

Université de Montréal

**Étude de la variation de phase des fimbriae F165<sub>1</sub>, Pap et CS31A et de  
l'impact des régulateurs homologues de PapI**

par RÉMI LAVOIE

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de  
l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires option microbiologie

Avril 2013

© Rémi Lavoie, 2013

## Résumé

Les *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) sont responsables d'une grande variété de maladies. Plus particulièrement, certaines souches ExPEC, du sous-groupe d'*E. coli* uropathogènes, sont porteuses de fimbriae de type P. Cette famille d'adhésines est soumise à une régulation transcriptionnelle appelée variation de phase; un mécanisme du tout ou rien. Il s'agit d'une compétition entre deux protéines régulatrices : la Dam méthylase et la nucléoprotéine Lrp. Ce mécanisme est aussi soumis à l'influence des régulateurs locaux PapB et PapI, deux régulateurs essentiels. Afin d'étudier PapI et ses homologues ainsi que leur impact sur la variation de phase des fimbriae F165<sub>1</sub>, Pap et CS31A. Grâce à une fusion chromosomique entre la région régulatrice de *clp* et les gènes *lacZYA*, nous avons étudié l'effet, en *trans*, de PapI et Fool qui ont pu restaurer la variation de phase avec une forte tendance pour la phase OFF. Pour étudier l'action de ces protéines sur *foo* et *pap*, nous avons utilisé un système utilisant *gfp* comme gène rapporteur de l'activité des promoteurs des opérons *pap* et *foo*. Cela a permis d'observer la variation de phase au niveau cellulaire par cytométrie en flux et en temps réel par microscopie à fluorescence. Ces expériences ont confirmé que la population de cellules F165<sub>1</sub> positives a un phénotype d'expression de F165<sub>1</sub> partielle alors que les cellules Pap sont en majorité en phase OFF. PapI et Fool n'ont pas la même influence sur la variation de phase, puisque Fool favorise une plus grande fréquence de variation de phase.

**Mots-clés :** *Escherichia coli*, virulence, fimbriae, variation de phase, adhésine, Lrp, *pap*, *foo*, *clp*

## Abstract

*Escherichia coli* extra-intestinal pathogenic (ExPEC) are responsible for a wide variety of diseases. Particularly ExPEC strains from the subset called uropathogenic *E.coli* (UPEC) are carrying fimbriae type P. This adhesin family is subject to transcriptional regulation called phase variation, an all or nothing mechanism. It is a competition between two regulatory proteins: the Dam methylase and the nucleoprotein Lrp. This mechanism is also under the influence of the local regulators PapB and PapI. These two regulators are essential to the phase variation. We therefore sought to investigate PapI and its homologs and their impact on the phase variation of fimbriae F165<sub>1</sub>, Pap, and CS31A. By means of a chromosomal fusion between the regulatory region of *clp* gene and *lacZYA*, we studied the effect in *trans* of PapI and FooI which could restore the phase variation with a strong tendency to phase OFF. To study the action of PapI and FooI, we used a system with *gfp* as a reporter gene in operons *pap* and *foo*. This allowed the observation of the phase variation at the cellular level by flow cytometry and real-time fluorescence microscopy. These experiments confirmed that the population of F165 positive cells have a partial expression state whereas Pap cells mostly have an OFF expression state. We also confirmed that FooI and PapI do not have the same influence on phase variation and that FooI promotes greater frequency of phase variation.

**Keywords :** *Escherichia coli*, virulence, fimbriae, phase variation, adhesin, Lrp, *pap*, *foo*, *clp*

## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des sigles et abréviations .....</b>	<b>ix</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xii</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Section I : Recension de la littérature .....</b>	<b>1</b>
1. <i>Escherichia coli</i> .....	2
1.1 Introduction.....	2
1.2 InPEC vs ExPEC .....	2
1.3 <i>Escherichia coli</i> pathogènes extra-intestinaux.....	3
1.4 Infection par les ExPEC.....	4
1.4.1 Septicémies .....	5
1.4.2 Méningites néo-natales .....	6
1.4.3 Infections urinaires .....	6
1.5 Infections animales par les ExPEC .....	8
1.5.1 Infections porcines .....	8
1.5.2 Infections bovines .....	9
1.5.3 Infections aviaires.....	9
2. Facteurs de virulence .....	10
2.1 Introduction.....	10
2.2 Adhésines .....	12
2.2.1 Fimbriae.....	13
2.2.1.1 Fimbriae de type 1 .....	15
2.2.2 Adhésines afimbriaires.....	17
2.2.2.1 La famille Afa/Dr .....	17
3. Régulation génétique.....	19
3.1 Introduction.....	19
3.2 Transcription.....	20
3.3 Régulation transcriptionnelle .....	22

3.3.1	Répression .....	23
3.3.2	Activation .....	24
3.4	Régulateurs globaux .....	25
3.4.1	Catabolite repressor protein ou Crp .....	25
3.4.2	Dam .....	26
3.4.3	H-NS (Histone-Like Nucleoid Structuring Protein) .....	27
3.4.4	Leucine responsive regulatory protein (Lrp) .....	27
4.	Régulation épigénétique .....	31
4.1	Généralités .....	31
4.2	Variation de phase .....	32
5.	Fimbriae de type P .....	34
5.1	L'opéron <i>pap</i> .....	34
5.1.1	Régulateurs locaux .....	38
5.1.1.1	PapB .....	38
5.1.1.2	PapI et ses homologues : Protéines FaeA-like .....	38
5.2	Homologues régulationnels de <i>pap</i> .....	41
5.2.1	<i>foo</i> /F165 <sub>1</sub> .....	41
5.2.2	<i>clp</i> /CS31A .....	43
5.3	Association entre les fimbriae .....	45
6.	Problématique .....	47
6.1	Hypothèse .....	48
6.2	Objectifs .....	48
<b>Section II : Méthodes et Résultats .....</b>		<b>49</b>
1.	Article I: Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) and PapI homologues influence phase variation of CS31A surface antigen .....	50
1.1	ABSTRACT .....	51
1.2	INTRODUCTION .....	51
1.3	MATERIALS AND METHODS .....	54
1.4	RESULTS .....	60
1.5	DISCUSSION .....	63
1.6	ACKNOWLEDGMENTS .....	67
1.7	REFERENCES .....	67
1.8	TABLES AND FIGURES .....	71

2. Article II : The epigenetic switch of F165 <sub>1</sub> P-like fimbriae generates a heterogenic phenotype.....	83
2.1 ABSTRACT .....	83
2.2 INTRODUCTION .....	84
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	86
2.4 RESULTS .....	89
2.5 DISCUSSION .....	92
2.6 CONCLUDING REMARKS .....	95
2.7 ACKNOWLEDGMENTS.....	96
2.8 LEGENDS .....	100
2.9 SUPPORTING INFORMATION.....	111
<b>Section III : Discussion et conclusion .....</b>	<b>124</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>125</b>
1. PapI et Fool restaurent la variation de phase de <i>clp</i> .....	125
2. L'analyse en cellule individualisée et en temps réel de <i>pap</i> et <i>foo</i> .....	131
2.1 Un niveau de complexité supérieur au paradigme ON/OFF de <i>pap</i> et <i>foo</i> ....	132
2.2 La phase intermédiaire n'est pas qu'un état transitoire .....	132
2.3 Fool induit un plus haut taux de variation de phase que PapI .....	135
3. Les phénomènes stochastiques et la survie du groupe.....	139
<b>Conclusions .....</b>	<b>141</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>142</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>144</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>xiii</b>
1. Méthylation différentielle.....	xiii
1.1 Principe général.....	xiii
1.2 Protocole de méthylation différentielle .....	xiii
1.3 Protocole extraction ADN.....	xx
1.4 Résultats pour <i>clp</i> .....	xxiii
2. Protocole de Cytométrie en flux et Microscopie à Fluorescence.....	xxiii

## Liste des tableaux

Table I : Article I, Table 1 .....	71
Table II : Article I, Table 2 .....	72
Table III : Article II, Table 1 .....	100
Table IV : Article II, Table 2 .....	101
Table V : Article II, Table S1 .....	115

## Liste des figures

Figure 1 : Cycle infectieux des ExPECs.....	4
Figure 2 : Remodelage de la membrane cellulaire par l'Intimine.....	11
Figure 3 : Biogénèse "chaperone-usher" des fimbriae .....	14
Figure 4 : Structure génétique des fimbriae de type 1 et recombinaison.....	16
Figure 5 : Structure des fimbriae de type 1 .....	16
Figure 6 : Biosynthèse des adhésines de la famille Afa/Dr .....	17
Figure 7 : Organisation génétique des opérons de la famille Afa/Dr .....	18
Figure 8 : Préinitiation de la transcription .....	20
Figure 9 : Étapes de la transcription .....	21
Figure 10 : Structure octamérique de Lrp et liaison à l'ADN .....	29
Figure 11 : Schématisation de la structure de l'opéron <i>pap</i> .....	34
Figure 12 : Schématisation de la variation de phase de Pap .....	36
Figure 13 : Modélisation de l'interaction de PapI avec l'ADN.....	39
Figure 14 : Séquence des variants de PapI.....	40
Figure 15 : Comparaison de séquences des homologues de PapI.....	40
Figure 16 : Modélisation de l'instabilité chez <i>foo</i> vs <i>pap</i> .....	43
Figure 17 : Organisation génétique de l'opéron <i>clp</i> codant l'antigène de surface CS31A. 44	
Figure 18 : Modèle illustrant différents scénarios d'expression séquentielle d'opérons fimbriaires homologues .....	46
Figure 19 : Article I, Figure 1 .....	73

Figure 20 : Article I, Figure 2 .....	74
Figure 21 : Article I, Figure 3 .....	76
Figure 22 : Article I, Figure 4 .....	77
Figure 23 : Article I, Figure 5 .....	78
Figure 24 : Article I, Figure 6 .....	79
Figure 25 : Article I, Figure 7 .....	80
Figure 26 : Article I, Figure S1.....	81
Figure 27 : Article I, Figure S2.....	82
Figure 28 : Article II, Figure 1.....	102
Figure 29 : Article II, Figure 2.....	104
Figure 30 : Article II, Figure 3.....	106
Figure 31 : Article II, Figure 4.....	108
Figure 32 : Article II, Figure 5.....	110
Figure 33 : Article II, Figure S1 .....	118
Figure 34 : Article II, Figure S2 .....	119
Figure 35 : Article II, Figure S3 .....	121
Figure 36 : Article II, Figure S4 .....	122
Figure 37 : Modèle schématique de régulation croisée de clp par régulateur PapI-like.	128
Figure 38 : Modèle schématique de régulation croisée de clp par régulateur PapI-like.	129
Figure 39 : Schématisation de l'adaptation entre deux milieux .....	129
Figure 40 : Système rapporteur par Gfp.....	131
Figure 41 : Modélisation de l'hérédité phénotypique et génotypique.....	134
Figure 42 : Modélisation moléculaire de la variation de phase .....	136
Figure 43 : Méthylation différentielle Pap vs Foo.....	137
Figure 44 : Modélisation de la structure de PapI .....	138



### Liste des sigles et abréviations

ADN (DNA)	Acide désoxyribonucléique (desoxyribonucleic acid)
Afa	<i>Afimbrial adhesion</i> ou adhésine afimbriaire
Amp	Ampicilline
Amp <sup>r</sup>	Résistance à l'ampicilline
AMPC (cAMP)	Adénosine monophosphate (AMP) cyclique ou <i>cyclic adenosin monophosphate</i>
ARN (RNA)	Acide ribonucléique (ribonucleic acid)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CAP/Crp	<i>Catabolite activator protein</i> ou <i>cAMP Receptor protein</i> ou protéine activateur catabolique ou protéine récepteur de l'AMPC
Cam	Chloramphénicol
Cam <sup>r</sup>	Résistance au chloramphénicol
<i>clp</i>	Capsule-like
Dam	<i>Deoxyadenoside methylase, DNA Adenine Methylase</i> ou <i>Deoxyadenosine methyltransferase</i> ou Déoxyadénosine méthyltransférase
DO (OD)	densité optique (optical density)
<i>foo</i>	<u>F</u> imbriae <u>o</u> ne hundred sixty-five <u>o</u> ne (F165 <sub>1</sub> )
<i>fot</i>	<u>F</u> imbriae <u>o</u> ne hundred sixty-five <u>t</u> wo (F165 <sub>2</sub> )
Gm	Gentamicine
Gm <sup>r</sup>	Résistance à la gentamicine
GATC <sup>dist</sup>	site GATC distal

GATC <sup>prox</sup>	site GATC proximal
H-NS	<i>Histone-like nucleoid structuring protein</i> ou protéine similaire à une histone structurant le nucléoïde
HTH	hélice-tour-hélice (helix-turn-helix)
Intermédiaire	Phase de transition entre la phase ON et OFF
Km	Kanamycine
Km <sup>r</sup>	Résistance à la kanamycine
Lrp	<i>Leucine-responsive regulatory protein</i> ou protéine régulatrice sensible à la leucine
ON	Phase ON ou phase d'expression de l'opéron
OFF	Phase OFF ou phase de non expression de l'opéron
ONPG	Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside
<i>pap</i>	<i>Pyelonephritis associated pili</i> ou fimbriae associé à la pyélonéphrite
pb (bp)	Paire de bases (bases pair)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , réaction de polymérase en chaine
qPCR	PCR quantitatif en temps réel
SPR	surface plasmon-résonance
U.A.F	Unité arbitraire de fluorescence
wHTH	<i>winged Helix-turn-helix</i>
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
$\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase

*À Christine, mon phare*

*À ma famille, mon roc*

## Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux sans qui ce projet de Maîtrise n'aurait jamais vécu le jour, ou même été mené à terme.

Il va sans dire que les tout premiers remerciements vont à Josée qui m'a permis d'intégrer son équipe de recherche. Sans écoute et ses conseils rien de ceci n'aurait été possible. J'ai souvent mis sa patience à rude épreuve et je veux aussi la remercier pour cela et son écoute.

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement tous les membres du Labo Harel de qui j'ai croisé le passage. Richard pour ses conseils et son mentorat inestimable. Philippe pour son aide et ses conseils. Simo, Guillaume et Philippe V, à la fois pour leurs conseils et pour les nombreuses discussions à la fois sur la science et sur le reste. Jean-Guillaume sans qui l'hiver aurait été bien plus long! Sans oublier Majela, Flor et les autres stagiaires, Samuel et Judith et tout le personnel au laboratoire de diagnostic.

Je ne peux pas non plus passer sous silence les autres étudiants du GREMIP : Jason, Jean-Phillipe, Damian, Dimitri, Clément, Claudia, Yannick, toute la bande chez Ann et Sylvain (Phillipe Lebel, Guillaume L.-G., Jessie, Alexandre, Gabriel, William, Audrey), qui ont de par leurs discussions, conseils ou simplement leur support moral contribué à ce projet.

Les membres du corps professoral ne sont pas à écarter, en plus de Josée je tiens à remercier particulièrement France Daigle pour m'avoir accueilli en tant que stagiaire et de m'avoir initié à la recherche. Daniel Dubreuil pour m'avoir permis de participer aux cours de microbiologie. Michaël Mourez et Christine Martin pour leurs conseils.

Je dois aussi finalement remercier tout le personnel de soutien au secrétariat, Hélène, Nancy, Manon, Christine Blondin et Diane Rodier.

Et pour finir je tiens à remercier, Christine, toute ma famille et mes amis pour leur support moral, sans eux rien n'aurait été possible.

## Introduction

La régulation de la transcription est un processus essentiel pour tout le règne vivant et il s'agit du phénomène biologique à la base de l'expression de gènes, peu importe leur fonction. La compréhension des mécanismes de régulation est donc à la base de la connaissance sur le fonctionnement des microorganismes pathogènes. Les bactéries de l'environnement, pathogènes ou commensales sont exposées à des conditions changeantes. En ce sens, la régulation transcriptionnelle joue un rôle critique dans les processus adaptatifs. Dans l'optique de survivre à ces modifications du microclimat, la physiologie bactérienne s'adapte en modifiant son métabolisme. La variation de phase épigénétique est un mécanisme de régulation unique, qui part la méthylation de l'ADN et la compétition entre les divers régulateurs entrant dans son mécanisme permet une régulation unique de l'expression génétique. Le phénomène stochastique qui en résulte donne naissance à un phénotype hétérogène au sein même d'une population, ce qui contraste avec d'autres modes de régulation plus classiques où une population bactérienne va réagir de façon plus ou moins uniforme à un changement dans son milieu. En donnant naissance à une population hétérogène, la variation de phase épigénétique permet potentiellement d'augmenter l'adaptabilité d'une population ou d'une souche en s'assurant qu'une portion de la population est prête à un changement dans le milieu.

Ce mémoire explore donc le mécanisme de la variation de phase épigénétique sous l'œil d'un mécanisme d'expression de gène de virulence, le fimbriae de type P, et l'implication de divers régulateurs homologues dans la modulation de cette expression.

## **Section I : Recension de la littérature**

## 1. *Escherichia coli*

### 1.1 Introduction

Le bacille à Gram négatif, *Escherichia coli* (*E. coli*), connu comme non sporulant et motile, est l'une des espèces les mieux étudiées des *Enterobacteriaceae*. Cette famille de bactéries est caractérisée par son métabolisme aérobie facultatif. C'est cette flexibilité métabolique qui leur permet la colonisation de plusieurs milieux notamment le tractus intestinal des mammifères ainsi que la flore de certains oiseaux. Ainsi, *E. coli* est une bactérie anaérobie facultative parmi les plus abondantes dans la flore intestinale humaine (Ron, 2006).

En tant que bactérie commensale, *E. coli* est en général inoffensive, voire bénéfique, pour l'hôte. Soit en favorisant l'absorption des nutriments, le développement du système immunitaire ou en agissant comme barrière à la colonisation bactérienne de l'intestin, par des souches pathogènes plus virulentes, en compétitionnant pour les nutriments (Kaper *et al.*, 2004, Salyers *et al.*, 2004, Johnson & Russo, 2002a). Toutefois, certaines souches d'*E. coli* sont nuisibles à la santé de leur hôte. Ces souches pathogènes sont divisées en deux grandes classes : Les InPEC (**IN**testinal **P**athogenic ***Escherichia coli***) causant des maladies intestinales, et les ExPEC (**EX**traintestinal **P**athogenic ***Escherichia coli***) causant des maladies extraintestinales (septicémies, infections urinaires, etc.) (Kaper *et al.*, 2004, Nataro & Kaper, 1998).

### 1.2 InPEC vs ExPEC

Ces deux classes sont davantage divisées en sous-catégories en fonction de leurs gènes de virulence ainsi que leur pathogénèse (Kaper *et al.*, 2004, Nataro & Kaper, 1998). Chez les InPEC, l'on retrouve : les ETEC (enterotoxigenic *Escherichia coli*) caractérisés par de nombreuses toxines (LT, STa, STb) provoquant des diarrhées; les EPEC (enteropathogenic *Escherichia coli*) caractérisés par leur mode d'adhésion aux cellules hôtes par la formation d'un piédestal; les STEC (Shiga toxin producing *Escherichia coli*)

qui peuvent produire la toxine Stx1 et/ou Stx2; les EHEC (enterohaemorrhagic *Escherichia coli*) qui souvent possèdent à la fois le système d'adhésion attachante/effaçant et la toxine Stx des STEC qui est responsable du syndrome hémolytique et urémique chez l'humain. Finalement, les DAEC (diffuse adherence *Escherichia coli*) et les EIEC (entero-invasive *Escherichia coli*) font aussi partie des InPEC.

Parmi les ExPEC on retrouve : les MNEC (meningitis associated *Escherichia coli*) causent une septicémie et une méningite, les UPEC (uropathogenic *Escherichia coli*) qui sont un des principaux agents responsables des infections urinaires (UTI) et finalement les APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) qui sont l'agent étiologique de diverses infections extra-intestinales, dont celles respiratoires, chez les oiseaux (Kaper et al., 2004, Rodriguez-Siek *et al.*, 2005a, Rodriguez-Siek *et al.*, 2005b).

### 1.3 *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux

Le groupe des ExPEC regroupe une grande variété de souches qui souvent se trouvent dans le tractus gastro-intestinal (humain/animal), mais qui peuvent se disséminer et causer la maladie extra-intestinale en infectant le site qui leur est spécifique (Kaper et al., 2004, Russo & Johnson, 2000). Les ExPEC peuvent donc être des pathogènes opportunistes. La pathogenèse de l'infection ExPEC se produit par adhésion et colonisation de la muqueuse, transcytose de la bactérie à travers les cellules épithéliales, dissémination par le système sanguin et colonisation de l'organe cible (Smith *et al.*, 2007, Johnson & Russo, 2002b, Gyles & Fairbrother, 2010), tel qu'illustré à la Fig.1.



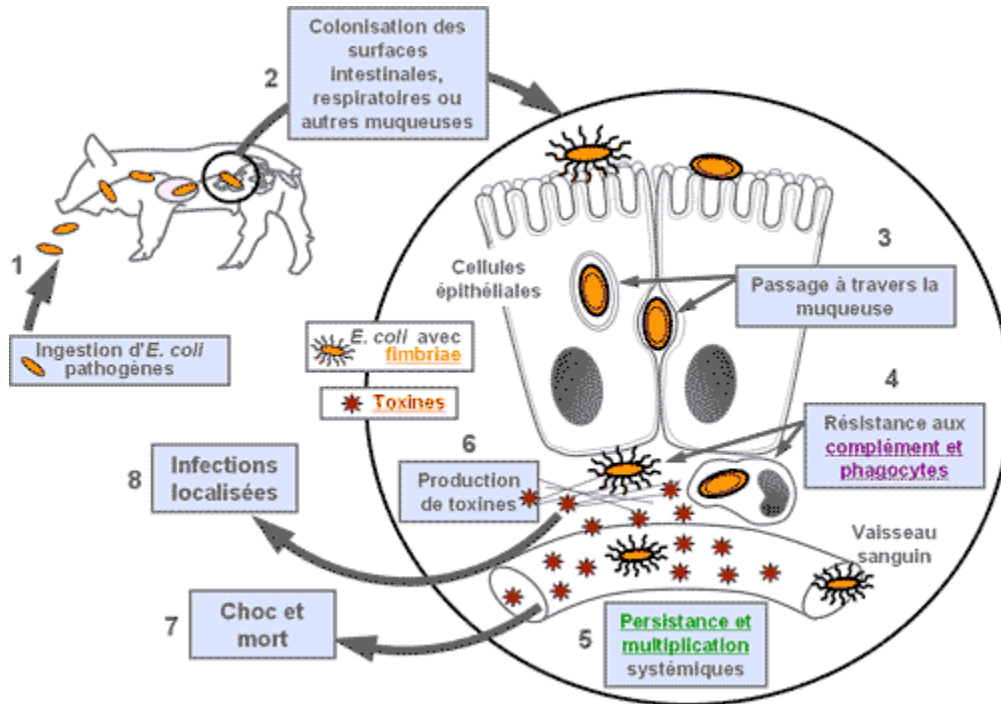


Figure 1 : Cycle infectieux des ExPECs  
(Gyles & Fairbrother, 2010)

Comme expliquée par la Figure 1, l'infection commence par l'ingestion des bactéries pathogènes par l'hôte (en 1). Ces bactéries vont ensuite transiter dans l'hôte afin de coloniser une surface : la muqueuse respiratoire, intestinale ou autre (pour les ExPEC) (2). Cette colonisation est possible grâce à des molécules d'adhésion : les fimbriae. Les bactéries vont ensuite pouvoir transiter à travers la muqueuse pour atteindre le système circulatoire où grâce à une résistance au complément et système immunitaire (3-4), elles vont pouvoir persister et éventuellement se multiplier de façon systémique, ce qui peut mener à une bactériurie ou une septicémie. Ce qui peut dès lors entraîner la mort (7)(Gyles & Fairbrother, 2010).

#### 1.4 Infection par les ExPEC

Les infections du tractus urinaire (UTI), méningites néo-natales, infections intraabdominales, pneumonies, ostéomyélites, infections des tissus mous, etc. sont des exemples d'infections par des ExPEC (Smith et al., 2007, Kaper et al., 2004). Ces maladies ExPEC ont une forte prévalence dans toutes les tranches d'âges, sexe et portions de

l'anatomie chez l'humain. Toutefois, ce sont les femmes qui sont principalement touchées par les UTI, près de 50 % des femmes vont subir une UTI au cours de leur vie (Foxman & Brown, 2003), 25 % d'entre elles vont avoir des infections récurrentes (Foxman *et al.*, 2000).

#### 1.4.1 Septicémies

La septicémie est une condition médicale relative à une infection non contrôlée du système circulatoire sanguin s'accompagnant d'une réponse inflammatoire systémique. La septicémie peut mener au dysfonctionnement des organes de l'hôte ainsi qu'à une chute de tension (hypotension) caractéristique du choc septique (Annane *et al.*, 2005). L'entrée de bactéries dans le système circulatoire peut suivre plusieurs voies selon les différentes infections : par les reins (UTI), viscères (péritonite), la peau (cellulite) ou les poumons (pneumonie).

Les nouveau-nés sont particulièrement vulnérables lors de leurs premiers jours de vie puisque leur système immunitaire est immature, ce faisant ils sont à risque de développer des symptômes graves comme une septicémie. Les microorganismes atteignent généralement le fœtus par le tractus génital de la mère ou en traversant les membranes amniotiques si la mère est déjà victime d'une bactériémie. Ces infections vont donner près de 3.3 millions d'enfants morts nés; quatre à cinq millions d'enfants mourront chaque année durant seulement leurs 4 premières semaines de vie; pour un total de 10.7 millions de morts répertorié. Plus de 98 % de ces morts surviennent dans des pays en développement (Zupan, 2005, Vergnano *et al.*, 2005). Les ExPEC représentent la seconde cause de septicémies néonatales après les streptocoques de groupe B (Hyde *et al.*, 2002).

Dans 17 % des cas les plus graves de septicémie aux États-Unis, *E. coli* en est l'agent étiologique. Des recherches ont ainsi établi que sur 127 500 septicémies sévères à

*E. coli*, près de 40 000 décès ont été enregistrés donc un taux de mortalité de 30 % (Russo & Johnson, 2003).

#### 1.4.2 Méningites néo-natales

La méningite est une condition où il y a inflammation des membranes du cerveau ou de la moelle épinière, se caractérisant par des exsudats purulents dans les méninges ainsi que de l'œdème au cerveau. Une infection de tel calibre est possible lorsque des agents infectieux réussissent à traverser la barrière hématoencéphalique. Cette barrière sépare le système nerveux central (SNC) du système vasculaire. Son rôle est dans le maintien de l'homéostasie du liquide interstitiel cérébral ainsi que la régulation des échanges sang-cerveau et prévient normalement le passage de microorganismes pathogènes (Huang & Jong, 2001, Huang *et al.*, 2000). La pathogenèse de l'infection se déroule ainsi : les bactéries en circulation dans le sang (bactériémie) atteignent la barrière hématoencéphalique, adhèrent aux cellules, envahissent celles-ci et traversent vers le SNC (Xie *et al.*, 2006, Xie *et al.*, 2004).

Les méningites néonatales à *E. coli* aux États-Unis reflètent un taux de mortalité de 8 % avec une majorité des sujets qui ont survécu avec des troubles neurologiques et développementaux (Russo & Johnson, 2003, Smith *et al.*, 2007). L'incidence de ce genre de maladie est toutefois faible (2-5 cas par 10 000 dans les pays développés, 10 fois plus dans les pays en développement) (Smith *et al.*, 2007), soit 400 cas annuellement causés par des ExPEC (Russo & Johnson, 2003). La méningite du nouveau-né se produit de différentes façons. Elle est en général due à une contamination pré- ou postnatale lors du passage du cordon ombilical ou par le canal vaginal (Smith *et al.*, 2007).

#### 1.4.3 Infections urinaires

Le haut taux d'infection urinaire cause près de 1.7 million de visites en urgence et de 11 millions de visite en bureau de médecin aux États-Unis uniquement (DeFrances &

Podgornik, 2006). Ces nombreuses infections sont un stress important au niveau économique, en 2000 près de 3.5 \$ milliards ont été dépensés aux États-Unis pour le seul traitement des UTI (Litwin *et al.*, 2005).

Une infection du tractus urinaire (UTI) se caractérise par la présence de bactéries dans le système urinaire du malade, que ce soit au niveau de la vessie (cystite), des reins (pyélonéphrite), urine (bactériurie) ou de la prostate (prostatite) (Marrs *et al.*, 2005, Foxman, 2010, Kucheria *et al.*, 2005, Drekonja & Johnson, 2008). Une UTI à UPEC survient en général par une contamination fécale du tractus urinaire (Johnson & Russo, 2005). L'emplacement du tractus urinaire chez la femme favorise en effet l'ascension des bactéries fécales dans l'urètre jusqu'à la vessie (Foxman, 2010). L'ascension des bactéries par l'uretère ou un reflux d'urine d'une vessie contaminée peut mener à la pyélonéphrite. Chez un individu sans complication médicale, la cystite évolue rarement en pyélonéphrite, mais la possibilité existe (Smith *et al.*, 2007). Cette infection a un taux de morbidité élevée et peut occasionner des complications sévères (Smith *et al.*, 2007).

La prévalence des UTI varie selon les individus. Par exemple, seulement 20 % des hommes contractent une UTI dans leur vie alors que de 50-60 % des femmes en sont affectées (Smith *et al.*, 2007). Les femmes présentent aussi un risque élevé 25-30 % de récurrence (Smith *et al.*, 2007, Kucheria *et al.*, 2005, Foxman, 2002). Les ExPEC sont responsables de 85-95 % des cystites chez des femmes préménopausées. Dans ce même groupe, 90 % des pyélonéphrites étaient d'origine ExPEC (Russo & Johnson, 2003, Smith *et al.*, 2007). La pyélonéphrite chez la femme enceinte peut être très dangereuse pour le fœtus, avec des conséquences allant du retard mental à la mort (Foxman, 2002). Avec de 6 à 8 millions de cas par an, les infections du tractus urinaire sont donc d'importance majeure et sont un intérêt d'étude important (Russo & Johnson, 2003).

## 1.5 Infections animales par les ExPEC

Tout comme chez l'humain, les animaux peuvent être contaminés par des bactéries pathogènes (Smith et al., 2007, Gyles & Fairbrother, 2010), notamment *E. coli*. Ces bactéries sont ingérées et parviennent au tractus intestinal (voir Fig. 1). Les souches ExPEC vont coloniser différentes surfaces muqueuses (tractus intestinal, respiratoire). Puis la bactérie traverse la muqueuse pour atteindre la circulation sanguine. Dès lors, la bactérie peut produire des toxines qui peuvent endommager les tissus. L'interaction avec la matrice extracellulaire et les récepteurs de surface (grâce aux adhésines et fimbriae) mène à la colonisation et l'établissement d'infections localisées : pneumonie, sérosite, mammite ou UTI (Gyles & Fairbrother, 2010). Les bactéries peuvent aussi se multiplier dans le sang (bactériémie) grâce à des sidérophores pour l'acquisition du fer et leur résistance à la phagocytose et à l'effet bactéricide du complément dans le sérum. Le tube digestif est considéré comme un réservoir pour les souches ExPEC.

### 1.5.1 Infections porcines

Chez le porc, les ExPEC causent principalement des septicémies chez les porcelets nouveau-nés. Il s'agit d'une infection systémique aiguë avec des phases tardives de diarrhée et qui sont en grande majorité mortelle en 3-8 heures (Gyles & Fairbrother, 2010). Des infections plus localisées sont aussi présentes, polyarthrites, pneumonies, métrites, méningites ou encore congestion intestinale, des ganglions lymphatiques mésentériques ou certains organes extra-intestinaux (Fairbrother *et al.*, 2005). Les lésions histopathologiques que l'on observe dans les cas typiques de septicémies sont : gastroentérite hémorragique, hémorragie des reins ou thrombose sur la muqueuse du petit intestin (Gyles & Fairbrother, 2010).

### 1.5.2 Infections bovines

Tout comme chez le porc, *E. coli* peut causer une septicémie qui survient dans les premiers jours suivant la naissance du veau. Les bactéries intègrent l'organisme par la barrière épithéliale de l'intestin ou par le cordon ombilical. Les signes cliniques sont similaires à ceux observés chez le porc, la majorité des bactéries étant retrouvées dans les fluides de l'animal infecté (sécrétion nasale, urine, fèces) (Gyles & Fairbrother, 2010). À l'autopsie on peut observer la présence de pétéchies sur l'épicarde et la membrane séreuse, avec occasionnellement de l'œdème pulmonaire ainsi qu'un gonflement de la rate (Gyles & Fairbrother, 2010).

### 1.5.3 Infections aviaires

Les infections aviaires sont causées par un groupe d'ExPEC, les APEC (*E. coli* pathogènes aviaires), et causent un taux de mortalité et de morbidité élevé (Gyles & Fairbrother, 2010, Pourbakhsh *et al.*, 1997b, Pourbakhsh *et al.*, 1997c, Pourbakhsh *et al.*, 1997a, Rodriguez-Siek *et al.*, 2005b). Ces infections sont un problème majeur en industrie agroalimentaire et causent des pertes économiques jugées importantes, toutefois aucune étude n'a été faite afin de déterminer l'impact réel au niveau économique (Saif & Barnes, 2008). Les souches pathogènes sont mises en contact avec l'organisme par inhalation (Gyles & Fairbrother, 2010, Pourbakhsh *et al.*, 1997a). Il y a colonisation des voies respiratoires et des sacs aériens. Ensuite, il peut survenir une pneumonie, péricardite, périhépatite, péritonite ou une septicémie menant à la mort de l'hôte. L'aérosacculite (infection des sacs aériens) se manifeste dans un épaissement des parois des sacs aériens ainsi que par des exsudats caséux (Gyles & Fairbrother, 2010). Les souches APEC infectent aussi l'oviducte des poules causant ainsi une salpingite, soit une incapacité à pondre. Les APEC peuvent aussi causer la maladie des grosses têtes (swollen head syndrome) qui se caractérise par de l'œdème gélatineux

dans la tête et les tissus périorbitaux ainsi que des exsudats caséeux sur les conjonctives et glandes lacrymales (Pourbakhsh et al., 1997a).

## 2. Facteurs de virulence

### 2.1 Introduction

La pathogénicité est définie comme la capacité d'un microorganisme à causer une maladie chez un hôte. Chez *E. coli*, comme plusieurs autres bactéries pathogènes, requiers pour causer une infection la présence de plusieurs facteurs de virulence qui vont lui permettre d'accomplir les différentes étapes de l'infection (Kaper et al., 2004, Croxen & Finlay, 2010). Afin de pouvoir causer une infection, les *E. coli* pathogènes, comme toute autre bactérie pathogène, possèdent des gènes codant pour des facteurs de virulence. Ces gènes (et les protéines qui sont ainsi codées) sont essentiels à la réalisation des étapes de l'infection :

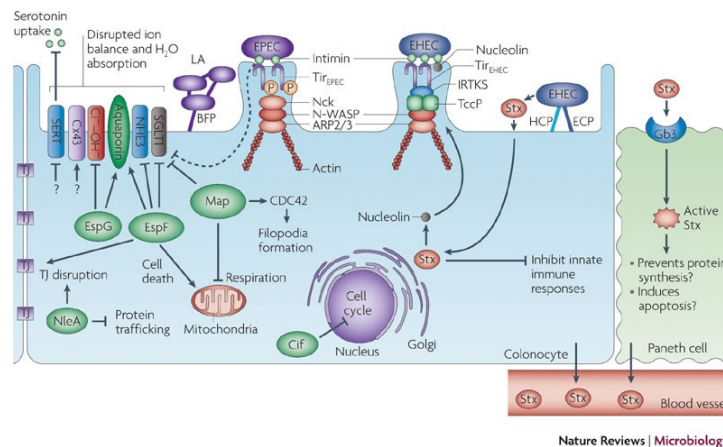
- 1- Adhésion et colonisation d'une surface;
- 2- Production de toxines/effecteurs qui agissent sur les cellules hôtes
- 3- Invasion des cellules épithéliales
- 4- Pénétration de la couche épithéliale de cellules pour atteindre le système sanguin ou les tissus profonds
- 5- Résistance aux défenses de l'organisme
- 6- Production d'un effet délétère pour l'organisme hôte : lésion de tissus, toxicité.

La pathogénèse et l'infection nécessitent toutefois un arsenal important de facteurs de virulence. Ceux-ci étant très variés, certains facteurs peuvent être retrouvés chez deux souches ne possédant pas la même virulence. De sorte que pour être considérée comme une ExPEC, une souche d'*E. coli* peut au moins deux des gènes suivants : *pap* (opéron codant pour les protéines du fimbriae de type P), *sfa/foc* (gènes codant pour les fimbriae S et F1C respectivement), *afa/dr* (gènes codant l'adhésine

afimbriaire Afa), *kpsMT* II (gène impliqué dans la synthèse de la capsule polysaccharidique de groupe 2), et *iut* (impliqué dans la synthèse de l'aérobactine) (Johnson & Russo, 2005).

De nombreux autres facteurs sont associés aux souches virulentes d'ExPEC. Notamment, l' $\alpha$ -hémolysine qui (Johnson, 1991, Wiles *et al.*, 2008) a pour principale propriété de causer la lyse des érythrocytes, des leucocytes et des cellules des tubes rénaux de mammifères. Sa synthèse est sous le contrôle de l'opéron *hlyCABD* (Nagy *et al.*, 2006) qui est principalement associé aux souches virulentes. La capacité d'une bactérie pathogène à exploiter les ressources à sa disposition est déterminante pour sa virulence. Comme le fer est un élément peu disponible (il est séquestré par l'hôte) dans le milieu infectieux, les ExPEC ont donc accès à une variété de molécules leur permettant de récupérer le fer de l'hôte : les sidérophores. La possession de certains de ces facteurs est associée à un plus grand pouvoir pathogène (Nielubowicz & Mobley, 2010).

Les souches intestinales quant à elles dénombrent de nombreux types de facteurs de virulence et de systèmes d'adhésion : par exemple, les EPEC induisent la formation d'un piédestal caractéristique découlant de l'interaction entre l'adhésine Intimine et son récepteur Tir, chez la cellule hôte (voir Fig. 2) (Croxen & Finlay, 2010).



**Figure 2 : Remodelage de la membrane cellulaire par l'Intimine**  
(Croxen & Finlay, 2010)



L'intimine des EPEC, par son action concertée avec les protéines effectrices du système de sécrétion de type 3 (SST3), cause entre autres le remodelage de la membrane de la cellule hôte (Vallance & Finlay, 2000, Phillips *et al.*, 2000). Le récepteur spécifique de l'intimine permet l'attachement à son récepteur Tir, qui est injecté dans la cellule hôte par le SST3 (Adu-Bobie *et al.*, 1998, Frankel *et al.*, 1996, Frankel *et al.*, 1995). La liaison entre l'intimine et Tir permet le rapprochement de la cellule bactérienne et aide à la formation du piédestal, structure caractéristique des EPEC et EHEC. On retrouve aussi de nombreuses toxines et même certains systèmes dits d'adaptation (« fitness ») (les sidérophores entre autres) qui servent à la survie dans l'environnement de l'hôte en offrant un avantage compétitif par rapport aux bactéries ne possédant pas ces facteurs (Kaper *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 2007, Croxen & Finlay, 2010).

## 2.2 Adhésines

Toutefois, comme mentionné précédemment la première étape de toute infection est l'adhésion et la colonisation. Cette étape est rendue possible par la synthèse de molécules d'adhésion aux diverses étapes de l'infection. Ces adhésines permettent l'adhésion aux cellules hôtes ce qui permet aux bactéries d'éviter l'expulsion par les fluides corporels (miction, diarrhée). Par ce contact rapproché, les bactéries peuvent aussi relâcher des toxines ou autres effecteurs dans les cellules de l'hôte afin de favoriser le passage aux étapes subséquentes de l'infection.

On trouve chez *E. coli* de nombreuses adhésines qui sont différenciées par leur composition (polysaccharidiques, polypeptidiques, etc.), leur structure ainsi que par leur spécificité de récepteur. Ici nous discuterons principalement des adhésines de type polypeptidiques (fimbriae et autres). Il faut aussi prendre en compte qu'une même souche pathogène peut porter plusieurs adhésines différentes. On dénote aussi une variété de spécificité de récepteurs parmi les différentes adhésines qu'une seule souche peut exprimer, ce qui permettrait de coloniser différentes niches. C'est aussi ce qui peut permettre à une même souche d'infecter différents organes d'un même hôte. Il y a principalement 2 types d'adhésines polypeptidiques; les fimbriae et les adhésines

afimbriaires. Les fimbriae forment des complexes protéiques filamenteux à la surface de la cellule alors que les adhésines afimbriaires ont une structure ressemblant à un fimbriae tronqué (Mainil, 2013). Ces adhésines ne possèdent pas d'équivalent à la sous-unité majeure, et sont donc plus courtes.

### 2.2.1 Fimbriae

L'architecture des fimbriae se base principalement sur une protéine de 14-22 kDa (Kuehn *et al.*, 1992, Jones *et al.*, 1995, Waksman & Hultgren, 2009), la sous-unité majeure. Cette protéine (généralement la protéine A) s'assemble en une structure de centaines de protéines dans une forme cylindrique typique aux fimbriae. La sous-unité majeure est aussi responsable du caractère antigénique de la structure, sa taille et de sa composition en acides aminés lui conférant son caractère antigénique (Kuehn *et al.*, 1992). Dans une même famille de fimbriae, on peut retrouver certaines variations antigéniques au niveau de la sous-unité majeure principalement par des modifications au sein de la séquence (van der Woude & Baumler, 2004). Toutefois, le fimbriae est une structure protéique complexe et donc plusieurs sous-unités mineures entrent aussi dans sa composition (Waksman & Hultgren, 2009). Ces unités sont en un nombre variable d'exemplaires, d'un seul à quelques-uns. La protéine se trouvant à la base du fimbriae au niveau de la couche externe de la membrane se nomme protéine d'ancrage (généralement la protéine C) (Dodson *et al.*, 1993, Hultgren *et al.*, 1991, Hultgren *et al.*, 1993, Lindberg *et al.*, 1989). Certaines sous-unités mineures assurent la bonne fixation du fimbriae à la protéine d'ancrage (Waksman & Hultgren, 2009) ou encore servent de coiffe au fimbriae sous la forme d'une courte fibrille (Kuehn *et al.*, 1992). On trouve finalement parmi ces sous-unités, la protéine responsable des propriétés d'adhésion du fimbriae : l'adhésine (Waksman & Hultgren, 2009). Cette protéine est composée de deux parties : l'extrémité carboxy terminale responsable de l'attachement aux autres sous-unités composant le fimbriae et l'extrémité aminoterminal responsable de la reconnaissance et de l'interaction spécifique avec le récepteur chez la cellule de l'hôte (Hung *et al.*, 2002, Dodson *et al.*, 1993, Merckel *et al.*, 2003). Encore une fois dans

certaines familles de fimbriae peuvent posséder des variations de séquences chez l'adhésine qui mène à des fimbriae identiques, mais qui montre une spécificité de récepteur différente (Waksman & Hultgren, 2009). Cette protéine est généralement retrouvée en exemplaire unique à l'extrémité du fimbriae.

