethal concentration of novobiocin (100 µg ml<sup>-1</sup>), and samples were removed 15 min post-treatment for transcript quantification using qRT-PCR. The *lpxC* gene was used as a reference for normalization For each gene, relative expressions are expressed as the ratio of the transcript level obtained in the pecT mutant relative to those obtained in the parental strain. Each value represents the mean of three independent experiments. Bars indicate the standard deviation. The impact of DNA relaxation on PecT activity in pel gene expression, in the presence of novobiocin, was significantly different from that observed in standard growth conditions (P values < 0.05). B. Effect of DNA gyrase inhibition on PecT binding to DNA promoters. Quantification of PecT binding to DNA promoters. by immunoprecipitation 15 min after the addition of novobiocin (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). ChIP fold enrichment scores were calculated relative to the non-target *lpxC*. Each value represents the mean of three independent experiments. Bars indicate the standard deviation. The impact of DNA relaxation on PecT binding on the pel and pecT promoters was different to that observed in standard growth conditions (P value < 0.05).

activity by the growth temperature involves changes in DNA topology, we evaluated the action of PecT on target genes under conditions of DNA relaxation using novobiocin, a coumarin drug inhibiting the generation of negative supercoils by DNA gyrase (Maxwell, 1997). In parallel, we used the plasmid pUC18 transformed in D. dadantii cells to monitor the effect of drugs on DNA topology. The addition of novobiocin leads to a significant relaxation of plasmid DNA, at 21.5°C, but only a slight relaxation of DNA is observed at 37.5°C (Fig. S5). The limited effect of novobiocin at 37.5°C is probably due to the naturally high level of DNA relaxation observed at this temperature. As a result, we used 21.5°C as the growth temperature for studying the impact of DNA relaxation on PecT activity. For this, we compared the *pel* gene expression between the parental strain and the pecT mutant, either in the presence of novobiocin or in standard growth conditions. The results revealed that the relaxation of DNA increased PecT repression on all three *pel* gene expressions by twofold to fourfold as compared with standard conditions, while the expression of IpxC, used as a reference gene for qRT-PCR (Hommais et al., 2011), did not vary significantly (Fig. 4A). These results indicate that PecT participates in the modulation of *pel* gene expression in response to DNA relaxation.

We next used ChIP, coupled to qPCR, to quantify PecT binding to *pel* gene promoters in conditions of DNA relaxa-

tion. Novobiocin treatment caused a significant increase in PecT occupancy for all three tested promoters (Fig. 4B). Taken together, our findings suggest that binding of PecT at the target gene promoters is enhanced by the relaxation of DNA. Because DNA is more relaxed at high temperature, this could contribute to the thermoregulation of *pel* gene expression by PecT.

#### The pecT mutant is virulent at high temperatures

We investigated the impact of a *pecT* mutation on the pathogenicity of *D. dadantii* at the three selected temperatures. For this, we used chicory leaf assays to compare the virulence of the WT *D. dadantii* 3937 strain and its *pecT* derivative. Because both strains have a significantly reduced growth rate at 21.5°C compared with those observed at 30 and 37.5°C, we used variable incubation times for the inoculated plant organs at the different temperatures: 16 h of incubation at 30 and 37.5°C.

At 21.5°C, no significant difference was observed in disease symptoms between the WT and pecT strains, whereas at 30°C, in accordance with our previous observations (Castillo and Reverchon, 1997), the amount of plant tissue macerated by the pecT mutant was at least sixfold higher than that of the WT strain. Finally, at 37.5°C, no disease symptoms were seen with the WT strain in

Dickeya dadantii PecT protein and virulence thermoregulation 7



**Fig. 5.** Impact of temperature on virulence of *D. dadantii* WT 3937 strain and its *pecT* derivative. Chicory leaves were inoculated with  $2.5 \times 10^6$  bacteria and incubated at the indicated temperature. As both strains show a significantly reduced growth rate at  $21.5^{\circ}$ C compared with those observed at 30 and  $37.5^{\circ}$ C, the inoculated chicory leaves were incubated for 16 h at 30 and  $37.5^{\circ}$ C, and for 32 h at  $21.5^{\circ}$ C. A. Representative examples of symptoms generated by WT and *pecT* strains.

B. Weight of macerated tissues; each value represents the mean of four independent experiments. Bars indicate the standard deviation. The weight of macerated tissues by the *pecT* mutant, at 30 and 37.5°C, was significantly different to that of the WT strain (*P* value < 0.05); no difference was observed between the two strains at 21.5°C. Fold changes (FC) are the ratio of the weight of macerated tissues in the *pecT* mutant relative to the weight of rotted tissues measured in the WT strain.

C. Numeration of bacteria in the macerated tissues. Each value represents the mean of four independent experiments ± standard deviation.

contrast with the *pecT* mutant for which significant maceration was observed (Fig. 5A and B). Bacterial multiplication was monitored by estimation of the bacterial concentration in the rotted tissues. This revealed that the WT and *pecT* strains display a similar growth capacity *in planta* at both 21.5 and 30°C (Fig. 5C). Thus, the WT strain was clearly less efficient than the *pecT* mutant in initiating and inducing soft-rot symptoms at high temperatures.

#### Discussion

The principal aim of this study was to shed light on the mechanism involved in the thermoregulation of *pel* gene expression, the main virulence factors in the plant pathogenic bacterium *D. dadantii*. In previous work, Pel synthesis was shown to be temperature-dependent (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992), but the thermoregulation mechanism has remained unresolved. We identified the temperature-responsive component that mediates thermoregulation of the *pel* genes. We demonstrated that PecT transduces temperature changes into a transcriptional response through its repression function. Furthermore, we found that PecT uses the changes in DNA topology induced by temperature variation to adjust its repressive activity on *pel* genes such that PecT binds more

strongly to relaxed DNA in *D. dadantii* cells grown at high temperatures (around 37°C). To our knowledge, this is the first example of a direct cooperation between a conventional transcriptional factor and DNA topology in order to regulate bacterial virulence gene expression in response to temperature.