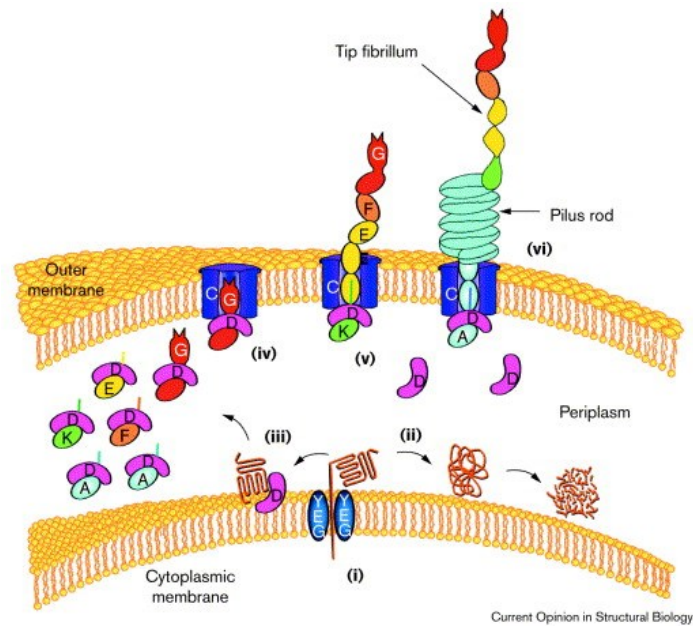


Figure 3 : Biogénèse "chaperone-usher" des fimbriae

(Sauer *et al.*, 2000)

La Figure 3 représente la synthèse chaperone-usher des fimbriae. Le texte ainsi que l'image sont tirés de (Sauer *et al.*, 2000), le texte a été adapté de l'anglais.

« Les sous-unités (et le gène codant) sont identifiées par les lettres uniques. (i) Les sous-unités du pilus/fimbriae entrent dans le périplasme par le mécanisme Sec (YEG). Sans chaperon les protéines ont un mauvais repliement, s'agrègent et sont dégradées (ii). La protéine chaperon PapD lie les sous-unités et facilite leur repliement en donnant son brin G1 afin de compléter leur repliement Ig-like, cela dans un mécanisme nommé : Complémentation par brin donneur (iii). Ce mécanisme à la fois stabilise la sous-unité et capuchonne son sillon interactionnel. Les complexes solubles sous unité/chaperonne sont ciblés par le placier (usher) PapC dans la membrane

externe. Le complexe PapD-PapG se lie le plus rapidement et fortement au placier (iv), ce qui initie l'assemblage du pilus et assure que l'adhésine, qui reconnaît les sucres gal ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) gal, est à l'extrémité du fimbriae qui grandi depuis la base (Bock *et al.*, 1985, Neidhardt & Curtiss, 1996). L'incorporation des sous-unités suivantes se produit par échange de brin donneur (Remaut *et al.*, 2006), où le N-terminus d'une sous-unité déplace le brin G1 de la chaperonne afin d'occuper le sillon de la sous-unité la plus récemment incorporée au fimbriae (v). Le pilus assume sa conformation quaternaire, une fois hors de la cellule, suite à son passage à travers le pore du placier de façon linéaire (vi). »

À la surface des cellules hôtes l'on retrouve les récepteurs spécifiques pour l'adhésion. Ces récepteurs sont généralement formés de complexes de carbohydrates (glycoprotéines ou glycolipides) liés de façon covalente à une chaîne polypeptidique.

#### 2.2.1.1 Fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont présents dans une majorité de souches pathogènes et non pathogènes d'*E. coli*, de 70 % à 80 % des souches possèdent les gènes de synthèse de ce type de fimbriae. Chez les UPECs il est un facteur de virulence important, car ils confèrent aux bactéries la capacité de lier les résidus mannose retrouvés à la surface des cellules uroépithéliales (Muller *et al.*, 2009, Rosen *et al.*, 2007). Ce qui permet la colonisation de la vessie par les bactéries pathogènes.

La synthèse des fimbriae de type 1 est sous le contrôle de l'opéron *fim*. Cet opéron est formé de deux unités transcriptionnelles distinctes; l'une codant pour FimB et FimE, les recombinases spécifiques, et l'autre pour l'opéron polycistronique codant pour les gènes de structure (*fimA*, *fimF*, *fimG*, *fimH*) et du système d'assemblage du pili. Cet opéron est dépendant de l'orientation d'une séquence de 314 pb, pour son expression. Cette séquence, contenant le promoteur de *fimA* (qui est le premier gène de l'opéron), est flanquée de deux petites séquences inverses répétées de 9 pb. Ces deux séquences inverses sont la cible des recombinases FimB et FimE. Celles-ci déterminent l'orientation

de l'élément chromosomique. Si le promoteur porté par l'élément est dans l'orientation transcriptionnelle, les gènes de l'opéron sont exprimés (phase ON), alors que s'il est dans l'orientation inverse la transcription de l'opéron est impossible (phase OFF). Les deux recombinaisons ont des fonctions différentes. FimB favorise à la fois le passage à la phase ON et le passage à la phase OFF. FimE ne peut que favoriser le passage de ON à OFF et donc défavorise la transcription (Nielubowicz & Mobley, 2010). La figure suivante (Fig. 4) démontre l'organisation génétique de l'opéron *fim*.

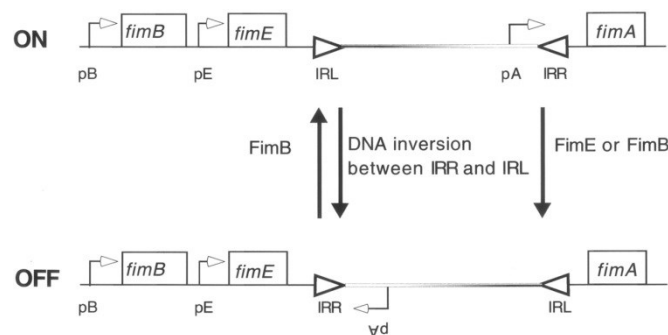
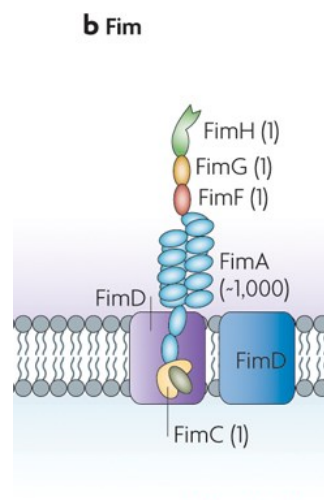


Figure 4 : Structure génétique des fimbriae de type 1 et recombinaison

(van der Woude & Baumler, 2004)

Leur structure (Fig. 5), se compose d'une structure d'homopolymère de la sous-unité FimA, avec à son extrémité une fibrille composée des protéines FimF, FimG et l'adhésine FimH.



Nature Reviews | Microbiology

Figure 5 : Structure des fimbriae de type 1

(Waksman & Hultgren, 2009)

## 2.2.2 Adhésines afimbriaires

Les adhésines afimbriaires, chez *E. coli*, sont comprises dans la famille Afa (afimbriated adhesin) et se caractérisent par l'absence de structures visibles autour de la cellule bactérienne. La famille des adhésines afimbriaires se regroupe en plusieurs sous-groupes (Mainil, 2013). Les adhésines Afa, Dr et M sont des adhésines afimbriaires tandis que F1845 et AAF forment de petites fibrilles et Nfa forme une structure semblable à une capsule (Mainil, 2013). Nous discuterons plus bas de la famille d'adhésines Afa/Dr.

### 2.2.2.1 La famille Afa/Dr

La famille d'adhésines afimbriaires Afa/Dr possède une structure tronquée par rapport à un fimbriae, puisque la sous-unité majeure formant la structure fimbriaire est absente (Mainil, 2013), ce qui en fait de vraies adhésines afimbriaires. Toutefois à la différence des fimbriae on retrouve une sous-unité mineur donc la fonction primaire est d'aider à l'invasion de la cellule hôte (Servin, 2005, Le Bouguenec & Bertin, 1999).

Leur assemblage s'effectue par un système chaperon-usher similaire à celui des fimbriae soumis au même système chaperon-usher (Fig. 6).

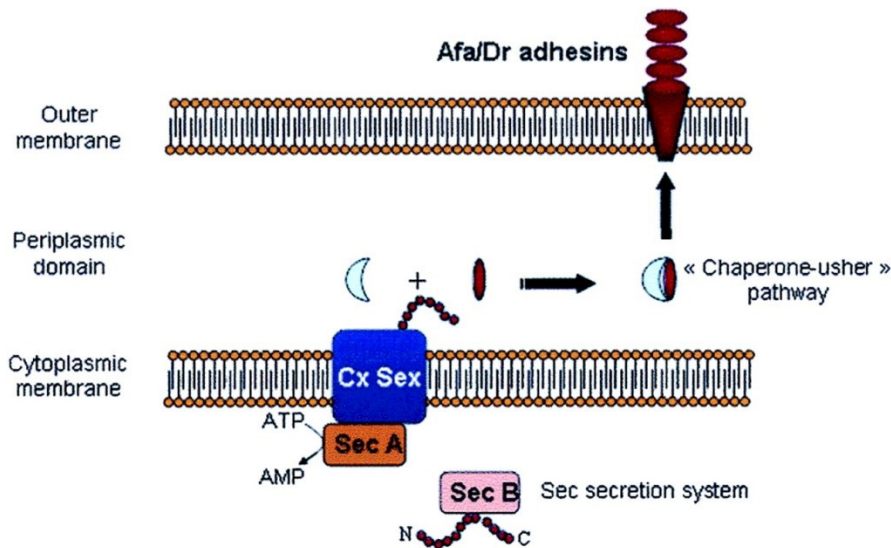


Figure 6 : Biosynthèse des adhésines de la famille Afa/Dr

(Servin, 2005)

La famille Afa/Dr regroupe de nombreux fimbriae possédant tous une organisation génétique de leur opéron similaire (Fig 7). Les gènes A à D sont hautement conservé et sont codant pour les protéines accessoires. Le gène E, codant pour l'adhésine démontre plus de variabilité. Certains variants, tel que *afa-3*, possède un régulateur positif supplémentaire AfaF. Ce dernier aide à l'activation du gène et possède une homologie avec d'autres protéines régulatrices possédant la même fonction, tel que PapB (discuté au point 5.1.1)(Servin, 2005, Mainil, 2013, Le Bouguenec & Bertin, 1999, Martin, 1996).

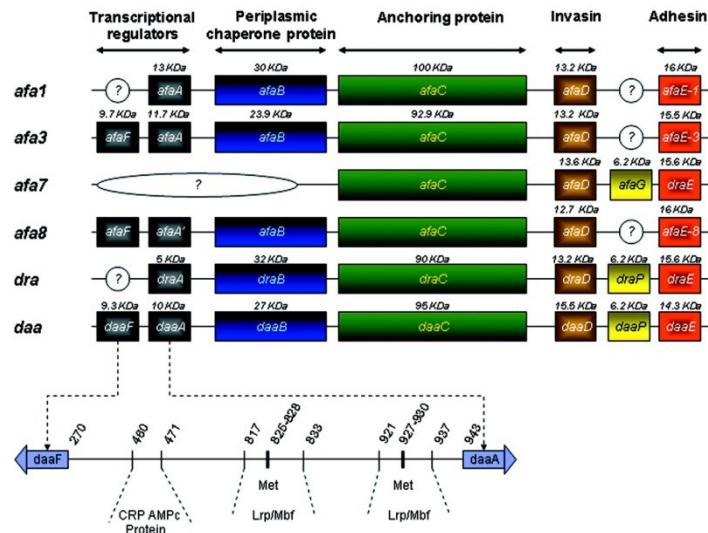


Figure 7 : Organisation génétique des opérons de la famille Afa/Dr

(Servin, 2005)

La plupart des *E. coli* producteurs d'adhésines afimbriaires ont un tendance vers un phénotype d'adhérence diffuse (DAEC) sur des cellules en culture (HEp-2, HeLa, MDCK) selon le variant de l'adhésine (Scaletsky *et al.*, 1984, Le Bouguenec & Bertin, 1999, Servin, 2005). Le récepteur principal des adhésines Afa, chez l'humain est le DAF (Decay-Accelerating Factor), une glycoprotéine que l'on retrouve sur les cellules hématopoïétiques endothéliales, du tractus urinaire et du tractus intestinal, toutefois la seule adhésine d'origine animale (Afa-VIII) ne reconnaît pas DAF comme récepteur et n'adhère pas aux Hep-II ou HeLa (Servin, 2005, Le Bouguenec & Bertin, 1999, Lalioui *et al.*, 1999). Il existe d'autres récepteurs pour les adhésines Afa/Dr soit le collagène de type IV et CEACAMs (CarcinoEmbryonic Antigens-related Cell-Adhesion Molecules) (Servin, 2005).

De plus chez l'animal la présence d'Afa est fortement corrélée à celle d'autres adhésines Pap (type P) et CS31A, une autre adhésine afimbriaire (voir section 5.0), retrouvées notamment chez les UPEC (Girardeau *et al.*, 2003, Le Bouguenec *et al.*, 2001).

### 3. Régulation génétique

#### 3.1 Introduction

Les bactéries réagissent aux différentes conditions de leur environnement en utilisant divers modes de régulation : régulation métabolique, traductionnelle, transcriptionnelle, etc (Campbell & Reece, 2009). Ces différents modes de régulation agissent sur le niveau d'expression des différents gènes bactériens. Ceux-ci peuvent être soumis à leur propre promoteur ou organisés sous forme d'opérons. L'organisation sous forme d'opérons permet que plusieurs gènes soient contrôlés en même temps, principalement lorsque les protéines qui en découlent ont une interaction importante (i.e : les différents gènes de synthèse des fimbriae)(Campbell & Reece, 2009). Au niveau supérieur de la hiérarchie organisationnelle génétique se retrouvent les régulons(Zhang *et al.*, 2012, Maas, 1964). Ces réseaux regroupent de nombreux gènes et opérons qui répondent à un ou plusieurs facteurs transcriptionnels communs. Ces facteurs transcriptionnels répondent souvent aux différentes conditions environnementales au cours de la croissance bactérienne. Leur action offre à la bactérie un moyen rapide de répondre aux changements environnementaux et d'adapter son expression génétique en fonction (Campbell & Reece, 2009, Neidhardt & Curtiss, 1996, Maas, 1964, Zhang *et al.*, 2012).

L'expression de ces régulons est soumise au contrôle de différentes protéines régulatrices (facteurs transcriptionnels). Ces facteurs reconnaissent une séquence spécifique sur la séquence d'ADN. Ces protéines sont directement responsables de l'activation (ou inhibition) de l'expression de leur régulon, leur activité précise étant



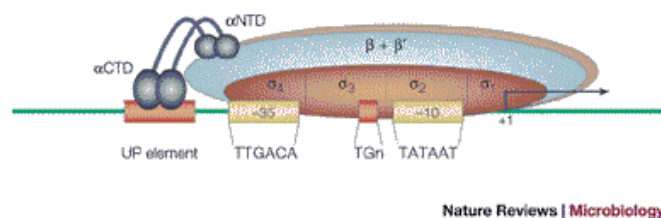
modulée par leur concentration dans le cytosol bactérien. Certaines molécules coeffectrices (la leucine pour Lrp au point 3.4.4), peuvent parfois être nécessaires afin d'observer l'effet régulateur des facteurs transcriptionnels.

### 3.2 Transcription

La transcription est le processus biologique par lequel la cellule copie les régions codantes de l'ADN en molécule d'ARN (ARNm, ARNt, ARNr et sARN). Cette action de transcription est la responsabilité d'une enzyme : l'ARN polymérase (ARNpol) (Browning & Busby, 2004). La transcription est composée de 5 étapes :

- 1) Préinitiation
- 2) Initiation
- 3) Retrait du site promoteur
- 4) Élongation
- 5) Terminaison

Lors de la préinitiation l'ARNpol se fixe dans la région promotrice aux positions -10 et -35 en relation au site du début de la transcription en amont du gène. Il y a ensuite isomérisation lorsque l'ARNpol se fixe sur l'ADN recouvrant alors les positions -10 et +2 (Browning & Busby, 2004) comme on voit en Fig. 8.



**Figure 8 : Préinitiation de la transcription**

**(Browning & Busby, 2004)**

L'initiation de la transcription nécessite la présence de cofacteurs ; les facteurs sigma ( $\sigma$ ). Ces protéines sont essentielles afin de permettre la reconnaissance de la région promotrice par l'ARNpol. Au début de l'initiation les facteurs  $\sigma$  s'associent à l'ARNpol et vont permettre la reconnaissance de la séquence -35 et -10.

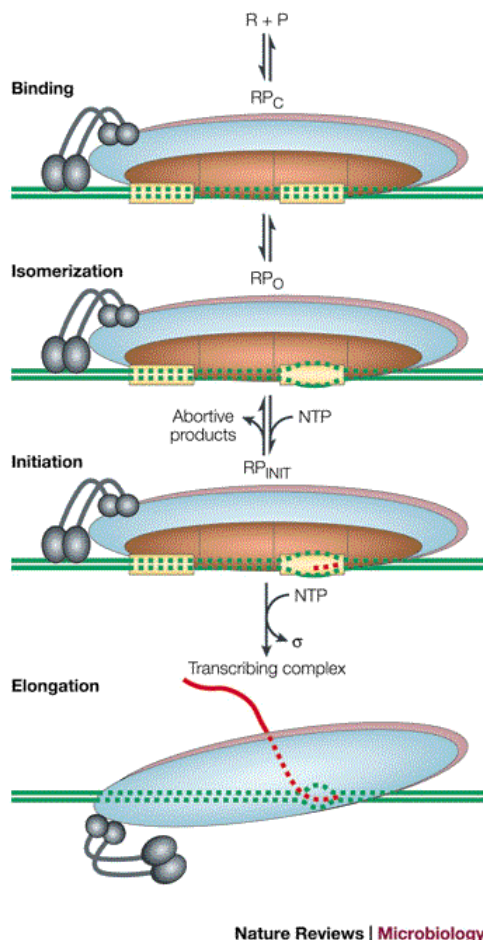


Figure 9 : Étapes de la transcription

(Browning & Busby, 2004)

En Fig. 9 on voit l'interaction de l'ARNpol avec la séquence promotrice (texte adapté de l'anglais (Browning & Busby, 2004)): L'ARN polymérase (R) interagit avec le promoteur (P) pour former le complexe fermé (RPC). Les lignes pointillées montrent le promoteur de l'ADN lié à l'holoenzyme de l'ARNpol. Le duplex d'ADN autour du site d'initiation de transcription est séparé (démonstré par la "bulle" dans l'ADN lié à l'holoenzyme) afin de former le complexe ouvert (RPO). Le complexe d'initiation est alors formé (RP<sub>INIT</sub>) et la synthèse de la chaîne d'ADN-modèle-dirigée par l'ARN

(représentée par une ligne pointillée rouge) commence par la formation d'une liaison phosphodiester entre le début et les nucléosides triphosphates phosphodiester (NTPs) adjacents. L'élongation est l'étape finale, et la chaîne d'ARN s'allonge telle que montrée par la ligne rouge pleine (Fig. 3).

Au début de la transcription, lors des premières étapes, l'ARN polymérase se déplace régulièrement tout le long de l'ADN ce qui provoque la synthèse de nombreux transcrits incomplets (initiation avortée); il faut un minimum de 20 pb transcrites afin que l'ARNpol se stabilise sur le transcrit et que l'élongation se poursuive jusqu'à la fin de la séquence à synthétiser.

La terminaison correspond au détachement de l'ARNpol. Celui-ci survient à la suite de la rencontre d'une structure en épingle à cheveux le long de l'ARN (terminaison rho indépendant) ou de la liaison du cofacteur rho qui provoque la dissociation du complexe ADN-ARNpol-ARN (terminaison rho-dépendante)(Henkin, 2000, Ciampi, 2006, Nudler & Gottesman, 2002).

### 3.3 Régulation transcriptionnelle

Afin de réguler l'expression génétique, les bactéries peuvent utiliser des facteurs transcriptionnels. Ces facteurs spécialistes se fixent à des régions et des séquences spécifiques de l'ADN, variant pour chacun d'entre eux. Ces régions ou motifs, varient en longueur, mais en général un facteur donné va reconnaître une séquence consensus, déduite en comparant les séquences reconnues par le facteur (van Hijum *et al.*, 2009). Le degré d'homologie entre la séquence de reconnaissance d'un facteur retrouvée dans la région régulatrice d'un gène et sa séquence consensus peut prédire son affinité de fixation et donc la force de son activité transcriptionnelle (Lassig, 2007). Le site de fixation quant à lui est généralement compris entre 12-30 pb, souvent sous la forme de palindromes ou de répétitions directes (Rodionov, 2007).

La fixation/libération des facteurs transcriptionnels (ainsi que leur activité activatrice/répressive) est souvent modulée par des cofacteurs de toutes sortes. Il peut s'agir de molécules de différentes tailles et nature chimique, des ions aux nucléotides, acides aminés et protéines (Aki *et al.*, 1996, Fabret *et al.*, 1999, Hantke, 2001, Stulke & Hillen, 1999).

### 3.3.1 Répression

L'activité inhibitrice d'un facteur transcriptionnel peut s'exercer de 4 manières différentes :

#### 1) Répression par encombrement stérique,

Le répresseur se fixe sur sa séquence spécifique qui chevauche la séquence promotrice. Ceci bloque la fixation de l'ARN polymérase, prévenant ainsi la transcription.

#### 2) Répression par blocage de l'élongation (par fixation sur le codon d'initiation),

Le répresseur se fixe sur le codon d'initiation, ce qui bloque le reste de la transcription en empêchant la progression de la polymérase.

#### 3) Répression par formation d'une boucle d'ADN

Grâce à des sites de fixation de chaque côté de la séquence promotrice, ce qui permet une interaction avec le répresseur qui va former une boucle avec le brin d'ADN. Cela cause la répression du promoteur en empêchant la liaison de l'ARN polymérase.

#### 4) Répression par modulation de l'action positive d'un second facteur

Le répresseur lie l'activateur, ce qui contribue à son action bloquante en empêchant la reconnaissance du promoteur par l'ARN polymérase (Browning & Busby, 2004, Rodionov, 2007, Lloyd *et al.*, 2001).

### 3.3.2 Activation

De façon similaire à la répression, l'activation possède 4 modes d'action :

- 1) Activation par fixation en amont de la séquence promotrice et interaction avec les sous-unités  $\alpha$  de l'ARNpol

En se liant en amont de la séquence, peut lier la sous-unité  $\alpha$ CTD de l'ARN polymérase, ce qui permet de recruter la polymérase au promoteur.

- 2) Activation par fixation sur une région adjacente à la région promotrice qui recrute le facteur  $\sigma$

L'activateur lie sa séquence spécifique adjacente au -35 du promoteur. L'activateur ainsi lié interagit avec  $\sigma 70$ , ce qui permet le recrutement de l'ARN polymérase et favorise la transcription du gène.

- 3) Activation par changement conformationnel de l'ADN, ce qui rend le promoteur accessible à l'entrée du facteur  $\sigma$ , se produit en général en tordant la double hélice

L'activateur se lie près du promoteur et réaligne les séquences -10 et -35. Cette modification de la conformation permet la liaison de l'ARN polymérase au promoteur.

#### 4) Activation par modulation de l'action inhibitrice d'un répresseur

L'activation par modulation requiert l'interaction entre le facteur d'activation transcriptionnelle et les sites de liaisons du ou des répresseurs. Cela cause une levée de la répression sans pour autant physiquement déplacer les répresseurs, puisque l'activateur s'y lie en premier (Lloyd et al., 2001, Browning & Busby, 2004, Rodionov, 2007, Smits *et al.*, 2007, Rodionov *et al.*, 2011, Barnard *et al.*, 2004).

### 3.4 Régulateurs globaux

La régulation génétique bactérienne fait intervenir de nombreux mécanismes influençant l'organisation globale du chromosome bactérien. Ces mécanismes sous-tendent en général un mécanisme de régulation global, ce qui regroupe simultanément un grand nombre d'unités transcriptionnelles. Les nucléoprotéines (ou protéines de type histone) sont une classe particulière de protéines qui regroupe entre autres : H-NS, Lrp, Crp, etc.

#### 3.4.1 Catabolite repressor protein ou Crp

Catabolite repressor protein ou Crp est la protéine réceptrice à l'AMPc. Il s'agit d'un des régulateurs locaux les plus étudiés et caractérisés d'*E. coli*. Grâce à l'action de Crp, l'AMPc devient un signal impliqué dans le contrôle global des gènes chez *E. coli*. Il a été démontré que la présence de glucose inhibe l'expression des gènes codant pour les enzymes nécessaires dans le métabolisme d'autres sources de carbone (le lactose par exemple)(Balsalobre *et al.*, 2006, Loomis & Magasanik, 1965). L'incorporation de glucose dans le milieu cause la diminution en concentration de Crp et de l'AMPc et c'est cette diminution dans la concentration du complexe Crp-AMPc qui cause la répression catabolique (Ishizuka *et al.*, 1994). Le complexe Crp-AMPc peut agir comme activateur ou comme répresseur de certains gènes. La modulation du niveau de ce complexe va donc

moduler l'action activatrice ou de répression et contribuer au phénomène de répression catabolique.

### 3.4.2 Dam

La Dam méthyltransférase transfère un groupement méthyle, de la S-adénosyl-méthionine, à un résidu adénine dans un motif 5'-GATC-3' (Wion & Casadesus, 2006). La méthylation survient rapidement après la réplication bactérienne, mais ce n'est pas un processus immédiat. Le passage de la fourche de réplication laisse donc de façon transitoire les sites GATC sous forme hémiméthylée (un brin méthylé l'autre non). La Dam est la première méthyltransférase identifiée comme ayant des répercussions au niveau physiologique bactérien.

L'origine de réplication *oriC* contient 11 sites GATC, une densité 10 fois supérieure à celle due au simple hasard. Cela dénote donc le rôle de Dam au niveau de la régulation du processus de réplication bactérien (Wion & Casadesus, 2006). La réplication est initiée par la fixation de DnaA sur *oriC* et la séparation des 2 brins d'ADN, ce qui n'est possible que si les sites GATC sont totalement méthylés (Boye *et al.*, 2000). Après le passage de la fourche de réplication, les GATC nouvellement synthétisés restent hémiméthylés durant le tiers de la durée du cycle bactérien. En effet, la protéine SeqA possède une très forte affinité pour les sites GATC hémiméthylés, ce qui empêche l'action de Dam en séquestrant ces sites. Tant que SeqA est lié aux sites GATC de *oriC* le cycle de réplication est retardé (Campbell & Kleckner, 1990), la méthylation par Dam des sites hémiméthylés permet l'initiation de la réplication suite au détachement de SeqA.

Chez les souches pathogènes, la Dam est aussi impliquée dans le contrôle de la régulation de certains facteurs de virulence (Low *et al.*, 2001, Wion & Casadesus, 2006, Hernday *et al.*, 2002), notamment la variation de phase des fimbriae de type P (discuté au point 4.2.1). La délétion de *dam* chez *Salmonella enterica* entraîne une atténuation de la virulence ainsi que des défauts d'expression de nombreux gènes de virulence,

altération de la stabilité de l'enveloppe et un relargage anormal de protéines, etc. (Giacomodonato *et al.*, 2004, Pucciarelli *et al.*, 2002, Garcia-Del Portillo *et al.*, 1999, Heithoff *et al.*, 1999).

### 3.4.3 H-NS (Histone-Like Nucleoid Structuring Protein)

H-NS est l'une des protéines les plus abondantes du cytosol bactérien et elle agit sur la structure de l'ADN en le compactant (à la manière des histones) et en modifiant sa superhélicité en induisant des supertours négatifs (Dorman, 2009a, Dorman, 2009b). H-NS semble interagir principalement avec les régions riches en A/T ou courbées de l'ADN (Dorman & Kane, 2009). H-NS joue aussi un rôle dans la régulation de l'expression des gènes à basse température en réprimant leur transcription, son rôle est aussi important au niveau du transfert horizontal et de la régulation des gènes acquis ainsi (Dorman & Kane, 2009). Le mécanisme par lequel H-NS régule la transcription n'est pas entièrement connu, on considère toutefois celui-ci comme étant la capacité de H-NS d'altérer le surenroulement de l'ADN ce qui inhiberait directement la transcription en limitant l'accès aux séquences promotrices (Dorman, 2010, Dorman & Kane, 2009, Dorman & Corcoran, 2009).

Hormis la température, d'autres conditions environnementales peuvent modifier la capacité régulatrice de H-NS : le pH, la pression osmotique et la concentration en O<sub>2</sub> ont aussi un impact (Krin *et al.*, 2001, Hommais *et al.*, 2001, Bertin *et al.*, 2001). H-NS est aussi impliquée dans la régulation de certains gènes de virulence comme certains fimbriae et flagelles chez *E. coli* (opérons *pap*, *daa*, *sfa*, *fim* et *fliC*) (White-Ziegler *et al.*, 2000, Morschhauser *et al.*, 1993, Harel & Martin, 1999, Schembri *et al.*, 1998, Olsen *et al.*, 1998, Landini & Zehnder, 2002, Goransson *et al.*, 1990).

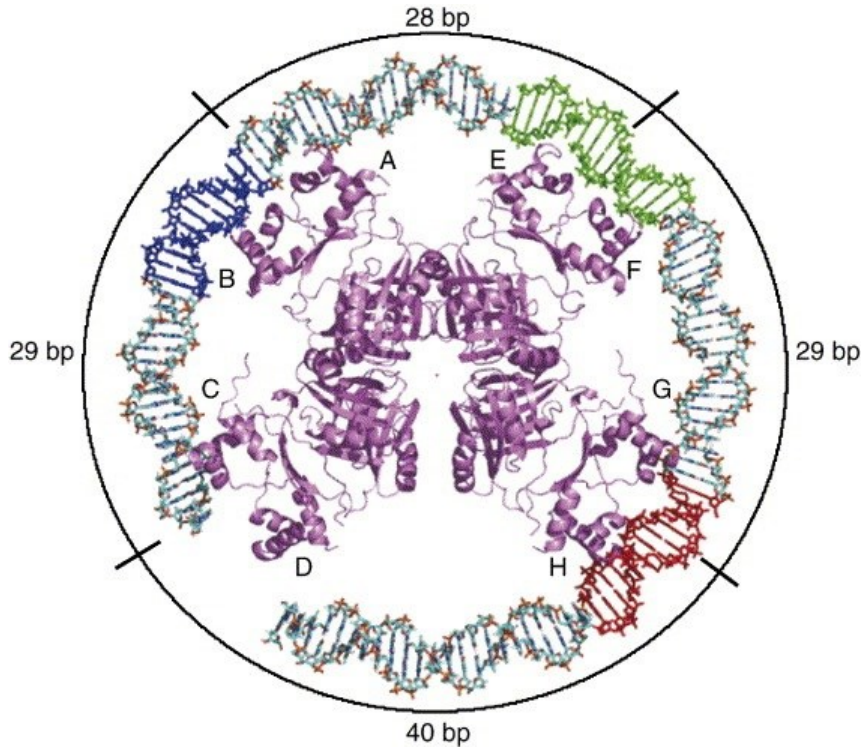
### 3.4.4 Leucine responsive regulatory protein (Lrp)

Lrp est une protéine basique (pI de 9,2) de 18,8 kDa se liant à l'ADN sous forme dimérique (Calvo & Matthews, 1994, Newman & Lin, 1995). Il s'agit d'une protéine de la



famille des protéines régulatrices AsnC et sa structure/séquence est fortement conservée parmi les eubactéries et archae (Yokoyama *et al.*, 2006). Lrp ne présente pas de séquence bien définie pour sa liaison à l'ADN. La séquence consensus (C/T)AG(A/C/T)A(A/T)ATT(A/T)T(A/G/T)CT(A/G) a été identifiée à Lrp par la méthode Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX). Cette séquence peut toutefois être simplifiée ainsi : GN<sub>2-3</sub>TTT où N correspond à n'importe quel nucléotide. Toutefois, celle-ci requiert une région riche en A/T afin de favoriser la liaison de Lrp (Yokoyama *et al.*, 2009, Newman & Lin, 1995).

Lrp est un régulateur transcriptionnel qui a une aussi activité de nucléoprotéine, agissant sur la conformation de l'ADN pour réguler l'expression génétique. Lrp contrôle un régulon, c'est-à-dire un large ensemble de gènes contrôlés par le même régulateur. Ce régulon peut comprendre de nombreux opérons. Le régulon de Lrp englobe de nombreux gènes impliqués dans la dégradation des acides aminés, le transport de petites molécules, l'osmolarité ou autres fonctions reliées au métabolisme bactérien ou la synthèse de pili. Son action est à très large spectre, puisque la délétion de *lrp* influence de façon directe ou indirecte 10 % du génome d'*E. coli* (Cho *et al.*, 2008, Newman & Lin, 1995). L'action régulatrice de Lrp peut être soit activatrice ou répressive, elle varie selon le gène régulé et la concentration en acides aminés aliphatiques (leucine, alanine notamment) exogènes.



**Figure 10 : Structure octamérique de Lrp et liaison à l'ADN**  
(de los Rios & Perona, 2007)

Lrp possède deux domaines distincts, un motif HTH (Hélice-Tout-Hélice) en amino terminal impliqué dans la liaison avec l'ADN et un second en carboxyle-terminal important pour son activité transcriptionnelle (de los Rios & Perona, 2007). Lrp dans son interaction avec l'ADN forme des oligomères en fonction de sa concentration dans le cytoplasme, ces oligomères vont du dimère à l'hexadécamère. La forme octamérique est formée de quatre dimères et est la forme préférentielle et c'est celle rencontrée en présence de fortes concentrations de leucine exogène (Fig. 10) (Chen & Calvo, 2002, Chen *et al.*, 2001b). Chaque sous-unité possède un site ayant une forte affinité pour la leucine favorisant la dimérisation et un second site favorisant le passage de l'hexadécamère à l'octamère (Chen & Calvo, 2002). D'autres acides aminés aliphatiques peuvent aussi affecter la capacité transcriptionnelle de Lrp, notamment la leucine, l'alanine, l'isoleucine et la valine. Ces acides aminés jouent alors le rôle de cofacteur et peuvent promouvoir l'action de Lrp, réprimer son action ou n'avoir aucune influence.

Cette variation dépend du gène régulé et de l'action normale de Lrp sur celui-ci (répression ou activation) (Chen *et al.*, 2001a).

L'action régulatrice de Lrp intervient généralement au moment de la transition entre deux conditions environnementales : d'une croissance riche en nutriments à une situation de famine et de carence nutritive, par exemple dans le cas du passage de la phase de croissance exponentielle à la phase stationnaire. C'est à ce moment précis (changement entre les deux phases de croissance) que l'on observe un pic de synthèse de Lrp qui coïncide avec la synthèse de l'alarhone ppGpp qui est impliquée dans la réponse au stress (Landgraf *et al.*, 1996).

Comme mentionné précédemment Lrp est impliqué dans la régulation de facteurs ayant un rôle à jouer dans l'établissement de la pathogenèse. La plupart des opérons fimbriaires sont régulés par Lrp (Low & Casadesus, 2008, Casadesus & Low, 2006, Muller *et al.*, 2009), l'adhésion aux tissus animaux étant grandement affectée par la délétion de *lrp* (Baek *et al.*, 2009).

## 4. Régulation épigénétique

### 4.1 Généralités

Un mécanisme se dit épigénétique si l'héritabilité d'un phénotype est due à un autre mécanisme qu'une mutation ou une modification de la séquence d'ADN (Casadesus & Low, 2006). Ce terme désigne donc toute modification phénotypique transmissible de génération en génération, de sorte les modifications biochimiques (i.e. : méthylation) ou d'un complexe protéique sont considérées comme les marqueurs d'un mécanisme épigénétique.

La régulation épigénétique est possible chez les eucaryotes comme les procaryotes. Un des mécanismes chez ces derniers est la méthylation irréversible de bases nucléotidiques le long de la séquence d'ADN, cette méthylation peut se présenter sur l'adénine ou la cytosine (Cheng, 1995, Wion & Casadesus, 2006). Cette méthylation reste stable lors du cycle cellulaire bactérien. Par contre le profil de méthylation peut changer lors de la réplication de l'ADN (Wion & Casadesus, 2006). Cette modification interfère dans l'interaction ADN-protéines, par exemple l'activité de nombreuses enzymes de restriction est affectée par la méthylation de l'ADN (Bickle & Kruger, 1993). Des enzymes tels que MboI ne peut que cliver les sites 5'-GATC-3' non méthylé (sur l'adénine) et l'enzyme DpnI clive les sites méthylés et hémiméthylés. L'hémiméthylation est une modification induite par la présence d'un brin méthylé et un brin non méthylé, ceux-ci sont générés lors de la réplication semi-conservative de l'ADN. La méthylation peut aussi interférer avec la liaison de facteurs transcriptionnels à leur site spécifique de liaison (Reisenauer *et al.*, 1999, Low *et al.*, 2001). La Dam méthyltransférase est l'un des excellents exemples d'une protéine impliquée dans la régulation épigénétique. La Dam régule l'expression génétique en méthylant les séquences 5'-GATC-3', entrant en compétition avec des régulateurs comme Lrp (régule près de 10 % du génome (Cho *et al.*, 2008)) et SeqA (Wion & Casadesus, 2006).

## 4.2 Variation de phase

La variation de phase est un mécanisme de variation phénotypique qui donne naissance, dans une population clonale, à des phénotypes hétérogènes (van der Woude & Baumber, 2004). Cette propriété permet à une bactérie de transiter entre deux états distincts, soit l'expression (phase ON) et la répression (phase OFF) d'un gène ou d'un complexe génétique. Cette variation phénotypique est héritable de génération en génération, avec des événements ponctuels où il y aura changement de phase (Jarboe *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2005). La fréquence de passage d'un phénotype à l'autre varie grandement entre les systèmes de 0,001 % à 10 % de la population totale (Davidson & Surette, 2008), pour certaines fréquences de variation le changement n'est visible que sur plusieurs générations, mais cette fréquence reste supérieure à celle d'une mutation spontanée qui provoquerait un changement de phénotype irréversible.

La variation de phase peut se produire par une variété de mécanismes très différents. Par exemple, les fimbriae de type 1 font appel à la recombinaison site spécifique induite par les recombinases FimB et FimE, qui cause une inversion de la séquence promotrice et le passage de ON->OFF et vice-versa (van der Woude & Baumber, 2004, Casadesus & Low, 2006, Blomfield, 2001, Holden *et al.*, 2007, Davidson & Surette, 2008). La variation de phase peut aussi être provoquée par « slipped-strand mispairing », qui peut causer l'insertion/délétion de séquences répétées. Ces séquences peuvent résulter dans un décalage du cadre de lecture et ainsi tronquer la protéine synthétisée. La présence de gènes dupliqués, mais modifiés (variants phénotypiques), permettra l'expression différentielle; soit par la génétique classique (mutations ponctuelles, changement du cadre de lecture, recombinaison) ou des mécanismes épigénétiques (Davidson & Surette, 2008). Chez *Neisseria gonorrhoeae*, la variation antigénique s'effectue grâce à un système RecA-dépendant qui permet la recombinaison d'homologues silencieux du gène afin de générer des variants nouveaux. Finalement, la variation épigénétique de son côté n'implique pas de changements directs de la séquence d'ADN, mais plutôt des modifications biochimiques au niveau des nucléotides spécifiques. La Dam méthyltransférase est donc impliquée dans le contrôle de la

variation de phase, notamment en collaboration avec Lrp pour la régulation de la variation de phase de l'opéron *pap*.

La variation de phase peut être un phénomène stochastique et donc peut être soumise à une analyse statistique. Dans une cellule donnée, la quantité exacte de chacun des facteurs transcriptionnels varie en disponibilité. Les facteurs transcriptionnels sont à tout moment soit liés à l'ADN ou libres dans le cytosol. L'affinité d'un régulateur pour sa séquence de liaison sera déterminante pour sa concentration dans le cytoplasme ainsi que pour sa disponibilité, plus la demie-vie de sa forme fixée est longue plus sa concentration cytosolique diminue. Ceci implique donc que la concentration exacte de chaque protéine sera différente d'une cellule à une autre au sein d'une population clonale, ce sont ces différences qui créent le bruit de fond (Acar *et al.*, 2010, Ozbudak *et al.*, 2002, Thattai & van Oudenaarden, 2001, Albano *et al.*, 2005, Mettetal & van Oudenaarden, 2007, Balazsi *et al.*, 2011). Ce bruit de fond donné par les phénomènes aléatoires est ce qui différencie un phénomène stochastique d'un phénomène déterministe.

De précédents travaux ont démontré que l'affinité d'un régulateur pour sa séquence de régulation va avoir un effet sur les probabilités liées à l'activation/répression des gènes contrôlés par ce régulateur. Dans l'exemple de l'opéron *pap* par rapport à l'opéron *foo* (Graveline *et al.*, 2011), la stabilité de Lrp au niveau du site 1 de la région régulatrice dans le cas de *pap* donne aux souches *pap* positives une très forte tendance à la non-expression (OFF). À l'opposé, l'opéron *foo* possède une courte séquence de liaison à Lrp causant une instabilité de Lrp au site 1, ce qui donne à *foo* un potentiel plus grand pour une variation de phase fréquente. L'opéron *pap* et sa régulation seront détaillés dans les sections suivantes.

## 5. Fimbriae de type P

Cette famille de fimbriae joue un rôle prépondérant dans l'infection des voies supérieures du système urinaire (Lane & Mobley, 2007). Le fimbriae de type P comme celui de type 1 est formé d'une tige de ~1000 monomères de sa sous-unité A (PapA) (Fig.8a). On retrouve à l'extrémité de la tige fimbriaire de PapA, l'adhésine PapG qui permet la reconnaissance des motifs Gal $\alpha$ (1->4)Gal présents à la surface des érythrocytes et d'autres types cellulaires, dont notamment les cellules uroépithéliales du rein et du tractus urinaire (Hung et al., 2002, Lane & Mobley, 2007, Dodson *et al.*, 2001, Waksman & Hultgren, 2009).

### 5.1 L'opéron *pap*

La biosynthèse des fimbriae de type P requiert environ 11 gènes (Fig 11) afin de produire les protéines nécessaires à leur assemblage. On retrouve les gènes de synthèse pour les protéines structurales (PapA, PapE, PapF, PapH, PapK, PapG), les protéines d'assemblage (PapC, PapD et PapJ) et pour finir les protéines régulatrices PapB et PapI (Waksman & Hultgren, 2009). Ces gènes sont organisés sous forme d'un opéron codant pour toutes les sous-unités (*papBAHCDJKEFG*), sauf *papI* qui est transcrit seul et en sens inverse du reste de l'opéron (Casadesus & Low, 2006, Hernday et al., 2002).

#### opéron *pap*

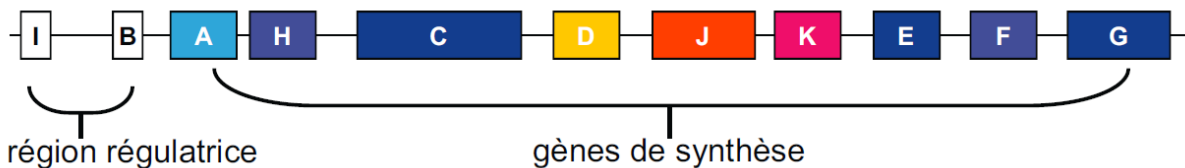


Figure 11 : Schématisation de la structure de l'opéron *pap*

(Adaptation de Richard Graveline, 2011)

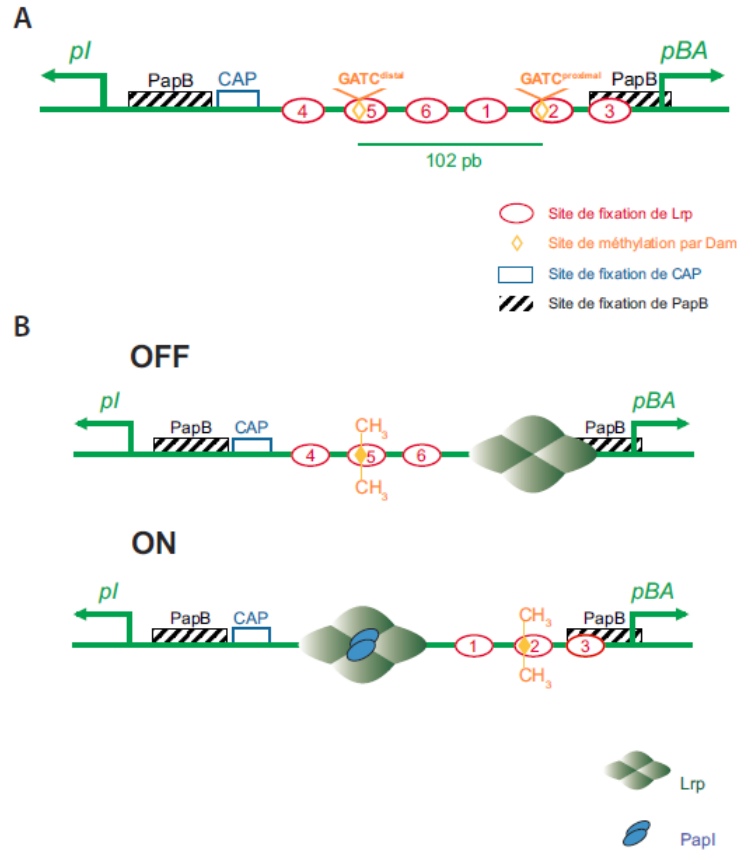
Le promoteur principal, pBA, régule la transcription de l'opéron alors que *papI* est régulé par son propre promoteur pI. L'activité du promoteur est soumise à de complexes interactions environnementales ainsi qu'à divers niveaux de régulation. Tout d'abord, il y

a la régulation transcriptionnelle. Un second niveau de régulation se trouve au niveau post-transcriptionnel. L'opéron *pap* est transcrit comme un grand ARNm polycistronique, toutefois il a été démontré que le taux d'ARNm de *papA* est plus élevé que celui de *papB* (Baga *et al.*, 1988). Cela est dû à la présence d'une séquence terminatrice en 3' de *papA*, ce qui augmente la stabilité de l'ARNm de *papA* et évite sa dégradation trop rapide.

Le troisième mode de régulation est post-traductionnel et repose sur la gestion du nombre d'unités amenées au périplasme et à la biosynthèse des pili (Hernday *et al.*, 2004). La protéase DegP effectue en effet une fonction régulatrice importante en dégradant les agrégats formés par les sous-unités mal repliées (donc n'ayant pas lié les chaperonnes). Les souches d'*E. coli* dépourvues de DegP subissent une accumulation létale de sous-unités. Les altérations tridimensionnelles subies dans le périplasme sont aussi importantes pour la production des fimbriae de type P. La Disulfide oxidoréductase A (Dsb A) catalyse la formation de ponts disulfures qui sont nécessaires pour l'assemblage du pilus. La transcription des gènes pour DegP et DsbA est toutefois soumise à la régulation du système à 2 composantes CpxAR, qui répond lui aussi à une accumulation de sous-unités dénaturées dans le périplasme (Hernday *et al.*, 2004). CpxA est la protéine senseur qui détecte les sous-unités dénaturées, CpxR est la protéine effectrice qui se lie à l'ADN. CpxA possède une activité phosphatase/kinase, qui par l'ajout d'un groupement phosphate, active l'action régulatrice de CpxR (et vice-versa). En plus de stimuler la transcription de *degP*, CpxR régule de façon négative *pBA* de *pap* et donc diminue la transcription des pilines (Hernday *et al.*, 2004) en se fixant sur les sites de liaison recouvrant ceux de Lrp.

La régulation de l'opéron est aussi caractérisée par sa région intergénique entre *papI* et *papB*. Celle-ci contient 6 sites de liaison pour la protéine régulatrice Lrp. Les sites 2 et 5 (Fig 12 A) sont séparés de 102 bp et forment avec les sites les flanquant ce que l'on nomme respectivement les sites GATC proximal (GATC<sup>prox</sup>) et GATC distal (GATC<sup>dist</sup>)





**Figure 12 : Schématisation de la variation de phase de Pap** (Graveline et al., 2011)

La Figure 12 représente en A) la Structure de l'opéron *pap* et sa région intergénique avec les différents sites de liaison pour Lrp et ses corégulateurs. En B) les différentes phases d'expression ainsi que les protéines impliquées et leur site de liaison.

La variation de phase des fimbriae de type P (Pap), implique l'intervention de plusieurs protéines, nommément : Lrp, PapI, PapB et Dam (Hernday et al., 2002, Casadesus & Low, 2006). Les phases ON et OFF d'expression de Pap sont reliées à l'état de fixation de Lrp dans la région intergénique de l'opéron (région située entre *pl* et *pBA*). Il s'y trouve 2 sites de fixation pour Lrp nommés : GATC proximal (*GATC<sup>prox</sup>*) et GATC distal (*GATC<sup>dist</sup>*). Plus précisément, dans le cas de la phase OFF, Lrp se fixe aux sites 1-3 (Fig. 7B) et cause un encombrement stérique qui préviendra la liaison de l'ARN polymérase et l'activation du promoteur *pBA*. En phase ON, Lrp se fixe aux sites 4-6 avec

l'assistance du régulateur PapI (Fig. 7B)(Hernday *et al.*, 2003), ce qui rend alors favorable la liaison de l'ARN polymérase aux deux promoteurs et la transcription bidirectionnelle.

La nucléoprotéine H-NS y joue aussi un rôle important dans la thermorégulation, puisque les fimbriae de type P sont produits par des cellules se multipliant à 25-37°C, de l'expression des régulateurs positifs de *pap* (PapB et PapI). Par retard sur gel il a été démontré que H-NS liait les deux sites GATC, bloquant la méthylation (essentielle pour la régulation normale de l'opéron) à des températures en deçà de 23 °C et pas à 37 °C (White-Ziegler *et al.*, 1998, White-Ziegler *et al.*, 2000). De plus, H-NS est aussi impliqué dans la répression associée à d'autres conditions environnementales : pression osmotique, riche milieu de croissance ou en présence de glucose comme unique source de carbone (White-Ziegler *et al.*, 2000).

La variation de phase de Pap étant un mécanisme épigénétique, elle est réversible et transmissible de génération en génération. Ceci provient de l'action de Dam au niveau du GATC<sup>prox</sup> et GATC<sup>dist</sup>, puisque Dam peut y méthyler l'adénine. Cette modification biochimique interfère avec la capacité de liaison de Lrp à ces sites : la méthylation de l'adénine au site 5 forcera Lrp à lier les sites 1-3, ce qui induit donc la phase OFF de par l'impossibilité de Lrp à lier 2 brins méthylés (Low *et al.*, 2001, Nou *et al.*, 1995, Nou *et al.*, 1993). Inversement, la méthylation du site 2 forcera la phase ON de par la liaison de Lrp au site distal. Toutefois, il est à noter que la liaison aux sites 4-6 est codépendante de l'action de PapI, les sites 4 et 6 étant caractérisés comme PapI-dépendant (Kawamura *et al.*, 2011). L'affinité de Lrp pour ces deux sites est tellement faible que seule la présence de PapI permet d'atteindre le niveau d'énergie requis pour la liaison, ce qui explique l'importance de PapI dans le maintien de la phase ON, et ce même si le site 5 est PapI-indépendant.

## 5.1.1 Régulateurs locaux

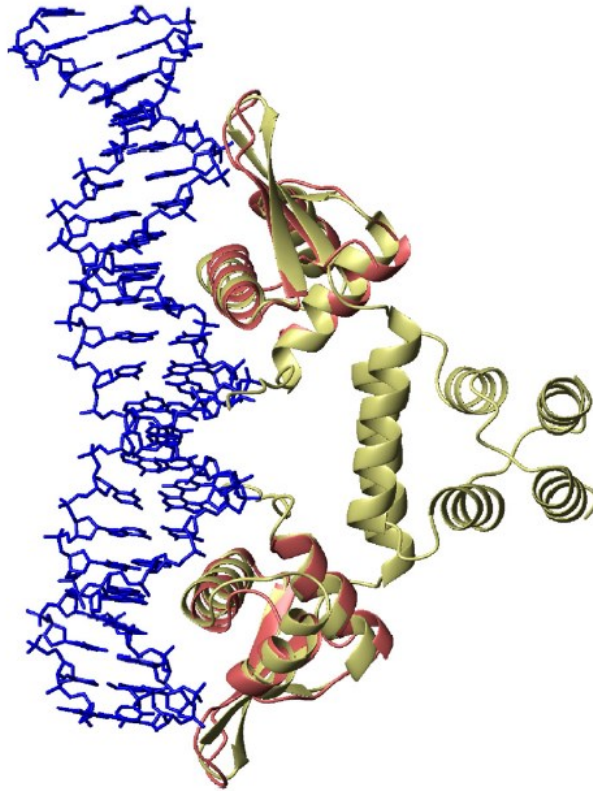
### 5.1.1.1 PapB

PapB est codée par le premier gène de l'opéron *pap* et possède une double fonction : activateur et répresseur. PapB est l'activateur transcriptionnel qui permet la transcription des 2 promoteurs de l'opéron *pap* : *pI* et *pBA* (Hernday et al., 2002). PapB engendre de cette façon une boucle positive d'activation de la phase ON en permettant la transcription de *papI* (Forsman *et al.*, 1989, Goransson *et al.*, 1989), qui code PapI le régulateur essentiel pour la liaison de Lrp au site GATC<sup>dist</sup>. Ainsi *papB* est nécessaire afin d'induire le passage OFF->ON (Hernday et al., 2002, Totsika *et al.*, 2008, Casadesus & Low, 2006). Toutefois, des concentrations trop élevées de PapB vont causer son action inhibitrice, puisque PapB possède 3 sites de liaison dans la région intergénique (Fig. 7A) : un à très forte affinité près de *pI* et 2 de faible affinité chevauchant la séquence entre *pBA* et le gène *papB* (Totsika et al., 2008, Hernday et al., 2002). À de fortes concentrations PapB peut donc lier ces sites de moindre affinité (par saturation) et causer la répression de l'opéron et donc aider le passage de ON->OFF.

### 5.1.1.2 PapI et ses homologues : Protéines FaeA-like

PapI est un des régulateurs essentiels pour la variation de phase, puisqu'il permet la fixation de Lrp au site GATC<sup>dist</sup> et donc sa protection de la méthylation (Hernday et al., 2003). PapI favorise l'interaction de Lrp avec les sites 4-6, ceux-ci étant PapI-dépendants (Kawamura et al., 2011) la fixation de Lrp ne peut s'y effectuer qu'en présence de PapI. Lrp interagit normalement avec des sites de façon non spécifique pour la séquence d'ADN. Des études précédentes ont démontré que Lrp possédait une affinité pour les sites 1-3, alors que le complexe Lrp-PapI lui possède une affinité accrue pour les sites 4-6 (Nou et al., 1995, Kaltenbach *et al.*, 1995, Graveline et al., 2011). C'est une petite protéine (8,8 kDa) de type wHTH, dont le domaine amino terminal jouerait un rôle dans la liaison avec l'ADN (Kawamura *et al.*, 2007, Totsika et al., 2008). Plus précisément, la troisième

hélice serait impliquée dans la liaison à l'ADN, liant le sillon majeur, les autres hélices seraient impliquées dans la stabilisation de la liaison (Fig. 13).



**Figure 13 : Modélisation de l'interaction de PapI avec l'ADN**

(Kawamura et al., 2007)

Jusqu'à maintenant, 15 allèles différents de *papI* ont été identifiés, ces 15 allèles codant pour 10 protéines différentes (Fig. 14) identifiées (Totsika et al., 2008). Chacun de ces variants peut posséder un potentiel d'activation différent des autres, tel que démontré par Totsika, *et al.* En comparant le potentiel d'activation de deux homologues, différenciés uniquement d'un seul acide aminé I.2 (PapI1) et I.3 (PapI2), ils ont pu déterminer que I.3 pouvait activer efficacement la phase ON de *pap1* alors que I.2 n'avait pas le même potentiel activateur sur *pap2* (Totsika et al., 2008).

```

      10      20      30      40      50      60      70
I.1      : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWLLKGEKQAGQSCSSTT
I.2_(CFT073_P1) : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT
I.3_(CFT073_P2) : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT
I.4      : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKEGVVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT
I.5_(536)  : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKEGVVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT
I.6_(J96/UTI89) : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKEGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT
I.7      : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKEGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT
I.8_(83972) : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKEGVVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT
I.9      : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKEGVVQRSPLRRGMATYWLLKGEKQAGQSCSSTT
I.10     : MSEYMKNEILEFLNRHGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKEGVVQRSPLRRGMATYWLLKGEKQAGQSCSSTT
      SS      HHHHHHHHHH      HHHHHHHH      HHHHHHHHHHHHH      SSSS      SSSS

```

Figure 14 : Séquence des variants de PapI

(Totsika et al., 2008)

Le gène codant pour PapI est situé 400 pb en amont du promoteur *pBA*. Il est transcrit grâce à son propre promoteur *pl*, transcrit de façon divergente, qui est activé par la présence de PapB.

PapI possède de nombreux homologues, notamment FooI le régulateur local impliqué dans la variation de phase de F161<sub>1</sub>, mais aussi des régulateurs présents dans d'autres familles d'adhésines (AfaF des adhésines afimbriaires) (Kawamura et al., 2007). Ce qui dénote le caractère répandu de la variation de phase épigénétique dans de nombreux opérons.

```

S.typhimurium PefI-----MSESIVTKLISIVQERQNMDDGAPVKRDLADAAGLSIYQVRLYLEQLHDVSVLEKVNACKGVPLMRL-----
S.enteritidis PefI-----MSSEIITHISITRERQNAHDGAPVKRDLADAAGLSIYQVRSYLEQLRAVSVLEKVNACKGVPLMRL-----
S.typhi hyp.-----MGESEITMISITRERQST-DNAPVKIRDLADAAGLSIYQVRSYLEQLRAVSVLEKVNACKCAPLMRL-----
S.enterica hyp.-----MSNDACDRLSGFMOQANGRINIPVRRSADAAGLTIYQARYYLVTLGAGVVEKMNACKGVSGRMLV-----
E.coli AfaF-----MKINKLTLNERKNDLSYFGEI-----NTPFRSEVVAEHLGVSAYQARHYLQCLEKKEKIKRSVPRFGASTLWEISAVTEPSVKTDRID
E.coli DaaF-----MKINKLTLNERKNDLSYFGEI-----NAPCRSEVVAEHLGVSAYQARHYLQCLEKKEKIKRSVPRFGASTLWEISSIPP-----
E.coli AfaF-----MKDNLTIFLTEL-----KTECRTEIPIHFGLSAYQARYYLMNLEKKEKIKRSVPRFGASTLWEMNS-----
E.coli KS71A-----MSEYMKNEILEFLNR-----HNGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT-
E.coli FooI-----MSEYMKNEILEFLNR-----HNGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT-
E.coli PapI-----HDGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT-
E.coli PapI-----MSEYMKNEILEFLNR-----HNGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT-
E.coli PrfI-----MSEYMKNEILEFLNR-----HNGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT-
E.coli hyp.-----MQNEIMGFLSR-----HNGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT-
E.coli hyp. SfaC--MNCQKQVSHLLSFLYREDDDMQNEIMGFLSR-----HNGGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT-
E.coli SfaC-----MQNEIMGFLSR-----HNVGKTAETAEIABALAVTDYQARYYLLLEKAGMVQRSPLRRGMATYWFLKGEKQAGQSCSSTT-
E.coli PaeA-----MKEHILEYINS-----RGSCTREIADATGISAVQARYYLMNLEKKEKIKRSVPRFGASTLWCVLREK-----
P.aerophilum hyp.-----MPRRQTDKVFERKEOILEYLT-----YGELTMSKLIQLTGLSHSCTFYILKLEKENIVK--EVKREKLIAYVRLVETREV-----
      HHHHHHHHHH-----HHHHHHHH--HHHHHHHHHHHHHH-----SSSS-----SSSS

```

Figure 15 : Comparaison de séquences des homologues de PapI

(Kawamura et al., 2007)

On observe dans cette famille de protéines, la famille FaeA-like (Fig 15), que la structure est assez variable. Certains comme les variants de PapI (incluant FooI et AfaF) possèdent la forme wHtH (winged Helix-turn-Helix) complète. Alors que d'autres homologues comme FaeA et PefI possèdent la forme wHtH, mais ne s'étendent pas après

le dernier feuillet  $\beta$ , elles sont donc « tail-less ». Ces homologues plus courts comme FaeA semblent avoir une fonction similaire à PapI, soit en régulant la synthèse d'adhésines de surface comme K88 (dans le cas de FaeA) avec un mécanisme de variation de phase Lrp/Dam dépendant. Toutefois le rôle de la protéine est très différent, le complexe FaeA-Lrp agissant en tant que répresseur de l'opéron *fae*. En substituant FaeA par PapI, on obtient une activation de l'opéron (Kawamura et al., 2007, Huisman *et al.*, 1994, Huisman & de Graaf, 1995).

Des modifications du régulateur « I » peuvent donc influencer grandement sur l'activité de l'opéron et le fonctionnement du mécanisme. Comme il a été démontré précédemment, une substitution d'un seul acide aminé D17->N chez PapI-2 par rapport à PapI-1, lui confère une activité activatrice plus importante que son homologue (Totsika et al., 2008).

## 5.2 Homologues régulationnels de *pap*

### 5.2.1 *foo*/F165<sub>1</sub>

Le fimbriae F165<sub>1</sub> est l'un des deux composants du complexe F165 (l'autre étant F165<sub>2</sub>) (Harel *et al.*, 1991, Harel *et al.*, 1992a, Harel *et al.*, 1995). F165<sub>1</sub> est un complexe multiprotéique rigide d'un diamètre de 4-6 nm et de 200 nm de longueur (Fairbrother *et al.*, 1988, Fairbrother *et al.*, 1986). F165<sub>1</sub> possède de fortes homologies avec Pap, notamment une adhésine G (FooG) de type III reconnaissant l'antigène de Forsmann (GB05) (Harel *et al.*, 1992b, Fairbrother et al., 1986). Identifié en premier lieu chez des souches non-EPEC isolées de cas de septicémie et diarrhées chez le porcelet, l'antigène F165<sub>1</sub> est associé à 35 % des mortalités à bactériémie colibacillaire chez le veau en France, au Canada et en Inde et de plus, au Canada 14 % des porcelets (Contrepois *et al.*, 1989, Ngeleka *et al.*, 1992, Ngeleka *et al.*, 1993, Fairbrother et al., 1986). Les souches exprimant ce fimbriae sont principalement du phylogroupe A et B1, ce qui en fait

principalement des pathogènes opportunistes. Leur rôle exact dans la pathogénie est incertain, des infections expérimentales avec des souches mutantes pour F165<sub>1</sub> suggèrent que le fimbriae permettrait l'attachement et la colonisation d'organes extra-intestinaux et de résister à la phagocytose (Ngeleka & Fairbrother, 1999, Ngeleka et al., 1993, Ngeleka *et al.*, 1994). L'adhésion aux cellules rénales canines et cellules tubulo-épithéliales porcines a aussi été démontrée (Bekal *et al.*, 2003).

Son organisation génétique est fortement similaire à celle de *pap* : Une région intergénique possédant 6 sites de liaison pour Lrp groupés en un site GATC proximal et un site GATC distal (séparés par 102 pb), de plus cette région est flanquée de deux promoteurs divergents. Ces deux promoteurs régulent l'expression d'un des gènes de synthèse et du régulateur *FooB*, l'autre permet l'expression de *FooI* (Maiti *et al.*, 1994). L'alignement des deux séquences montre une homologie de séquence à 92 %. L'expression de *foo* est sujette à la régulation par CRP, H-NS, Lrp et Dam de la même manière que *pap* (Crost *et al.*, 2004, Daigle *et al.*, 2000). L'expression de *foo* est aussi inhibée par l'ajout d'alanine et de leucine (Crost *et al.*, 2003, Berthiaume *et al.*, 2004).. En revanche, au niveau régulationnel, *foo* diffère légèrement de *Pap*, puisque par des tests avec des gènes rapporteurs (*lacZ*), des études ont démontré que la phase ON est plus prépondérante chez *foo* que chez son homologue *pap* (Crost et al., 2003, Daigle et al., 2000, Graveline et al., 2011, Tessier *et al.*, 2007).

La présence au niveau du site 1 (Fig. 16) d'une séquence de reconnaissance pour Lrp supplémentaire, cause une instabilité qui permet la dissociation plus facile de Lrp de son complexe avec l'ADN au niveau des sites 1-3 (Graveline et al., 2011). L'opéron *pap* ne présentant pas cette séquence, la fixation de Lrp au site proximal démontre une constante de dissociation plus faible, donc une plus grande stabilité. Il a été démontré qu'en effectuant des modifications au niveau du site 1 on pouvait modifier le profil d'expression de *pap* en celui de *foo*, soit augmenter la fréquence de variation de phase et le nombre de colonies en phase ON (Graveline et al., 2011).

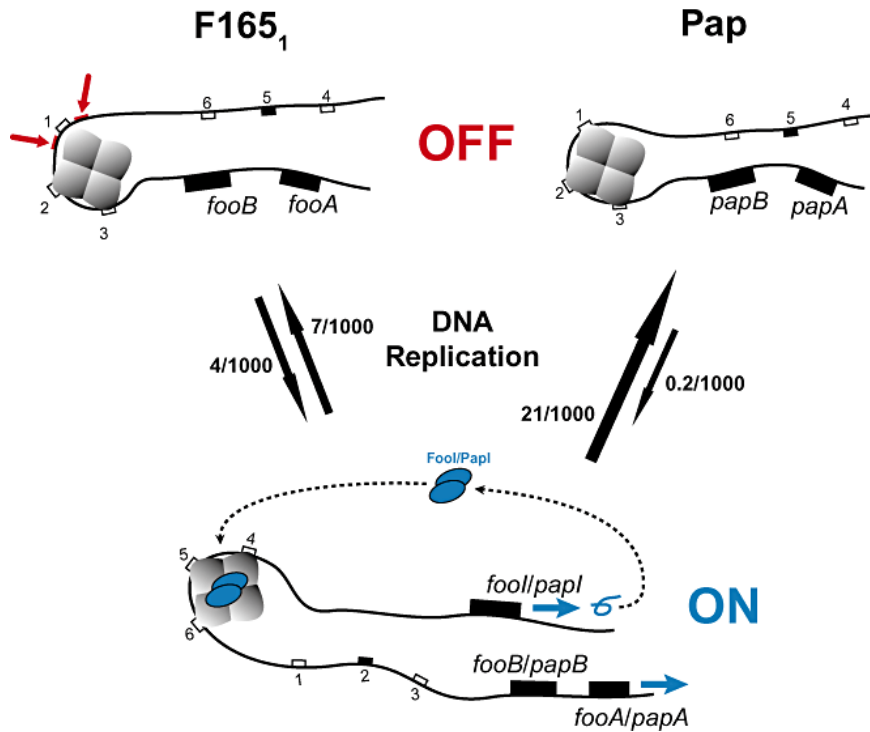


Figure 16 : Modélisation de l'instabilité chez *foo* vs *pap*

(Graveline et al., 2011)

Cependant, ces phénotypes ne sont complètement identiques qu'en interchangeant les régulateurs PapI et Fool en plus de modifier la région intergénique. Cela démontre l'importance de ces deux régulateurs dans la variation de phase et faire ressortir leurs propriétés différentes, puisque *foo* (portant Fool) est principalement en phase ON et que *pap* (portant PapI) est majoritairement en phase OFF.

### 5.2.2 *clp*/CS31A

CS31A est un facteur d'adhésion afimbriaire. Visible en microscopie électronique, il forme une structure similaire à une capsule (capsule-like : *clp*) à la surface de la cellule et entoure celle-ci. L'adhésine ClpG est le composant majeur du complexe et lie les groupements N-acétylneuraminique à la surface des cellules hôtes (Di Martino *et al.*, 1997, Girardeau *et al.*, 1988, Di Martino *et al.*, 1995). Identifié originellement dans les fèces de veau diarrhéique chez la souche 31A (Bertin *et al.*, 1998, Bertin *et al.*, 2000, Contrepois *et al.*, 1993, Girardeau *et al.*, 1988), l'antigène CS31A a été depuis identifié



chez de nombreuses autres souches d'*Escherichia coli*, et ce à la fois dans les cas de septicémies et diarrhées et est représenté dans 37 % des cas de mortalité par bactériémie chez le veau, présent aussi dans 5 % des *E. coli* isolés de patients humains et chez 1 % des porcelets diarrhéiques (Contrefois et al., 1989, Bertin et al., 2000, Jallat *et al.*, 1994). Cette adhésine présente des homologies de séquence avec les adhésines K88 et F41 (Girardeau *et al.*, 1991, Martin *et al.*, 1991, Girardeau et al., 1988), toutefois CS31A et K88 ont des différences marquées au niveau de leur tropisme tissulaire, notamment l'adhésine K88 permet l'adhésion à la bordure en brosse des cellules porcines alors que CS31A n'adhère pas (Girardeau et al., 1988, Martin, 1996). De plus, l'adhésine ClpG de CS31A possède un seul acide aminé de différence avec l'adhésine CF29K, adhésine présente dans des souches de *Klebsiella pneumoniae* nosocomiales (Di Martino et al., 1995, Contrefois et al., 1993).

L'adhésine CS31A est encodée par l'opéron *clp*. Ce dernier possède une structure génétique similaire à *pap* (voir Fig. 16). Toutefois, contrairement à *pap* et *foo* aucun homologue de PapI n'a pu être identifié. L'expression de l'opéron est donc basale et très faible en absence de ce régulateur (Croft et al., 2004, Croft et al., 2003, Martin, 1996), son expression étant très fortement réprimée par ClpB et Lrp. L'ajout en *trans* du régulateur AfaF, un homologue de PapI présent chez *afa-3*, a permis la restauration de la variation de phase. Tout comme pour *pap* et *foo* cette régulation génétique est soumise à la régulation par Dam et est transmissible de génération en génération. Toutefois, cette variation de phase est biaisée vers la phase OFF pareillement à *pap*. Toutefois, une organisation similaire n'est pas garante d'une homologie de séquence puisqu'il a été démontré que AfaA possède 60,6 % d'homologie avec ClpB, alors que PapB n'a que 42,4 % d'homologie avec ClpB (Martin, 1996).

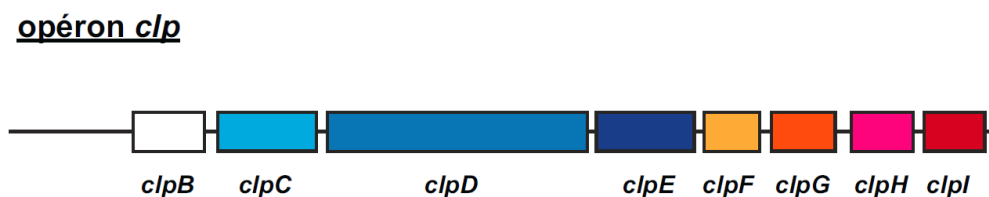


Figure 17 : Organisation génétique de l'opéron *clp* codant l'antigène de surface CS31A

(Martin, 1996)

### 5.3 Association entre les fimbriae

De nombreux types d'adhésines bactériennes peuvent se retrouver dans une même souche. Plusieurs souches en effet portent plus d'un opéron de synthèse d'adhésine. Cela permet aux bactéries de s'adapter aux environnements changeants, puisque cela leur permet d'interagir avec plusieurs récepteurs distincts. Il a été démontré qu'une seule et même souche pouvait posséder les gènes codants pour Pap, F165<sub>1</sub> et/ou CS31A (Contrepois et al., 1989, Harel et al., 1991, Contrepois *et al.*, 1986). Il a été démontré que sur plus de 230 souches ExPEC, 17 % possédaient F165<sub>1</sub> et CS31A à leur surface (Contrepois et al., 1989) et que plusieurs souches isolées d'animaux domestiques (bovins, porc, etc.) démontraient une présence simultanée de Pap et F165<sub>1</sub> (Harel et al., 1991). La présence de plusieurs adhésines à la surface d'une bactérie est donc chose commune chez *E. coli*. La présence de deux molécules d'adhésion offre un certain potentiel d'interférence pour lier le même récepteur. De plus, il a été démontré qu'il existe de nombreux mécanismes de régulation croisée entre les différents opérons d'adhésines (Totsika et al., 2008, van der Woude, 2006, van der Woude, 2011, Holden *et al.*, 2006, Simms & Mobley, 2008b, Simms & Mobley, 2008a, Schwartz & Hultgren, 2012). La régulation croisée entre les différents opérons fimbriaires offre un modèle d'expression séquentielle des gènes de virulence (Totsika et al., 2008, Kaper et al., 2004, Pourbakhsh et al., 1997c, Pourbakhsh et al., 1997a), où le changement de conditions environnementales offre l'opportunité d'un changement d'expression puisque l'expression du second fimbriae inhibe l'expression du premier, comme dans le modèle d'infection ascendante et le passage de type 1 à type P avec la progression de l'infection (chez les UPEC et les APEC)(Pourbakhsh et al., 1997c, Kaper et al., 2004). L'expression des fimbriae de type 1 étant exprimé dans l'adhésion aux cellules épithéliales de la vessie, alors que les fimbriae de type P sont exprimés lorsque l'infection progresse dans les néphrons. Cette régulation croisée existe avec d'autres types de fimbriae comme entre les opérons *pap* et *sfa* (codant pour le fimbriae S/F1C) où le régulateur PapI se fixe sur la séquence de *sfa* et en active la transcription (Schwartz & Hultgren, 2012) et à l'inverse SfaC, homologue de PapI, peut aussi activer l'opéron *pap* (Goransson *et al.*,

1988). Totsika *et al.*, ont aussi développé un modèle démontrant la séquence d'expression chez CFT073 des opérons *pap1*, *pap2* et *sfa* (Totsika et al., 2008) (voir Fig. 18).

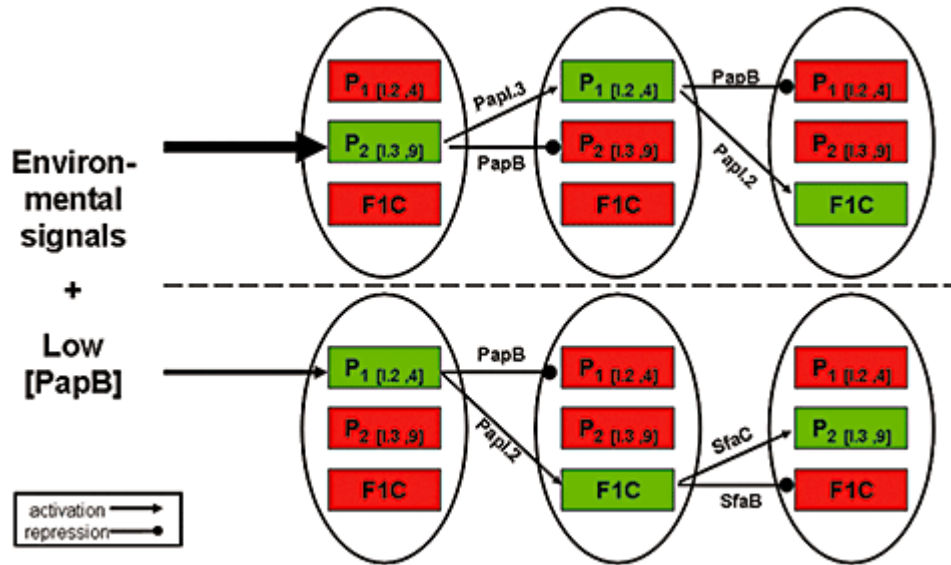


Figure 18 : Modèle illustrant différents scénarios d'expression séquentielle d'opérons fimbriaires homologues (Totsika et al., 2008)

Légende du diagramme adapté de l'anglais : Modèle d'isolat UPEC contenant 3 opérons fimbriaires : P1 et P2 pour les fimbriae de type P et F1C (pour fimbriae F1C/S). Les différences dans la séquence régulatrice entre P1 et P2 sont montrées par le variant de PapI (I.2 et I.3) et par le nombre de répétitions de 9 pb présents dans le site de liaison de PapB pour chaque opéron (4 et 9, respectivement). Les opérons activés sont en vert et ceux qui sont réprimés en rouge. La probabilité de chacun des cas est représentée par la largeur de la flèche et est due à (i) la réponse différentielle des homologues de *pap* à certaines conditions environnementales et (ii) la sensibilité différente du site 1 de PapB à l'activation en présence de concentrations faibles de PapB. Une fois le premier opéron activé des conditions suivantes suivent : (i) l'opéron P2 possède une meilleure chance d'activer de façon croisée P1 que l'inverse, principalement due aux différences inhérentes entre les variants de PapI et leur capacité d'activation croisée (ii) des niveaux croissants de PapB/SfaB répriment l'expression de *pap/sfa* et (iii) L'activation de F1C/S

(*sfa*) suivra l'expression de P1 ou P2, puisque PapI peut l'activer et SfaC peut lui aussi activer en croisé *pap* (Goransson et al., 1988). (Texte adapté de (Totsika et al., 2008).)

## 6. Problématique

Les opérons *clp* (CS31A), *foo* (F165<sub>1</sub>) et *pap* (Pap) démontrent des taux de variation de phase différents (Graveline et al., 2011, Crost et al., 2004, Crost et al., 2003). Il a été démontré par Graveline et al. 2011, que ce sont des différences au niveau de la région régulatrice intergénique de *foo* et *pap* qui sont responsables des différences entre les taux de variation de phase, notamment au niveau du site 1 de liaison pour Lrp. Ainsi, chez *foo*, on retrouve des différences nucléotidiques qui favorisent la dissociation de Lrp au site proximal (Graveline et al., 2011). Chez *clp* la variation de phase est réprimée par Lrp et ClpB (Crost et al., 2003, Martin, 1996), et ne peut être restaurée qu'en présence de AfaF, un homologue de PapI fourni en *trans* puisqu'aucun n'est trouvé chez dans le locus *clp* seulement (Martin, 1996). La variation de phase *in vivo* a été évaluée en utilisant le gène rapporteur (*lacZ*) fusionné au promoteur de l'opéron fimbriaire. Ainsi une colonie blanche sur milieu X-Gal est considérée comme étant en phase OFF et bleue comme en phase ON. L'opéron *clp* démontre, en présence d'AfaF (un homologue de PapI), un maintien important de la phase OFF, supérieur à celui de *pap*. Toutefois, l'effet de PapI ou son homologue Fool n'est pas connu sur *clp*. Il a été démontré que deux variants de PapI qui diffèrent d'un seul acide aminé ont une activité activatrice différente (Totsika et al., 2008), on veut donc observer les différences potentielles entre l'activité de PapI et Fool chez *clp* puisqu'ils sont différents d'un acide aminé à la position 17(N pour D).

De plus, l'observation que les colonies OFF de fusions *foo-lacZ* sont bleu pâle et non pas blanches comme celles de *pap* laissent supposer une grande hétérogénéité au niveau de la population de la colonie. Cette hétérogénéité serait due à des différences dans la fréquence de variation de phase, puis *foo* démontre plus de cellules en phase ON que *pap* (Graveline et al., 2011). L'inversion des régulateurs PapI et Fool entre *foo* et *pap*

(Graveline et al., 2011), a permis de démontrer de légères modifications dans la fréquence de variation de phase, mais rien de significatif.

## 6.1 Hypothèse

En se basant sur les données d'études précédentes, les protéines FooI et PapI semblent posséder des fonctions régulatrices différentes malgré leur très forte similarité. Nous supposons donc que les régulateurs FooI et PapI jouent un rôle différent sur l'expression fimbriaire des opérons de la famille *pap*.

## 6.2 Objectifs

PapI et FooI ont une capacité à activer d'autres opérons différents. L'utilisation de l'opéron *clp* dépourvu de régulateur I servira à mettre en évidence les différences d'activités de FooI et PapI. Cet objectif sera couvert dans l'Article I où l'on compare l'influence des deux régulateurs sur la variation de phase de *clp*.

De plus, afin de mettre en lumière les différences de fréquence de variation de phase au niveau cellulaire des opérons codant pour Pap et F165<sub>1</sub>, nous avons développé un système utilisant la Gfp comme rapporteur de l'activité de promoteurs *pap* et *foo* dans des cellules individualisées et en temps réel. Ce nouveau système permettra de vérifier l'hétérogénéité d'expression plus importante des cellules *foo+* par rapport aux cellules *pap+*. Nous pourrons aussi étudier l'influence spécifique des régulateurs locaux PapI et FooI sur la variation de phase de *pap* et *foo*. Ce second objectif sera discuté dans l'Article II.

## **Section II : Méthodes et Résultats**

Dans cet article j'ai effectué les expériences de variation de phase sur Pétri ainsi que participé à l'analyse des résultats. J'ai aussi effectué les expériences du dosage d'activité bêta-galactosidase et analysé les résultats. J'ai contribué partiellement à la correction de l'article.

L'article est soumis à Journal of Bacteriology

1. Article I: Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) and PapI homologues influence phase variation of CS31A surface antigen

**Authors:**

Richard Graveline,<sup>1</sup> Christine Martin,<sup>3</sup> Michaël Mourez,<sup>1</sup> Mark A. Hancock,<sup>2</sup> Rémi Lavoie<sup>1</sup> and Josée Harel<sup>1#</sup>

**Adresse :**

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, CANADA;<sup>1</sup> Sheldon Biotechnology Centre, McGill University, Montréal, Quebec, CANADA; <sup>2</sup> and Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genès-Champanelle, FRANCE <sup>3</sup>

#Corresponding author.

**Running title:**

Influence of Lrp and PapI homologues on CS31A phase variation

## 1.1 ABSTRACT

CS31A, a K88-related surface antigen and member of the type P family of adhesive factors, plays a key role in the establishment of disease caused by septicaemic and enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Its expression is under the control of methylation-dependent transcriptional regulation for which the leucine-responsive regulatory protein is essential. CS31A is preferentially in the OFF state and exhibits distinct regulatory features compared to other P family members. In the present study, Surface Plasmon Resonance and DNase I protection assays showed that leucine-responsive regulatory protein binds to the distal moiety of the *clp* regulatory region with low micromolar affinity, as compared to the proximal moiety that exhibits stronger nanomolar affinity. Complex formation was also influenced by the addition of PapI or FocI, which increased the affinity of the leucine-responsive regulatory protein for the *clp* distal and proximal regions, and was required to induce phase variation. The influence of PapI or FocI, however, was predominantly associated with more of a complete shutdown of *clp* expression, in contrast to what has previously been observed with AfaF. Taken together, our data suggest that the preferential OFF state observed in CS31A cells is mainly due to the weak interaction of the leucine-responsive regulatory protein with the *clp* distal region and PapI homolog favors the OFF phase. Within the large repertoire of fimbrial variants in the P family, our study illustrates that *clp* is an exquisite example of finely-tuned regulatory expression that arms the bacterium with strategies for adapting to more than one particular environment.

## 1.2 INTRODUCTION

Bacterial infection involves a dynamic balance between the requirement of virulence factors that are produced by the microorganism and the production of an antigen recognized by the host immune system [15, 33]. Phase variation is an example of the complex regulatory systems that pathogenic strains have developed to change their



phenotype in response to environmental signals. This stochastic and reversible switch between an “all-or-none” (ON/OFF) phenotype is a key mechanism to generate phenotypic diversity in genetically identical cells, especially to survive in a hostile environment [1, 34]. After division, most daughter cells retain the expression phase of the parent whereas the minority of cells switches to the other phenotype. Despite its energetic cost and the risk of being deleterious to individual cells, phase variation confers a net advantage to the entire population by allowing it to anticipate host environmental changes without having to sense them. Thus, many virulence factors such as fimbrial adhesins are subject to phase variation and pathogenic bacteria coordinately express simultaneously more than one adhesin by phase variation [39, 40].