We have previously found that *pecT* expression is strongly repressed by H-NS (Nasser and Reverchon, 2002) and the thermoregulation of virulence genes, in mammalian pathogenic bacteria, often involves a regulatory cascade mechanism initiated by H-NS (Falconi et al., 1998; Hurme and Rhen, 1998). However, we show that such a model is not relevant in D. dadantii as H-NS did not appear to be involved in the thermoregulation of Pel production (Fig. 1A). We have shown that PecT synthesis is thermoregulated probably via the autoregulation of PecT on its own gene (Castillo and Reverchon, 1997), but the thermoregulation of Pel production appeared not to be correlated with the cellular concentration of PecT. These observations are contrary to those previously reported in mammalian pathogenic bacteria where the concentration of the specific regulators, working in concert with H-NS, is a determinant of virulence gene thermoregulation (Falconi et al., 1998; Hurme and Rhen, 1998; Herbst et al., 2009). This notable difference may explain the lack of involvement of H-NS in the thermoregulation of Pel synthesis.

8 E. Hérault, S. Reverchon and W. Nasser



Fig. 6. Model of temperature-mediated regulation of pel gene expression. The lines with a bar represent a repression mechanism; wide and dotted arrows under the genes indicate high and low transcription, respectively; 'i' and 'a' represent inactive and active forms of the regulator PecT at low and high temperature, respectively. At a low temperature, the high supercoiling state of DNA and a conformational change to the less active form of PecT prevents effective binding of PecT on pel gene promoters; this leads to an efficient production of Pels. An elevated temperature induces a conformational change to the active form of PecT and a relaxation of DNA. PecT then binds efficiently to the pel gene promoters to repress their expression.

PecT silences pel gene expression at high temperatures by direct binding at the target gene promoters (Fig. 3). Furthermore, the interaction between PecT and the *pel* gene promoter varies according to DNA topology (Fig. S4 and Fig. 4). This indicates that PecT fine-tunes the sensing of superhelicity of the pel gene promoters. Interestingly, in Salmonella enterica, it has recently been observed that DNA topology also modulates the binding of OmpR, a master stress-response regulator, on virulence genes located in the SPI-1 and SPI-2 pathogenicity islands (Cameron and Dorman, 2012). There is, therefore, a growing body of evidence that in addition to nucleoidassociated proteins, specialized regulators can also use changes in DNA topology, a global regulatory mechanism of gene expression (Travers and Muskhelishvili, 2005; Dillon and Dorman, 2010), to control specific target gene expression. The changes in DNA topology may play a more diffuse role in the regulation of bacterial gene expression than anticipated. A future overall analysis of PecT binding to the D. dadantii chromosome will shed light on the relative contribution of DNA relaxation to PecT-DNA interactions.

The modulation of PecT binding to *pel* gene promoters via changes in DNA topology may not be the only parameter that adjusts PecT regulatory function in response to temperature fluctuations (compare Fig. 2 and Table S3 with Fig. 4B). As depicted in Fig. 6, although speculative, it is plausible that a second mechanism acts in conjunction with changes in the DNA supercoiling state. This consists of a conformational transition of PecT in response to

temperature, resulting in the modulation of its DNAbinding capacity. Such a control has been previously reported for RovA in Yersinia (Herbst et al., 2009), TIpA in Sa. enterica (Hurme et al., 1997) and for RheA in Streptomyces albus (Servant et al., 2000). The thermosensing activity of the MarR-type regulator, RovA, is mainly mediated by a small loop within the RovA dimerization domain and residues in the adjacent C-terminal helix. These determinants allow partial unfolding of RovA upon a temperature upshift that affects the proper positioning of the DNA-binding segment (Herbst et al., 2009; Steinmann and Dersch, 2013). TpIA exhibits homology with proteins involved in plasmid partition or chromosome segregation, whereas RheA is a heat-shock gene repressor. Both TpIA and RheA sense temperature changes with coiled-coil domains. A thermo-induced conformational transition in these proteins results in either an active or an inactive form. The probability that PecT could adopt a coiled-coil conformation was calculated using the COILS program (Lupas et al., 1991). When a window of 14 and the MTIDK unweighted matrix were used together, a region encompassing the residues 40-53 (SAVSQQMQRLEQLI), with a significant probability (0.675 for all the 14 residues) for forming a coiled-coil structure, was detected. Interestingly, this motif partially overlaps the PecT Helix-Turn-Helix (HTH) motif (residues 26 to 47: NTFAAAAVAVCRTQSAVSQQMQ). Thus, the temperature-dependent conformational transition of the potential coiled-coil motif in PecT might affect the proper folding of the DNA-binding HTH segment, as proposed for

RovA. At present, the intrinsic tendency of PecT to aggregate represents a significant barrier to establishing a direct link between the structural changes of PecT and its thermoregulation function.

According to our observations of the regulation of Pel production, we found that the virulence of the *pecT* mutant, as regards temperature changes, was different from that of the parental strain (Fig. 5A and B). Thus, it is tempting to speculate that DNA topology and PecT constitute an efficient system for sensing temperature changes and adjusting, in turn, D. dadantii virulence. The significance of a temperature-sensitive expression of virulence factors in plant pathogenic bacteria is speculative at the moment. However, because these bacteria have to adjust their virulence gene expression in response to diurnal and seasonal temperature fluctuations during both their pathogenic and saprophytic life styles, it becomes evident that any response to temperature represents an important challenge for plant pathogenic bacteria. In the case of D. dadantii, a rapid response to temperature shifts at the level of *pel* gene transcription might enable this bacterium to take advantage of favourable abiotic conditions and to infect the host plant. For example, under low temperatures that are unfavourable for bacterial growth, D. dadantii could use both the high supercoiling state of DNA and the inability of PecT to interact tightly with DNA to ensure a sufficient production of Pels to initiate a rapid response as soon as favourable growth conditions occur (e.g. high humidity and temperatures around 30°C). Then, the relaxation of DNA and an increase in the PecT binding capacity to pel gene promoters would result in a decrease in Pel production. However, at the optimal growth temperature (30°C), the decrease in Pel production might be compensated for by the improved growth capacity of D. dadantii. Moreover, it should be kept in mind that the regulation of *pel* gene expression is complex and involves several regulators (Lautier et al., 2007; Sepulchre et al., 2007; Reverchon et al., 2010; Ouafa et al., 2012). Some of these previously described regulatory systems may, in conditions of pathogenesis, overlap with the system described in this work to regulate precisely Pel production. For the past three decades, potato culture in Europe has been suffering from the emergence of phytopathogenic bacteria belonging to the Dickeya genus, which cause blackleg disease, even though this bacterial genus was previously considered as being restricted to tropical and subtropical areas or greenhouse cultures (Toth et al., 2011). Bacteria of the Dickeya genus would seem to have a good capacity for adapting to changes in temperature and for survival in cold weather regions. Future investigations should focus on the integration of the thermoregulation mechanism in the networks controlling the synthesis of Pels and on the role of this thermoregulation mechanism in the emergence of *Dickeya* in cold regions.

#### Experimental procedures

# Bacterial strains, plasmids, culture conditions and DNA manipulation techniques

Bacterial strains and plasmids used were from D. dadantii strains, grown either in rich Luria-Bertani medium or in M63 minimal salts medium (Miller, 1972) supplemented with carbon source sucrose or glycerol at 2 g  $l^{-1}$ , and PGA at 4 g  $l^{-1}$ . M63 minimal medium was used for all the experiments involving temperature changes because most of our previous studies, particularly those concerning the regulation of gene expression, were carried out in this growth medium. When required, antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; kanamycin 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; Cm 25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Liquid cultures were grown in a shaking incubator (220 rpm). Media were solidified with 1.5% (w/v) Difco agar. Novobiocin was used at a sublethal concentration (100 µg ml<sup>-1</sup>) to inhibit DNA gyrase in *D. dadantii* for 15 min. At this concentration, novobiocin has no impact on D. dadantii growth (Ouafa et al., 2012). DNA manipulations were performed using the standard methods (Sambrook and Russell, 2001).

# Separation of plasmid topoisomers by gel electrophoresis

The multicopy plasmid pUC18 was extracted from *D. dadantii* using the Qiaprep Spin Miniprep kit, and approximately 1  $\mu$ g of plasmid DNA was electrophoresed on 1% agarose gels containing 2.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> chloroquine. Electrophoresis and analysis of topoisomer distribution was performed as previously described (Ouafa *et al.*, 2012).

#### Enzyme assays

An assay of pectate lyase was performed on toluenized cell extracts. Pectate lyase activity was measured by following the degradation of PGA to unsaturated products that absorb at 230 nm (Moran *et al.*, 1968). Specific activity is expressed as  $\mu$ mol of unsaturated products liberated min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (dry weight) bacteria. Bacterial concentration was estimated by measuring turbidity at 600 nm, given that an OD<sub>600</sub> of 1.0 corresponds to 10<sup>9</sup> bacteria ml<sup>-1</sup> and to 0.47 mg of bacteria (dry weight) ml<sup>-1</sup>.

#### RNA isolation and qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted from *D. dadantii* by the hot-phenol method, followed by Turbo DNase digestion (Ambion, Austin, TX, USA). RNA was quantified using a Nanodrop ND2000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, NC, USA), and the quality was evaluated using agarose gel electrophoresis. For RT-PCR analysis, cDNA was synthesized using random hexamers and Fermentas reverse transcriptase, and qPCR was performed using the LightCycler® fast-start DNA masterplus SYBR Green I kit from Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), as previously described (Lautier et al., 2007). Oligonucleotides used as primers for quantitative PCR are listed in Table S4. The program used to analyse the data was the Relative Expression Software Tool (Pfaffl et al., 2002). The IpxC gene was selected as the reference gene for real-time RT-PCR to provide an accurate normalization (Hommais et al., 2011).

#### 10 E. Hérault, S. Reverchon and W. Nasser

#### Virulence assays

Pathogenicity tests were performed on chicory leaves using  $2.5 \times 10^6$  bacteria as inoculum, as described by Lautier and Nasser (2007). Assays were carried out in triplicate and negative controls were performed using sterile buffer.

# Stability of Pel activity and degradation rate of PecT measured by antibiotic chase

Bacteria grown in M63 minimal medium containing glycerol and PGA to the late-exponential phase ( $OD_{600} = 0.6$  at 21.5°C, and  $OD_{600} = 0.8$  at 30 and 37.5°C) were treated with Cm at a final concentration of 200 µg ml<sup>-1</sup>. Samples were removed at time points between 0 and 24 h, toluenized, and then used for Pel activity quantification, as previously described. Although Pel production is optimal in early stationary growth phase, these experiments were performed in late exponential growth phase because bacterial cells are more sensitive to Cm during this growth stage. For PecT quantification, samples corresponding to a constant bacterial number were removed during the same time period, centrifuged, resuspended in an adequate volume of Laemmli sample buffer and boiled for 2-3 min. Samples were separated by SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and transferred for 20 min onto a nitrocellulose membrane using a semi-dry blotter. Western blots of the separated proteins were incubated with a polyclonal anti-PecT, as the primary antibody, and an anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody (SIGMA, Saint Louis, MO, USA) as the secondary antibody. The signals obtained in Western experiments were detected by autoradiography on Amersham MP film and quantified using the Image J software from National Institutes of Health. Polyclonal PecT antibodies were obtained by collecting sera from rabbits, following a course of four injections, at intervals of 2 weeks, using 200  $\mu$ g of purified PecT for the first injection and 100 µg of protein for the subsequent booster injections.