The *clp*-encoded CS31A surface antigen, found in septicaemic and enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of bovine and human origins, is required for full bacterial virulence [12, 16]. It was first described in *E. coli* strains recovered from calves with septicemia or diarrhoea. It is a capsule-like surface protein, immunologically related to F4 (K88) and F41 fimbriae [16]. Experimental infections [11] and epidemiological data [28] suggest a close association of CS31A-producing strains with cases of septicemia [26]. Phase variation of CS31A relies on a mechanism similar to that already described for the well-characterized Pap-regulatory family of adhesive factors. It has also been proposed the CS31A depends on the expression of an additional fimbrial gene cluster that is also controlled by phase variation [13, 14, 23].

For Pap, expression is inherited in an epigenetic manner [40] because of methylation-controlled modifications within the regulatory region of the *pap* operon and the presence of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) [40]. Lrp controls a large number of operons in *E. coli* including those involved in amino acid biosynthesis, amino acid degradation, metabolite transport, and carbon metabolism [9]. The regulatory region of *pap* consists of a DNA sequence of approximately 400 bp, surrounded by two divergently transcribed genes, *papI* and *papB* (Fig. 1). The intergenic region also includes 6 Lrp binding sites (all containing the consensus sequence GN(2-

3)TTT where N is any nucleotide), as well as 2 GATC sites spaced 102 bp apart (GATC<sup>prox</sup>, GATC<sup>dist</sup>). Differences in the methylation status of these sequences determine the binding of Lrp [7, 30]. Thus, switching from one phenotype to the other is the result of competition between the binding of Lrp at sites 1 to 3 or sites 4 to 6 and methylation by Dam methyltransferase at the opposite GATC site, which prevents the binding of Lrp (Fig. 1; for reviews, see [5, 8, 19]). When GATC<sup>dist</sup> is fully methylated, Lrp cooperatively binds to sites 1 to 3, maintaining the cells in the OFF state, and when GATC<sup>prox</sup> is fully methylated, Lrp binds to sites 4 to 6, maintaining the ON state (Fig. 1). Control of *pap* phase variation also requires the action of PapI, a positive regulator that increases the affinity of Lrp for sites 4 to 6 *in vivo* [19, 38], as well as PapB, a second specific regulator of the *pap* operon that coordinates the expression of the *pBA* and *pl* promoters [19]. Taken together, the combined actions of Lrp, Dam methyltransferase, PapI, and PapB result in a finite probability of each cell to express (ON) or not (OFF) Pap fimbriae just after DNA replication.

In the case of CS31A, striking features include the absence of a PapI homologue and a moderate level of *clp* transcription. The presence of *papI* homologue in *trans*, however, promotes *clp* phase variation [13, 23], confirming that it is required during *clp* phase variation. To date, direct evidence for the interplay between PapI homologues and phase variation has only been described with AfaA, the *papI* homologue found in *afa-3* [13, 23]. This mechanism might not mimic what is found in natural isolates since strains may possess adhesin gene clusters other than *afa-3*. For instance, Bertin *et al.* showed that the reference strain 31A not only encodes CS31A, but also P fimbriae [3]. Whether PapI homologues encoded by other *pap*-related operons cross-regulate *clp* transcription remains to be investigated.

Similar to Pap, we have previously shown that CS31A phase variation in the presence of *afaF* is mediated by the global regulator Lrp and the methylation protection of the two *clp* GATC sites [13, 23]. CS31A is characterized by a higher level of OFF cells than *pap* in the presence of *afaF*, and we have also shown that the two *clp* GATC sites are

methyated in the absence of Lrp and that methylation protection of these sites requires the presence of Lrp [13].

To provide direct evidence as to why *clp* expression (CS31A) gives rise to a high level of OFF cells compared to *pap* (Pap) and to establish if PapI homologues influence CS31A phase variation in an identical manner, we analyzed the interactions between Lrp, PapI, and/or Fool with the intergenic regions of the *clp* operon in our present work; notably, Fool is a PapI homologue that differs by only a single amino acid modification (D17N) in its sequence.

By combining *in vitro* binding experiments with genetic phase variation studies, we show that the preferential OFF state observed in CS31A-positive cells is mainly due to a weak interaction of Lrp to the distal region of *clp*. Moreover, the addition of PapI or Fool promoted CS31A phase variation to similar extents and, due to increased Lrp affinity for both GATC<sup>dist</sup> and GATC<sup>prox</sup>, the OFF state surpassed levels previously observed in the presence of *afaF*. Furthermore, the overall affinity of the ternary complex (DNA together with Lrp and PapI or Fool) is so strong for the *clp* proximal region that only a small fraction of cells can switch to the ON state.

### 1.3 MATERIALS AND METHODS

#### **Bacterial strains, plasmids and growth conditions**

*E. coli* strain MC4100.λ6 contains a single chromosomal copy of a *clp-lacZYA* fusion. Ptrf5 and ptrf6, multicopy recombinant plasmids derived from ptrc99A (Pharmacia Biotech) express *fool* and *papI*, respectively, under the control of the *trc* promoter. Luria-Bertani (LB) broth and M9 minimal broth were prepared as described previously [27, 35]. When necessary, these media were supplemented with antibiotics at the following concentrations (unless otherwise noted): ampicillin, 100 μg.ml<sup>-1</sup>; kanamycin, 40 μg.ml<sup>-1</sup>; and with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), 1 mM and 5-bromo-4-chloro-3-

indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal), 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Cultures of strains harboring ptrf5 or ptrf6 were grown in the absence of IPTG to avoid too high expression of *fool* or *papI*.

### **Plasmid construction**

For overexpression and purification of the Fool protein, the pET32a-fool plasmid was constructed by first amplifying the *fool* sequence from the chromosome of strain 4787 using the NcoI-foolrg1F and XhoI-foolrg1R primers containing the NcoI and XhoI restriction sites, respectively. After enzymatic digestion, the fragment was ligated into the NcoI/XhoI restriction sites of the expression plasmid pET32a. Inserts were sequenced for verification after transforming *E. coli* BL21(DE3)pLysS by electroporation. Plasmid pET32a-papI was constructed using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis System (Stratagene). Briefly, expression plasmid pET32a-fool was first extracted from strain *E. coli* BL21(DE3)pLysS, purified and used as template for amplification using the foolIN17D-F and foolIN17D-R primers. PCR amplified plasmids were purified and digested with the restriction enzyme DpnI to remove any trace of the pET32a-fool template. PCR-amplified plasmids were dialyzed and transformed into strain *E. coli* BL21(DE3)pLysS by electroporation.

### **Purification of recombinant proteins**

*E. coli* strain CV1494 was used to purify His<sub>6</sub>-tagged Lrp as previously described [24]. A 1-liter culture of CV1494 was grown in LB broth at 37°C, with shaking, to an OD<sub>600</sub> of 0.7–0.8. Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture at a final concentration of 0.5 mM for 6 h. Bacteria were harvested, resuspended in 30 ml of Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 0.5 M NaCl), and lysed with a French press and an ultrasonic processor. The soluble fraction was clarified by centrifugation at 15,000  $\times g$  for 20 min at 4°C. Proteins were purified using an ÄKTA purifier system with a 1-ml His Trap HP column (Amersham Biosciences) according to the instructions of the manufacturer. Purified proteins were subsequently dialyzed against TG<sub>50</sub>ED buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.1 M NaCl) and purity of the proteins was confirmed by SDS-PAGE and staining with Coomassie blue.

For purification of Fool and PapI, a single *E. coli* BL21(DE3)pLysS colony carrying plasmid pET32a-fool or pET32a-PapI was incubated in LB broth with shaking at 37°C, to an OD<sub>600</sub> of 0.4–0.6. The culture was incubated for 3 more h in the presence of IPTG at a final concentration of 1 mM. Bacteria were harvested, resuspended in 30 ml of Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 0.5 M NaCl), and lysed with a French press and an ultrasonic processor. The soluble fraction was clarified by centrifugation at 15,000 × *g* for 20 min at 4°C. The His<sub>6</sub>-Trx-Fool and His<sub>6</sub>-Trx-PapI fusion proteins were purified using an ÄKTA purifier system using the same procedure as for His<sub>6</sub>-tagged Lrp. Fool and PapI protein were removed from their His<sub>6</sub>-Trx tag after enzymatic digestion using Enterokinase (New England BioLabs) in digestion buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>). Proteins were dialyzed against 20 mM 2-[N-morpholino]ethanesulphonic acid (Mes), pH 6.0 and purified using an ÄKTA purifier system with a mono S 5/50 GL column (Amersham Biosciences) according to the instructions of the manufacturer. Purity of Fool and PapI proteins was confirmed by SDS-PAGE and staining with Coomassie blue.

### **Surface plasmon resonance**

Interactions between 5' biotinylated, double-stranded oligonucleotides (*clp* distal, 120 kDa; *clp* proximal, 77 kDa; *clp* distal-proximal, 185 kDa) and three DNA-binding proteins (Lrp, 20 kDa monomer; Fool, 9 kDa; PapI, 9 kDa) were examined using label-free, real-time BIACORE 3000 instrumentation (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Experiments were performed on research-grade streptavidin-coated (SA) sensor chips (XanTec Bioanalytics GmbH, Muenster, Germany) at 25°C using filtered (0.2 μm) and degassed CALVO-P running buffer: 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT, 0.005% (v/v) Tween-20. As recommended by the manufacturer, SA sensor chips were pre-conditioned with three 1-min pulses of 1M NaCl in 50mM NaOH. Protein-grade detergents (Tween-20, Empigen) were from Anatrace (Maumee, OH, USA) and fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) was from Millipore (Billerica, MA, USA); all other chemicals were reagent grade quality. Purified protein

concentrations were determined using the BCA assay and purity (>95%) was assessed by SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide) under reducing (5% [v/v] 2-mercaptoethanol) and non-reducing conditions (data not shown).

To examine binding with Lrp, the appropriate oligonucleotides were annealed (see [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com) protocol) and then captured (20  $\mu$ l/min x 10 nM in running buffer containing 0.5M NaCl) to generate low-density surfaces (<100 RU immobilized). Lrp (0 – 100 nM) or BSA (negative control) was injected over reference (*i.e.* SA only) and active (*i.e.* *clp* DNA fragments) surfaces in-tandem using ‘KINJECT’ mode (25  $\mu$ l/min x 10 min association + 10 min dissociation). Between sample injections, surfaces were regenerated at 50  $\mu$ l/min using two 30 sec pulses of solution I (1 M NaCl, 0.02% [v/v] Empigen in CALVO-P) followed by ‘EXTRACLEAN’ and ‘RINSE’ procedures.

To examine binding with F<sub>o</sub>oI and PapI, medium-density oligonucleotide surfaces (300 – 400 RU immobilized) were prepared as noted above. F<sub>o</sub>oI or PapI (0 – 15  $\mu$ M) was injected over reference and active surfaces in-tandem using ‘KINJECT’ mode (5  $\mu$ l/min x 5 min association + 10 min dissociation). Between sample injections, surfaces were regenerated as noted above. In additional experiments, Lrp (50 nM) was also injected in the presence of F<sub>o</sub>oI and PapI (0.0 to 5.6 and 0.0 to 8.1  $\mu$ M, respectively) using ‘KINJECT’ mode (10  $\mu$ l/min x 5 min association + 10 min dissociation).

Mass transport-independent data were doubled-referenced [29] and are representative of duplicate injections acquired from three independent trials. For each replicate series, a buffer blank was injected first, the highest titrant concentration second, and serial dilutions followed (from the lowest to the highest concentration); comparing responses between the two highest titrant injections verified consistent DNA surface activity throughout each assay. To estimate apparent equilibrium dissociation constants ( $K_D$ ), steady-state binding responses (Req; average RU near the end of the association phase) were plotted as a function of protein concentration (C) and then subjected to non-linear regression (“One site – Specific binding with Hill slope” or

“Steady-state affinity” models; Prism5 version 5.0c for Mac OS X, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). To estimate individual dissociation rate constants ( $k_d$ ), sensorgram profiles were analyzed using the “Fit Kinetics / Separate  $k_a/k_d$ ” tool (BIAevaluation v4.1). Theoretical binding maxima were predicted using the following equation:

$$R_{\max} = (MWA / MWL) (RL) (n)$$

where  $R_{\max}$  is the maximal binding response (RU) at saturating protein concentration; MWA is the molecular weight (kDa) of the protein injected in solution; MWL is the molecular weight (kDa) of the DNA fragment immobilized; RL is the amount (RU) of DNA immobilized;  $n$  is the predicted binding stoichiometry (*e.g.* 1:1).

### **Footprint analysis**

DNase I footprinting of free DNA and DNA-protein complexes was performed as described [20]. DNA fragment corresponding to the *clp* regulatory region (491bp) was amplified using primers *clp*-F (5'-TACAATCGTCAGCGTCGTCCTC-3') and *clp*-R (5'-ACGTATTCACTCTGTTGCCGTCCT-3'). End-labeled  $^{32}\text{P}$ -*clp* DNA fragment (125,000 cpm, 0.3 nM) was subsequently incubated in a total volume of 20  $\mu\text{L}$  with 3  $\mu\text{g}$  of salmon sperm DNA and 2  $\mu\text{g}$  of acetylated bovine serum albumin (New England Biolabs) in binding buffer (60 mM Tris-HCl [pH 7.5], 40 mM KCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT). After incubation for 10 min at room temperature, 6  $\mu\text{L}$  of DNase I (2,000 U.ml<sup>-1</sup>, New England Biolabs) containing 22 mM CaCl<sub>2</sub> and 22 mM MgCl<sub>2</sub> was added for 1 min. The reaction was stopped by the addition of 200  $\mu\text{L}$  of stop buffer (10% glycerol, 2.5 mM EDTA, 0.6 M ammonium acetate, 2 mg yeast tRNA per ml) to each sample. DNA fragments were precipitated in ethanol and an equivalent of c.p.m. ( $5 \times 10^4$ ) from each reaction was loaded onto 6% polyacrylamide/7M urea gels. A + G Maxam-Gilbert reactions [25] were carried out on the appropriate  $^{32}\text{P}$ -labeled DNA fragments and loaded alongside the DNase I footprinting reactions. Gels were dried and analyzed by autoradiography.

### **Phase variation and measurement of switching frequencies**

The switch frequency was calculated as described previously [6, 13]. Strains were inoculated onto LB-kanamycin agar. Colonies were excised from the agar and resuspended in M9 salts containing no carbon source. Appropriate dilutions were subsequently spread onto M9 X-Gal agar containing 0.2% glycerol and, after 36 h of growth at 37°C, plates were digitally photographed for record. Three colonies showing a uniform Lac<sup>+</sup> or Lac<sup>-</sup> phenotype were excised from the agar, resuspended in M9 salts, and spread onto M9 X-gal agar as before. The passage from M9 X-gal agar to fresh M9 X-gal agar containing the same source of carbon was repeated twice more to follow the switch frequency through three generations. At least 2,000 colonies were scored for a Lac phenotype as described [6] and to calculate the switch frequencies according to the formula  $(M/N)/g$ , where M is the number of cells that underwent phase variation, N the total number of cells evaluated and g the total number of generations (estimated to be 20 generations for all the strains tested in our experiments).

### **β-Galactosidase activity assay**

A single bacterial colony was used to inoculate an overnight culture in M9 glycerol medium. This culture was diluted 50-fold, grown to an OD<sub>600</sub> of 0.5-0.8 in M9 glycerol medium. Cultures were then assayed for β-Galactosidase activity as described [27]. For strains showing phase variation, a blue or white colony was picked from M9-glycerol plates as starting material for assays of β-Galactosidase activity of ON and OFF cultures, respectively. Each experiments was performed in duplicate at least three times.



## 1.4 RESULTS

### **Differences in complex formation between Lrp and *clp* proximal or distal regions**

Similar to the intensively studied *pap* operon, *clp* phase variation requires Lrp. The Lrp target regulatory region contains two GATC sites separated by 102 bp. Protection of these sites from methylation is Lrp dependent [13, 23]. We hypothesized that the lower affinity of Lrp for the *clp* distal region (compared to *clp* proximal) is responsible for the CS31A bias towards the OFF phase. To test for these interactions, label-free Surface Plasmon Resonance (SPR) was used to monitor real-time binding of Lrp to unmethylated DNA fragments corresponding to the *clp* regulatory regions. Biotinylated oligonucleotides duplexes containing the *clp* distal, *clp* proximal, or the *clp* distal-proximal region were immobilized on streptavidin-coated sensor chips, and His6-Lrp was injected over the reference and DNA surfaces simultaneously. As shown in Fig. 2, dose-dependant and/or saturable binding of Lrp to the *clp* regions was detected. In contrast to what has already been described for *pap* [19, 31], Lrp binding to the *clp* distal region was noticeably weaker (*i.e.* slow association, fast dissociation kinetics) than to the *clp* proximal region (*i.e.* fast association, slow dissociation kinetics). A hybrid of the distal and proximal kinetics is reflected in the binding of Lrp to the full-length *clp* fragment.

Analysis of the data sets was performed according to previous reports in the literature indicating that Lrp binding is cooperative (*i.e.* sites 1-3 and 4 -6) [9]. Similar to SPR analyses in which other co-operative protein-DNA kinetics have been analyzed [21], the *clp* proximal titration series fit well to a “one-site model with Hill slope” which indicated positive cooperativity (*i.e.* Hill coefficients >1; Fig. S1). While Lrp binding to the proximal region exhibited low nanomolar affinity ( $K_D \sim 10$  nM; Table 1), binding to the distal region exhibited significantly different micromolar affinity ( $K_D \sim 11$  uM); overall binding to the full-length *clp* distal-proximal fragment was characterized by nanomolar affinity ( $K_D \sim 180$  nM). Taken together, our data indicate that Lrp exhibits higher affinity for the *clp* proximal region compared to the distal region; this differential property could block

the entry of the RNA polymerase at the *clpBA* promoter, thus yielding a predominant OFF phase.

Given that SPR showed that Lrp has a higher affinity for *clp* proximal than for the distal region, we hypothesized that such a difference could be due to differences in the proximal and distal Lrp-binding sites, and/or to divergent nucleotide sequences surrounding the GATC sites. In contrast to *pap* for which six Lrp-binding sites have been identified, *clp* intergenic region contains more GN<sub>2-3</sub>TTT motifs of Lrp-binding sites (Fig. 1). Thus, we used DNaseI footprint analysis to identify the Lrp-binding sites within the full-length *clp* regulatory region. Fig. 3 shows that the addition of His6-Lrp was associated with the presence of multiple gel-protected regions with five corresponding to the proximal region and four to the distal region. GATC<sup>prox</sup> and GATC<sup>dist</sup> sites were included within Lrp-binding sites of *clp*. In addition, DNase protection was observed at a lower concentration of His6-Lrp for the *clp* proximal region than for the distal region, in agreement with a better affinity of Lrp for the *clp* proximal region observed by SPR. In contrast, whereas the *pap* proximal region was protected at a Lrp concentration 10-times lower than that for the *clp* proximal region [17]. Thus, this unique pattern of Lrp-binding sites may result in a weak affinity for the *clp* distal region.

### **PapI and Fool direct CS31A phase variation toward OFF state**

In *E. coli* K12, phase variation of the *clp* operon requires the presence in *trans* of a PapI homologue [13, 14, 23]. So far, this has only been demonstrated with AfaF, a PapI homologue that controls the genetically distant operon *afa-3* that is absent in the pathogenic reference strain *E. coli* 31A [23]. However, strain 31A carries a *pap*-fimbrial operon in its genome so that *clp* phase variation could result from the cross-regulation between *clp* and *pap* fimbriae through the supply of PapI in *trans*. To assess if PapI homologues can influence *clp* phase variation (as previously demonstrated with AfaF), *clp* phase variation was measured *in vivo* by providing Fool or PapI in *trans*. Strain MC4100.λ6 carrying a chromosomal fusion between the *clp* regulatory region and the *lacZYA* reporter system was transformed with plasmids ptrf5 or ptrf6 (expressing *fool*

and *papI*, respectively). The two transformed strains were then plated onto X-gal M9 agar without IPTG (to avoid a too high level of PapI or FooI protein in the cell) and the [Lac] phenotype was followed for up to two generations. This medium uses glycerol as the carbon source to avoid catabolite repression, which affects phase variation [35], and has no amino acids [2]. While strain MC4100.λ6 led to a uniform phenotype characterized by light-blue colonies (data not shown), transformation with either *ptrf5* or *ptrf6* led to a majority of white colonies with few dark blue colonies (Fig. 4A and Table 2). Thus, PapI or FooI produced in *trans* induced phase variation of the *clp* operon. However, phase variation of *clp* was always biased toward the OFF state, even when the starting phenotype was the ON state (Table 2). This resulted in a global level of β-galactosidase activity lower in the presence than in the absence of any PapI homologues tested, regardless of the starting phenotype (Fig. 4B). This result is in agreement with the observation that Lrp shows a better affinity for the *clp* proximal region than for the *clp* distal region whether a PapI homologue is present or absent [13, 23]. As a result, the low affinity of Lrp for the *clp* distal region greatly contributes to the low level of ON cells. Interestingly, differences in the ability of PapI and FooI to promote switching toward the ON state were observed. Notably, the level of ON cells was higher in the presence of FooI than in the presence of PapI. Thus it seems that even if PapI homologues are all able to promote phase variation, they still can differentially influence the level of the ON population.

### **PapI and FooI preferentially increase association and stability of Lrp binding to the *clp* proximal region**

To understand why FooI and PapI had such a strong influence on the level of OFF cells, we used SPR to investigate the direct binding of FooI or PapI to the *clp* distal and proximal regions. Rapid-on, rapid-off binding of FooI and PapI to all *clp* fragments correlated with low micromolar overall binding affinities (Fig. 5, Table 1), consistent with previous work by Kawamura *et al.* who showed direct binding of PapI to *pap* sites 2 and 5 with similarly weak affinities [22]. However, no noticeable differences in the binding kinetics were observed between FooI and PapI with all *clp* fragments (Fig. 5 and

S2). In additional SPR experiments, a fixed concentration of His6-Lrp was injected over the *clp* distal and proximal regions in the absence or presence of increasing PapI or FooI concentration. While low micromolar injections of FooI or PapI (*i.e.* < 8  $\mu$ M) yielded small binding responses to the *clp* fragments on their own (Fig. 5), Lrp binding was significantly altered in the presence of FooI or PapI (Fig. 6). In a dose-dependent manner, increasing concentrations of FooI or PapI enhanced the overall amounts of Lrp bound in all cases (*i.e.* increased association). The stability of the resultant *clp* distal and proximal complexes was also increased (*i.e.* dissociation rates were approximately 50% slower by 6  $\mu$ M FooI and 8  $\mu$ M PapI).

Because the transcription of *papI* homologues on a *ptrc99A* vector is independent of the *clp* operon, a PapI homologue may contribute to enhancing the binding of Lrp at the *clp* proximal region. Thus, these results suggest that PapI and FooI have two opposite functions. First, they contribute to switch ON the *clp* operon by increasing the association kinetics of Lrp for the *clp* distal region; second, they strongly maintain cells in the OFF state by forming a particularly stable complex between Lrp and the *clp* proximal region.

## 1.5 DISCUSSION

The objective of the present study was to determine why *clp* expression (CS31A) gives rise to a higher level of OFF cells compared to *pap* (Pap). Using *in vitro* techniques, we have demonstrated that the weak micromolar affinity of Lrp for the *clp* distal region likely contributes to the low level of ON cells observed. Moreover, we have also shown that PapI homologues, namely FooI and PapI, favour the OFF state during CS31A phase variation mainly through their capacity to increase the association and stability of Lrp binding to the proximal region of the *clp* operon.

During phase variation of P fimbriae, the competitive Lrp and Dam assembly on the regulatory region is important for the heritability of the OFF state. In phase OFF cells, Lrp binds the proximal region, which blocks the entry of the RNA polymerase and

protects GATC<sup>prox</sup> from Dam methylation. In phase ON cells, Lrp binds to the distal region and protects GATC<sup>dist</sup> from methylation. The methylation of GATC<sup>prox</sup> site by Dam is required for transition to the phase ON state by specifically blocking PapI-dependent binding of Lrp to promoter proximal sites [19].

Regulation of the *clp* operon, encoding CS31A, shares similar mechanisms with the regulation of the expression of other P-related fimbrial operons [23]. Notably, CS31A production is under phase variation control in strain 31A. The *clp* gene cluster does not carry any *papI* homologue, however, even though one is required for phase variation to occur. Only AfaF, a PapI homologue controlling the genetically distant operon *afa-3*, has been used to observe CS31A phase variation to date. Based on these observations, it was suggested that the presence of an additional *pap* operon on the chromosome of CS31A-positive strains may supply the PapI required in *trans*, resulting in *clp* phase variation [13]. We have now used several techniques to demonstrate that PapI homologues (PapI or Fool) can induce phase variation of the *clp* operon, but overall expression is repressed due to their capacity to enhance Lrp binding at the proximal region of the *clp* operon. Moreover, we show here that the affinity of Lrp for the distal region is significantly lower (10<sup>3</sup>-fold) than for the proximal region - this distinction greatly contributes to the overall repression of *clp*. In the absence of a PapI homologue supplied in *trans* (*i.e.* in the absence of phase variation), Martin showed that Lrp protects the GATC sites from methylation and cannot bind methylated GATC sites [23]. Here, we provide further information showing that Lrp possesses a lower affinity for GATC<sup>dist</sup> than for GATC<sup>prox</sup> in the *clp* regulatory region.

In Pap, low nanomolar Lrp affinity is only two-fold higher for the proximal sites 1 to 3 than for the distal sites 4 to 6 [19]. Moreover, binding of Lrp at the proximal sites 1 to 3 reduces by 10-fold the affinity of Lrp for *pap* at the distal sites 4 to 6. This phenomenon, apparent when Lrp binding on plasmid DNA is analyzed has been denoted “mutual exclusion” [19]. However, no “mutual exclusion” *sensu stricto* could be observed in CS31A since Lrp affinity is 10<sup>3</sup>-fold higher for the proximal region compared to the

distal region. Moreover, our findings are consistent with previous reports [32] that have proposed two distinct interaction states for Lrp - binding to *clp* proximal with low nanomolar affinity (in the range similar to what is shown when Lrp is considered as a specific regulator), versus binding to *clp* distal with low micromolar affinity (in the same range as what is shown when Lrp is considered a nucleoprotein). As a result, Lrp protects GATC<sup>prox</sup> from methylation and negatively controls basal *clp* expression.

By comparing phase variation control of F165<sub>1</sub> (another member of the P family) to that of Pap, we have shown that a higher level of ON cells for F165<sub>1</sub> is due to an altered Lrp binding stability at the DNA repressor sites 1-3 [17]. Furthermore, we identified nucleotides surrounding the Lrp-binding site 1 that are critical for maintaining a high OFF to ON switch rate during F165<sub>1</sub> phase variation, as well as for switching Pap fimbriae toward the OFF state by reducing Lrp dissociation from the proximal site. In the case of CS31A, the predominant OFF state is mainly due to low Lrp affinity for the *clp* distal region. The presence of additional Lrp binding sites, if not directly involved in Lrp binding, probably influences the interaction of Lrp with *clp* regulatory region. This suggests that the interaction of Lrp with its binding sites dictates their accessibility to methylation and thus influences the epigenetic process of phase variation. Given that phase variation of P fimbriae involves the action of multiple regulators, both local (*e.g.* PapB and PapI) and global (*e.g.* CpxAR, cAMP-CAP) regulators may contribute to phase variation differences between strains [18, 36, 37, 41].

In *E. coli* reference strain 31A, CS31A is encoded by the high-molecular-weight plasmid p31A that does not harbor a *clp* specific homologue to *papI*. It was suggested that the phase variation control observed in wild-type strains could result from crosstalk between *clp* and a chromosomal *pap*-related operon as strain 31A encodes P fimbriae [13, 14]. In this study, PapI and the homologue FooI restored the bistable state of phase variation when supplied in *trans*. Similar to *pap*, the affinity of Lrp for both the distal and proximal regions increases in the presence of PapI or FooI. Moreover, the significantly stronger affinity of the PapI/FooI-Lrp complex for the proximal region means that only a

minority of *clp* cells are in the ON phase. Furthermore, decreased dissociation of the PapI/FooI-Lrp complex to the DNA target could also explain why the level of *clp* operon expression is even lower in the OFF phase compared to the moderate level observed in the absence of a PapI homologue (*i.e.* PapI-Lrp stable complex blocks *clp* transcription more efficiently than Lrp alone, or in the presence of AfaF [13]). Taken together, our results show that, in the case of *clp*, PapI homologues play a dual role: (i) promoting the ON phase when *papI* is not expressed (Fig. 7) and (ii) promoting the OFF phase when expressed, thus inducing phase variation in a manner different than what was observed with AfaF. The precise mechanism by which PapI homologues promote the switch from OFF to ON remains unresolved.

It is also noteworthy that levels of ON colonies can vary greatly depending on which PapI homologue is present in the cell. Indeed, previous AfaF studies [23] exhibited higher levels of ON cells compared to what we observed in the present study and our head-to-head comparison between FooI and PapI also demonstrated differences in the level of ON cells. Considering that at least 16 *papI* alleles have been identified so far [36] and that CS31A is often associated with the presence of other type P-related fimbriae such as Pap or F165<sub>1</sub> [3, 4, 10, 12], we suggest that PapI homologues can be seen as specific regulators that co-coordinately regulate the expression of more than one fimbrial operon (Fig. 7) [36]. Similarly, Totsika *et al.* studying the cross-activation of *pap* variants by FooI and PapI suggested that sequence variation among PapI homologues could affect their ability to activate *pap* transcription, and that they may have evolved in order to prevent cross-activation of related proteins [36].

Overall, the present study provides novel insights about why *clp* expression is repressed by Lrp alone and, in the presence of a PapI homolog, has a low switch rate like *pap*. This is likely due to the very low affinity of Lrp to *clp* distal site. Our data emphasize that the fine molecular interaction of regulatory proteins with their DNA-binding sites influences phase variation and expression of fimbriae. Within the large repertoire of fimbrial variants in the P family, we show that *clp* is an exquisite example of finely-tuned\* regulatory expression that arms the bacterium with strategies for adapting to more than one particular environment.

## 1.6 ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to David Low (University of California) for the generous gift of purified PapI and enlightening discussions. We are grateful to Cécile Crost (CRIP) and George Szatmari for their invaluable advice during this study. This work was supported by funding from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP; Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies Regroupements stratégiques 111946), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Discovery Grant 25120 to JH and 262746 to MM), and the Canada Research Chair program to MM. SPR infrastructure at Sheldon Biotechnology Centre was provided by Canada Foundation for Innovation and supported by a Research Resource Grant from the Canadian Institutes of Health Research.

## 1.7 REFERENCES

1. **Acar M., J. T. Mettetal, and A. van Oudenaarden.** 2008. Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nat Genet* **40**:471–475.
2. **Berthiaume F., C. Crost, V. Labrie, C. Martin, E. B. Newman, and J. Harel.** 2004. Influence of L-leucine and L-alanine on Lrp regulation of *foo*, coding for F1651, a Pap homologue. *J Bacteriol* **186**:8537–8541.
3. **Bertin Y., J. P. Girardeau, A. Darfeuille-Michaud, and C. Martin.** 2000. Epidemiological study of pap genes among diarrheagenic or septicemic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap(31A) fimbriae. *J Clin Microbiol* **38**:1502–1509.
4. **Bertin Y., C. Martin, J. P. Girardeau, P. Pohl, and M. Contrepois.** 1998. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol Lett* **162**:235–239.
5. **Blomfield I. C.** 2001. The regulation of pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.* **45**:1–49.



6. **Blyn L. B., B. A. Braaten, C. A. White-Ziegler, D. H. Rolfson, and D. A. Low.** 1989. Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *EMBO J* **8**:613–620.
7. **Calvo J. M., and R. G. Matthews.** 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**:466–490.
8. **Casadesús J., and D. Low.** 2006. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:830–856.
9. **Chen S., M. Iannolo, and J. M. Calvo.** 2005. Cooperative binding of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) to DNA. *J Mol Biol* **345**:251–264.
10. **Cherifi A., M. Contrepois, B. Picard, P. Goulet, J. de Rycke, J. Fairbrother, and J. Barnouin.** 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol Lett* **58**:279–283.
11. **Contrepois M., H. C. Dubourguier, A. L. Parodi, J. P. Girardeau, and J. L. Ollier.** 1986. Septicaemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Vet Microbiol* **12**:109–118.
12. **Contrepois M., J. M. Fairbrother, Y. K. Kaura, and J. P. Girardeau.** 1989. Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. *FEMS Microbiol Lett* **50**:319–323.
13. **Crost C., A. Garrivier, J. Harel, and C. Martin.** 2003. Leucine-responsive regulatory protein-mediated repression of *clp* (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:1886–1894.
14. **Crost C., J. Harel, F. Berthiaume, A. Garrivier, M. C. Tessier, H. Rakotoarivonina, and C. Martin.** 2004. Influence of environmental cues on transcriptional regulation of *foo* and *clp* coding for F165(1) and CS31A adhesins in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **155**:475–482.
15. **Dobrindt U., and J. Hacker.** 2008. Targeting virulence traits: potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Curr Opin Microbiol* **11**:409–413.
16. **Girardeau J. P., M. Der Vartanian, J. L. Ollier, and M. Contrepois.** 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **56**:2180–2188.
17. **Graveline R., M. Mourez, M. A. Hancock, C. Martin, S. Boisclair, and J. Harel.** 2011. Lrp-DNA complex stability determines the level of ON cells in type P fimbriae phase variation. *Mol Microbiol*.

18. **Hernday A. D., B. A. Braaten, G. Broitman-Maduro, P. Engelberts, and D. A. Low.** 2004. Regulation of the *pap* epigenetic switch by CpxAR: phosphorylated CpxR inhibits transition to the phase ON state by competition with Lrp. *Mol Cell* **16**:537–547.
19. **Hernday A., M. Krabbe, B. A. Braaten, and D. Low.** 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **99 Suppl 4**:16470–16476.
20. **Kaltenbach L. S., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1995. Specific binding of PapI to Lrp-*pap* DNA complexes. *J Bacteriol* **177**:6449–6455.
21. **Kaufman B. A., N. Durisic, J. M. Mativetsky, S. Costantino, M. A. Hancock, P. Grutter, and E. A. Shoubridge.** 2007. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell* **18**:3225–3236.
22. **Kawamura T., L. U. K. Le, H. Zhou, and F. W. Dahlquist.** 2007. Solution structure of *Escherichia coli* PapI, a key regulator of the *pap* pili phase variation. *J Mol Biol* **365**:1130–1142.
23. **Martin C.** 1996. The *clp* (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Mol Microbiol* **21**:281–292.
24. **Matthews R. G., Y. Cui, D. Friedberg, and J. M. Calvo.** 2000. Wild-type and hexahistidine-tagged derivatives of leucine-responsive regulatory protein from *Escherichia coli*. *Meth Enzymol* **324**:322–329.
25. **Maxam A. M., and W. Gilbert.** 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth Enzymol* **65**:499–560.
26. **Mercado E. C., S. M. Rodríguez, A. L. D'Antuono, A. L. Cipolla, A. M. Elizondo, C. A. Rossetti, R. Malena, and M. A. Méndez.** 2003. Occurrence and characteristics of CS31A antigen-producing *Escherichia coli* in calves with diarrhoea and septicaemia in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **50**:8–13.
27. **Miller J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
28. **Mohamed Ou Said A., M. G. Contrepois, M. Der Vartanian, and J. P. Girardeau.** 1988. Virulence factors and markers in *Escherichia coli* from calves with bacteremia. *Am. J. Vet. Res.* **49**:1657–1660.
29. **Myszka D. G.** 1999. Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.* **12**:279–284.
30. **Newman E. B., and R. Lin.** 1995. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu Rev Microbiol* **49**:747–775.
31. **Nou X., B. A. Braaten, L. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1995. Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **14**:5785–5797.

32. **Peterson S. N., F. W. Dahlquist, and N. O. Reich.** 2007. The role of high affinity non-specific DNA binding by Lrp in transcriptional regulation and DNA organization. *J Mol Biol* **369**:1307–1317.
33. **Smith J. L., P. M. Fratamico, and N. W. Gunther.** 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* **4**:134–163.
34. **Thattai M., and A. van Oudenaarden.** 2004. Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics* **167**:523–530.
35. **Thomason L., D. L. Court, M. Bubunencko, N. Costantino, H. Wilson, S. Datta, and A. Oppenheim.** 2007. Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 1**:Unit 1.16.
36. **Totsika M., S. A. Beatson, N. Holden, and D. L. Gally.** 2008. Regulatory interplay between *pap* operons in uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **67**:996–1011.
37. **van der Woude M. W., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1992. Evidence for global regulatory control of pilus expression in *Escherichia coli* by Lrp and DNA methylation: model building based on analysis of *pap*. *Mol Microbiol* **6**:2429–2435.
38. **van der Woude M., B. A. Braaten, and D. Low.** 1996. Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **4**:5–9.
39. **van der Woude M. W.** 2006. Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett* **254**:190–197.
40. **van der Woude M. W., and A. J. Bäumlner.** 2004. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**:581–611, table of contents.
41. **Weyand N. J., B. A. Braaten, M. van der Woude, J. Tucker, and D. A. Low.** 2001. The essential role of the promoter-proximal subunit of CAP in *pap* phase variation: Lrp- and helical phase-dependent activation of *papBA* transcription by CAP from -215. *Mol Microbiol* **39**:1504–1522.

## 1.8 TABLES AND FIGURES

**Table 1. Apparent equilibrium dissociation rate constants ( $K_D$ ) for Lrp, Fool, and PapI binding to *clp* regulatory regions.** SPR binding responses (RU, average 710 to 730 sec) were plotted as a function of concentration using Prism5 version 5.0c for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). ‘Lrp’ constants were determined by fitting the experimental data to a “One site – specific binding with Hill slope” model. ‘PapI’ and ‘Fool’ constants were determined by fitting the experimental data to a “steady-state affinity” model. Each titration series was analyzed globally using the specified model and estimates represent the average of three independent trials (+/- standard error of the mean).

Fragment	Affinity ( $K_D$ )		
	Lrp	PapI	Fool
<b><i>clp</i> distal</b>	11,000 ±1000 nM	13 ±1.0 μM	14 ±1.4 μM
<b><i>clp</i> proximal</b>	10 ±1 nM	17 ±1.1 μM	14 ±0.7 μM
<b><i>clp</i> distal-proximal</b>	180 ±15 nM	N.D.	N.D.

Table I: Article I, Table 1

**Table 2. Effects of PapI homologues on phase variation of *E. coli* *clp-lacZYA* fusion lysogen.**

Strain/phenotype	Phenotypic switch			
	Total no. of colonies counted	No. of [Lac <sup>+</sup> ]/no. Of [Lac <sup>-</sup> ] colonies	% of colonies	Switch frequency (α or β)
<b>MC4100.λ6 (<i>ptrf5-fool</i>)</b>				
[Lac <sup>-</sup> ]	5889	239/5650	4.05 %	α ⇒ 1.0 × 10 <sup>-3</sup>
Second colony as above	4838	57/4781	1.18 %	α ⇒ 0.6 × 10 <sup>-3</sup>
[Lac <sup>+</sup> ]	4864	155/4709	3.18 %	β ⇒ 4.9 × 10 <sup>-2</sup>
Second colony as above	6664	575/6089	8.62 %	β ⇒ 4.4 × 10 <sup>-2</sup>
<b>MC4100.λ6 (<i>ptrf6-papI</i>)</b>				
[Lac <sup>-</sup> ]	7774	19/7755	0.20 %	α ⇒ 8.2 × 10 <sup>-5</sup>
Second colony as above	6141	29/6112	0.40 %	α ⇒ 0.2 × 10 <sup>-3</sup>
[Lac <sup>+</sup> ]	8701	72/8629	0.80 %	β ⇒ 4.0 × 10 <sup>-2</sup>
Second colony as above	7099	149/6950	2.10 %	β ⇒ 4.2 × 10 <sup>-2</sup>

**Table II : Article I, Table 2**

**Figure 1. Overview of the *clp* operon.** **A.** Schematic representation of the *clp* operon. The two GATC sites subject to methylation by Dam are indicated by GATC<sup>dist</sup> and GATC<sup>prox</sup>. Note the absence of a *papI* homologue in the *clp* operon. **B.** Comparison of the nucleotide sequences of the regulatory regions of the *clp* and *pap* operons. Identical nucleotides in *clp* and *pap* are shown as boxed regions. The identification of *pap* and *clp* Lrp-binding sites are underlined on the DNA sequences (numbers 1 to 6 indicate the positions of Lrp-binding sites in *pap* sequence and Roman letters indicate the positions of Lrp-binding sites in *clp* sequence, as identified by DNase I footprint). The regions corresponding to the PapB binding sites, the CAP binding site and the putative promoter regions (-10 and -35 sites) are represented by dotted lines underlined. Red letters indicate the presence of GATC sites. Blue and red Arrows represent the boundaries of the distal and proximal fragments used in Biacore experiments, respectively.

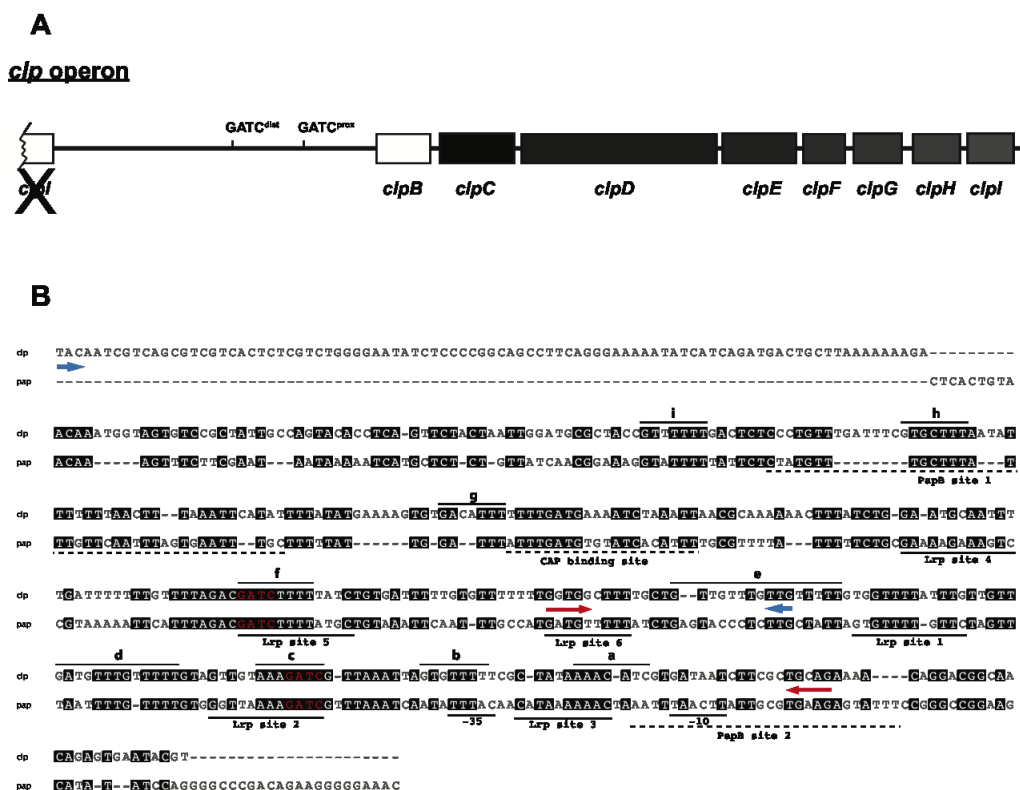


Figure 19 : Article I, Figure 1

**Figure 2. Association and dissociation kinetics of His<sub>6</sub>-Lrp binding to *clp* regulatory regions.** Representative SPR analyses of Lrp (0 to 100 nM; 2-fold dilution series) injected over *clp* distal, proximal, and distal-proximal fragments (95, 40, and 100 RU, respectively) at 25  $\mu$ L/min (10 min association + 10 min dissociation).

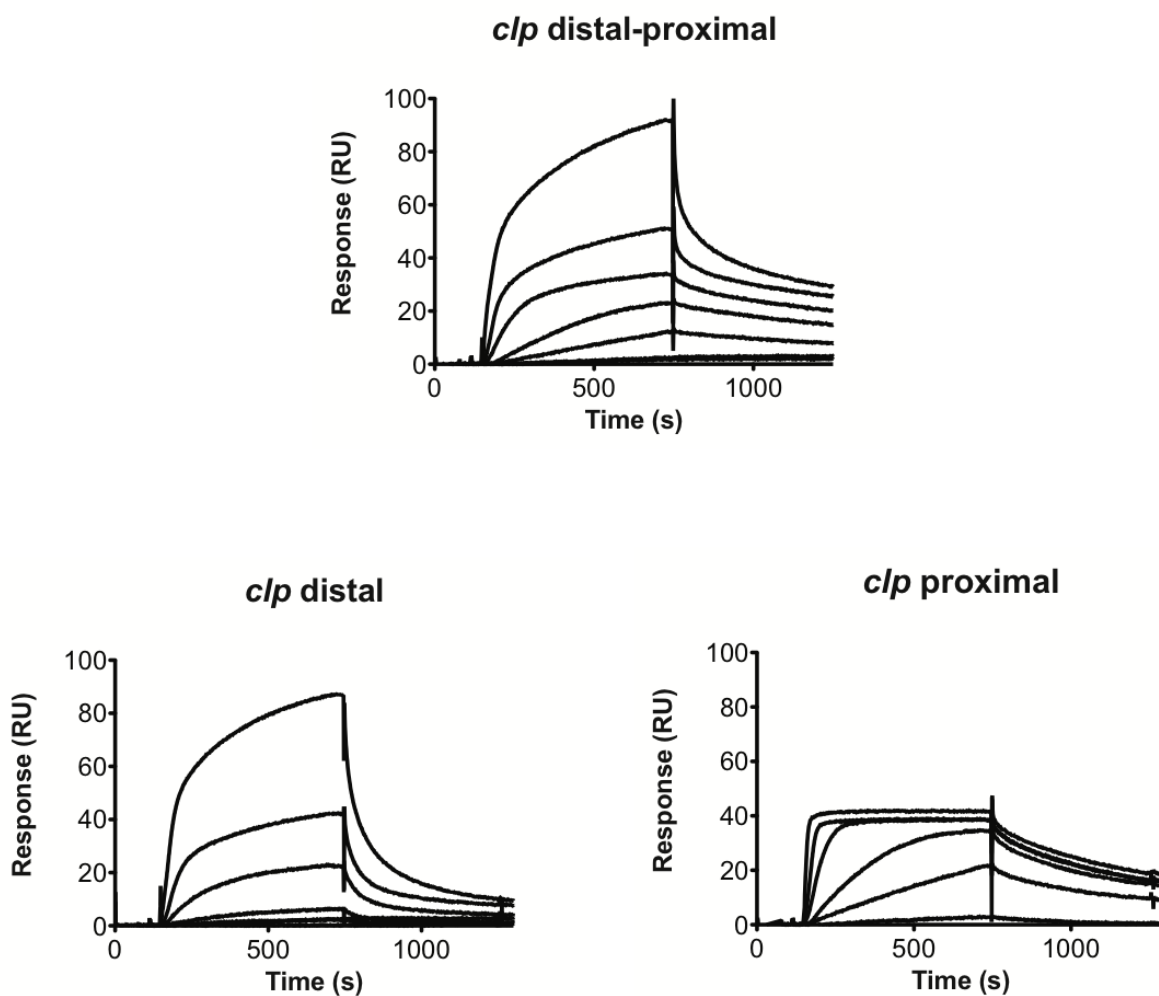


Figure 20 : Article I, Figure 2

**Figure 3. Lrp localization on *clp* regulatory region.** DNase I footprinting assays with increasing amounts of Lrp: Lane1, A + G Maxam and Gilbert reactions; Lanes 2 to 8: DNase I footprinting assays with increasing amounts of Lrp on *clp* regulatory region (491bp) end-labeled with  $^{32}\text{P}$  on the top strand (lane 2, DNA alone; lane 3, Lrp at 1nM; lane 4, Lrp at 10nM; lane 5, Lrp at 100nM; lane 6, Lrp at 1 $\mu\text{M}$ ; lane 7, Lrp at 10 $\mu\text{M}$ ; lane 8, Lrp at 40 $\mu\text{M}$ ). The arrow along the *clp* DNA sequence indicates the presence of GN(2-3)TTT minimal motif recognized by Lrp. Orientation of the arrow depends on the orientation of the GN(2-3)TTT motifs. Roman letters indicate the positions of Lrp-binding sites in the *clp* sequence.





**Figure 4. Effect of Pap I homologues on *clp* basal expression.** Lac<sup>+</sup> and Lac<sup>-</sup> phenotypes of *clp* strains expressing *papI* or *fool*. A. Switch frequencies are calculated using the formula  $(M/N)/g$ , where  $M$  is the number of cells that underwent phase transition,  $N$  the total number of cells evaluated, and  $g$  the number of generations, estimated to be 20 generations that gave rise to the colony (\*,  $p < 0.001$ ). Cells were grown on M9 X-Gal agar containing 0.2% glycerol for 36 hours of growth at 37°C. B.  $\beta$ -galactosidase activities are indicated in Miller units. Values represent the mean of at least three independent experiments. MC4100. $\lambda$ 06 was the strain used in all these conditions.

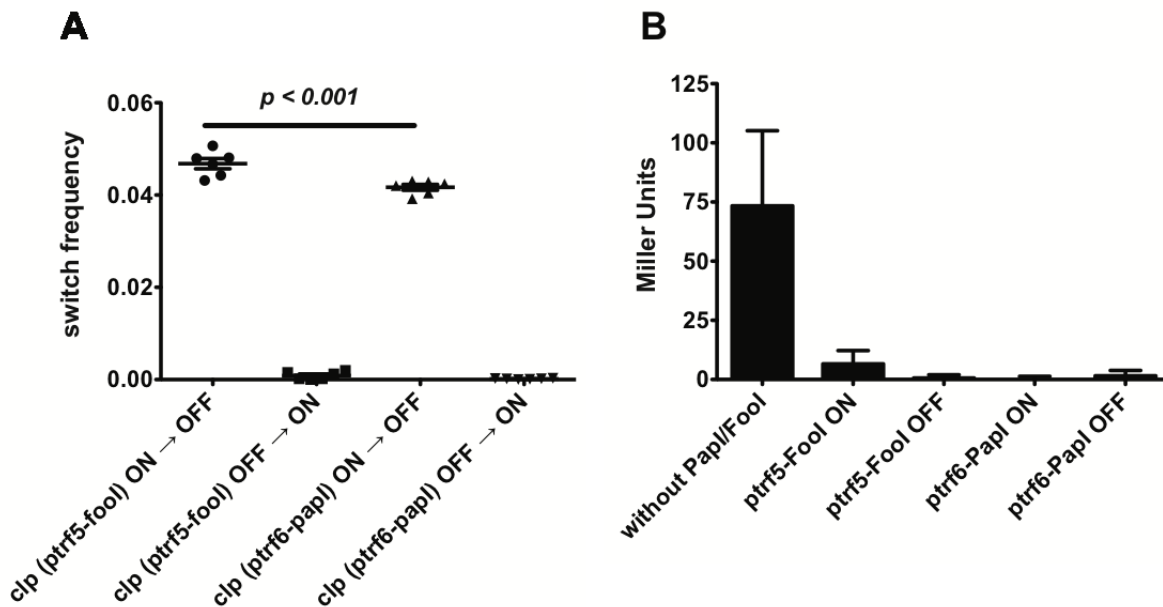


Figure 22 : Article I, Figure 4

**Figure 5. Association and dissociation kinetics of PapI and FoorI when bound to the distal or proximal regions of the *clp* operon.** Representative SPR analyses of PapI or FoorI (0 to 15  $\mu$ M; 2-fold dilution series) binding to immobilized *clp* distal (400 RU) and proximal (300 RU) fragments at 5  $\mu$ L/min (5 min association + 5 min dissociation).

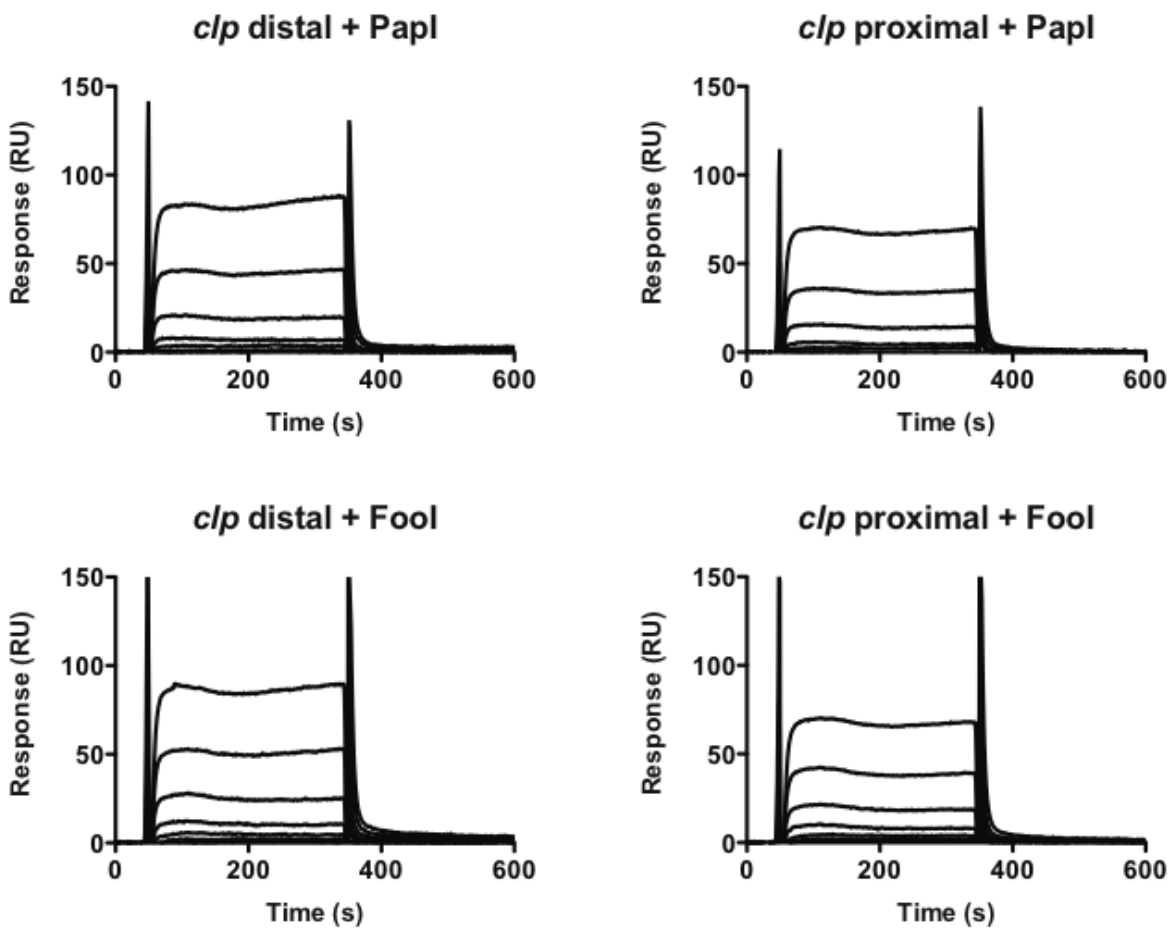


Figure 23 : Article I, Figure 5

**Figure 6. PapI and Fool increase both association and stability of Lrp at the *clp* proximal and distal regions.** Representative SPR analyses of 50 nM Lrp binding to immobilized *clp* (95 RU distal, 40 RU proximal) fragments in the absence (solid lines) and presence (dashed lines) of FoolI (0 to 6 uM; 2-fold dilution series) or PapI (0 to 8 uM; 2-fold dilution series).

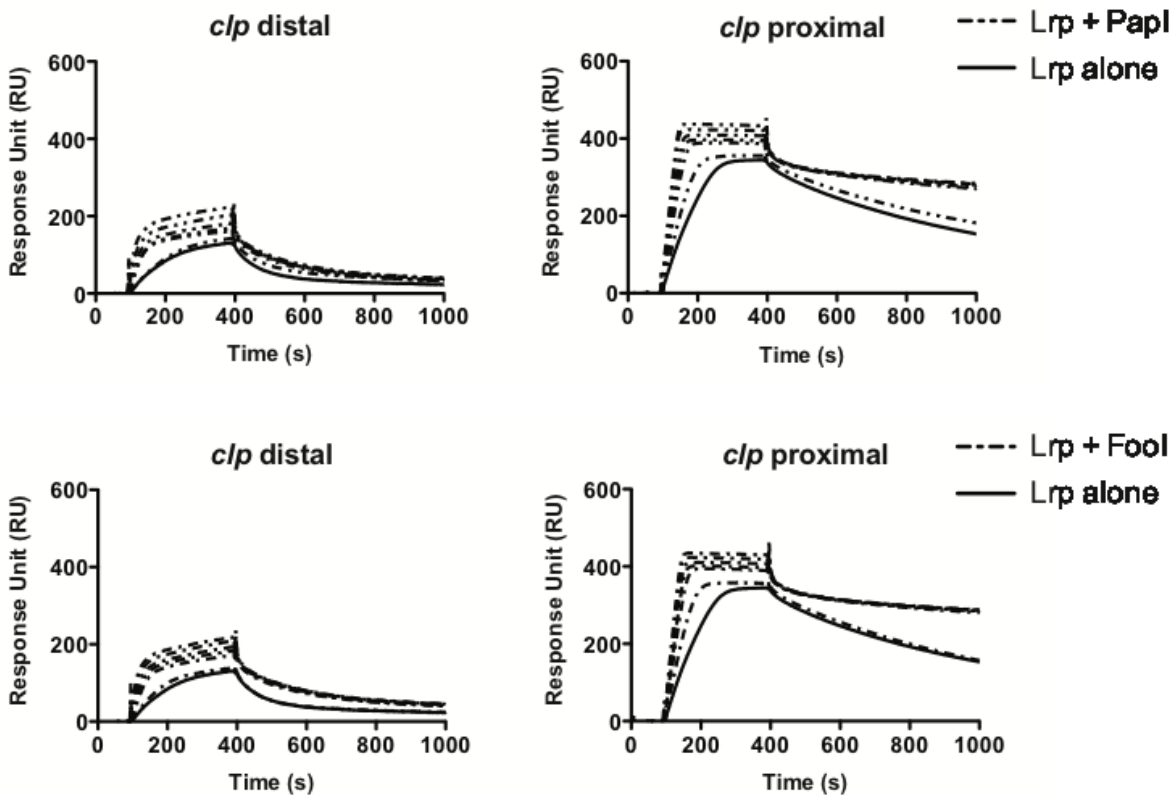


Figure 24 : Article I, Figure 6

**Figure 7. Schematic model representing *clp* phase variation, depending on the presence of PapI in *trans*.** In this model, the control of *clp* expression by phase variation depends on the presence in *trans* of PapI expressed by a *pap*-related operon in the genome of the CS31A strain. Since the expression of *pap* fimbriae is also controlled by phase variation, expression of *papI* reflects Pap ON bacteria. Thus, the presence/absence of PapI results in a cross-talk between *pap* and *clp* in *pap*-positive and *clp*-positive bacteria: For cells in the ON state for *pap*, PapI is produced then *clp* is mostly repressed through the generations (grey dots and lines), with a few cells that show a high level of expression (dark blue) for *clp*. Reciprocally, for cells in the OFF state for *pap*, PapI is not produced; then *clp* is expressed at a low level (pale blue).

## ***clp* phase variation**

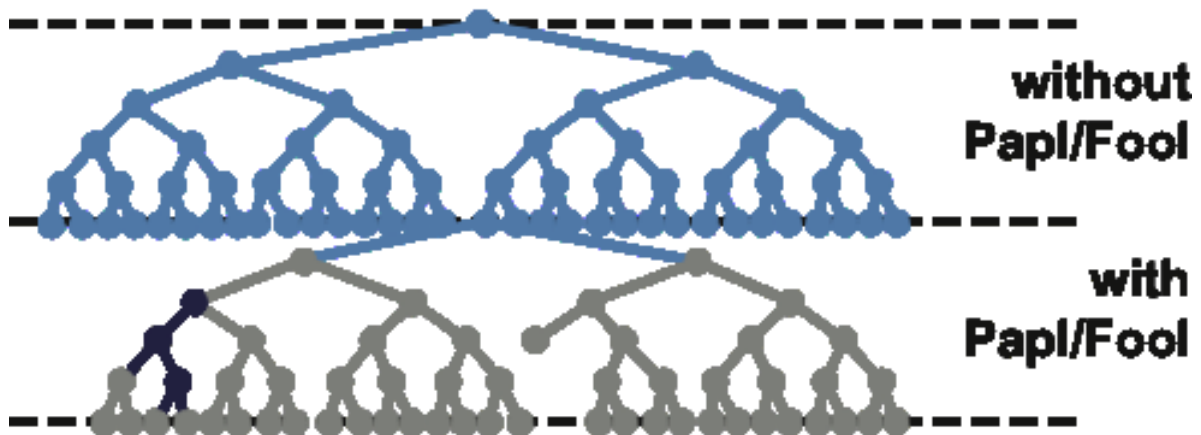


Figure 25 : Article I, Figure 7

**Figure S1. Non-linear regression analysis for Lrp binding to *clp* regulatory regions.** Representative plots of SPR binding responses (RU, average 710 to 730 sec) as a function of Lrp concentration. Experimental data (*symbols*) were subjected to non-linear regression analysis (*lines*) using the “One site – specific binding with Hill slope” model in Prism5 version 5.0c for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

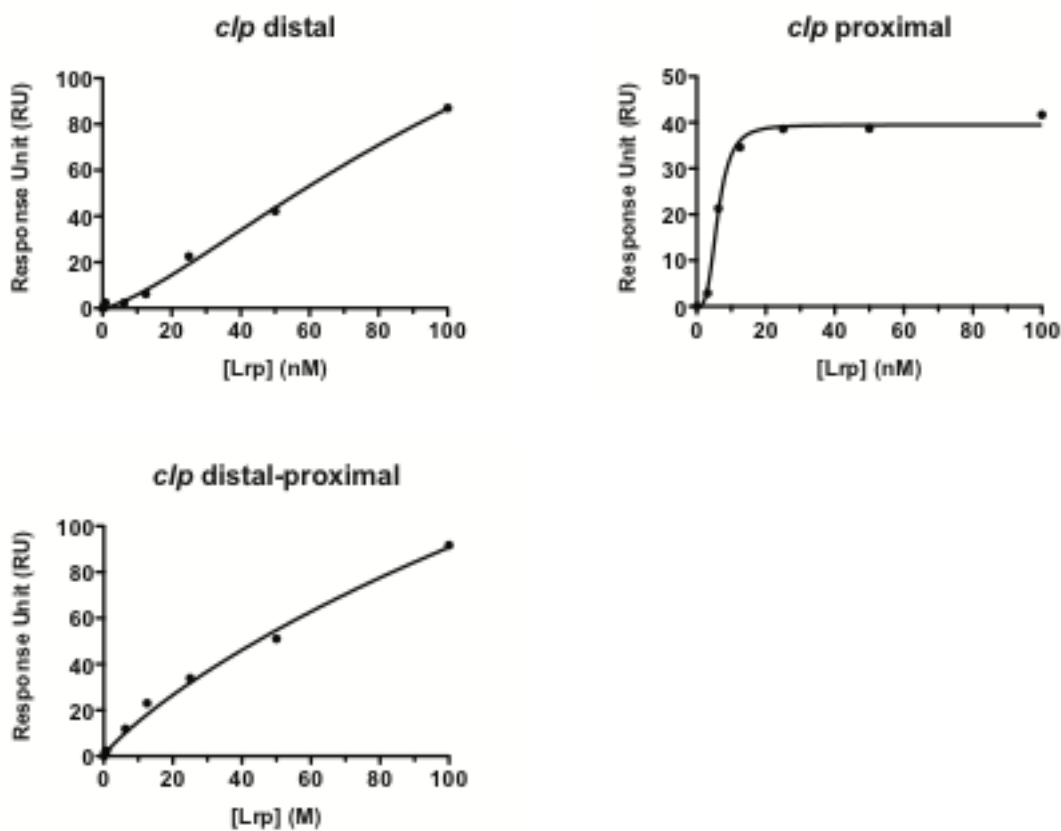


Figure 26 : Article I, Figure S1

**Figure S2. Non-linear regression analysis for PapI or Fool binding to *clp* regulatory regions.** Representative plots of SPR binding responses (RU, average 310 to 330 sec) as a function of Lrp concentration. Experimental data (*symbols*) were subjected to non-linear regression analysis (*lines*) using the “One site – specific binding with Hill slope” model in Prism5 version 5.0c for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

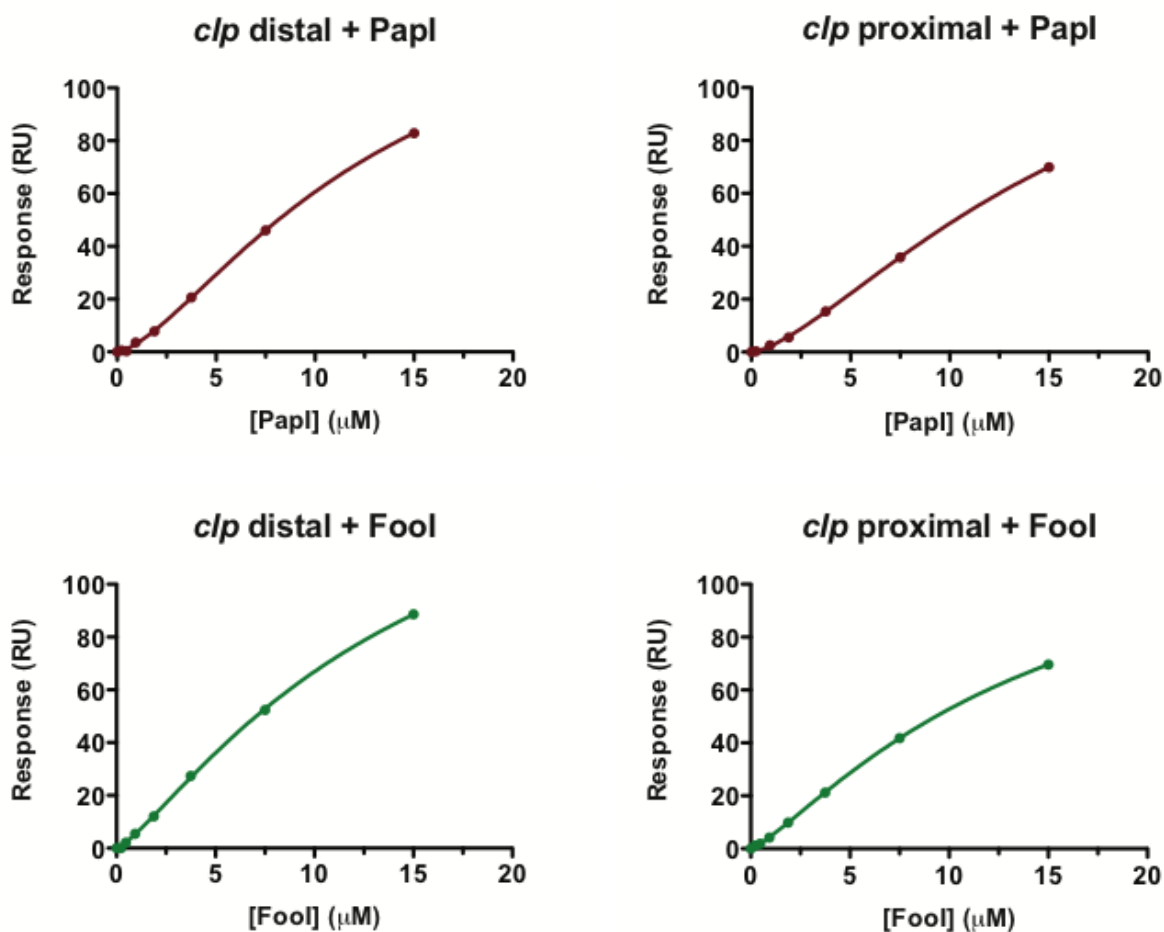


Figure 27 : Article I, Figure S2

Dans cet article j'ai participé aux expériences de cytométrie en flux. J'ai aussi complété la majorité des expériences de microscopie à fluorescence ainsi que l'analyse des résultats ainsi obtenus. J'ai participé à sa rédaction en rédigeant des parties importantes de l'introduction, du matériel et méthodes, des résultats ainsi que la discussion dans sa quasi intégralité.

## 2. Article II : The epigenetic switch of F165<sub>1</sub> P-like fimbriae generates a heterogenic phenotype

Rémi Lavoie<sup>1†</sup>, Richard Graveline<sup>1,4†</sup>, France Daigle<sup>2</sup>, Christine Martin<sup>3</sup> and Josée Harel<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, CANADA; <sup>2</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Quebec, CANADA ; <sup>3</sup>Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genès-Champanelle, FRANCE ; <sup>4</sup>Department of Pharmacology, New York University School of Medicine, 500 First Avenue, New York City, NY 10016, USA.

†These authors contributed equally to the work

#Corresponding author.

### 2.1 ABSTRACT

F165<sub>1</sub> and the pyelonephritis-associated pili (Pap) are two members of the type P family of adhesive factors that play a key role in the establishment of disease caused by Extra-intestinal *Escherichia coli* (ExPEC) strains. They are both under the control of an epigenetic and reversible switch that defines the number of fimbriated (ON) and afimbriated (OFF) cells within a clonal population. We monitored the phase variation of F165<sub>1</sub> and Pap fimbriae in individual *Escherichia coli* by flow cytometry and real time fluorescence microscopy. We also observed that ON cells after division generate cells in an intermediate phase, possibly being important for bacteria having a high switching rate, such as those possessing F165<sub>1</sub>. This fimbrial heterogenic phenotype of the bacteria could represent increased fitness in unpredictable environments.



## 2.2 INTRODUCTION

Phase variation is a stochastic and reversible switch between an “all-or-nothing” (ON/OFF) phenotype, each being capable of responding to a specific condition. After cell division, most daughter cells retain the expression phase of the parent, but a minority switches to the other expression phase. F165<sub>1</sub> fimbriae, encoded by the *foo* gene cluster, are members of the type P fimbriae family of *Escherichia coli* (1-4). The regulatory region of *foo* operon encoding F165<sub>1</sub> shares more than 96% identity with that of *pyelonephritis-associated pili (pap)* region. Previous work showed that the role of F165<sub>1</sub> fimbriae is essential for virulence and survival during systemic stages of infection in young pigs (5-8). F165<sub>1</sub> are principally found in infections caused by opportunistic *E. coli* while Pap are found in clinical cases of urinary tract infections. Members of the type P family are subject to phase variation control. Mechanistically, Pap phase variation occurs because of methylation-controlled modifications within the regulatory region of the *pap* operon. This region consists of an approximately ~400 bp intergenic region that is surrounded by two divergently transcribed genes, *papI* and *papB*. The intergenic region also includes six leucine-responsive regulatory protein (Lrp) binding sites, as well as two GATC sites (referred to as GATC<sup>prox</sup> and GATC<sup>dist</sup> respectively) spaced 102 bp apart. The differential methylation status of these sequences determines the binding of Lrp. Indeed, the switch from one phenotype to the other arises from the competition between the binding of Lrp at its distal or proximal binding sites and methylation by Dam methyltransferase at the opposite GATC site (for reviews, see (9-11)). When GATC<sup>dist</sup> is fully methylated, Lrp cooperatively binds to sites 1-3, maintaining the cells in the OFF state; when GATC<sup>prox</sup> is fully methylated, Lrp binds to sites 4-6, maintaining the ON state (Fig. 1). Thus, the DNA methylation pattern directly affects the probability of Lrp to be translocated from one site to the other. Control of *pap* expression also requires the action of PapI, a positive regulator that increases the affinity of Lrp for sites 4-6 *in vivo* (10, 12). PapB, the second specific regulator of the *pap* operon, plays an important role at the transcriptional level, mainly by coordinating the expression of the *pBA* and *pI* promoters (28). All together, the combined actions of Lrp, Dam methyltransferase, PapI, and PapB result in a finite

probability of each cell to express (ON) or not express (OFF) Pap fimbriae just after DNA replication. Previous studies on Pap phase variation have only allowed the observation of phase variation at the level of the population by inferring the number of ON and OFF cells from the expression level of the colonies (13). In contrast to *pap* phase variation where most of the colonies are in the OFF state, phase variation of *foo* is characterized by a higher level of ON colonies (14). We have showed that subtle sequence differences within the promoter proximal regulatory region (when combined with the specific actions of FooI or PapI) can cause a significant change in the level of ON cells. The differential expression level of *foo* relative to *pap*, relies on the concerted action of Lrp, Dam methylase, FooB, and FooI (15-17). Ultimately, this creates two different phase variation systems: Pap as a slow switcher and F165<sub>1</sub> as a fast switcher. However, direct observations of these switching events have so far been lacking, obscuring possible correlations between switching events themselves. To compare F165<sub>1</sub> and Pap switching events in single cells, a genetic amplifier system from Lim and Van Oudenaarden (18) was used where the expression of T7 RNAP, which is under the control of the *foo* or *pap* regulatory region, activates a T7 RNAP-specific promoter that regulates expression of the green fluorescent protein (GFP) gene located on a plasmid was used (Fig. 2). This system enabled single cells in the ON and OFF states of the *foo* and *pap* strains to be distinguished by flow cytometry and fluorescence microscopy. We also followed cell growth and the level of green fluorescent protein (GFP) expression over time, and determined the genealogical relationships within the population by using image analysis. We observed distinctive patterns of *foo* and *pap* expression that confirmed the difference between switch rates. Furthermore, in addition to ON and OFF cell populations a third subpopulation was put in evidence. In multiple genealogically related lineages we also observed ON cells after division generate cells in an intermediate phase that can be important in the case of bacteria that have a high switching rate such as F165<sub>1</sub> bacteria. The fimbrial heterogeneous phenotype for the bacteria could represent increased fitness in unpredictable environments.

## 2.3 MATERIALS AND METHODS

### Media and growth conditions

Luria-Bertani (LB) broth, M63, and M9 minimal broths were prepared as described previously (19, 20). When necessary, media were supplemented with antibiotics at the following concentrations (unless otherwise noted): ampicillin (amp), 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; chloramphenicol (Cm), 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; gentamicin, 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; kanamycin, 40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; tetracycline (tet) 12.5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; as well as with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (X-gal) at a final concentration of 40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . For microscopy experiments, M9 minimal salts medium was supplemented with 0,2% glycerol, 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  gentamicin (Sigma Aldrich) and 2% BD Bacto™-Agar.

### Strains and plasmids

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The primers used for strain construction can be found in Table S1. To monitor *foo* and *pap* phase variation, we adapted the genetic amplification system developed by Lim and van Oudernaarden (18). The reporter system was constructed by replacing the chromosomal coding sequence of the fimbrial operon by the sequence of the T7 RNA polymerase (T7 pol). The expression of T7 pol is under the control of phase variation and, in turn, dictates the expression of plasmidic *gfp* mut3.1 (under the control of a T7-specific promoter) (18). Briefly T7 polymerase coding sequence replaced *lacZ* under the control of *foo* and *pap* fimbrial promoters of strains JH200 (*fooI-foo*), JH201 (*papI-foo* mutant), DL4388 (*papI-pap*) and JH204 (*fooI-pap* mutant) (14, 21) and the plasmid pHL40 gentamicin resistant carrying *gfp* was inserted in these constructs. This resulted in strains JH300 (*fooI-foo-T7pol*) JH303 (*papI-pap-T7pol*) and *fooI* / *papI* swapping strains JH301 (*papI-foo-T7pol*) and JH304 (*fooI-pap-T7pol*) (Table 1 and Fig 2).

Briefly, for the construction of the latter strains a PCR fragment corresponding to the T7 RNA polymerase gene (*T7pol*) and the chloramphenicol resistant gene (*Cam<sup>R</sup>*) was first amplified from strain cHNL135 using *lacZ-T7pol\_fwd* and *lacZ-CAM\_R*. The PCR product was then recombined into strains JH200 (*fooI-foo*), JH201 (*papI-foo* mutant), DL4388

(*papI-pap*) and JH204 (*fool-pap* mutant) using  $\lambda$  red-recombination system (14, 21){Braaten, 1994 #7}. Recombinant strains were selected for resistance on LB-Cm agar and then transformed with *gfp* reporter plasmid pHL40. Plasmid pHL40 was constructed by replacing the kanamycin-resistance cassette from plasmid pHL32 (18) by a gentamicin-resistance cassette. Briefly, a gentamicin-resistance cassette was first amplified from plasmid pUCGM using primers SacI-genta-F and AatII-genta-R. Plasmid pHL32 was then digested using the endonucleases AatII and SacI (Neb) and, after purification, the DNA fragment containing the T7 RNA polymerase-specific promoter and *gfp* was ligated with the PCR-amplified gentamicin-resistance cassette to generate plasmid pHL40. For cloning procedures, PCR amplification was carried out using the FidelityTaq PCR MasterMix (GE Healthcare).

### **Flow cytometry acquisition and analysis**

Cells were streaked on LB plates with appropriate antibiotics. After 24 hours of growth at 37°C, a single colony was subsequently spread onto M9 X-Gal agar plates containing 0.2% glycerol and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of gentamicin. After another 24 h of growth, cells were inoculated into 1 mL sterile PBS, and ON and OFF single cells were separated using a Becton Dickinson FACSort flow cytometer (488-nm excitation laser; 525-nm emission filter). ON and OFF populations (from 10,000 to 100,000 individual cells) were then resuspended in 1 mL of fresh M9 media containing 0.2% glycerol and let for growth at 37°C for 20 hours. These populations were then analyzed by flow cytometry. Data from 20,000 individual cells were collected for each sample and analysed with a Becton Dickinson FACScalibur flow cytometer (488-nm excitation laser; 525-nm emission filter). FACScalibur data were converted to ASCII format using MFI (E. Martz, University of Massachusetts, Amherst) and analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc.). Strain JH210 (*fool-foo-lacZYA*) lacking T7pol but having plasmid pHL40, was used as a negative control and BL21(DE3)p, expressing T7pol and having plasmid pHL40, was used as positive control.

### **Real-time Microscopy**

**Microscopy sample preparation.** Bacteria were first cultivated on LB-agar and then isolated on minimal M9 media with glycerol and grown for 24 h at 37°C. A few colonies were harvested and resuspended in sterile 1 ml PBS solution. The prewarmed cell suspension was then diluted in 1/100 so that the density of cells allows the observation of single cells. A 5 µl of the bacterial suspension was dropped on the agar strip.

An adhesive silicone isolator (Grace Bio-labs) (19 mm x 32 mm x 1.0 mm depth) was affixed onto a microscope slide in order to create a chamber that contains the solid media. A volume of 700 µl culture media consisting of M9 glycerol medium with 2% agar was poured within the silicone isolator. A coverslip 22mmx60mmx60mm (Fisher) coated with Sigmacote (Sigma) is then placed over the isolator. Once the agar is solidified the coverslip is removed. The now flat-surfaced agar was trimmed into a thin strip of about 19 mm width and 15 mm length. The rest of the cavity acted as an air reservoir for cell growth. The cells spread evenly and became immobile. Over time, each single cell grew into microcolonies.

### **Image acquisition**

Microscope slides and bacterial suspensions were placed under the 37 °C incubation chamber of the Zeiss Axiovert inverted microscope, as to limit the cold shock when the cells are transferred on the microscope slides. A 5 ul of the bacterial suspension was dropped on the agar strip. The sample was immediately closed using another coverslip and was ready for observation.

The observations were done following the growth of a single ON phase cell. The cell had to be identified and isolated (such as during growth there is no overlap of the microcolonies, which would be detrimental to the tracking analysis). The growth was followed for 10h at 37°C, with pictures taken at every 10 minutes, both DIC (differential interference contrast) and Fluorescence images were captured. Both sets of images are needed to follow the growth and the switching events occurring for each bacteria. Imaging was performed with a Zeiss Aksiovert-A1 inverted microscope.

**Data analysis.** Images were reviewed and analyzed using MATLAB analysis package Schnitzcells kindly provided by M. Elowitz (California Institute of Technology) which segments and tracks cells in a frame-to-frame method(22). This process yields quantitative expression data on cell lineages, which can illustrate dynamic expression profiles. Cell fluorescence quantification and lineage tree construction were performed with Schnitzcells, a program written in MATLAB, kindly provided by M. Elowitz (22). Schnitzcells program uses the Image Processing and the Statistics toolboxes, along with the basic MATLAB module.

## 2.4 RESULTS

### **Single-cell measurement of *foo* and *pap* phase variation reveals a third sub-population at the single-cell level.**

To detect *foo* and *pap* switching events in single cells, we used the genetic amplification system developed by Lim and van Oudernaarden (2007) (18). The expression of T7 pol is under the control of phase variation and, in turn, dictates the expression of plasmidic Gfp (under the control of a T7-specific promoter) (18). The ON and OFF states of strains JH300 (*fooI-foo-T7pol*) JH303 (*papI-pap-T7pol*) as well as *fooI* /*papI* swapping strains JH301 (*papI-foo-T7pol*) and JH304 (*fooI-pap-T7pol*) , carrying plasmid pHL40 (carrying *gfp* under a T7pol specific promoter), were distinguished by flow cytometry.

The flow cytometry experiments were done in two parts. First the bacteria were sorted to select ON and OFF populations (Table S2). The state of the populations after growth of these progenitor populations was then analyzed by flow cytometry (Fig.3). ON and OFF states were defined according to positive control strain BL21(DE3)p and negative control strain JH210. The histograms of single-cell fluorescence measured by flow cytometry showed different levels in *gfp* expression between strains. As expected, the negative strain JH210 showed a low level of fluorescence; similarly, the positive control strain BL21(DE3)p, carrying pHL40, always showed a high level of fluorescence ( $\sim 10^4$

a.u.)(Fig. 3). In contrast, JH300 (*fool-foo*) and JH303 (*papI-pap*) presented different intensity levels of fluorescence. These were defined as high, intermediate and low fluorescence and corresponded to ON, intermediate (INT) and OFF states, respectively. When starting from an initial ON phase cell, strain JH300 (*fool-foo*) presented a mixed population of ON and OFF cells as well as an important subpopulation of intermediate levels of fluorescence ( $\sim 10^3$ a.u.). While starting from initial OFF phase cells, JH300 exhibited slightly more OFF cells, as shown by the shift towards low fluorescence levels. Strain JH303 (*papI-pap*) mainly produced an OFF population irrespective of the initial expression phase of the starting population. These findings could correlate with previous observations that showed a higher proportion of ON colonies for *foo-lacZ* than for *pap-lacZ* (14). This corresponded to previous observations that indicated that F165<sub>1</sub> strain show a higher number of colonies in the ON phase than Pap strain (14, 15, 23). Swapping strain JH301 (*papI-foo*) exhibited two clearly marked fluorescence peaks from both ON and OFF progenitor cells, one at  $10^3$  a.u. and the other between  $10^2$ - $10^3$ a.u. The swapping strain JH304 (*fool-pap*) showed a fluorescence tendency profile similar to that of JH300 (*fool-foo*), with an important subpopulation of cells having an intermediate fluorescence level ( $\sim 10^3$ a.u.) (Fig. 3).

The relative percentage of each of the 3 fluorescent bacterial subpopulations was also estimated according to the fluorescence intensity (Table 2). Strain JH300 (*fool-foo*) demonstrated mostly intermediate fluorescence when starting with OFF and ON progenitors (58,3% and 47,59%, respectively) and thus cells were mostly in the INT phase. Cells of strain JH303 (*papI-pap*) from OFF progenitors were in majority in the OFF phase with, 86% of *pap* cells in the OFF phase. Cells of strain JH303 (*papI-pap*) from ON progenitors were also mostly in the OFF phase with still 61,86 % of the population OFF. These findings confirmed previous observations, at the cellular level, that showed a higher proportion of ON colonies for *foo-lacZ* than for *pap-lacZ* (14). However, as shown here the cytometry data indicate that *foo* colonies included an important proportion of INT phase cells. This can explain why using *lacZ* reporter *foo* ON colonies appeared light blue compared to dark blue *pap* ON colonies and *foo* OFF colonies were not as white as the *pap* OFF colonies (14, 23, 24). The Fool/PapI regulators influenced the phenotype of

the swapping strains compared to their respective parental strains. The swapping strain *fooI-pap* had a more important subpopulation of cells in ON and INT phases more similar to that of strain *fooI-foo* than to parental *papI-pap*. Swapping *papI-foo* exhibited less striking difference from its parental *fooI-foo*.

Thus, the expression of *gfp* was inherited in an epigenetic manner, as previously observed when measuring the fimbrial phase variation in colonies using *lacZ* fusions (14, 15, 25). As reported, Pap phase variation favors the OFF phase more than F165<sub>1</sub>. In addition, the presence of an important intermediate fluorescence subpopulation indicates that during the switch an intermediate expression phase occurs. In addition, the influence of PapI homolog specific on the switch rate and the proportion of the intermediate phase cells is revealed in swapping strains.