#### ChIP

ChIP experiments were essentially performed as previously described (Reverchon *et al.*, 2010) on late exponential phase growing cells. PecT-antibodies were used for immunoprecipitation of DNA. Following purification, PCR was used to analyse immunoprecipitated DNA:  $5 \,\mu$ I DNA samples were used in a 50- $\mu$ I reaction mix containing a 0.5  $\mu$ M concentration of each oligonucleotide primer. DNA amplification was catalysed by Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnus, Lithuania), and the PCR was allowed to proceed for 22–25 cycles before 10  $\mu$ I of the reaction mixture was analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel. Alternatively, qPCR was performed with a 1  $\mu$ I DNA sample, as previously described.

#### Statistical analysis

All statistics were performed using a Student's t test, and the results were considered to be significantly different when P values were below 0.05.

#### Acknowledgements

We are grateful to Valerie James for the English corrections and to our colleagues G. Condemine and O. Zghidi-Abouzid for their support and advice. We are grateful to J. Wawrzyniak and S. Piquerez for technical support. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and from the French 'Agence Nationale de la Recherche (ANR)' through 'ANR blanc DAMAGE 2009 Program'. The funders were not involved in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### References

- Braun, Y., Smirnova, A.V., Weingart, H., Schenk, A., and Ullrich, M.S. (2009) Coronatine gene expression *in vitro* and *in planta*, and protein accumulation during temperature downshift in *Pseudomonas syringae*. Sensors **9**: 4272– 4285.
- Cameron, A.D., and Dorman, C.J. (2012) A fundamental regulatory mechanism operating through OmpR and DNA topology controls expression of *Salmonella* pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2. *PLoS Genet* **8**: e1002615.
- Castillo, A., and Reverchon, S. (1997) Characterization of the pecT control region from *Erwinia chrysanthemi* 3937. J Bacteriol **179**: 4909–4918.
- Castillo, A., Nasser, W., Condemine, G., and Reverchon, S. (1998) The PecT repressor interacts with regulatory regions of pectate lyase genes in *Erwinia chrysanthemi*. *Biochim Biophys Acta* **1442**: 148–160.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., et al. (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J* **43**: 262–272.
- Dillon, S.C., and Dorman, C.J. (2010) Bacterial nucleoidassociated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8: 185–195.
- Dorman, C.J. (1991) DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect Immun* **59:** 745–749.
- Dorman, C.J., and Corcoran, C.P. (2009) Bacterial DNA topology and infectious disease. *Nucleic Acids Res* 37: 672– 678.
- Eriksson, S., Hurme, R., and Rhen, M. (2002) Lowtemperature sensors in bacteria. *Philos T Roy Soc B* **357**: 887–893.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G., and Gualerzi, C.O. (1998) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperaturedependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J* 17: 7033–7043.
- Herbst, K., Bujara, M., Heroven, A.K., Opitz, W., Weichert, M., Zimmermann, A., and Dersch, P. (2009) Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog* 5: e1000435.
- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Ligori, S., Expert, D., *et al.* (2008) PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **190**: 7508–7522.

- Hommais, F., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Pineau-Chapelle, E., Van Gijsegem, F., Nasser, W., and Reverchon, S. (2011) *lpxC* and *yafS* are the most suitable internal controls to normalize real time RT-qPCR expression in the phytopathogenic bacteria *Dickeya dadantii*. *PLoS One* **6**: e20269.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Dominguez, H., and Robert-Baudouy, J. (1992) Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **174:** 7807–7818.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., and Reverchon, S. (1996) Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol* **50**: 213– 257.
- Humair, B., González, N., Mossialos, D., Reimmann, C., and Haas, D. (2009) Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *ISME J* **3**: 955–965.
- Hurme, R., and Rhen, M. (1998) Temperature sensing in bacterial gene regulation – what it all boils down to. *Mol Microbiol* **30**: 1–6.
- Hurme, R., Berndt, K.D., Normark, S.J., and Rhen, M. (1997) A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* **90**: 55–64.
- Kamp, H.D., and Higgins, D.E. (2011) A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 7: e1002153.
- Kepseu, W.D., Sepulchre, J.A., Reverchon, S., and Nasser, W. (2010) Toward a quantitative modeling of the synthesis of the pectate lyases, essential virulence factors in *Dickeya dadantii. J Biol Chem* **285**: 28565–28576.
- Klinkert, B., and Narberhaus, F. (2009) Microbial thermosensors. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2661–2676.
- Lautier, T., and Nasser, W. (2007) The DNA nucleoidassociated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi. Mol Microbiol* **66**: 1474–1490.
- Lautier, T., Blot, N., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. (2007) Integration of two essential virulence modulating signals at the *Erwinia chrysanthemi pel* gene promoters: a role for Fis in the growth-phase regulation. *Mol Microbiol* **66:** 1491– 1505.
- Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Côte, E., Nasser, W., and Van Gijsegem, F. (2008) The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environ Microbiol* **10**: 545– 559.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**: 1162–1164.
- Maxwell, A. (1997) DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol* **5:** 102–109.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moran, F., Nasuno, S., and Starr, M.P. (1968) Extracellular and intracellular polygalacturonic acid trans-eliminases of *Erwinia carotovora. Arch Biochem Biophys* **123**: 298–306.
- Nasser, W., and Reverchon, S. (2002) H-NS-dependent activation of pectate lyases synthesis in the phytopathogenic

bacterium *Erwinia chrysanthemi* is mediated by the PecT repressor. *Mol Microbiol* **43**: 733–748.