### **Real-time analysis of *pap* and *foo* phase variation**

To characterize the distribution of the *foo* and *pap* operon expression level, at a single time point, individual *E. coli* cells were followed by real time microscopy. Phase variation was monitored as the cells grew and divided, as type P fimbriae phase transition requires DNA replication (25-28)(Fig S3). Cell growth and the level of green fluorescent protein (GFP) expression were monitored over time, and the genealogical relationships were determined within the population using image analysis. JH300 (*fooI-foo*), JH303 (*papI-pap*) as well as swapping strain JH304 (*fooI-pap*) growing in a M9 glycerol medium were spread onto agar and then imaged using phase-contrast and fluorescence microscopy. All strains demonstrated regular growth under the microscope, also the experiments were started with initial ON phase cells. Microcolonies of 87-181 cells were formed over a period of 10h with a generation time of 80-93 min during the exponential phase. In our experimental work, cells growing slowly in minimal media were most probably not subjected to multiple replication events per cell.

We observed distinct patterns of *foo* and *pap* expression in multiple genealogically related lineages. Similar to results observed by flow cytometry, distinctive patterns of fluorescence were observed—one with low mean fluorescence (0-2 a.u.), and one with a high level of fluorescence (4+ a.u.)—corresponded to the OFF and ON states as well as



intermediate levels of fluorescence (ranging from 2 to 4 a.u) corresponding to the INT state (Fig. 4). Three different subpopulations were observed in different lineages of JH300 (*fooI-foo*) (movie S1). Over time, following different lineages, many daughter cells showed intermediate fluorescence and only a subset of these presented a clear ON or OFF fluorescence phenotype. While lineages from several ON progenitors of JH303 (*papI-pap*) rapidly switched to an OFF state upon division and that most of their daughter cells remained in the OFF phase (movie S2). Only a small subset of cells switched back from OFF to ON phase. The swapping strain JH304 (*fooI-pap*) (movie S3) behaved in a similar manner to that of JH300 (*fooI-foo*) where the majority of the daughter cells maintained in the INT phase.

Quantitative expression data on cell lineages using Schnitzcells program (22) illustrated dynamic expression profiles of *foo* and *pap*. The lineage of the cells as well as their Gfp expression level revealed different intensity fluorescence patterns (Fig S1). JH300 (*fooI-foo*) and JH304 (*fooI-pap*) showed populations with a heterogeneous level of expression of fluorescence, while JH 303 (*papI-pap*) showed a marked preference for the OFF state and a monotonic decrease in fluorescence expression within the whole progeny. In the case of JH 303 (*papI-pap*), daughter cells switching from ON to OFF phase inherit GFP protein, T7pol and messenger RNA, as observed for type 1 phase variation (29), which are then diluted during subsequent divisions of OFF cells explaining the monotonic decrease of fluorescence. While the heterogeneous fluorescence observed in JH300 (*fooI-foo*) and JH304 (*fooI-pap*) lineages reflects the higher switch rates where within a lineage the daughters cells after division often switch to the other phase. These cells can express variable levels of Gfp depending on the prior state of the progenitor.

## 2.5 DISCUSSION

### **Single-cell measurement of *foo* and *pap* reveals a higher complexity to phase variation**

Using flow cytometry and real time microscopy, we confirm the observation is that *foo* expression (F165<sub>1</sub> fimbriae) gives rise to a higher level of ON cells compared to *pap* (Pap) but the observation of *foo* phase variation reveals intermediate states that separate the ON and OFF states previously unrecognized. However, after ON cell division, daughter cells that switched phase can retain the expression phase of the parent giving rise to an intermediate phase. Distinctive patterns of type 1 fimbriae (*fim*) expression on *fim* switching by DNA inversion in multiple genealogically related lineages were also observed (11). The different patterns of fimbrial expression could be explained by a derived model proposed by Adiciptaningrum *et al.* (29) that combines a single switching event with chromosomal replication, as well as the epigenetic inheritance of expressed fimbrial protein and RNA, and their dilution by growth of OFF cells (11). To this, we propose that the frequency of switching can play an important role in the importance of the intermediate phase. In that way *foo* cells demonstrating a high switch rate can have a variable level of *foo* expression depending on the prior state of the progenitor and its state. In the case of *foo* the partial expression of *gfp* is linked to a high switching frequency during replication in a cell lineage (29). While most *pap* cells are in the OFF state the intermediate phase daughter cells issued from a ON cell are then diluted during subsequent divisions.

Studies on *pap* phase variation showed that the competitive Lrp and Dam binding to the regulatory region dictates the stability of Lrp to the proximal region and is important for the heritability of the OFF state (30). We previously showed that the high level of ON cells found during F165<sub>1</sub> phase variation is due to the lack of a stable interaction between Lrp and the *foo* proximal repressor region that contains subtle differences in sequence compared to that of *pap*, in combination local regulator Fool which promotes the transit of Lrp toward its activator distal region after each cell cycle (14).

While the *pap* strain was characterized by a prominent OFF phase due to a majority of cells staying in the OFF phase (14), the *foo* strain on the other hand gave rise to a wider distribution of expression levels, not only ranging from OFF to ON, but also with more cells expressing an intermediate level of expression. Thus, the intermediate state

observed mainly with *foo* could be attributed to frequent phase variation events correlated to bacterial division events. The heterogenic phenotype of *foo* is mainly due to ON to OFF switching after cell division where daughter cells that inherit only GFP protein and messenger RNA and that undergo phase switching during the next cell division. During *pap* or *foo* fimbrial phase variation, the competition between Dam and Lrp for sites at each replication event represents an opportunity for Lrp to switch its binding from the activator region to the repressor region (Fig S3) (23). Lrp dissociation from the DNA is for Dam to gain access and methylate the GATC sites residing in the activator and repressor regions. Therefore, each replication event represents a possibility of switching event (25). The frequent switching in *foo* is due a weak affinity of Lrp for its *foo* proximal region that facilitates the OFF to ON switch whereas the formation of a particularly stable complex between Lrp and the *pap* proximal region maintains the OFF state through generations Graveline (11). In addition, differential methylation assays (24) correlated the switch rate with the population methylation status of the GATC sites of the fimbrial regulatory region (Fig S3-S4). The fraction of hemimethylated sites of both repressor and activator regions was more important in *foo* than in *pap* suggesting a frequent change of the methylation DNA status during *foo* cell division (Fig. S3-S4). In contrast, GATC<sup>prox</sup> site of the repressor region of *pap* remained methylated in a greater proportion than GATC<sup>dist</sup> of the activator region. This correlates the prevalent OFF state of *pap* cells.

Multistep epigenetic switches with biased transition rates may exist in various configurations, with an ON-partial-OFF level of expression related to the state of methylation and protein binding to specific sites, as previously demonstrated with *agn43* (18). Lim *et al.* (18), showed that switching mechanism of *agn43*, requires the presence of several, rarely occupied, intermediate states that separate the ON and OFF states. The process of *agn43* switching shares some similarities with the *pap*-like fimbrial system, as it depends on the methylation state of GATC sequences which is determined by competitive binding between Dam) and the repressor OxyR. The partial states occur during the hemimethylated state and the intermediate unmethylated states. The

unmethylated switch region can be re-methylated and become in the ON phase or bound by OxyR repressor results in OFF expression (18).

### **Fool induces a higher switching rate than PapI**

The specific regulator Fool and PapI not only are also essential for phase variation (23, 25, 31) but they also influence the phase variation rate (14). The swapping of PapI by Fool in *pap* background changed the expression to that of *fool-foo* (Figure 4C and S4C). PapI is a nonspecific DNA-binding protein (14, 32, 33) and it can directly interact with Lrp. We and others have previously showed that a low concentration of Fool and PapI significantly increases the binding and stability of Lrp at both sites in the repressor and activator regions (14, 25, 31). The Lrp-PapI complex is sufficient for the methylation dependent affinity change to occur (34). Since Lrp alone can form a stable complex with the *pap* repressor region, the action of PapI is more sensitive at the *pap* activator region for maintaining the cells in the ON state. In contrast, the action of Fool upon Lrp is similar between *foo* binding sites of both regions. This results in a high *foo* switch rate of phase variation. The action of Fool might also influence Lrp binding to *pap* regulatory region concurring with a higher switch rate than with PapI.

Interestingly PapI and Fool only differ from one amino acid position 17 (D->N) (18, 25, 26). Totsika *et al.* (35), showed that variants similar to Fool and PapI have different influence patterns on cross activation of fimbrial operons. PapI and Fool are members of the Fae-like protein family (PF04703) that includes orthologs of PapI, which are wHtH (winged helix-turn-helix) type of protein (33). The third helix has been identified as the one for DNA recognition (33), while the two others serve to provide additional contact. The amino acid difference residing prior to the second helix might influence the structure PapI-like proteins and their interaction with Lrp (33, 36).

## 2.6 CONCLUDING REMARKS

By investigating the behavior of single cells, this study has shown that stochastic system of phase variation at an individual level can have some influence at the population level.

We put in evidence with *foo* that F165<sub>1</sub> bacteria could be in ON, OFF but also intermediate phase. It has been proposed that population heterogeneity increases fitness in unpredictable environments (37, 38). Being able to keep a set of *foo* cells in an intermediate expression state would allow the population as a whole to adapt quickly to changing environment. This may work as a kind of bet-hedging (39, 40) allowing a given genotype to express multiple phenotypes of differing viability. One phenotype may be better adapted to the current environment while others are prepared for future environmental changes under which they may gain higher fitness (41). On the other hand, heterogeneous populations may simply undergo performance-based selection, in which fitter cells always perform better despite an environmental change.

As pathogenic *E. coli* strains producing F165<sub>1</sub> are mainly opportunistic and have a limited arsenal of virulence factors, the intermediate state of *foo* expression might give a fitness advantage in some conditions (42). On the other hand urinary tract infection strains producing Pap fimbriae contain an arsenal of virulence factors including many fimbrial determinants. As *pap* phase variation occurs at a lower rate than it is possible that the expression of *pap* is being required in a specific niche to adapt to different environments the bacteria would rely on its other virulence determinants.

## 2.7 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Michael B. Elowitz (California Institute of Technology) for providing the Schnitzcells program and advices, David Low (University of California) and Carlòs Balsalobre (Universitat de Barcelona) for the enlightening discussions. We are also grateful to Serge S  n  chal (Universit   de Montr  al) for his help with flow cytometry experiments and to Aleks Spurmanis, Claire Brown and the staff at the McGill Imaging Facility for their help with real-time microscopy. This work was supported by funding from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire (Fonds de la Recherche Qu  b  cois en Nature et Technologies, CRIPA Regroupement Strat  gique **170946**), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Discovery Grant **25120** to J.H.).

## REFERENCES

1. **Plos K, Carter T, Hull S, Hull R, Svanborg Eden C.** 1990. Frequency and organization of pap homologous DNA in relation to clinical origin of uropathogenic *Escherichia coli*. J Infect Dis **161**:518-524.
2. **Wullt B, Bergsten G, Connell H, Röllano P, Gebretsadik N, Hull R, Svanborg C.** 2000. P fimbriae enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract. Mol Microbiol **38**:456-464.
3. **Wullt B, Bergsten G, Connell H, Röllano P, Gebratsedik N, Hang L, Svanborg C.** 2001. P-fimbriae trigger mucosal responses to *Escherichia coli* in the human urinary tract. Cell Microbiol **3**:255-264.
4. **Bergsten G, Samuelsson M, Wullt B, Leijonhufvud I, Fischer H, Svanborg C.** 2004. PapG-dependent adherence breaks mucosal inertia and triggers the innate host response. J Infect Dis **189**:1734-1742.
5. **Ngeleka M, Martineau-Doizé B, Fairbrother JM.** 1994. Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165"F165(1) resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes in vitro: role of F165(1) fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. Infect Immun **62**:398-404.
6. **Ngeleka M, Fairbrother JM.** 1999. F165(1) fimbriae of the P fimbrial family inhibit the oxidative response of porcine neutrophils. FEMS Immunol Med Microbiol **25**:265-274.
7. **Harel J, Jacques M, Fairbrother JM, Bosse M, Forget C.** 1995. Cloning of determinants encoding F165(2) fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. Microbiology **141 ( Pt 1)**:221-228.
8. **Harel J, Forget C, Saint-Amand J, Daigle F, Dubreuil D, Jacques M, Fairbrother J.** 1992. Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165(1), a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. J Gen Microbiol **138**:1495-1502.
9. **Casadesús J, Low D.** 2006. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. Microbiol Mol Biol Rev **70**:830-856.
10. **Hernday A, Krabbe M, Braaten B, Low D.** 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. Proc Natl Acad Sci USA **99 Suppl 4**:16470-16476.
11. **Blomfield IC.** 2001. The regulation of pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. Adv Microb Physiol **45**:1-49.
12. **van der Woude M, Braaten B, Low D.** 1996. Epigenetic phase variation of the pap operon in *Escherichia coli*. Trends Microbiol **4**:5-9.
13. **Gally DL, Bogan JA, Eisenstein BI, Blomfield IC.** 1993. Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. J Bacteriol **175**:6186-6193.

14. **Graveline R, Mourez M, Hancock MA, Martin C, Boisclair S, Harel J.** 2011. Lrp-DNA complex stability determines the level of ON cells in type P fimbriae phase variation. *Mol Microbiol* **81**:1286-1299.
15. **Daigle F, Forget C, Martin C, Drolet M, Tessier MC, Dezfulian H, Harel J.** 2000. Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Res Microbiol* **151**:563-574.
16. **Harel J, Daigle F, Forget C, Tessier MC, Crost C, Martin C.** 2000. Phase variation of F165(1) (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. *Can J Microbiol* **46**:1101-1107.
17. **Berthiaume F, Crost C, Labrie V, Martin C, Newman EB, Harel J.** 2004. Influence of L-leucine and L-alanine on Lrp regulation of foo, coding for F1651, a Pap homologue. *J Bacteriol* **186**:8537-8541.
18. **Lim HN, van Oudenaarden A.** 2007. A multistep epigenetic switch enables the stable inheritance of DNA methylation states. *Nat Genet* **39**:269-275.
19. **Miller JH.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
20. **Thomason L, Court DL, Bubunenko M, Costantino N, Wilson H, Datta S, Oppenheim A.** 2007. Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 1**:Unit 1.16.
21. **Datsenko KA, Wanner BL.** 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.
22. **Young JW, Locke JC, Altinok A, Rosenfeld N, Bacarian T, Swain PS, Mjolsness E, Elowitz MB.** 2012. Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy. *Nat Protoc* **7**:80-88.
23. **Crost C, Harel J, Berthiaume F, Garrivier A, Tessier MC, Rakotoarivonina H, Martin C.** 2004. Influence of environmental cues on transcriptional regulation of foo and clp coding for F165(1) and CS31A adhesins in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **155**:475-482.
24. **Tessier MC, Graveline R, Crost C, Desabrais JA, Martin C, Drolet M, Harel J.** 2007. Effects of DNA supercoiling and topoisomerases on the expression of genes coding for F165(1), a P-like fimbriae. *FEMS Microbiol Lett* **277**:28-36.
25. **Hernday AD, Braaten BA, Low DA.** 2003. The mechanism by which DNA adenine methylase and PapI activate the *pap* epigenetic switch. *Mol Cell* **12**:947-957.
26. **Wion D, Casadesus J.** 2006. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol* **4**:183-192.
27. **Wallecha A, Munster V, Correnti J, Chan T, van der Woude M.** 2002. Dam- and OxyR-dependent phase variation of *agn43*: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation. *J Bacteriol* **184**:3338-3347.
28. **Hernday A, Krabbe M, Braaten B, Low D.** 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**:16470-16476.
29. **Adicptaningrum AM, Blomfield IC, Tans SJ.** 2009. Direct observation of type 1 fimbrial switching. *EMBO Rep* **10**:527-532.

30. **Peterson SN, Reich NO.** 2008. Competitive Lrp and Dam assembly at the pap regulatory region: implications for mechanisms of epigenetic regulation. *J Mol Biol* **383**:92-105.
31. **Kaltenbach LS, Braaten BA, Low DA.** 1995. Specific binding of PapI to Lrp-pap DNA complexes. *J Bacteriol* **177**:6449-6455.
32. **Kawamura T, Vartanian AS, Zhou H, Dahlquist FW.** 2011. The design involved in PapI and Lrp regulation of the pap operon. *J Mol Biol* **409**:311-332.
33. **Kawamura T, Le LU, Zhou H, Dahlquist FW.** 2007. Solution structure of *Escherichia coli* PapI, a key regulator of the pap pili phase variation. *J Mol Biol* **365**:1130-1142.
34. **Nou X, Braaten B, Kaltenbach L, Low DA.** 1995. Differential binding of Lrp to two sets of pap DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **14**:5785-5797.
35. **Totsika M, Beatson SA, Holden N, Gally DL.** 2008. Regulatory interplay between pap operons in uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **67**:996-1011.
36. **Huisman TT, de Graaf FK.** 1995. Negative control of fae (K88) expression by the 'global' regulator Lrp is modulated by the 'local' regulator FaeA and affected by DNA methylation. *Mol Microbiol* **16**:943-953.
37. **Blake WJ, Balazsi G, Kohanski MA, Isaacs FJ, Murphy KF, Kuang Y, Cantor CR, Walt DR, Collins JJ.** 2006. Phenotypic consequences of promoter-mediated transcriptional noise. *Mol Cell* **24**:853-865.
38. **Fraser D, Kaern M.** 2009. A chance at survival: gene expression noise and phenotypic diversification strategies. *Mol Microbiol* **71**:1333-1340.
39. **Veening JW, Smits WK, Kuipers OP.** 2008. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **62**:193-210.
40. **Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S.** 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**:1622-1625.
41. **Ni M, Decrulle AL, Fontaine F, Demarez A, Taddei F, Lindner AB.** 2012. Pre-disposition and epigenetics govern variation in bacterial survival upon stress. *PLoS Genet* **8**:e1003148.
42. **Dezfulian H, Batisson I, Fairbrother JM, Lau PC, Nassar A, Szatmari G, Harel J.** 2003. Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. *J Clin Microbiol* **41**:1375-1385.
43. **Braaten BA, Nou X, Kaltenbach LS, Low DA.** 1994. Methylation patterns in pap regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**:577-588.



## 2.8 LEGENDS

**Table 1. Strains and plasmids used in this study.**

Strain or plasmid	Description and relevant phenotype	Source or reference
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
NC397	<i>lacI::kan-Ter-cat sacB-lacZYA</i>	Svenningsen <i>et al.</i> (2005)
cHNL135	MC4100 <i>agn43::T7pol-CamR</i>	(18)
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	{Studier, 1986 #6256}
BL21(DE3)p	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) + pHL40	This study
DL4388	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen (wild type <i>papI-pap-papBA-lacZYA</i> )	(43)
JH100	DL4388 <i>papI::cat-sacB-papBA-lacZYA</i>	(14)
JH200	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen ( <i>fool-foo-papBA-lacZYA</i> )	(14)
JH201	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen ( <i>papI-foo-papBA-lacZYA</i> )	(14)
JH204	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen ( <i>fool-pap-papBA-lacZYA</i> )	(14)
JH210	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen ( <i>fool-foo-papBA-lacZYA</i> ) + pHL40	This study
JH300	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen ( <i>fool-foo-papBA-T7pol-CamR</i> ) + pHL40	This study
JH301	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen ( <i>papI-foo-papBA-T7pol-CamR</i> ) + pHL40	This study
JH303	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen ( <i>papI-pap-papBA-T7pol-CamR</i> ) + pHL40	This study
JH304	MC4100 $\lambda$ 354 lysogen ( <i>fool-pap-papBA-T7pol-CamR</i> ) + pHL40	This study
<b>Plasmides</b>		
pKM201	Lambda genes <i>red</i> and <i>gam</i> under the control of the IPTG inducible PtacIPTGinduciblePtac promoter (AmpR)	Murphy <i>et al.</i> (2003)
pHL32	Reporter plasmid that express <i>gfp</i> under the control of a T7 RNA polymerase-specific promoter (Kan R)	(18)
pHL40	pHL32 derivative that possesses the gentamicin resistance cassette instead of that of kanamycin.	This study

**Table III : Article II, Table 1**

**Table 2. FACS analysis of expression states of *foo* and *pap* strains.**

Starting Phenotype	Cell population	Strains			
		JH300( <i>fooI-foo</i> )	JH301( <i>papI-foo</i> )	JH303( <i>papI-pap</i> )	JH304( <i>fooI-pap</i> )
<b>OFF</b>	A(%OFF)	27.11	26.08	86.22	13.16
	B(%INT)	58.30	58.93	13.64	68.66
	C(%ON)	13.95	14.27	0.12	16.74
<b>ON</b>	A(%OFF)	13.00	23.19	61.86	13.03
	B(%INT)	47.59	54.97	36.09	67.00
	C(%ON)	38.26	21.44	1.87	18.61

**Table IV : Article II, Table 2**

**Figure 1. Simplified model of *pap* phase variation.** Organization of the regulatory region shared between the *foo* and the *pap* operons, with binding sites for the main regulators depicted according to Hernday et al (25). The Lrp sites are shown as empty rectangles. Grey rectangles represent GATC sites submitted to methylation by Dam, GATC<sup>prox</sup> and GATC<sup>dist</sup>, which are located within Lrp binding sites 2 and 5, respectively. Localization of Lrp, PapI binding onto their sites, as well as methylation status are also shown for bacteria in either the OFF state or the ON state.

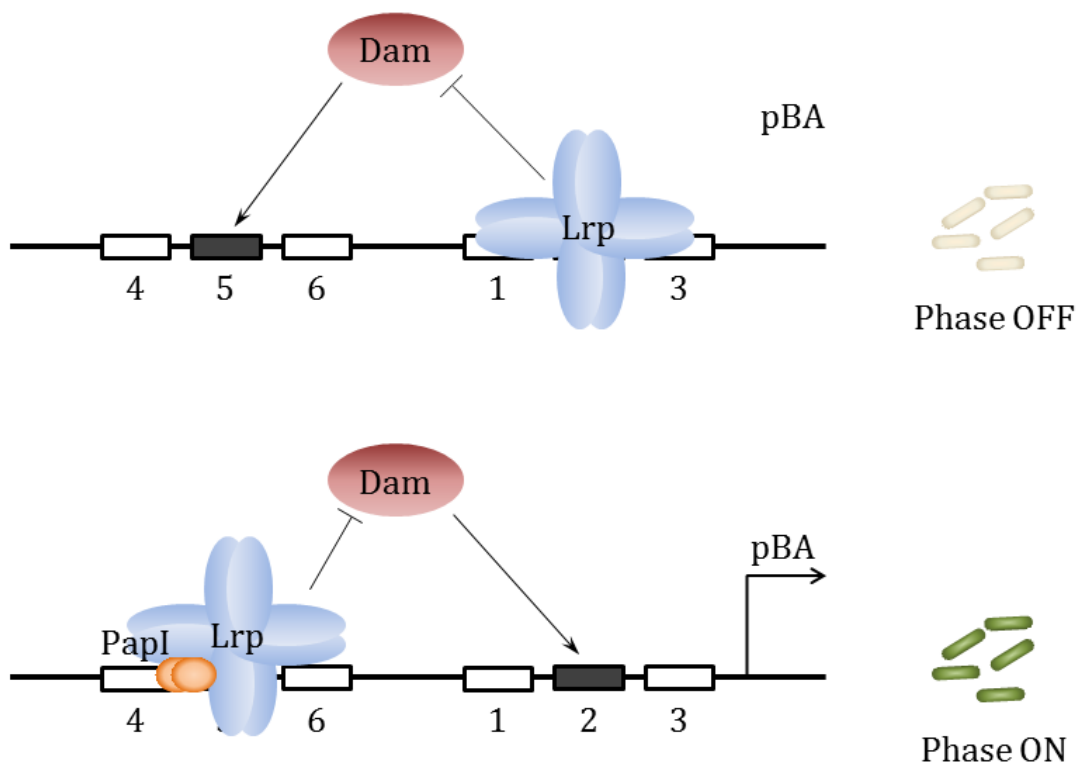


Figure 28 : Article II, Figure 1

**Figure 2. Schematic representation of the reporter system used in this study.** In order to monitor *foo* and *pap* phase variation, we adapted the genetic amplification system developed by Lim and van Oudernaarden (2007) (18). The reporter system was constructed by replacing the chromosomal coding sequence of the fimbrial operon by the sequence of the T7 RNA polymerase (T7 pol). The expression of T7 pol is under the control of phase variation and, in turn, dictates the expression of plasmidic Gfp (under the control of a T7-specific promoter) (18). This system allows an amplified signal and thus improves the signal versus background ratio.

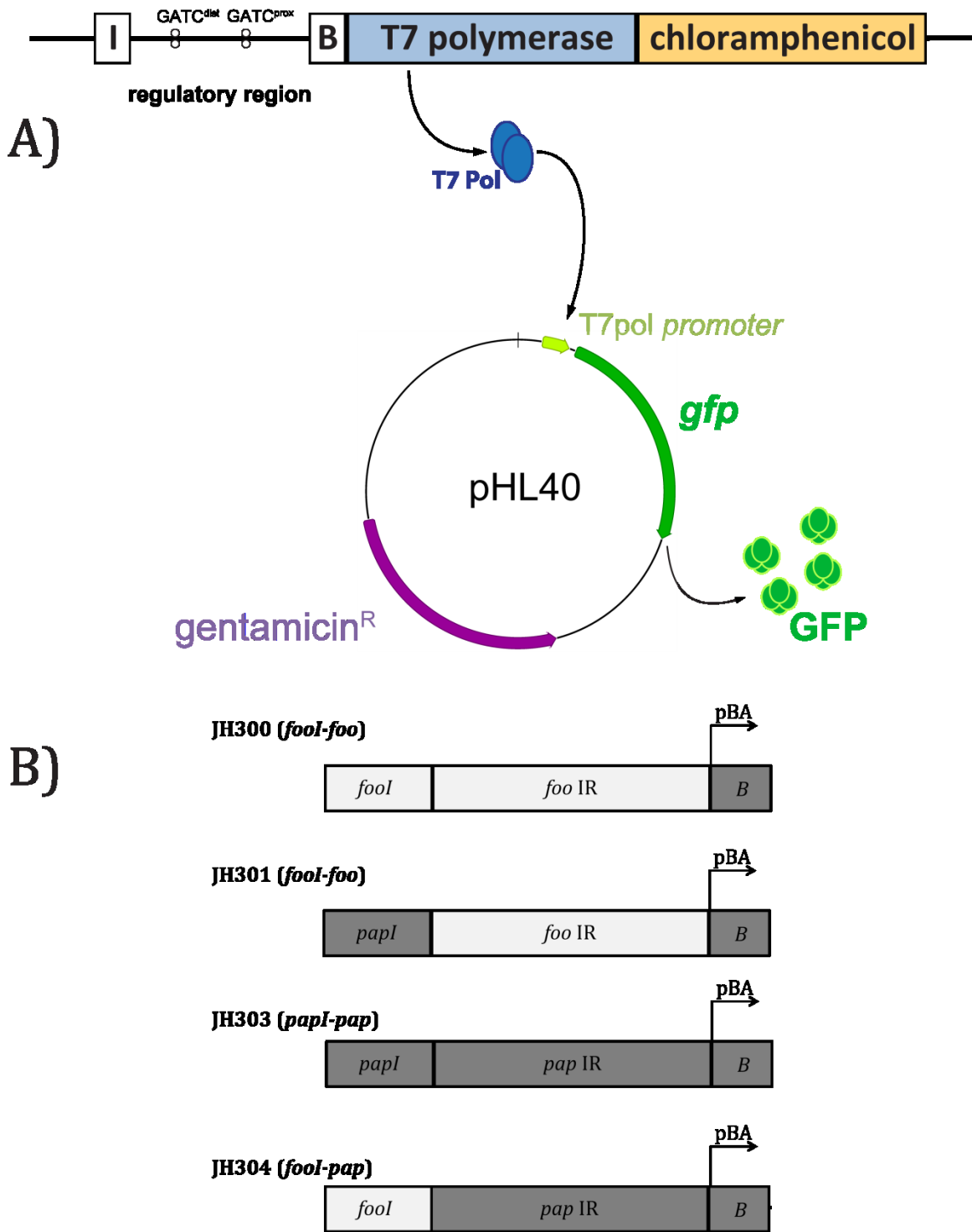


Figure 29 : Article II, Figure 2

**Figure 3. Histograms of single-cell fluorescence for *foo* and *pap* strains with gaussian correspond to OFF, partial and ON expression states.** A colony isolated from a rich media plate is streaked on M9 glycerol minimal media. After 24h of incubation at 37°C, colonies are resuspended in PBS and bacteria corresponding to the ON and OFF populations are sorted, using a flow cytometer, and reinoculated to liquid M9 minimal media. These are the progenitor cells from which the populations are analyzed by flow cytometry after incubation. The red curve represents cells sorted from an OFF progenitor population and the green curve represents cells sorted from ON progenitor population.

Top and bottom leftmost panels, corresponded to controls with top panel the control ON strain BL21(DE3)p with the pHL40 reporter plasmid but induced T7 RNA polymerase and bottom panel the control OFF strain JH210 with the pHL40 reporter plasmid but no T7 RNA polymerase. In the middle panels are strains JH300(*fooI-foo*) and JH303(*papI-pap*) and in rightmost panels *papI /fooI* swapping strains (JH301 and JH304). Three populations with different fluorescence intensity (a, b, and c) corresponding to high intensity (ON state), intermediate intensity (intermediate state) and low intensity (OFF state) can be observed.

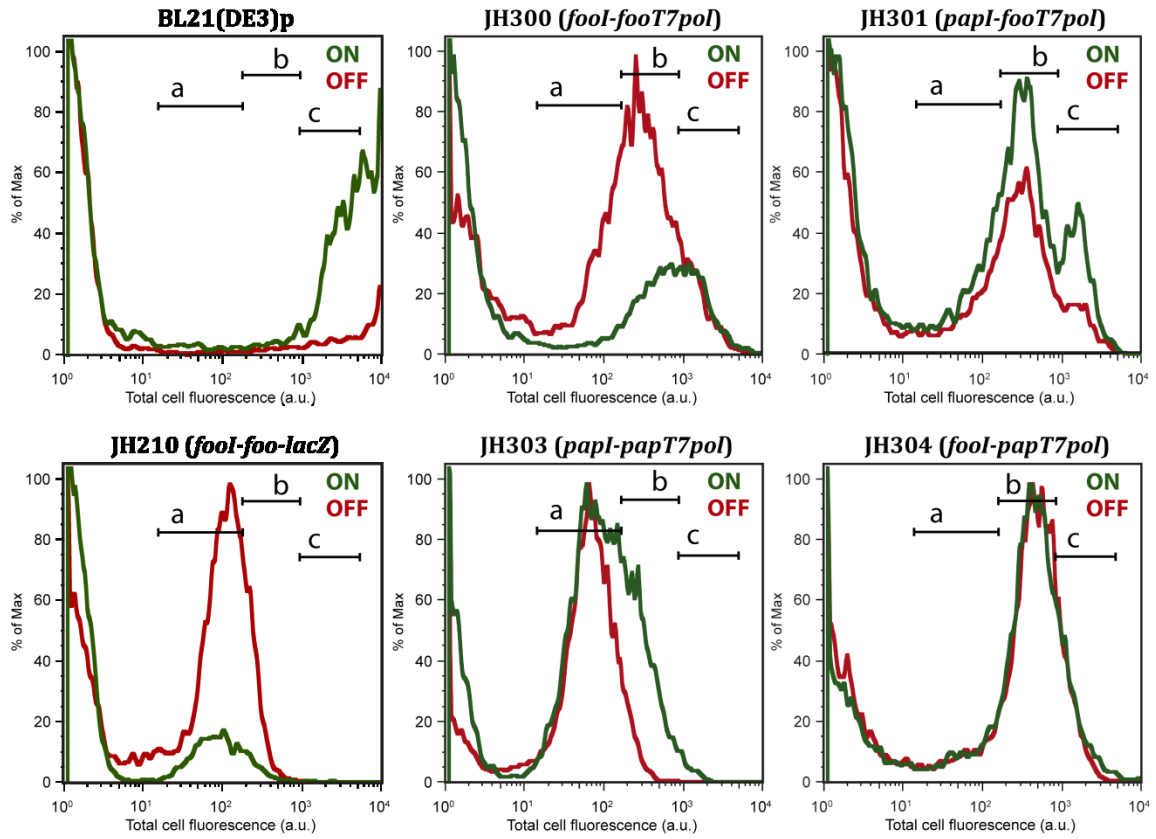


Figure 30 : Article II, Figure 3

**Figure 4. ON switching in a growing microcolony.** Panel 1, JH300 (*fooI-foo*), panel 2 JH303 (*papI-pap*), panel 3 JH304 (*fooI-pap*). In subpanels A) The merged DIC and fluorescence images show, JH300 (*fooI-foo*) and JH304 (*fooI-pap*), start from an ON cell (black arrow) and develop into an heterogeneous population with different levels of fluorescence, indicating ON to OFF and inversely switching events, while for JH303 (*papI-pap*) the disappearance fluorescence indicates an ON-to-OFF fimbrial switch event. For *pap* strain, a fluorescent cell in this isogenic population can develop into a low fluorescent sub-colony, indicating an ON-to-OFF switch event. For *foo* strain a fluorescent cell in this isogenic population can develop into an intermediate fluorescent sub-colony, indicating ON to OFF and inversely switching events. In subpanels B) GFP expression history of the four lineages represented by different colored lines. Starting from an ON cell it can be observed that most of JH300 (*fooI-foo*), and JH304 (*fooI-pap*) lineages as the cells divide show an increase or variable intensity fluorescence whereas JH303 (*papI-pap*) lineages rather show a monotonic decrease of fluorescence. Y axis represents the mean of fluorescence (a.u.) and the X axis the time (mins). In each panel the red line represents the mother lineage.



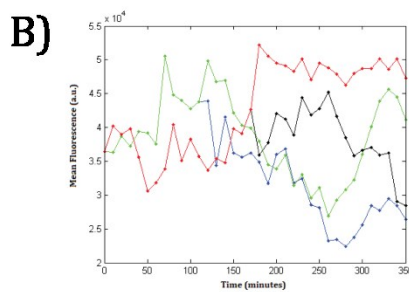
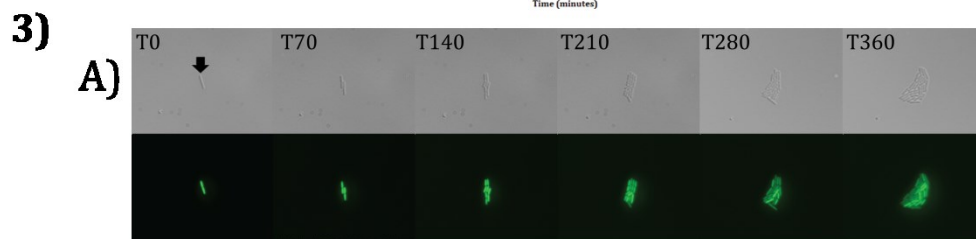
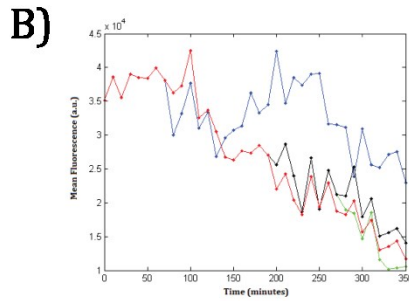
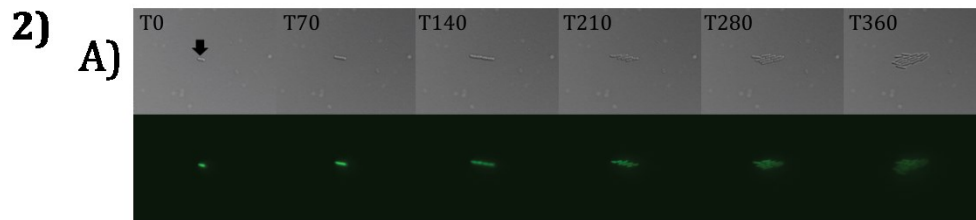
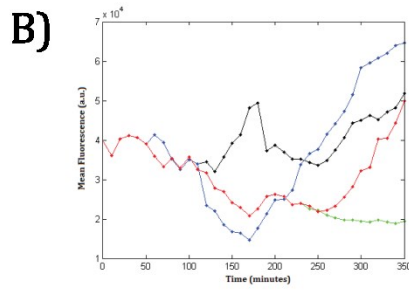
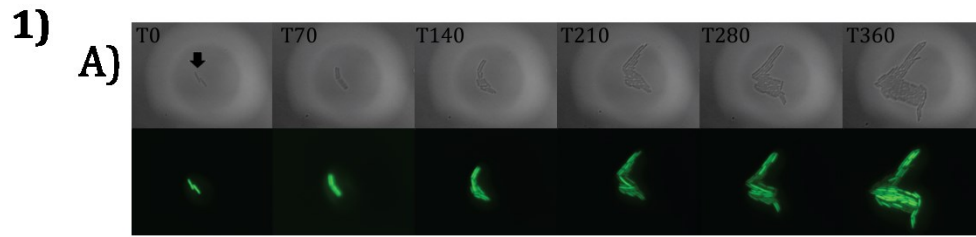


Figure 31 : Article II, Figure 4

**Figure 5. Fimbrial expression and DNA replication. Model for *foo* and *pap* switching event during division including the intermediate phase.** Model for slow-growing *E. coli* cells inheriting a single chromosome (replicated bi-directionnaly) with ON-to-OFF switching occurs after DNA replication. The daughter cell that switches to the OFF state inherits only GFP protein and messenger RNA. This can result in an intermediate expression state. This can be diluted by subsequent division of OFF cells and thus decrease in concentration. As observed for *pap* characterized by less frequent switching event and cells in the OFF state, this results in a monotonic decrease of fluorescence. In the case of *foo* where frequent switching events occur during cell generations, the lineages express an intermediate fluorescence baseline. This can lead to a lag between genotype and phenotype and thus three phenotypes can appear ON, OFF and Intermediate (INT). Green circle represents the ON state and red circle represents the OFF state of the operon. Gradation of green inside cells represents different Gfp expression levels (dark high level, pale green intermediate level) while white cells are cells with no Gfp expression .



## 2.9 SUPPORTING INFORMATION

The epigenetic switch of F165<sub>1</sub> P-like fimbriae generates a heterogenic phenotype

Rémi Lavoie<sup>1†</sup>, Richard Graveline<sup>4†</sup>, France Daigle<sup>2</sup>, Christine Martin<sup>3</sup> and Josée Harel<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, CANADA; <sup>2</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Quebec, CANADA ; <sup>3</sup>Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genès-Champanelle, FRANCE ; <sup>4</sup>Department of Pharmacology, New York University School of Medicine, 500 First Avenue, New York City, NY 10016, USA.

### **Table of Contents :**

#### **Text S1. Material and Methods**

**Movie S1: Phase variation in a growing microcolony of JH303 (*papI-pap*)**

**Movie S2: Phase variation in a growing microcolony of JH300 (*fooI-foo*)**

**Movie S3: Phase variation in a growing microcolony of JH304 (*fooI-pap*)**

**Table S1: List of primers used in this study**

**Figure S1: Overall population expression level from the growth of microcolonies.**

**Figure S2: Population distribution after cell-sorting**

**Figure S3: Molecular model of the steps involved in P and F165<sub>1</sub> fimbriae switching event mechanism**

**Figure S4 :Differential methylation of *pap* and *foo* intergenic region**

## **Text S1. Material and Methods**

### **Media and growth conditions**

Luria-Bertani (LB) broth, M63, and M9 minimal broths were prepared as described previously (1, 2). When necessary, media were supplemented with antibiotics at the following concentrations (unless otherwise noted): ampicillin (amp), 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; chloramphenicol (Cm), 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; gentamicin, 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; kanamycin, 40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; tetracycline (tet) 12.5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; as well as with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (X-gal) at a final concentration of 40  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . For microscopy experiments, M9 minimal salts x1 media supplemented with 0,2% glycerol and gentamicin 10  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma Aldrich) and 2% BD Bacto™-Agar.

### **Real-time Microscopy**

**Microscopy sample preparation.** Bacteria were first cultivated on LB-agar and then isolated on minimal M9 media with glycerol and grown for 24 h at 37°C. A few colonies were harvested and resuspended in sterile 1 ml PBS solution. The cell prewarmed suspension was then diluted in 1/100 so that the density of cells allows the observation of single cells. A 5  $\mu\text{l}$  of the bacterial suspension was dropped on the agar strip. An adhesive silicone isolator (Grace Bio-labs) (19 mm x 32 mm x 1.0 mm depth) was affixed onto a microscope slide in order to create a chamber that contains the solid media. A volume of 700  $\mu\text{l}$  culture media consisting of M9 glycerol medium with 2% agar was poured within the silicone isolator. A coverslip 22mm x 60mm (Fisher) coated Sigmacote (Sigma) is then placed over the isolator. Once the agar is solidified the coverslip is removed. The now flat-surfaced agar was trimmed into a thin strip of about 19 mm width and 15 mm length. The rest of the cavity acted as an air reservoir for cell growth. The cells spread evenly and became immobile. Over time, each single cell grew into microcolonies.

### **Image acquisition**

Microscope slides and bacterial suspensions were placed under the 37 °C incubation chamber of the Zeiss Axiovert inverted microscope, as to limit the cold shock when the cells are transferred on the microscope slides. A 5 ul of the bacterial suspension was dropped on the agar strip. The sample was immediately closed using another coverslip and was ready for observation. The observations were done following the growth of a single ON phase cell. The cell had to be identified and isolated (such as during growth there is no overlap of the microcolonies, which would be detrimental to the tracking analysis). The growth was followed for 10h at 37°C, with pictures taken at every 10 minutes, both DIC (differential interference contrast) and Fluorescence images were captured. Both sets of images are needed to follow the growth and the switching events occurring for each bacteria. Imaging was performed with a Zeiss Aksiovert-A1 inverted microscope.

**Data analysis.** Cell fluorescence quantification and lineage tree construction were performed with Schnitzcell, a program written in MATLAB, kindly provided by M. Elowitz (Young *et al.*, 2011). Schnitzcell uses the Image Processing and the Statistics toolboxes, along with the basic MATLAB module.