- Nasser, W., Faelen, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Reverchon, S. (2001) Role of the nucleoid-associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 10–20.
- Ouafa, Z.-A., Reverchon, S., Lautier, T., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. (2012) The nucleoid-associated proteins H-NS and FIS modulate the DNA supercoiling response of the *pel* genes, the major virulence factors in the plant pathogen bacterium *Dickeya dadantii*. *Nucleic Acids Res* **40**: 4306–4319.
- Perombelon, M.C.M. (2002) Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol* **51**: 1–12.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: e36.
- Prosseda, G., Falconi, M., Giangrossi, M., Gualerzi, C.O., Micheli, G., and Colonna, B. (2004) The *virF* promoter in *Shigella*: more than just a curved DNA stretch. *Mol Microbiol* **51**: 523–537.
- Reverchon, S., Van Gijsegem, F., Effantin, G., Zghidi-Abouzid, O., and Nasser, W. (2010) Systematic targeted mutagenesis of the MarR/SlyA family members of *Dickeya dadantii* 3937 reveals a role for MfbR in the modulation of virulence gene expression in response to acidic pH. *Mol Microbiol* **78**: 1018–1037.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sepulchre, J.A., Reverchon, S., and Nasser, W. (2007) Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *J Theor Biol* **244:** 239–257.
- Servant, P., Grandvalet, C., and Mazodier, P. (2000) The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus. Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3538–3543.
- Smirnova, A., Li, H., Weingart, H., Aufhammer, S., Burse, A., and Finis, K. (2001) Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Arch Microbiol* **176:** 393–399.
- Smirnova, A.V., Braun, Y., and Ullrich, M.S. (2008) Sitedirected mutagenesis of the temperature-sensing histidine protein kinase CorS from *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiol Lett* **283**: 231–238.
- Steinmann, R., and Dersch, P. (2013) Thermosensing to adjust bacterial virulence in a fluctuating environment. *Future Microbiol* 8: 85–105.
- Surgey, N., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G. (1996) The *Erwinia chrysanthemi pecT* gene regulates pectinase gene expression. *J Bacteriol* **178**: 1593–1599.
- Toth, I., Van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., *et al.* (2011) *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol* **60**: 385–399.
- Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2005) DNA supercoiling a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* **3**: 157–169.

<sup>© 2013</sup> John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology, Environmental Microbiology

#### 12 E. Hérault, S. Reverchon and W. Nasser

#### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Fig. S1.** Stability of the *pel, pecT* and *lpxC* transcripts as a function of temperature. Transcription was blocked in late exponential growing cells by adding rifampicin (0 min) to a concentration of 500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> and samples were removed, at the indicated times, for transcript analysis using qRT-PCR. The *lpxC* gene was used as a reference for normalization. The quantity of transcripts detected at t = 0 min was arbitrarily taken as equal to 1. Each value represents the mean of three experiments and bars indicate the standard deviation. The level of transcripts remaining after addition of rifampicin was plotted as a function of time. No significant difference in the transcript degradation rate was observed between the parental strain and the *pecT* mutant.

Fig. S2. Impact of temperature on the levels of Pel activity and PecT protein. A. Cultures of the parental strain and the pecT mutant were grown, at the indicated temperatures, to late exponential phase and then treated with Cm at a final concentration of 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, to stop protein synthesis. Samples were taken at different time points following chloramphenicol addition and then used for the quantification of Pel activity. The Pel activity measured at t = 0 min was arbitrarily considered as equal to 1. The remaining Pel SA, after Cm treatment, in the PS and in its pecT derivative was plotted as a function of time. Each result represents the mean of three independent experiments; bars indicate the standard deviation. B. Representative results of PecT cellular content, measured in Western blot experiments, after Cm treatment as in A. 10 µg of total cellular proteins were used for the different samples analysed. Similar results were obtained in three different experiments.

**Fig. S3.** Impact of temperature shift on PecT repressive activity. Initial cultures of the parental and *pecT* strains were maintained at 30°C until late exponential growth phase ( $OD_{600} = 0.8$ ). Cultures were then divided into three different aliquots: one aliquot was transferred to 21.5°C, another was transferred to 37.5°C and one was kept at 30°C. Samples were removed at 0, 5, 10 and 15 min after the temperature

shift to measure mRNA transcripts using quantitative RT-PCR. The presented data represent the fold changes of transcript levels obtained in the *pecT* mutant versus those obtained in the parental strain for four genes (*lpxC*, *pelB*, *pelD* and *pelE*). Each result represents the mean of three independent experiments; bars indicate the standard deviation. Results obtained at time points 5 min, 10 min and 15 min at 30°C are significantly different from those obtained at the same time points at 21.5°C and 37.5°C (*P* values < 0.05 in a sample *t*-test).

**Fig. S4.** Effect of growth temperature on DNA supercoiling state. Topoisomers of plasmid pUC18 were isolated from the parental strain and its *pecT* derivative, grown at the stated temperatures. Topoisomers were separated on agarose gels containing  $2.5 \,\mu g \, ml^{-1}$  chloroquine. At this concentration of chloroquine, the more negatively supercoiled topoisomers migrate faster in the gel. Similar results were obtained in three independent experiments. The GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas) was used to visualize the distribution of topoisomers in the gel.

**Fig. S5.** Effect of DNA gyrase inhibition on the DNA supercoiling state in *D. dadantii* grown at 21.5°C and 37.5°C. Topoisomers of plasmid pUC18 were isolated from parental and *pecT* strains, grown at the indicated temperatures, and separated on agarose gels containing 2.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> chloroquine. At this concentration of chloroquine, the more negatively supercoiled topoisomers migrate faster in the gel. Similar results were obtained in three separate experiments and typical results are shown. Plasmids were extracted from late exponential growing bacteria treated (+) or not (-) with a sublethal concentration of novobiocin (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>).

**Table S1.** Influence of growth temperature on pectate lyase synthesis in the parental strain A350 and its derivative strains (*pecT*, *hns*, *hns-pecT*).

**Table S2.** Fold change of *pel, pecT* and *lpxC* gene expression induced by high temperatures in the parental strain and the *pecT* mutant.

**Table S3.** Fold change of *pel* and *lpxC* gene expression induced by inactivation of the PecT repressor.

**Table S4.** Bacterial strains, plasmids and oligonucleotides used in this work.

Strain	Pel SA		
-	21.5 °C	30 °C	<b>37.5</b> °С
PS	$2.19 \pm 0.07 \ [1.0]$	1.13 ± 0.40 [1.0]	0.04 ± 0.01 [1.0]
pecT	$4.54 \pm 0.76 \ [+2.1]$	$13.97 \pm 0.89 \ [+12.3]$	$2.46 \pm 0.12 \ [+ 66.3]$
hns	$0.06 \pm 0.003$ [- 36.5]	$0.03 \pm 0.002$ [- 37.7]	$0.001 \pm 3.10^{-4}$ [-36.2]
hns-pecT	$9.16 \pm 0.49 \ [+4.2]$	$33.85 \pm 8.68 \ [+29.9]$	4.60 ± 0.13 [+ 124.0]

**Table S1.** Influence of growth temperature on pectate lyase synthesis in the parental strain

 A350 and its derivative strains (*pecT*, *hns*, *hns-pecT*)

Pel specific activity (Pel SA) was measured for each strain grown, at selected temperatures, in minimal medium supplemented with glycerol and polygalacturonate. Data presented are the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviation. The results obtained at 21.5 °C and 37.5 °C are significantly different from those obtained at 30 °C for all the strains analyzed (*P* values < 0.05) Furthermore, the results obtained in all mutant strains at the three indicated temperatures are different from those obtained in the parental strain (*P* values < 0.05). The fold changes in Pel activity, resulting from inactivation of H-NS and/or PecT proteins, are indicated in brackets for each temperature. They are expressed as the ratio of the Pel SA measured in each mutant strain compared with that obtained in the parental strain, respectively. Pel SA is expressed as  $\mu$ mol of unsaturated product liberated per min per mg of bacterial dry weight.

**Table S2.** Fold change of *pel*, *pecT* and *lpxC* gene expression induced by high temperatures in the parental strain and the *pecT* mutant.

Gene name	Fold change induced by high temperatures			
	Parental strain A350		<i>pecT</i> muta	ant A2148
	30 °C	37.5 °C	30 °C	37.5 °C
lpxC	$-1.11 \pm 0.01$	$+ 1.09 \pm 0.07$	$-1.03 \pm 0.03$	$-1.14 \pm 0.03$
pelB	$-1.98 \pm 0.14$	$\textbf{-8.75} \pm 0.42$	$+$ 2.12 $\pm$ 0.03	$-1.12 \pm 0.07$
pelC	$-4.59 \pm 0.03$	$\textbf{-20.65} \pm 0.86$	$+\ 2.58 \pm 0.04$	$-1.61 \pm 0.02$
pelD	$-11.88 \pm 0.05$	$-621.38 \pm 24.64$	$+\ 3.80 \pm 0.39$	$-2.10 \pm 0.41$
pelE	$-12.19 \pm 0.65$	$-315.39 \pm 3.48$	$+\ 4.09 \pm 0.25$	$-2.20 \pm 0.14$
pecT	$-1.82 \pm 0.05$	$-3.62 \pm 0.00$	-	-

Fold changes are expressed as the relative expression of the genes cited at the indicated temperature (30 °C or 37.5 °C), compared to that at 21.5 °C. Positive and negative fold changes indicate up-regulation and down-regulation, respectively. Data presented are the means from three independent experiments  $\pm$  standard deviation. The results obtained for the *pel* and *pecT* genes at 30 °C and 37.5 °C are different from those obtained at 21.5 °C for all the strains analysed (*P* values < 0.05).

Gene name	Fold change induced by inactivation of the PecT repressor		
	21.5 °C	30 °C	37.5 °C
<i>lpxC</i>	$+ 1.21 \pm 0.10$	$+ 1.30 \pm 0.03$	$-1.03 \pm 0.02$
pelB	$+\ 4.75 \pm 0.02$	$+ 19.85 \pm 0.25$	$+37.15 \pm 1.79$
pelC	$+ 1.42 \pm 0.06$	$+ 16.80 \pm 0.25$	$+\ 18.19\pm0.76$
pelD	$+\ 1.29 \pm 0.09$	$+58.23 \pm 6.00$	$+388.74 \pm 15.40$
pelE	$+2.33 \pm 0.04$	$+ 115.94 \pm 6.97$	$+334.13 \pm 3.69$

**Table S3.** Fold change of *pel* and *lpxC* gene expression induced by inactivation of the PecT repressor.

Fold changes are expressed as the relative expression of the genes cited in the *pecT* mutant compared to that in the parental strain. Positive and negative fold changes indicate upregulation and down-regulation, respectively. Data presented are the means from three independent experiments  $\pm$  standard deviation. The results obtained for the four *pel* genes in the *pecT* mutant, at 30 °C and 37.5 °C, are different from those obtained in the parental strain at the same temperatures (*P* values < 0.05). In the case of *pelB* and *pelE*, a significant difference in expression was also observed at 21.5 °C (*P* values < 0.05) between the parental strain and the *pecT* mutant.