### **Differential methylation assay**

The methylation pattern of GATC-I and GATC-II sites of the *foo/pap* intercistronic region of strains JH200 (*fooI-foo-papBA-lacZ*) (3) and strain DL4388 (*papI-pap-papBA-lacZ*) (4) was studied, using a qPCR method on digested genomic DNA using restriction enzymes that recognize methylated or non-methylated GATC sites. Primer sequences are presented in Table S1. For DNA purification, a single blue or a single white colony was picked from M9-glycerol-X-Gal agar, resuspended in M9 salts, and used to inoculate three flasks containing M9 glycerol medium as described previously (3, 5). Genomic DNA was isolated from overnight cultures as described previously (6). DNA concentrations were measured using ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Digestions of 1 µg of DNA with restriction endonucleases *DpnI* (cuts methylated

GATC sites), *Sau3A I* (cuts all GATC sites, whether they are methylated or not) were performed as specified by the manufacturer. After incubation, the enzymes were inactivated and DNA fragments were purified using the MinElute system from Qiagen (Hilden, Germany). DNAs were quantified by measuring the  $A_{260}$  using ND-1000 Spectrophotometer. Using the Smart Cycler apparatus (Cepheid, Sunnyvale, CA), qPCR reactions were done with 1.25  $\mu\text{M}$  of each primer, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 12.5  $\mu\text{l}$  of QuantiTect SYBR Green PCR Kits (Qiagen) and 4  $\mu\text{l}$  of digested DNA (20 ng) in microcapillary tubes in a final volume of 25  $\mu\text{l}$ . Primers *fooDI* (5'-GTATTTGCTTTATTTGCG-3') and *fooR1* (5'-CAAACAACAAGAATACAC-3') for amplification of GATC<sup>dist</sup> of *foo* intergenic region (IR), *Foo\_prox-F* (5'-CACCATGATGTTTTTATCTGAGTGTATTCTTGTTGTTTGTG-3') and *fooR2* (5'-GTGTATTCTTGTTGTTTGTG-3') for GATC<sup>prox</sup>. Primers for the *pap* IR were *Pap4-6 F* (5'-TTCTCTATGTTTGCTTTATTTGTT-3') and *Pap4-6 R* (5'-TAATAGCAAGAGGGTACTCAGATA-3') for GATC<sup>dist</sup> and *Pap\_prox-F* (5'-TGCCATGATGTTTTTATCTGAGTACCCTCTTGCTATTAGTG-3'), *Pap1-3 R* (5'-TACTCTTCACGCAATAAGTTAAAT-3') for GATC<sup>prox</sup>.

Standard curves for *clp* quantification were obtained by PCR amplification of genomic DNA from DL4388 (*pap*)(4) and MC4100.λ1 (*foo*) (7). The PCR products were purified with the MinElute PCR purification kit (Qiagen) and DNA amounts were quantified by measuring the  $A_{260}$ . This amount was converted to molecule number as previously described (8). Then PCR products were 10-fold serially diluted from  $10^7$  to  $10^3$  molecules\* $\mu\text{l}^{-1}$  and three q-PCRs were carried out in a Smart Cycler apparatus (Cepheid). The standard curve for *rpoA* quantification was obtained in the same way using the genomic DNA of MC4100.λ1 and the primers *rpoA\_F* (5'-CGTATCAAAGTTCAGCGCGGTTCGT-3') and *rpoA\_R* (5'-CAGCTTGTCCAGGTCCGGTACGC-3'). Primers were selected in a region devoid of GATC sites as to not be digested by the enzymes used. Data were normalized by making the ratio N (copies of tested gene)/ N (copies of *rpoA*). Here *rpoA*, is used as the reference gene since it's present at only 1 copy per genome. Thus it gives us an indication of the number of genomes and therefore and indication on the number of copies of the intergenic region that were to be digested. The results represent the mean of two independent experiments.

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
i-cat2	5'CCTGGTAATCCGTTACCGCCAGCGCCTCTGCAATTTCTGCAAATGAGACGTTGAT CGGCACGT-3'
fooUB-sacB	5'TACTCTTCACGCAATAAGTTAAATTTAGTTTTTTATGTTGATCAAAGGGAAAAC GTCCATATGCACAGATG-3'
pI/fl-fwd	5'-CCTGGTAATCCGTTACCGCCAG-3'
fool->papI-F	5'- AATCCGTTACCGCCAGCGCCTCTGCAATTTCTGCCGTTTTCCCTCCATCATGCCTGTT CAGAAATTCC-3'
papI->fool-F	5'AATCCGTTACCGCCAGCGCCTCTGCAATTTCTGCAGTTTTCCCTCCATTATGCCTG TTCAGAAATTCC-3'
fooUB40	5'-TACTCTTCACGCAATAAGTTAAATTTAGTTTTTTATGTTG-3'
fool-fwd	5'-AGTTGTGGAAGAACAGCTTTGCCC-3'
foopB-rvs	5'-ACTTCATGATGCGCCATGTTTCCC-3'
lacZ-T7pol_fwd	5'- GCATTTTAACTTTCTTTATCACACAGGAAACAGCTACACGATTAACATCGCTAAGA AC-3'
lacZ-CAM_R	5'- CGCTCATCGCCGGTAGCCAGCGCGGATCATCGGTCAGACGATGGAGTTCTGAGGTCA TTACTG-3'
SacI-genta-F	5'-TACCGAGCTCGAATTGGCCGCGGCG-3'
AatII-genta-R	5'- ATTAGACGTGCGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCATTG ACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTAAACTGTAATGC-3'
fooDI	5'-GTATTTGCTTTATTTGCG-3'
fooR <sub>1</sub>	5'-CAAACAACAAGAATACAC-3'
Foo_prox-F	5'-CACCATGATGTTTTTATCTGAGTGTATTCTTGTTGTTTGTG-3'
fooR <sub>2</sub>	5'-GTGTATTCTTGTTGTTG-3'
Pap4-6 F	5'-TTCTCTATGTTTGCTTTATTTGTT-3'
Pap_prox-F	5'-TGCCATGATGTTTTTATCTGAGTACCCTCTTGCTATTAGTG-3'
Pap1-3 R	5'-TACTCTTCACGCAATAAGTTAAAT-3'
rpoA_F	5'-CGTATCAAAGTTCAGCGGTCGT-3'
rpoA_R	5'-CAGCTTGTCAGGTCGGTACGC-3'

**Table V : Article II, Table S1**

**Table S1**



**Movie S1: Phase variation in a growing microcolony of JH300 (*fool-foo*)**

This film shows 720 minutes (72 frames fluorescence images) of microcolony growth from a single ON cell condensed to X seconds. Images were taken every 10 minutes. Multiple ON and OFF switching events can be seen through. Medium is M9-glycerol.

**Movie S2: Phase variation in a growing microcolony of JH303 (*papI-pap*)**

This film shows 720 minutes (72 frames fluorescence images) of microcolony growth from a single ON cell condensed to X seconds. Images were taken every 10 minutes. Cells switch OFF at the star and then ON switching events can be seen at Y seconds. Medium is M9-glycerol.

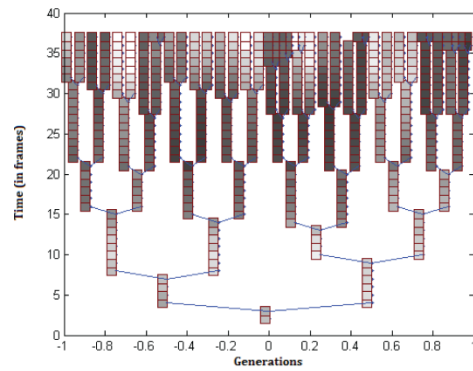
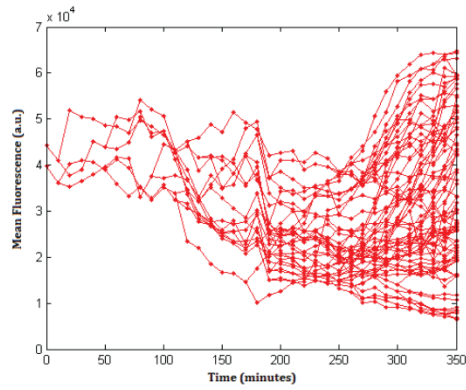
**Movie S3: Phase variation in a growing microcolony of JH304 (*fool-pap*)**

This film shows 720 minutes (72 frames fluorescence images) of microcolony growth from a single ON cell condensed to X seconds. Images were taken every 10 minutes. Multiple ON and OFF switching events can be seen through. Medium is M9-glycerol.

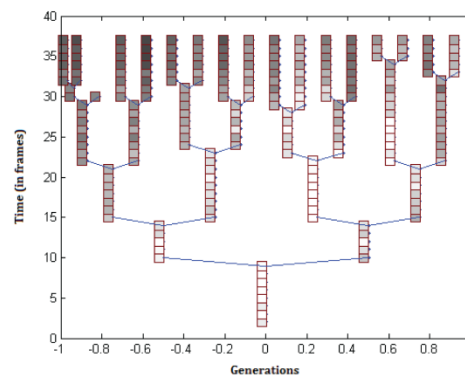
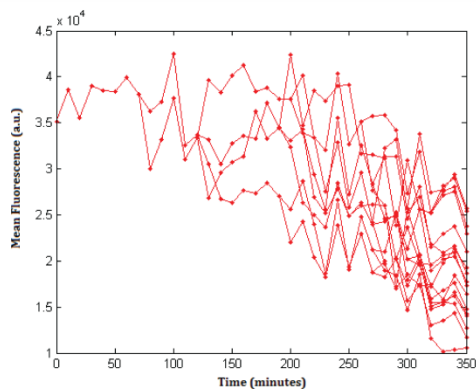
**Figure S1 Overall population expression level from the growth of microcolonies.**

(Left Panel) These graphs represent the overall expression of fluorescence over the course of the experiment for each strain. At each division, JH300 (*fool-foo*), and JH304 (*fool-pap*) lineages as the cells divide show an increase or variable intensity fluorescence whereas JH303 (*papI-pap*) lineages rather show a monotonic decrease of fluorescence. (Right Panel) These lineage trees depict generations of strains JH300 (*fool-foo*), JH303 (*papI-pap*) and JH304 (*fool-pap*). The length of the bars represents division time with each square representing a picture frame. Each graph starts at the bottom, with cells going from white (ON) to black (OFF).

### JH300 (*fool-foo*)



### JH303 (*papI-pap*)



### JH304 (*fool-pap*)

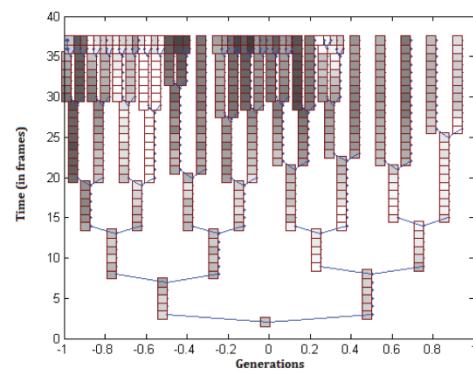
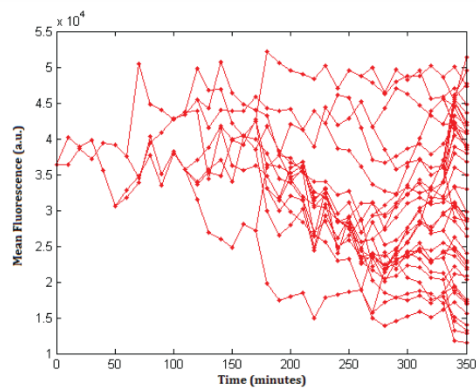


Figure 33 : Article II, Figure S1

Figure S1: Overall population expression level from the growth of microcolonies.

**Figure S2. Population distribution after cell-sorting.** Cells from each strain were sorted according to their Gfp expression pattern: low or no expression meant cells were in the OFF phase, while moderate to high expression meant the ON phase. Positive control is strain BL21DE3p and negative control is strain JH210.

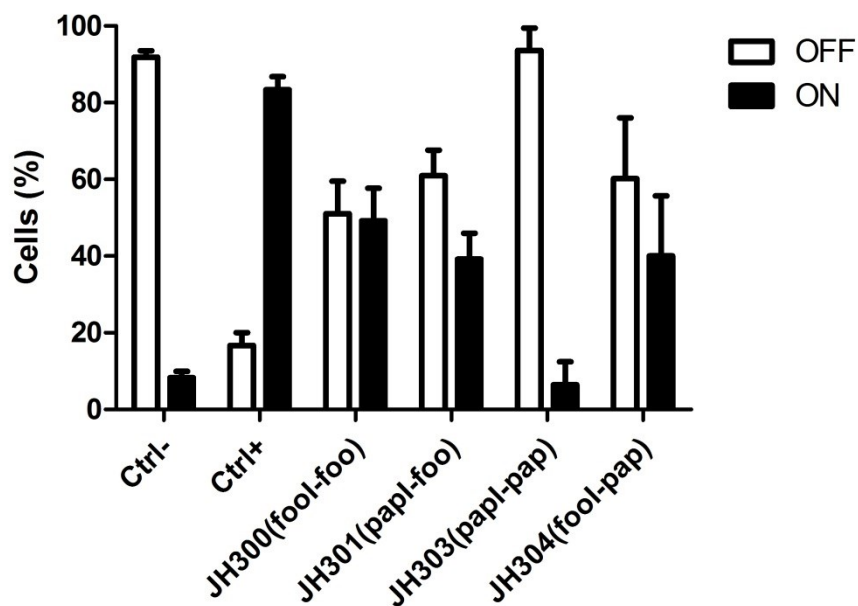


Figure 34 : Article II, Figure S2

**Figure S2 : Population distribution after cell-sorting.**

**Figure S3. Molecular model of the steps involved in P and F165<sub>1</sub> fimbriae switching event mechanism,** (adapted from Hernday et al, 2002 (9)). During phase variation Dam and Lrp compete for binding to the unmethylated switch region. Binding of Lrp to the unmethylated switch region blocks Dam, thereby preventing DNA methylation. As Lrp can also bind to hemimethylated sites, during the replication of an ON cell (Replication I), Lrp can either bind the unmethylated distal site or the hemimethylated proximal site. Binding to the proximal site leads to the OFF (or partial) state. At the second round of replication (Replication II) of the daughter cell in OFF state, Lrp will either bind hemimethylated distal or proximal sites, or unmethylated proximal site. Binding of Lrp to the proximal site will then generate cell in the OFF state and binding to the distal site will lead to cell in the ON (or partial state). The intermediate expression put in evidence with *foo* could be mainly due during ON to OFF switching of daughter cell that inherits only GFP protein and messenger RNA, which can be diluted by growth and thus decrease in concentration if the cell lineage remain in the OFF state. However the high rate of *foo* switching points out a cell population in the intermediate state.

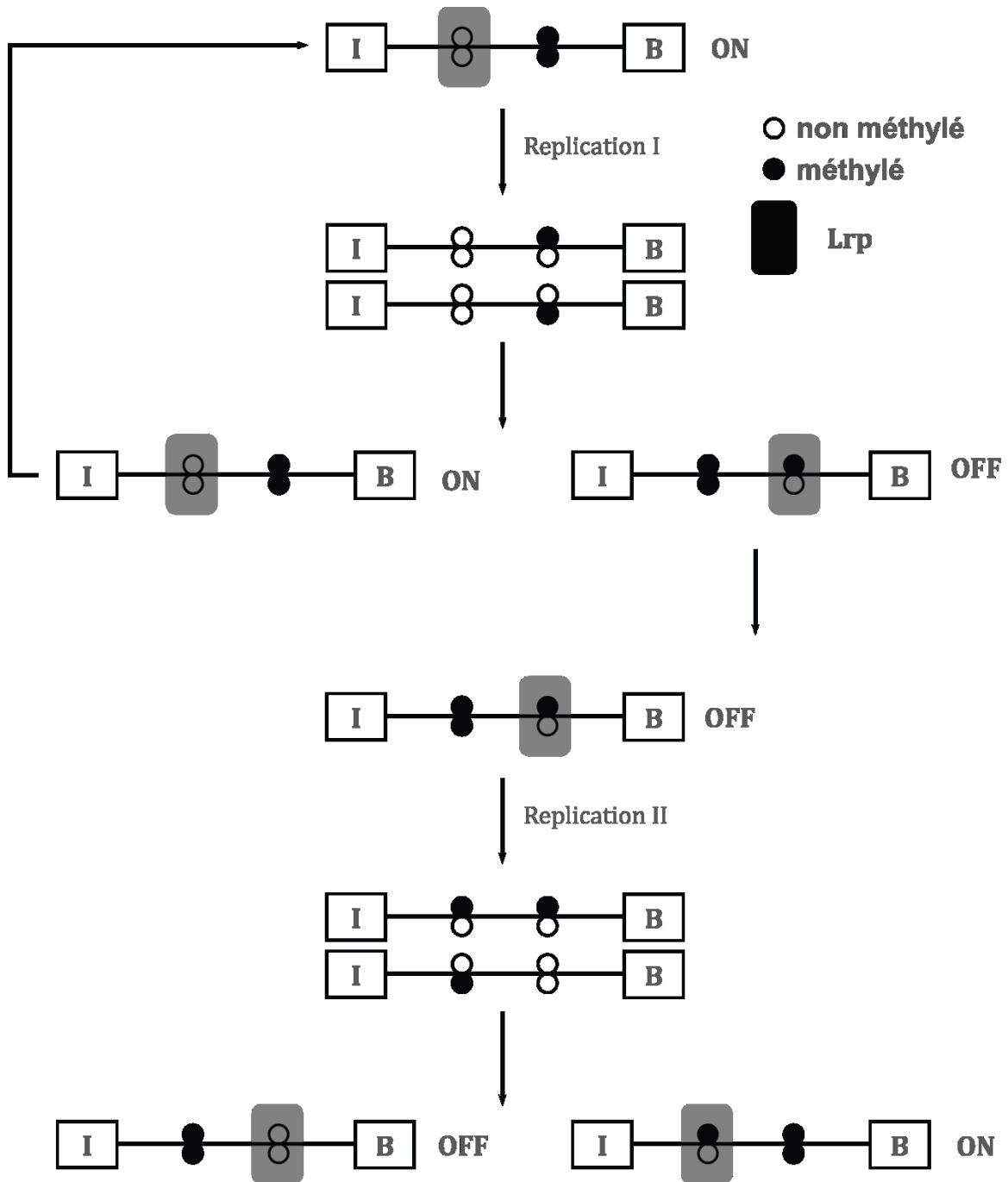


Figure 35 : Article II, Figure S3

Figure S3

**Figure S4. Differential methylation of *pap* and *foo* intergenic region.** Percentage of amplification of each GATC site, proximal (GATC<sup>prox</sup>) and distal (GATC<sup>dist</sup>), after enzymatic digestion by DpnI. Values are normalized by the amplification of a house-keeping gene (*rpoA*) that represents the number of bacterial genomes in the solution. Amplification is done on DNA from two conditions, ON and OFF cells for a *pap* and a *foo* bearing strain.

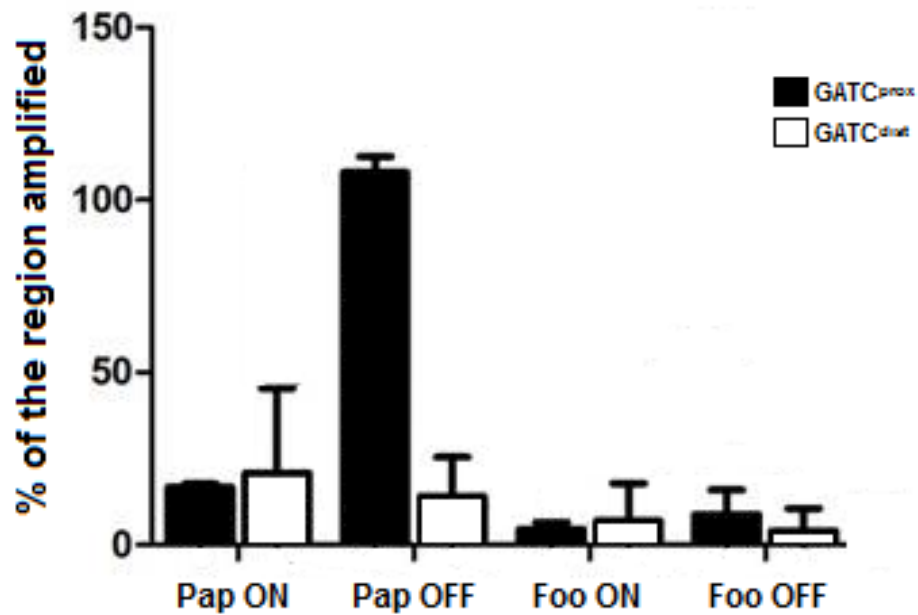


Figure 36 : Article II, Figure S4

## References

1. **Miller JH.** 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
2. **Thomason L, Court DL, Bubunenko M, Costantino N, Wilson H, Datta S, Oppenheim A.** 2007. Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 1**:Unit 1.16.
3. **Graveline R, Mourez M, Hancock MA, Martin C, Boisclair S, Harel J.** 2011. Lrp-DNA complex stability determines the level of ON cells in type P fimbriae phase variation. *Molecular microbiology* **81**:1286-1299.
4. **Braaten BA, Nou X, Kaltenbach LS, Low DA.** 1994. Methylation patterns in pap regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**:577-588.
5. **Crost C, Garrivier A, Harel J, Martin C.** 2003. Leucine-responsive regulatory protein-mediated repression of clp (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **185**:1886-1894.
6. **Harel J, Forget C, Ngeleka M, Jacques M, Fairbrother JM.** 1992. Isolation and characterization of adhesin-defective TnphoA mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F165. *Journal of general microbiology* **138**:2337-2345.
7. **Crost C, Harel J, Berthiaume F, Garrivier A, Tessier MC, Rakotoarivonina H, Martin C.** 2004. Influence of environmental cues on transcriptional regulation of foo and clp coding for F165(1) and CS31A adhesins in *Escherichia coli*. *Research in microbiology* **155**:475-482.
8. **Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y.** 2002. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes* **16**:99-110.
9. **Hernday A, Krabbe M, Braaten B, Low D.** 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99 Suppl 4**:16470-16476.



## **Section III : Discussion et conclusion**

## Discussion

Pour répondre à nos deux objectifs : 1- Démontrer la capacité de PapI et Fool à activer un système différent, dépourvu d'homologues de PapI; 2- Caractériser les différences d'activité régulatrice entre PapI et Fool, nous avons utilisé deux modèles : Tout d'abord, étudier leur effet en *trans* chez *clp* (Article I) et en second analyser la variation de phase de cellules individualisées portant *foo* et *pap* (Article II).

Le modèle de *clp* nous a permis d'évaluer l'action du régulateur spécifique I dans un système *clp* qui en est dépourvu, se faisant permettant potentiellement d'apprécier leurs actions différentes. L'analyse en cellules individualisées quant à elle a permis d'analyser au niveau de cellules individuelles la variation de phase alors que nos études précédentes utilisant le système de fusion transcriptionnelle par *lacZ* nous permettraient d'étudier la variation de phase avec des colonies. Ceci a permis de mieux évaluer le phénotype « intermédiaire » chez *foo*. Alors que *pap* est caractérisé par une conservation de la phase OFF, les colonies *foo* démontrent une tendance vers la phase ON. Toutefois, la majorité (voire la totalité) des colonies « OFF » présente un niveau d'expression minimal plus élevé que celles de *pap* : elles sont bleu pâle. D'où l'intérêt d'utiliser un système qui observe la variation de phase des cellules au niveau individuel.

### 1. PapI et Fool restaurent la variation de phase de *clp*

L'objectif de l'étude de l'Article I était de déterminer pourquoi *clp* avait un phénotype favorisant la phase OFF ainsi que de confirmer si l'ajout de PapI ou d'un de ses homologues pouvait redonner le phénotype de variation de phase chez *clp*. Grâce aux résultats de surface-plasmon resonance (SPR), nous avons pu déterminer une affinité micromolaire, donc très faible, de Lrp pour le site distal de la région intergénique de *clp*. Cela est corrélé avec l'observation d'une proportion plus faible de colonies en phase ON chez CS31A. On a aussi déterminé que PapI et son homologue Fool jouaient un rôle dans

le maintien de la phase OFF. Les deux régulateurs favorisent l'affinité et la stabilité de Lrp non seulement au site distal, mais aussi au niveau du site proximal.

Puisque la régulation de *clp* est similaire à la régulation des fimbriae de type P (Martin, 1996), nous nous sommes attardés à l'influence du régulateur PapI ainsi que son homologue Fool. À l'état naturel, le plasmide portant *clp* ne présente aucun régulateur homologue à PapI, toutefois le régulateur I est essentiel pour avoir une variation de phase (Martin, 1996). Pourtant chez la souche sauvage 31A l'expression de l'adhésine CS31A est soumise à la variation de phase. Toutefois, comme chez l'opéron *fae* (Huisman & de Graaf, 1995) la régulation de *clp* est régulée de façon négative par ClpB et Lrp (Martin, 1996). Comme la souche 31A possède aussi un opéron *pap*, nous avons supposé que la variation de phase *clp*, codant pour l'adhésine CS31A, était soumise à la régulation croisée de *pap*. Étant sous une régulation similaire à celle de *pap*, *clp* est donc sous l'influence de PapI synthétisée par l'opéron *pap*. Dès lors, nous avons voulu étudier l'influence de PapI et son homologue Fool sur *clp* et sa variation de phase (Graveline *et al.*, resoumission, Article I). Nous avons remplacé sur le plasmide ptrf1 le gène *afaF* par *papI* (ptrf6) ou *fool* (ptrf5) et l'avons inséré dans la souche MC4100.λ06 (souche portant la région intergénique de *clp* ainsi que l'opéron avec une fusion transcriptionnelle *clpB::lacZ*) (Fig. 19).

L'analyse de la variation de phase, sur les transformants qui portent les plasmides ptrf5 et 6, nous indique que la restauration de la variation de phase chez *clp* est possible, tout comme en présence du plasmide ptrf1 portant le régulateur AfaF (Martin, 1996, Crost *et al.*, 2003). Toutefois la croissance des colonies s'en trouvait ralentie, avec un minimum de temps de croissance entre 30-36h. Nous avons constaté la létalité de l'expression de Fool/PapI, car nous avons observé par induction à l'IPTG (le promoteur pTrc y est inductible) une toxicité importante sur la croissance. Ce qui corrèle des observations précédentes dans le laboratoire suggérant qu'une production importante de Fool ou PapI peut avoir un effet létal sur les cellules bactériennes. Ceci serait peut-être dû à la surproduction de « I » qui aurait non seulement un effet en combinaison avec

Lrp sur l'expression locale de *clp* mais aussi d'autres cibles géniques de Lrp dont certaines seraient impliquées dans l'homéostasie cellulaire. Il est aussi possible que I se liant à faible affinité à des sites peu spécifiques (Kawamura et al., 2011) lorsque surproduit intervient directement sur l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie cellulaire.

Cette analyse nous a permis d'évaluer la fréquence de variation de phase de *clp* en présence de PapI et FooI produites en faible quantité (Fig. 22A). On peut donc observer que FooI et PapI ont une très forte influence sur le maintien en phase OFF, beaucoup plus qu'avec AfaF (Crost et al., 2003, Crost et al., 2004, Martin, 1996). On dénote aussi une légère différence entre les taux de variation passant de OFF à ON entre PapI et FooI. Ce qui semble indiquer une plus grande capacité à promouvoir la variation de phase chez FooI. Afin de confirmer l'effet répresseur de FooI et PapI sur le système, nous avons effectué un dosage d'activité bêta-galactosidase (Fig. 22B). Ces résultats nous permettent de confirmer l'effet répresseur des deux régulateurs.

Les homologues de « I » font partie de la super-famille de régulateurs FaeA-like. La protéine FaeA est un régulateur local dans le système *fae* qui code pour l'expression d'adhésine de type K88. Cette protéine est reconnue pour réguler de façon négative conjointement à Lrp, la variation de phase de *fae* (Huisman & de Graaf, 1995). Des études plus récentes sur la structure des régulateurs homologues de PapI démontrent une plus grande homologie entre PapI et FaeA, qu'entre PapI et AfaF (Kawamura et al., 2007). Comme CS31A est reconnu comme étant similaire au système de K88 (Girardeau et al., 1988), on peut donc supposer que PapI et FooI étant proches de FaeA pourraient aussi avoir une interaction avec *clp* similaire à celle de FaeA sur *fae*.

C'est ce qui nous amène à suggérer un modèle différent de variation de phase dans le cas de *clp* qui invoquerait le phénomène de régulation croisée. Puisque chez *E. coli*, l'adhésine CS31A est souvent retrouvée avec un membre des fimbriae de type P (Pap) (Bertin et al., 2000, Crost et al., 2003), l'opéron fimbriaire Pap pourrait fournir en *trans*

de régulateur local I qui permettrait la variation de phase de *clp*. Il est important de savoir que l'opéron *clp* sans régulateur I a un certain niveau d'expression basal (Martin, 1996) (Fig. 22B) « without-PapI/FooI » est la souche MC4100.λ06 sans plasmide. Ceci indique que la présence du régulateur I permet non seulement la variation de *clp*, mais aussi sa répression.

Il est possible que chez la souche sauvage CS31A sans PapI il y a expression faible de *clp*. En effet, lorsque PapI-like de l'opéron *pap* en phase OFF n'est pas produite, CS31A serait exprimé, donc en phase ON (Fig. 33). Cela étant dû à la faible affinité de Lrp pour les sites distaux et proximaux. La phase OFF de *clp* quant à elle peut se produire lorsque PapI like est exprimé et permettrait une affinité plus importante au site proximal. (Fig 37-38).

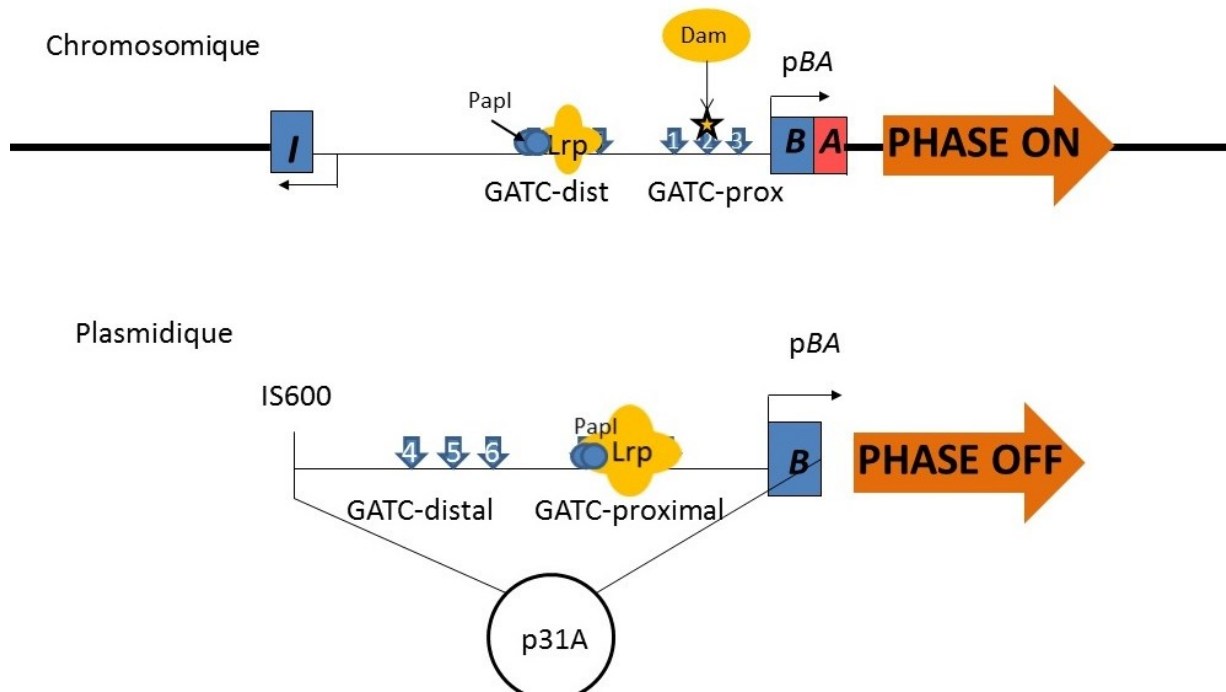


Figure 37 : Modèle schématique de régulation croisée de *clp* par régulateur PapI-like

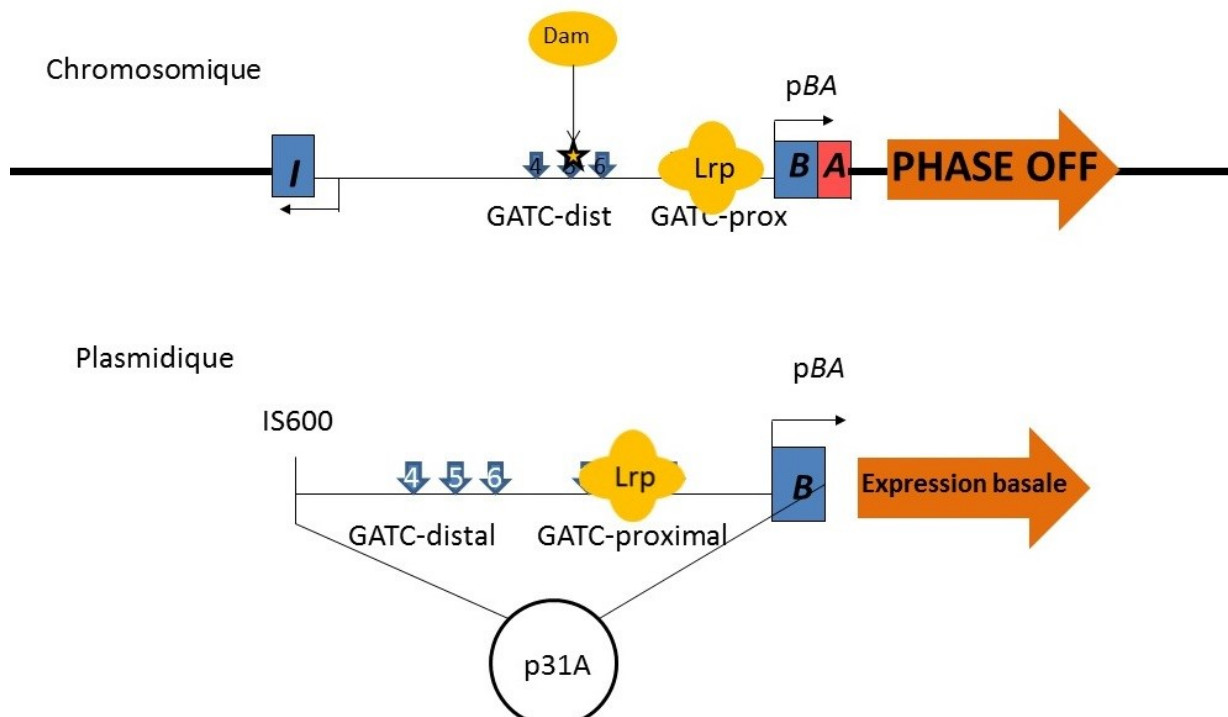


Figure 38 : Modèle schématique de régulation croisée de *clp* par régulateur PapI-like

Ce système de régulation croisée nous permet aussi de démontrer la fine régulation nécessaire et impliquée dans la lutte entre les organismes pour s'adapter dans un environnement changeant (Fig 39).

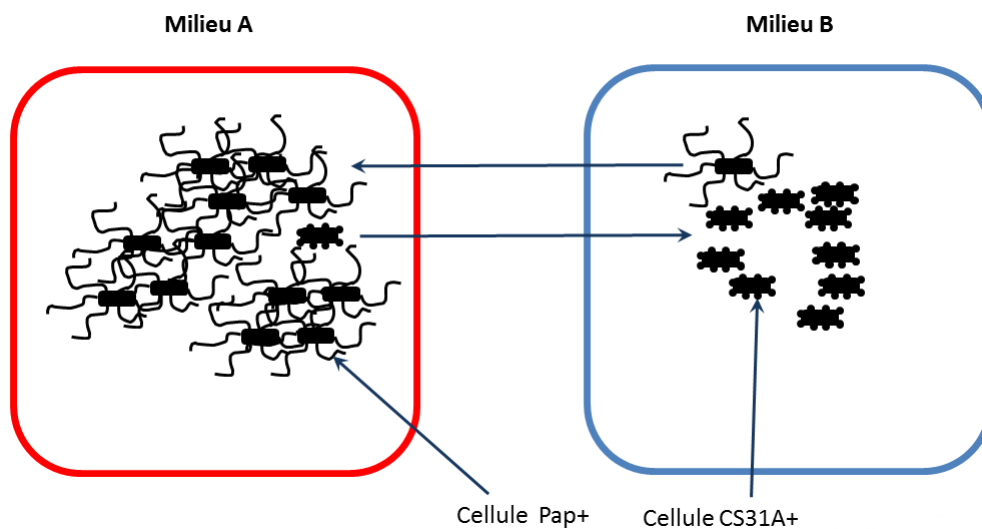


Figure 39 : Schématisation de l'adaptation entre deux milieux

L'expression faible de *clp* et rarement occurrente peut sembler un bénéfice marginal pour une population bactérienne, mais essentielle s'il advenait qu'un tel changement d'expression soit nécessaire à la survie de la population dans un changement d'environnement radical (contamination d'un nouvel hôte ou dissémination rapide à un nouveau site d'infection, ou encore évasion du système immunitaire). Comme suggéré précédemment (Totsika et al., 2008), la régulation croisée de différents fimbriae peut aussi jouer un rôle important dans leur activation séquentielle. Dans leur cas, *pap2* de CFT073 a démontré sa capacité (grâce à son régulateur PapI-2) à activer *pap1* alors que l'inverse est peu efficace. Puisque, la protéine PapI-1 n'a pas la même capacité activatrice que son homologue, cela sous-tend un système d'activation séquentielle, où l'expression de PapI-2 permet l'activation de *pap1*. Lorsque *pap2* fait le passage de ON à OFF, il peut être réactivé par PapI-1, un autre fimbriae sera activé lorsque *pap1* effectuera le changement de ON->OFF. Les régulateurs homologues de PapI ne sont pas les seuls impliqués dans cette régulation croisée, Totsika *et al* met principalement l'avant les régulateurs PapB, mais sans ignorer l'influence activatrice importante des régulateurs PapI.

Néanmoins, le système de fusion transcriptionnelle avec *lacZ*, a démontré certaines lacunes quant à l'évaluation de la variation de phase : notamment la lenteur d'apparition de colonies bleues chez *clp*, la présence de phénotypes plus hétérogènes, mais aussi les colonies « bleu-pâle » de *foo* (Graveline et al., 2011). Ce système permet de capturer le phénotype au niveau de la population et infère aux cellules le même phénotype : ce qui se produit dans le cas de *foo* où l'on donne aux colonies bleu pâle le phénotype OFF, alors que clairement de telles colonies montrent une hétérogénéité dans leur expression au niveau cellulaire individuel. Afin d'approfondir la compréhension des différences au niveau interactionnel entre PapI et FooI, nous devons utiliser un nouveau système.

## 2. L'analyse en cellule individualisée et en temps réel de *pap* et *foo*

Pour permettre de faire une analyse en temps réel et en cellules individualisées (Article II), nous avons dû modifier notre modèle de travail. Ce modèle fut construit en remplaçant les gènes *lacZYA* par celui de la T7 RNA polymérase (T7-RNAP), *T7pol*, puis en utilisant un plasmide portant *gfp* sous le contrôle d'un promoteur spécifique à T7-RNAP. Ce faisant, nous obtenions un modèle où en phase ON l'expression de *T7pol* allait générer la T7-RNAP et par le biais de *gfp* sur le plasmide, produire assez de Gfp pour couvrir le bruit de fond et ainsi donner un signal plus clair que ce que d'autres groupes avaient essayé par fusion de *gfp* au niveau chromosomique (Totsika et al., 2008).

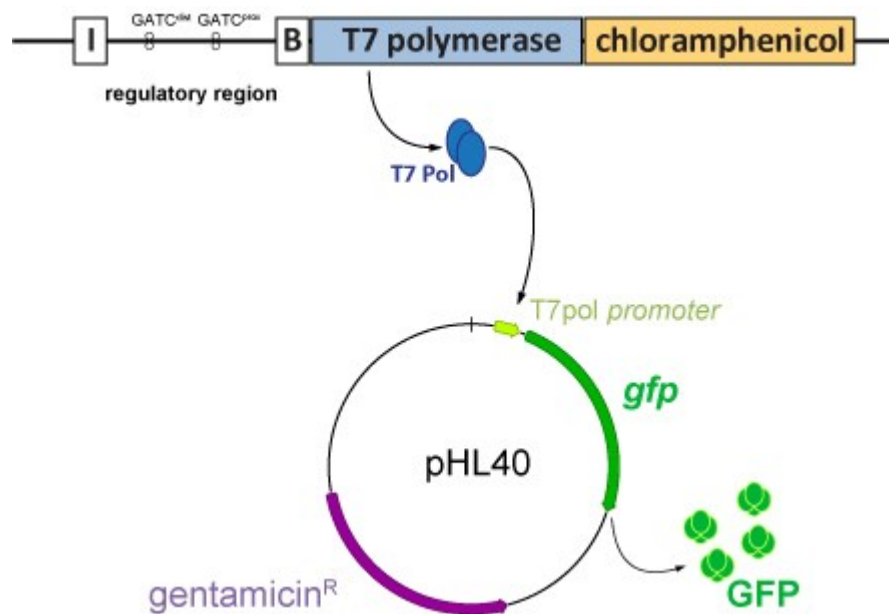


Figure 40 : Système rapporteur par Gfp  
Adapté de (Lim & van Oudenaarden, 2007)

Ce modèle fut inspiré et adapté des travaux d'un autre groupe sur *agn43* (Lim & van Oudenaarden, 2007) et sur la variation de phase des fimbriae de type 1 (Adiciptaningrum *et al.*, 2009). Par ce système nous avons obtenu 4 souches, 2 ayant le phénotype sauvage de *foo* et *pap* et 2 autres ayant un échange du régulateur spécifique I : JH300 (*fooI-foo-T7pol* ou *foo* sauvage), JH303 (*papI-pap-T7pol* ou *pap* sauvage) et JH304



(*fooI-pap-T7pol* ou *pap swap*), la souche JH301 (*papI-foo-T7pol* ou *foo swap*), comme mentionné dans l'Article I.