Strain	Relevant characteristics and use	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> DH5α	$F^-$ Φ80 <i>lac</i> ZΔM15 Δ( <i>lac</i> ZYA- <i>arg</i> F) U169 <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1	Life Technology
	hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1	
Dickeya dadantii		
3937	Wild-type strain isolated from Saintpaulia ionantha	Laboratory collection
A4116	3937 <i>pecT</i> ::Cm <sup>R</sup>	(Lebeau et al., 2008)
A350	3937 rafR, ganB	(Hugouvieux-Cotte-Pattat and Charaoui-Boukerzaza, 2009)
A2148	A350 $pecT$ ::Cm <sup>R</sup>	(Surgey et al., 1996)
A3379	A350 <i>hns</i> ::Km <sup>R</sup>	(Nasser et al., 2001)
A3381	A350 $pecT$ ::Cm <sup>R</sup> , $hns$ ::Km <sup>R</sup>	(Nasser and Reverchon, 2002)
Plasmids pUC18	Cloning vector, Ap <sup>R</sup>	Laboratory collection
Oligonucleotides		
pAW qPCR fw	5'- CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC -3'	Applied Biosystems
pAW qPCR rv	5'- TGACCACCCAGCCATCCTTC -3'	Applied Biosystems
pelA qPCR fw	5'- AGGACGGAACCATTGTCGGAGAAA -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelA qPCR rv	5'- AAACCATGCTGATTGGTCACAGCG -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelB qPCR fw	5'- TCCGCCAACTTCGGTATCTGGATT -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelB qPCR rv	5'- TGACGTCGTTGTAGCGGTTATGGT -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelC qPCR fw	5'- CACTTCCGGTGGTAACGTG -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelC qPCR rv	5'- ACCTTTGGAATCGACTTTGG -3'	(Venkatesh et al., 2006)
pelE qPCR fw	5'- AGCGAATTCAAAGCAGCACT -3'	(Lautier et al., 2007)
pelE qPCR rv	5'- GGCGTTTCGATGTACAGGTT -3'	(Lautier et al., 2007)
pelD qPCR fw	5'- TTGTGGAAGGTAACGCGCAGTTTG -3'	(Lautier et al., 2007)
pelD qPCR rv	5'- ATGGCAAATTCACCAACGGCTCTC -3'	(Lautier et al., 2007)
pecT qPCR fw	5'- ATACAAGTCGCCCTGTCCTC -3'	(Mhedbi-Hajri et al., 2011)
pecT qPCR rv	5'- AGGCCTCATCGTTAAACTGC -3'	(Mhedbi-Hajri et al., 2011)
lpxC qPCR fw	5'- ACGGTAAGCGCATTCTGGTA -3'	(Hommais et al., 2011)
lpxC qPCR rv	5'- CATCCAGCAGCAGGTAGACA -3'	(Hommais et al., 2011)
pecT ChIP fw	5'- TCAAGCAAACGGAGAATCAA -3'	This work

pecT ChIP rv	5'- AAAACCAGCCATCTCACTCG -3'	This work
pelD ChIP fw	5'- GCCACTCAATACGGTTCAGG -3'	This work
pelD ChIP rv	5'- CGTTTTTATCTGAAATAACCCAAA -3'	This work
pelE ChIP fw	5'- CGTTTTTACGTCTAGCCCACA -3'	This work
pelE ChIP rv	5'- CGATGATTGGAACGGTGATA -3'	This work
pelB ChIP fw	5'- CAGCGATAAAGGCAGGGTAA -3'	This work
pelB ChIP rv	5'- ACGGAAGCAGGAGTGACTGT -3'	This work

Kanamycin (Km), chloramphenicol (Cm), ampicillin (Ap).

Oligonucleotides used for transcript quantification and for promoter fragment quantification in ChIP experiments are indicated as "qPCR" and "ChIP" respectively.



**Figure S1**. Stability of the *pel*, *pecT* and *lpxC* transcripts as a function of temperature. Transcription was blocked in late exponential growing cells by adding rifampicin (0 min) to a concentration of 500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> and samples were removed, at the indicated times, for transcript analysis using qRT-PCR. The *lpxC* gene was used as a reference for normalization. The quantity of transcripts detected at t= 0 min was arbitrarily taken as equal to 1. Each value represents the mean of three experiments and bars indicate the standard deviation. The level of transcripts remaining after addition of rifampicin was plotted as a function of time. No significant difference in the transcript degradation rate was observed between the parental strain and the *pecT* mutant.



Time post-chloramphenicol treatment (hours)

Figure S2. Impact of temperature on the levels of Pel activity and PecT protein.

A. Cultures of the parental strain and the *pecT* mutant were grown, at the indicated temperatures, to late exponential phase and then treated with chloramphenicol (Cm) at a final concentration of 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, to stop protein synthesis. Samples were taken at different time points following chloramphenicol addition and then used for the quantification of Pel activity. The Pel activity measured at t=0 min was arbitrarily considered as equal to 1. The remaining Pel SA, after chloramphenicol treatment, in the PS and in its *pecT* derivative was plotted as a function of time. Each result represents the mean of three independent experiments; bars indicate the standard deviation.

B. Representative results of PecT cellular content, measured in Western blot experiments, after chloramphenicol treatment as in A. 10  $\mu$ g of total cellular proteins were used for the different samples analyzed. Similar results were obtained in three different experiments.



Figure S3. Impact of temperature shift on PecT repressive activity.

Initial cultures of the parental and *pecT* strains were maintained at 30 °C until late exponential growth phase (OD<sub>600</sub> = 0.8). Cultures were then divided into three different aliquots: one aliquot was transferred to 21.5 °C, another was transferred to 37.5 °C and one was kept at 30 °C. Samples were removed at 0, 5, 10 and 15 minutes after the temperature shift to measure mRNA transcripts using quantitative RT-PCR. The presented data represent the fold changes of transcript levels obtained in the *pecT* mutant versus those obtained in the parental strain for four genes (*lpxC, pelB, pelD* and *pelE*). Each result represents the mean of three independent experiments; bars indicate the standard deviation. Results obtained at time points 5 min, 10 min and 15 min at 30 °C are significantly different from those obtained at the same time points at 21.5°C and 37.5 °C (*P* values < 0.05 in a sample *t*-test).



**Figure S4.** Effect of growth temperature on DNA supercoiling state. Topoisomers of plasmid pUC18 were isolated from the parental strain and its *pecT* derivative, grown at the stated temperatures. Topoisomers were separated on agarose gels containing 2.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> chloroquine. At this concentration of chloroquine, the more negatively supercoiled topoisomers migrate faster in the gel. Similar results were obtained in three independent experiments. The GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas) was used to visualize the distribution of topoisomers in the gel.



**Figure S5**. Effect of DNA gyrase inhibition on the DNA supercoiling state in *D. dadantii* grown at 21.5 °C and 37.5 °C. Topoisomers of plasmid pUC18 were isolated from parental and *pecT* strains, grown at the indicated temperatures, and separated on agarose gels containing 2.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> chloroquine. At this concentration of chloroquine, the more negatively supercoiled topoisomers migrate faster in the gel. Similar results were obtained in three separate experiments and typical results are shown. Plasmids were extracted from late exponential growing bacteria treated (+) or not (-) with a sublethal concentration of novobiocin (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>).

### References

- Hommais, F., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Pineau-Chapelle, E., Van Gijsegem, F., Nasser, W., and Reverchon, S. (2011) *lpxC* and *yafS* are the most suitable internal controls to normalize real time RT-qPCR expression in the phytopathogenic bacteria *Dickeya dadantii*. *PLoS One* 6:e20269.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Charaoui-Boukerzaza, S. (2009) Catabolism of raffinose, sucrose, and melibiose in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **191**:6960–6967.
- Lautier, T., Blot, N., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. 2007. Integration of two essential virulence modulating signals at the *Erwinia chrysanthemi pel* gene promoters: a role for Fis in the growth-phase regulation. *Mol Microbiol* **66**:1491–1505.
- Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Côte, E., Nasser, W., and Van Gijsegem, F. (2008) The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environ Microbiol* **10**:545–559.
- Mhedbi-Hajri, N., Malfatti, P., Pedron, J., Gaubert, S., Reverchon, S., and Van Gijsegem, F. (2011) PecS is an important player in the regulatory network governing the coordinated expression of virulence genes during the interaction between *Dickeya dadantii* 3937 and plants. *Environ Microbiol* 13:2901–2914.
- Nasser, W., and Reverchon, S. (2002) H-NS-dependent activation of pectate lyases synthesis in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* is mediated by the PecT repressor. *Mol Microbiol* **43**:733–748.
- Nasser, W., Faelen, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Reverchon, S. (2001) Role of the nucleoid-associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi. *Mol Plant Microbe Interact* 14:10–20.
- Surgey, N., Robert-Baudouy, J., and Condemine, G. (1996) The *Erwinia chrysanthemi pecT* gene regulates pectinase gene expression. *J Bacteriol* **178**:1593–1599.
- Venkatesh, B., Babujee, L., Liu, H., Hedley, P., Fujikawa, T., Birch, P., et al. (2006) The Erwinia chrysanthemi 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants. J Bacteriol 188:3088–3098.
Régulation de la synthèse des facteurs de virulence par la température chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii* 

## Résumé

L'entérobactérie *Dickeya dadantii* est responsable de la maladie de la pourriture molle sur de nombreux hôtes végétaux. Ce symptôme est essentiellement dû à la production d'un arsenal d'enzymes qui dégradent la pectine, ciment des parois des cellules végétales. Parmi ces enzymes, les pectate lyases (Pels) ont un rôle majeur dans le pouvoir pathogène en raison de leur capacité à reproduire, sous forme purifiée, le symptôme de la pourriture molle. La synthèse des Pels est soumise à un contrôle très fin qui fait intervenir différents régulateurs agissant de manière intégrée via un réseau de régulation. De nombreuses conditions environnementales modulent la synthèse des Pels *via* l'action de ces régulateurs. La température est un facteur qui agit sur leur synthèse et pour lequel les mécanismes moléculaires restaient non élucidés.

Lors de cette étude, nous avons montré que le régulateur PecT, un répresseur du réseau de régulation, intervient dans la thermorégulation de la synthèse des Pels. PecT s'est avéré être également impliqué dans la thermorégulation de deux autres fonctions de virulence : la mobilité et la synthèse des exopolysaccharides de surface. La quantification des transcrits des gènes de ces 3 fonctions de virulence a permis de montrer que l'action de PecT dans ce contrôle a lieu au niveau transcriptionnel.

Le mécanisme moléculaire de la thermorégulation exercée par PecT a été étudié plus en détail sur les gènes *pel*. Des résultats obtenus *in vivo* ont montré que la fixation de PecT sur les régions régulatrices des gènes *pel* est plus efficace quand la température augmente. La croissance de *D. dadantii* à hautes températures induit un relâchement de l'ADN. De manière remarquable, un relâchement artificiel de l'ADN par un traitement inhibant la gyrase entraine une augmentation de la fixation de PecT sur les gènes *pel* même pour des cellules cultivées à basses températures. De plus, la délétion de PecT se traduit par une augmentation de la capacité de *D. dadantii* à induire la pourriture molle à hautes températures. Ainsi la topologie de l'ADN et PecT agissent de manière concertée pour moduler la synthèse des Pels en fonction de la température.

L'ensemble de ces données apporte une preuve supplémentaire de l'importance de la dynamique structurale de la chromatine dans l'ajustement de la physiologie bactérienne en réponse aux variations des conditions environnementales.

**Mots-clés :** thermorégulation, régulateur LysR, surenroulement de l'ADN, protéines associées au nucléoïde