## 2.1 Un niveau de complexité supérieur au paradigme ON/OFF de *pap* et *foo*

L'expérience en cellules individuelles par triage cellulaire, tel que présenté en Section II, a permis tout d'abord d'identifier le taux d'expression de *gfp* au niveau de chaque cellule. Cela permet de contourner un des biais mentionnés dans la problématique. Les tests précédents de variation de phase (Graveline et al., 2011, Crost et al., 2004, Berthiaume et al., 2004, Daigle et al., 2000) ne faisaient foi que du niveau d'expression au niveau de la colonie (donc d'une population clonale). Toutefois la variation de phase est reconnue comme étant une variation phénotypique apportant des modifications au sein même d'une population clonale. Donc en utilisant un système rapporteur avec Gfp l'on pouvait contourner ce problème. Le triage cellulaire a donc permis de mettre en lumière 3 niveaux d'expression de la Gfp (Fig 30 et Table IV), un niveau élevé ( $\pm 10^4$  U.A.F) correspondant à la phase ON (comme démontré par notre contrôle positif), un niveau faible ( $\pm 10^2$  U.A.F) correspondant à la phase OFF et un troisième niveau de fluorescence se situant au milieu ( $\pm 10^3$  U.A.F) : la phase intermédiaire. La théorie veut que la variation de phase soit le passage ((Blyn *et al.*, 1990) et (Blyn *et al.*, 1989)) d'une phase vers une autre (ON-OFF) par modification au niveau de la transcription. Ce que nous avons pu observer toutefois diverge donc légèrement du consensus établi précédemment, puisque nous pouvons observer clairement (chez *foo*) 3 phases d'expression distinctes et stables dans le temps. On voit chez *pap* des cellules avec un niveau d'expression intermédiaire, toutefois cet état est plus transitoire, *pap* présentant un phénotype très conservateur de la phase OFF.

## 2.2 La phase intermédiaire n'est pas qu'un état transitoire

Ce que nos résultats nous permettent de supposer c'est que la phase intermédiaire proviendrait d'évènements de variation de phase fréquents. La variation de phase des fimbriae de type P est dépendante de la réplication et de la division cellulaire pour

survenir. Nos cellules ayant subi une croissance en milieu minimal on peut supposer qu'elles ne portent qu'un seul chromosome lors de la phase de réplication (Adiciptaningrum et al., 2009), ce qui exclut les chromosomes multiples (donc des chromosomes avec des phases différentes) comme explication pour la phase intermédiaire (INT). Des évènements fréquents de variation de phase au niveau de la région intergénique requièrent de multiples générations afin d'être observés phénotypiquement. Dans figure suivante (Fig. 41), chaque cellule possède un chromosome dont la couleur (verte ou rouge) indique la phase d'expression de la région intergénique de *pap*. Des degrés variables de vert indiquent le niveau d'expression observé en fluorescence verte par Gfp. Les cellules exprimant *pap* favorisent la phase OFF au vu de la stabilité de Lrp pour le site GATC<sup>prox</sup> (Graveline et al., 2011), à l'opposé les cellules exprimant *foo* démontrent un niveau d'expression plus élevé (par un nombre de cellules ON et INT supérieur). L'héritabilité du phénotype OFF de *pap* (A) mène à une population principalement OFF avec peu de cellules exprimant Gfp ou portant une Gfp résiduelle, les nombreuses générations conservées en phase OFF, et donc l'intervalle temporel des évènements de variation de phase étant plus importants (ou bien la fréquence d'évènements de variation de phase étant moins importante et plus portée vers la phase OFF), cela permet la dilution de la Gfp, de l'ARNm et de la T7pol dans les cellules de mêmes lignées génétiques. Les cellules exprimant *foo* au contraire démontrent une fréquence de variation de phase plus élevée ce qui corrèle avec la stabilité de Lrp sur *foo* moins importante au site GATC<sup>prox</sup> que sur *pap*. Ces nombreux évènements de variation de phase rapprochés permettent à la fois de conserver une phase ON (la cellule progénitrice étant ON), mais aussi d'obtenir un nombre important de cellules INT, puisque la dilution n'est jamais totale les cellules filles de mêmes lignées maintiennent toujours des ARNm, Gfp et T7pol résiduels, ce qui donnerait naissance au phénotype INT. C'est ce portage intergénérationnel des protéines de synthèse et des ARNm qui mènerait au retard entre le phénotype et le génotype que l'on peut observer chez les cellules INT. Ces cellules sont des cellules OFF au niveau intergénique, mais elles ont un phénotype d'expression ON. Cette phase ne peut donc survenir que lors du changement d'une phase à l'autre (ON->OFF or OFF->ON).

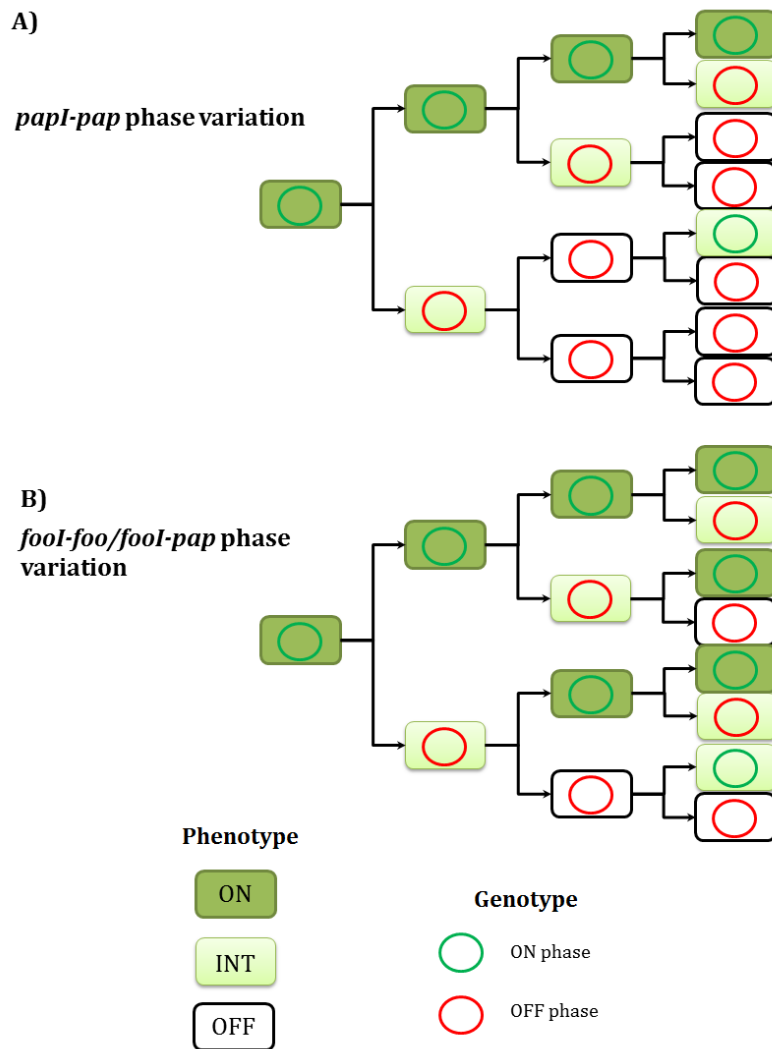


Figure 41 : Modélisation de l'hérédité phénotypique et génotypique

La phase intermédiaire n'est donc pas transitoire puisqu'elle est maintenue par de fréquents évènements de variation de phase tout au long de la croissance de la microcolonie. Pour *pap* cette phase n'est pas aussi apparente puisque les évènements ne sont pas aussi fréquents et que les phases sont donc mieux conservées de génération en génération. Cette phase intermédiaire d'expression est une piste d'explication aux colonies bleu pâle observées chez *foo* avec le modèle *lacZ* et pas chez *pap*. Cela renforce le fait que l'on ne peut pas mettre de côté l'impact des évènements stochastiques sur les cellules uniques, et comment cela se rapporte sur la population en général. Koutsoumanis et Lianou, ont démontré qu'au niveau de la cellule unique les évènements

stochastiques ont un impact important, mais que ceux-ci sont dilués dans une grande population (Koutsoumanis & Lianou, 2013). Toutefois, ils font aussi mention du fait que les infections surviennent souvent avec des doses infectieuses faibles et donc que les modèles déterministes ne prennent pas en compte toutes les variables. On peut donc poser la question de l'impact des cellules INT au niveau de l'infection.

### 2.3 Fool induit un plus haut taux de variation de phase que PapI

En suivant la descendance de chacune des souches observées, nous avons pu démontrer que des événements de variation de phase fréquents se produisent dans les souches arborant *fool* et pas *papI* puisque les souches portant *fool*, soit la souche sauvage *fool-foo* et le mutant d'inversion *fool-pap*, démontrent une descendance avec un large éventail d'expression de fluorescence, comme décrit par la Fig. 31 et 33. La souche portant *papI-pap* à l'opposé démontre une diminution systématique de son niveau de fluorescence à mesure que la majorité des cellules ont subi un événement de variation de phase vers la phase OFF et que la fluorescence se dilue lors de la division chez les cellules filles. Toutefois, comment démontrer qu'il y a réellement des événements de variation de phase fréquents ?

La variation de phase des fimbriae de type P est régulée par la compétition entre les régulateurs globaux Lrp et Dam pour la liaison à la région intergénique. La méthylation par Dam et l'attachement de Lrp sont mutuellement exclusifs. Le passage d'un site complètement méthylé à non méthylé doit passer par un cycle cellulaire où Lrp se lie au site sous forme hémiméthylée.

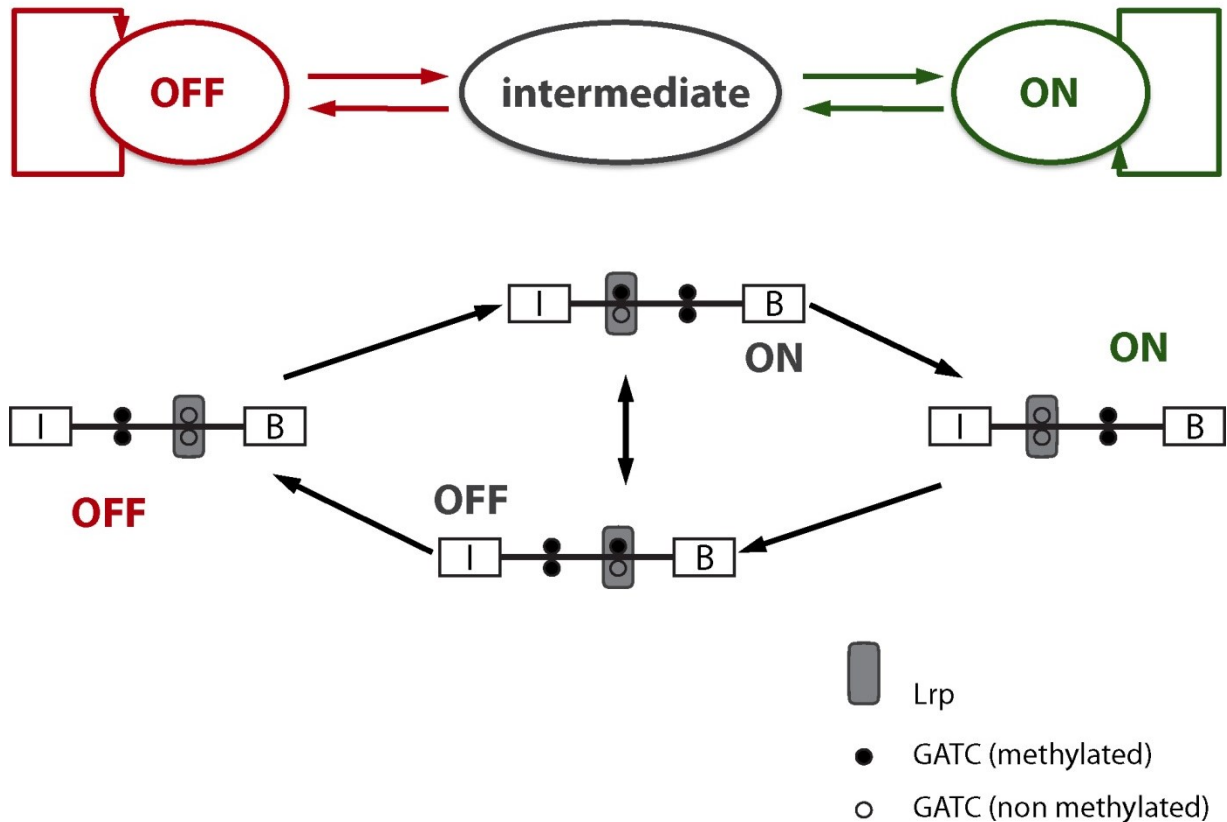


Figure 42 : Modélisation moléculaire de la variation de phase

Ce faisant, 4 situations peuvent se produire (Fig. 42) : -i- Lrp lié au site  $GATC^{dist}$  non méthylé, -ii- Lrp lié au site hémiméthylé  $GATC^{dist}$ , -iii- Lrp lié au site  $GATC^{prox}$  non méthylé et -iv- Lrp lié au site  $GATC^{prox}$  hémiméthylé. Les variations épigénétiques à étapes multiples avec des ratios de transition biaisés peuvent exister dans des configurations complexes comme démontré par Lim et van Oudenaarden avec *agn43* (Lim & van Oudenaarden, 2007). Notre système diffère toutefois de ce dernier puisque Lrp est requis pour les deux phases (ON/OFF) à l'opposé du régulateur de *agn43* nommé OxyR qui n'est requis qu'en phase OFF, étant uniquement un répresseur. Afin de déterminer l'état de méthylation de l'ADN dans différentes conditions pour *pap* et *foo* nous avons développé la méthylation différentielle par qPCR (voir Annexe II). Par digestion enzymatique sur l'ADN génomique de souches portant *pap* et *foo* nous avons pu obtenir des profils en utilisant la qPCR pour amplifier chacun des sites  $GATC^{prox}$  et

GATC<sup>dist</sup>. L'enzyme de restriction DpnI clivant les sites méthylés (et légèrement les sites hémiméthylés, 50x moins) nous l'avons utilisée afin d'obtenir les profils en Fig. 43.

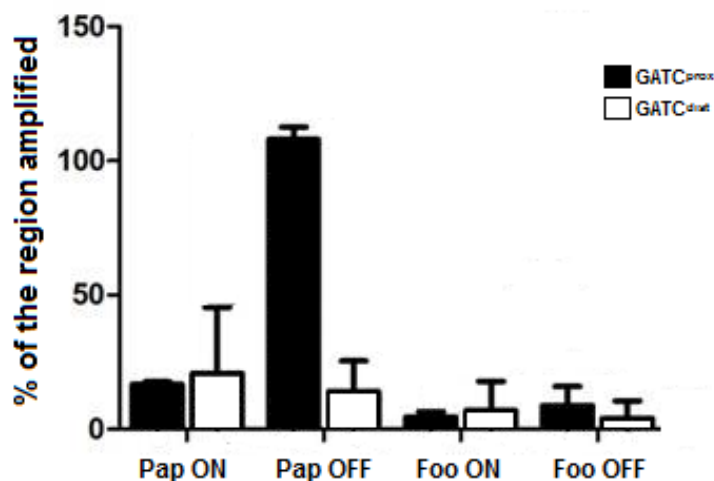


Figure 43 : Méthylation différentielle Pap vs Foo

Nous obtenons pour *pap* un profil qui correspond à la théorie, soit une protection importante de la méthylation par Lrp du site proximal et pas au site distal en phase OFF puisque Lrp se lie au site proximal pour bloquer l'accès de la RNA polymérase au promoteur. Quant à *foo* quelle que soit la phase de départ ON ou OFF de la colonie on ne retrouve pas de protection. Ceci s'expliquerait par la fréquence élevée de variation de phase des cellules *foo*. En effet, comme DpnI clive les sites hémiméthylés et les sites hémiméthylés, il est possible que la population des cellules *foo* soit de façon importante en état hémiméthylé au niveau des sites GATC de la région intergénique de *foo*. Ceci, considérant les Fig. 31-41-42, tend à soutenir la théorie selon laquelle *foo* présenterait plus d'évènements de variation de phase. Puisqu'il faut au moins deux évènements de variation de phase pour passer d'un site méthylé à non méthylé (et que l'on peut passer d'un site hémiméthylé à un autre), de fréquents changements de phase pourraient causer une augmentation importante du nombre de sites hémiméthylés.

Les souches portant *fool* démontrent donc une meilleure capacité à changer de phase, comme le démontrent leurs populations avec une grande variabilité d'expression, par rapport à *papI-pap*. Même si la différence entre les deux régulateurs n'est que d'un acide aminé (D17->N) il a déjà été démontré précédemment qu'une si simple différence peut avoir un impact sur la capacité du régulateur à cross-activer ses homologues (Totsika et al., 2008). Totsika *et al.* (Totsika et al., 2008), ont montré que I.3 (CFT073 *pap-2*), un homologue de PapI, pouvait cross-activer 3 opérons différents (dont 2 *pap*) alors que I.2 ne pouvait activer de façon aussi importante (seulement 2 des 3 au même niveau que son homologue I.3 : CFT073 *pap-1* and F1C). La protéine PapI avec laquelle nous avons travaillé est de *pap17* et est 100% identique à I.2, alors que Fool est identique à 100% à I.3. Ces résultats soutiennent nos propres observations que Fool peut activer de façon plus importante *pap* que PapI ne peut influencer *foo*.

Toutefois, le mécanisme exact grâce auquel Fool influence la phase variation par rapport à PapI est relativement peu compris. Ces deux protéines font partie de la famille de protéines conservées FaeA-like qui sont des protéines de type wHtH (winged helix-turn-helix) (Kawamura et al., 2007) (voir 4.2.2.2). La différence entre PapI et Fool étant en position 17 (D->N) (Crost et al., 2004, Berthiaume et al., 2004, Graveline et al., 2011, Daigle et al., 2000), cette position se trouve entre les deux premières hélices  $\alpha$  (Fig. 44, la flèche représentant la position de l'acide aminé différent)) (Kawamura et al., 2007).



Figure 44 : Modélisation de la structure de PapI

(Kawamura et al., 2007)

La troisième hélice a été identifiée pour sa capacité à lier le sillon majeur de l'ADN, les deux autres servant possiblement à stabiliser la liaison (Kawamura et al., 2007). La partie impliquée dans l'interaction avec Lrp est inconnue, on peut donc supposer que cette modification au niveau du brin entre les deux hélices peut avoir une influence soit sur l'interaction avec l'ADN ou avec Lrp et donc les différences observées entre PapI et FoaI. FaeA est un membre de la même famille de protéines que PapI et n'a pas la même queue au niveau de son C-terminal, et agit en tant que répresseur de *fae* et non activateur, de simples modifications peuvent donc avoir un effet important sur l'activité exacte de la protéine.

### 3. Les phénomènes stochastiques et la survie du groupe

Acar, *et al* ont déjà précédemment décrit les phénomènes stochastiques et leur importance dans la survie de *Saccharomyces cerevisiae* (Acar *et al.*, 2008). Ils y ont montré deux souches de *S. cerevisiae* l'une capable de changer rapidement de phase et l'autre lentement. La souche pouvant changer rapidement de phase démontrait une meilleure adaptation dans des milieux à fluctuation rapide à l'inverse la souche plus lente était favorisée dans les milieux plus stables. Une hétérogénéité de phénotypes dans la population a longtemps été proposée comme étant un facteur augmentant l'adaptabilité de l'organisme "fitness" (Acar et al., 2008, Blake *et al.*, 2006, Fraser & Kaern, 2009), il s'agit d'une sorte de répartition des risques (bet hedging) (Veening *et al.*, 2008, Balaban *et al.*, 2004) où un seul génotype exprime plusieurs phénotypes à variabilité diverse. La phase INT s'inscrivant dans ce type de situation, puisqu'elle permet à la cellule d'être prête à toute situation. Si la phase ON est défavorable, seuls les descendants en phase OFF ayant de moins en moins de fimbriae F165<sub>1</sub> (dans notre cas à l'étude) survivront, et vice versa. Ces cellules sont donc plus adaptables et par extension la population.

Les souches produisant F165<sub>1</sub> sont principalement opportunistes (Dezfulian *et al.*, 2004, Dezfulian *et al.*, 2003) alors que les souches causant des UTI et portant Pap ont en général un arsenal divers de facteurs de virulence, dont de nombreux différents fimbriae.



La variation de *pap* étant moins fréquente (plus lente) il est possible que son expression et son utilité soient plus niche-spécifique. Il a été récemment démontré que les fimbriae de type P (Pap) et de type 1 collaborent en synergie pour causer l'infection du glomérule (Melican *et al.*, 2011). Les fimbriae de type P seraient requis pour permettre l'attachement aux cellules épithéliales alors que les fimbriae de type 1 seraient requis afin de former le biofilm qui permet à la population bactérienne de former une structure permettant de résister à la pression du flot dans le glomérule. De plus, les fimbriae de type P sont reconnus comme ayant la capacité de réprimer l'expression des fimbriae de type 1 via la liaison de PapB sur plusieurs régions de *fim* et activer l'expression de FimE (Xia *et al.*, 2000, Holden *et al.*, 2001). Ceci favoriserait le passage de ON->OFF. De plus, PapB empêcherait aussi l'inversion de *fimS* médiée par FimB (Xia *et al.*, 2000). Le maintien de la phase OFF de *pap* pourrait donc être un facteur favorisant l'établissement de colonies bactériennes, de souches comme CFT073 (*pap+* et *fim+*) sous forme de biofilm dans sa niche spécifique (le rein) grâce à l'expression de *fim* par les cellules en phase OFF de *pap* (Melican *et al.*, 2011).

Les souches exprimant *foo* sont opportunistes et possèdent peu de facteurs de virulence. Il est possible que les souches exprimant *foo* soient aussi moins virulentes au niveau des UTI de par leur expression plus importante de *foo*. L'effet de FooB sur le contrôle de *fim* est inconnu, toutefois FooB et PapB ne sont différenciés que par 2 acides aminés (Graveline *et al.*, 2011). Nous avons démontré que FooI et PapI sont différents d'un acide aminé et ont des différences importantes au niveau de leur activité régulatrice. Il pourrait être intéressant d'étudier la régulation croisée entre *foo* et *fim* (via FooB, notamment), sur la formation de biofilms. Si l'interaction de *foo* avec *fim* est la même que *pap* (donc cause la répression de *fim* par l'action de FooB, homologue de PapB), le haut taux de variation de phase chez *foo* pourrait causer une diminution du biofilm. Cela pourrait contribuer à la sélection d'une sous population bactérienne produisant différents niveaux de F165<sub>1</sub> pour rapidement s'adapter à un environnement différent.

En 1935, Erwin Schrödinger a imaginé une expérience pour réfuter l'interprétation de Copenhague de la mécanique quantique, qui conduisait à un chat à la fois mort et vivant. Un chat est enfermé à l'intérieur d'une boîte qui contient un dispositif libérant du poison s'il détecte la désintégration d'un atome d'un corps radioactif. Si les probabilités indiquent qu'une désintégration a une chance sur deux d'avoir eu lieu au bout d'une minute, la mécanique quantique indique que, tant que l'observation n'est pas faite, l'atome est *simultanément* dans deux états (intact/désintégré). Or l'expérience de Schrodinger lie l'état du chat (mort ou vivant) à celui des particules radioactives. Ce faisant l'animal serait *simultanément* dans deux états (l'état *mort* et l'état *vivant*), jusqu'à ce que l'ouverture de la boîte (l'observation) déclenche le *choix* entre les deux états. Du coup, on ne peut absolument pas dire si le chat est mort ou non au bout d'une minute (Wheeler & Zurek, 1983, Schrödinger, 1935).

Ainsi en conservant cet état d'incertitude la population bactérienne s'adapte au changement puisqu'elle contient des cellules qui ne sont jamais de façon définitive dans un état ou l'autre. Ainsi tout comme chez le cas du chat de Schrödinger où l'on ne peut déterminer l'état de vie ou de mort du chat que par une observation. Cependant, un état cellulaire ne sera favorisé qu'en présence d'un facteur externe, tel qu'une pression de sélection. Cela s'applique par extension à la population en général. Les états stochastiques sont en quelque sorte la somme des possibilités et restent tels quels si on n'exerce aucune influence externe.

## **Conclusions**

Nos objectifs étaient de : 1- Démontrer la capacité de PapI et FooI à activer un système différent, dépourvu d'homologue de PapI ; 2- Caractériser les différences d'activité régulatrice entre PapI et FooI. Dans l'Article I nous avons clairement montré que ces deux régulateurs peuvent activer d'autres systèmes similaires lorsque fournis en *trans*, notamment avec l'opéron *clp*. Toutefois le système utilisant *lacZ* comme gène rapporteur a démontré ses limites dans sa capacité à discriminer entre l'activité de FooI

et PapI, puisque la répression était très forte menant à de faibles niveaux d'expression. C'est donc par analyse de cellules individualisées et en temps réel des systèmes génétiques *pap* et *foo* que nous avons pu caractériser les différences d'action entre PapI et FooI. Dans L'Article II nous avons pu mettre en lumière un mécanisme de variation de phase plus complexe. Soit la présence, en plus des états ON ou OFF, d'un troisième état d'expression ou plutôt de niveau de fluorescence, la phase intermédiaire (INT). L'Article II a aussi démontré que FooI semble posséder une influence positive plus importante sur la variation de phase. Ces résultats laissent supposer qu'une population de cellules *foo+* a une plus grande versatilité génétique dans l'environnement.

## **Perspectives**

Il reste toutefois de nombreuses zones grises à éclaircir notamment approfondir les données au niveau de la méthylation différentielle de *pap* et *foo* ainsi que des souches variantes afin de confirmer les différences de fréquence de variation. Le modèle moléculaire dans les souches K12 utilisées dans ce projet appliqué aux souches plus virulentes (CFT073/UTI89 pour *pap* et 4787 pour *foo*), pourrait permettre de mieux caractériser les interactions et la régulation génétique des opérons *pap* et *foo* chez une souche clinique. En comparant les souches virulentes aux données déjà établies pour *pap* et *foo*, nous pourrions ajuster le modèle à son fonctionnement dans une souche sauvage et dans ses interactions avec la régulation génétique d'un génome comprenant de plus nombreux facteurs de virulence. Afin de confirmer les résultats obtenus au niveau de l'expression fimbriaire, nous pourrions utiliser les souches virulentes et K12, portant l'opéron *pap* ou *foo* sur un plasmide, et effectuer de la cytométrie en utilisant des anticorps anti-PapA ou anti-FooA.

La microscopie multiphotonique (MPM) sur des animaux vivants est utilisée afin de visualiser en temps réel le processus d'infection bactérienne et aussi de vérifier le niveau d'expression des fimbriae (Helmchen & Denk, 2005, Melican et al., 2011, Melican & Richter-Dahlfors, 2009a, Melican & Richter-Dahlfors, 2009b, Piston, 1999). Il s'agit d'une

étape importante et d'une avancée majeure dans le domaine de l'étude de la pathogenèse d'une maladie. Dans le cas qui nous concerne, la microscopie multiphotonique permettrait d'étudier dans un modèle d'infection les interactions et le développement de la population des souches *pap+* et *foo+*, en pouvant potentiellement étudier l'impact de modifications sur la région intergénique et l'échange des régulateurs locaux PapI et Fool. En répliquant nos études dans un modèle d'infection nous pourrions ainsi valider notre modèle de régulation. Ceci permettrait de mieux appréhender le phénomène de la fréquence de variation de phase plus faible chez les souches virulentes ayant des spécificités d'organes (UPEC par exemple) et plus importantes chez les souches opportunistes ou septicémiques (*foo*).

Enfin, des expériences de double hybride ou autre méthode d'étude d'interactions biochimiques devraient être poursuivies afin de comprendre l'interaction exacte entre Lrp et PapI et l'ADN cible en relation avec la variation de phase et aussi de comprendre comment une différence d'un seul acide aminé au niveau du régulateur spécifique I peut influencer la variation de phase.

## Bibliographie

- Acar, M., J.T. Mettetal & A. van Oudenaarden, (2008) Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nat Genet* **40**: 471-475.
- Acar, M., B.F. Pando, F.H. Arnold, M.B. Elowitz & A. van Oudenaarden, (2010) A general mechanism for network-dosage compensation in gene circuits. *Science* **329**: 1656-1660.
- Adicptaningrum, A.M., I.C. Blomfield & S.J. Tans, (2009) Direct observation of type 1 fimbrial switching. *EMBO Rep* **10**: 527-532.
- Adu-Bobie, J., L.R. Trabulsi, M.M. Carneiro-Sampaio, G. Dougan & G. Frankel, (1998) Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin alpha and intimin beta from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**: 5643-5649.
- Aki, T., H.E. Choy & S. Adhya, (1996) Histone-like protein HU as a specific transcriptional regulator: co-factor role in repression of gal transcription by GAL repressor. *Genes Cells* **1**: 179-188.
- Albano, M., W.K. Smits, L.T. Ho, B. Kraigher, I. Mandic-Mulec, O.P. Kuipers & D. Dubnau, (2005) The Rok protein of *Bacillus subtilis* represses genes for cell surface and extracellular functions. *J Bacteriol* **187**: 2010-2019.
- Annane, D., E. Bellissant & J.M. Cavillon, (2005) Septic shock. *Lancet* **365**: 63-78.
- Baek, C.H., S. Wang, K.L. Roland & R. Curtiss, 3rd, (2009) Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **191**: 1278-1292.
- Baga, M., M. Goransson, S. Normark & B.E. Uhlin, (1988) Processed mRNA with differential stability in the regulation of *E. coli* pilin gene expression. *Cell* **52**: 197-206.
- Balaban, N.Q., J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik & S. Leibler, (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622-1625.
- Balazsi, G., A. van Oudenaarden & J.J. Collins, (2011) Cellular decision making and biological noise: from microbes to mammals. *Cell* **144**: 910-925.
- Balsalobre, C., J. Johansson & B.E. Uhlin, (2006) Cyclic AMP-dependent osmoregulation of crp gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 5935-5944.
- Barnard, A., A. Wolfe & S. Busby, (2004) Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Curr Opin Microbiol* **7**: 102-108.
- Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother & J. Harel, (2003) Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J Clin Microbiol* **41**: 2113-2125.

- Berthiaume, F., C. Crost, V. Labrie, C. Martin, E.B. Newman & J. Harel, (2004) Influence of L-leucine and L-alanine on Lrp regulation of *foo*, coding for F1651, a Pap homologue. *J Bacteriol* **186**: 8537-8541.
- Bertin, P., F. Hommais, E. Krin, O. Soutourina, C. Tendeng, S. Derzelle & A. Danchin, (2001) H-NS and H-NS-like proteins in Gram-negative bacteria and their multiple role in the regulation of bacterial metabolism. *Biochimie* **83**: 235-241.
- Bertin, Y., J.P. Girardeau, A. Darfeuille-Michaud & C. Martin, (2000) Epidemiological study of pap genes among diarrheagenic or septicemic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap(31A) fimbriae. *J Clin Microbiol* **38**: 1502-1509.
- Bertin, Y., C. Martin, J.P. Girardeau, P. Pohl & M. Contrepois, (1998) Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol Lett* **162**: 235-239.
- Bickle, T.A. & D.H. Kruger, (1993) Biology of DNA restriction. *Microbiol Rev* **57**: 434-450.
- Blake, W.J., G. Balazsi, M.A. Kohanski, F.J. Isaacs, K.F. Murphy, Y. Kuang, C.R. Cantor, D.R. Walt & J.J. Collins, (2006) Phenotypic consequences of promoter-mediated transcriptional noise. *Mol Cell* **24**: 853-865.
- Blomfield, I.C., (2001) The regulation of pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* **45**: 1-49.
- Blyn, L.B., B.A. Braaten & D.A. Low, (1990) Regulation of pap pilin phase variation by a mechanism involving differential dam methylation states. *EMBO J* **9**: 4045-4054.
- Blyn, L.B., B.A. Braaten, C.A. White-Ziegler, D.H. Rolfson & D.A. Low, (1989) Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *EMBO J* **8**: 613-620.
- Bock, K., M.E. Breimer, A. Brignole, G.C. Hansson, K.A. Karlsson, G. Larson, H. Leffler, B.E. Samuelsson, N. Stromberg, C.S. Eden & et al., (1985) Specificity of binding of a strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal alpha 1---4Gal-containing glycosphingolipids. *J Biol Chem* **260**: 8545-8551.
- Boye, E., A. Lobner-Olesen & K. Skarstad, (2000) Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep* **1**: 479-483.
- Browning, D.F. & S.J. Busby, (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 57-65.
- Calvo, J.M. & R.G. Matthews, (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 466-490.
- Campbell, J.L. & N. Kleckner, (1990) *E. coli* oriC and the dnaA gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell* **62**: 967-979.
- Campbell, N.A. & J.B. Reece, (2009) *Biology*, p. xlvi, 1267 p. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.

- Casadesus, J. & D. Low, (2006) Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 830-856.
- Chen, S. & J.M. Calvo, (2002) Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *J Mol Biol* **318**: 1031-1042.
- Chen, S., Z. Hao, E. Bieniek & J.M. Calvo, (2001a) Modulation of Lrp action in *Escherichia coli* by leucine: effects on non-specific binding of Lrp to DNA. *J Mol Biol* **314**: 1067-1075.
- Chen, S., M.H. Rosner & J.M. Calvo, (2001b) Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **312**: 625-635.
- Cheng, X., (1995) Structure and function of DNA methyltransferases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**: 293-318.
- Cho, B.K., C.L. Barrett, E.M. Knight, Y.S. Park & B.O. Palsson, (2008) Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 19462-19467.
- Ciampi, M.S., (2006) Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* **152**: 2515-2528.
- Contrepolis, M., Y. Bertin, J.P. Girardeau, B. Picard & P. Goulet, (1993) Clonal relationships among bovine pathogenic *Escherichia coli* producing surface antigen CS31A. *FEMS Microbiol Lett* **106**: 217-222.
- Contrepolis, M., H.C. Dubourguier, A.L. Parodi, J.P. Girardeau & J.L. Ollier, (1986) Septicaemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Vet Microbiol* **12**: 109-118.
- Contrepolis, M., J.M. Fairbrother, Y.K. Kaura & J.P. Girardeau, (1989) Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. *FEMS Microbiol Lett* **50**: 319-323.
- Crost, C., A. Garrivier, J. Harel & C. Martin, (2003) Leucine-responsive regulatory protein-mediated repression of clp (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 1886-1894.
- Crost, C., J. Harel, F. Berthiaume, A. Garrivier, M.C. Tessier, H. Rakotoarivonina & C. Martin, (2004) Influence of environmental cues on transcriptional regulation of foo and clp coding for F165(1) and CS31A adhesins in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **155**: 475-482.
- Croxen, M.A. & B.B. Finlay, (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**: 26-38.
- Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M.C. Tessier, H. Dezfulian & J. Harel, (2000) Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Res Microbiol* **151**: 563-574.
- Davidson, C.J. & M.G. Surette, (2008) Individuality in bacteria. *Annu Rev Genet* **42**: 253-268.

- de los Rios, S. & J.J. Perona, (2007) Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly. *J Mol Biol* **366**: 1589-1602.
- DeFrances, C.J. & M.N. Podgornik, (2006) 2004 National Hospital Discharge Survey. *Adv Data*: 1-19.
- Dezfulian, H., I. Batisson, J.M. Fairbrother, P.C. Lau, A. Nassar, G. Szatmari & J. Harel, (2003) Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. *J Clin Microbiol* **41**: 1375-1385.
- Dezfulian, H., D. Tremblay & J. Harel, (2004) Molecular characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) pathogenicity islands in F165-positive *E. coli* strain from a diseased animal. *FEMS Microbiol Lett* **238**: 321-332.
- Di Martino, P., Y. Bertin, J.P. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly & A. Darfeuille-Michaud, (1995) Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun* **63**: 4336-4344.
- Di Martino, P., J.P. Girardeau, M. Der Vartanian, B. Joly & A. Darfeuille-Michaud, (1997) The central variable V2 region of the CS31A major subunit is involved in the receptor-binding domain. *Infect Immun* **65**: 609-616.
- Dodson, K.W., F. Jacob-Dubuisson, R.T. Striker & S.J. Hultgren, (1993) Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3670-3674.
- Dodson, K.W., J.S. Pinkner, T. Rose, G. Magnusson, S.J. Hultgren & G. Waksman, (2001) Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell* **105**: 733-743.
- Dorman, C.J., (2009a) Global regulators and environmental adaptation in Gram-negative pathogens. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 1**: 47-50.
- Dorman, C.J., (2009b) Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv Appl Microbiol* **67**: 47-64.
- Dorman, C.J., (2010) Horizontally acquired homologues of the nucleoid-associated protein H-NS: implications for gene regulation. *Mol Microbiol* **75**: 264-267.
- Dorman, C.J. & C.P. Corcoran, (2009) Bacterial DNA topology and infectious disease. *Nucleic Acids Res* **37**: 672-678.
- Dorman, C.J. & K.A. Kane, (2009) DNA bridging and antibridging: a role for bacterial nucleoid-associated proteins in regulating the expression of laterally acquired genes. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 587-592.
- Drekonja, D.M. & J.R. Johnson, (2008) Urinary tract infections. *Prim Care* **35**: 345-367, vii.
- Fabret, C., V.A. Feher & J.A. Hoch, (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* **181**: 1975-1983.



- Fairbrother, J.M., S. Lariviere & W.M. Johnson, (1988) Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhea. *Am J Vet Res* **49**: 1325-1328.
- Fairbrother, J.M., S. Lariviere & R. Lallier, (1986) New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infect Immun* **51**: 10-15.
- Fairbrother, J.M., E. Nadeau & C.L. Gyles, (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**: 17-39.
- Forsman, K., M. Goransson & B.E. Uhlin, (1989) Autoregulation and multiple DNA interactions by a transcriptional regulatory protein in *E. coli* pili biogenesis. *EMBO J* **8**: 1271-1277.
- Foxman, B., (2002) Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* **113 Suppl 1A**: 5S-13S.
- Foxman, B., (2010) The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol* **7**: 653-660.
- Foxman, B. & P. Brown, (2003) Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect Dis Clin North Am* **17**: 227-241.
- Foxman, B., B. Gillespie, J. Koopman, L. Zhang, K. Palin, P. Tallman, J.V. Marsh, S. Spear, J.D. Sobel, M.J. Marty & C.F. Marrs, (2000) Risk factors for second urinary tract infection among college women. *Am J Epidemiol* **151**: 1194-1205.
- Frankel, G., D.C. Candy, E. Fabiani, J. Adu-Bobie, S. Gil, M. Novakova, A.D. Phillips & G. Dougan, (1995) Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 4323-4328.
- Frankel, G., O. Lider, R. Hershkoviz, A.P. Mould, S.G. Kachalsky, D.C. Candy, L. Cahalon, M.J. Humphries & G. Dougan, (1996) The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem* **271**: 20359-20364.
- Fraser, D. & M. Kaern, (2009) A chance at survival: gene expression noise and phenotypic diversification strategies. *Mol Microbiol* **71**: 1333-1340.
- Garcia-Del Portillo, F., M.G. Pucciarelli & J. Casadesus, (1999) DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11578-11583.
- Giacomodonato, M.N., S.H. Sarnacki, R.L. Caccuri, D.O. Sordelli & M.C. Cerquetti, (2004) Host response to a dam mutant of *Salmonella enterica* serovar enteritidis with a temperature-sensitive phenotype. *Infect Immun* **72**: 5498-5501.
- Girardeau, J.P., Y. Bertin, C. Martin, M. Der Vartanian & C. Boeuf, (1991) Sequence analysis of the clpG gene, which codes for surface antigen CS31A subunit: evidence of an evolutionary relationship between CS31A, K88, and F41 subunit genes. *J Bacteriol* **173**: 7673-7683.

- Girardeau, J.P., M. Der Vartanian, J.L. Ollier & M. Contrepolis, (1988) CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **56**: 2180-2188.
- Girardeau, J.P., L. Lalioui, A.M. Said, C. De Champs & C. Le Bouguenec, (2003) Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the afa-8 operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J Clin Microbiol* **41**: 218-226.
- Goransson, M., K. Forsman & B.E. Uhlin, (1988) Functional and structural homology among regulatory cistrons of pili-adhesin determinants in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **212**: 412-417.
- Goransson, M., P. Forsman, P. Nilsson & B.E. Uhlin, (1989) Upstream activating sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **3**: 1557-1565.
- Goransson, M., B. Sonden, P. Nilsson, B. Dagberg, K. Forsman, K. Emanuelsson & B.E. Uhlin, (1990) Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **344**: 682-685.
- Graveline, R., M. Mourez, M.A. Hancock, C. Martin, S. Boisclair & J. Harel, (2011) Lrp-DNA complex stability determines the level of ON cells in type P fimbriae phase variation. *Mol Microbiol* **81**: 1286-1299.
- Gyles, C.L. & J.M. Fairbrother, (2010) *Escherichia coli*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. J.F.P. C.L. Gyles, J.G. Songer, and C.O. Thoen (ed). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, pp. 267-308.
- Hantke, K., (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 172-177.
- Harel, J., F. Daigle, S. Maiti, C. Desautels, A. Labigne & J.M. Fairbrother, (1991) Occurrence of pap-, sfa-, and afa-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol Lett* **66**: 177-182.
- Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques & J.M. Fairbrother, (1992a) Isolation and characterization of adhesin-defective TnphoA mutants of septicemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-F165. *J Gen Microbiol* **138**: 2337-2345.
- Harel, J., C. Forget, J. Saint-Amand, F. Daigle, D. Dubreuil, M. Jacques & J. Fairbrother, (1992b) Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165(1), a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicemic *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **138**: 1495-1502.
- Harel, J., M. Jacques, J.M. Fairbrother, M. Bosse & C. Forget, (1995) Cloning of determinants encoding F165(2) fimbriae from porcine septicemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiology* **141** ( Pt 1): 221-228.
- Harel, J. & C. Martin, (1999) Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* **30**: 131-155.
- Heithoff, D.M., R.L. Sinsheimer, D.A. Low & M.J. Mahan, (1999) An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**: 967-970.

- Helmchen, F. & W. Denk, (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* **2**: 932-940.
- Henkin, T.M., (2000) Transcription termination control in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **3**: 149-153.
- Hernday, A., M. Krabbe, B. Braaten & D. Low, (2002) Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**: 16470-16476.
- Hernday, A.D., B.A. Braaten, G. Broitman-Maduro, P. Engelberts & D.A. Low, (2004) Regulation of the pap epigenetic switch by CpxAR: phosphorylated CpxR inhibits transition to the phase ON state by competition with Lrp. *Mol Cell* **16**: 537-547.
- Hernday, A.D., B.A. Braaten & D.A. Low, (2003) The mechanism by which DNA adenine methylase and PapI activate the pap epigenetic switch. *Mol Cell* **12**: 947-957.
- Holden, N., I.C. Blomfield, B.E. Uhlin, M. Totsika, D.H. Kulasekara & D.L. Gally, (2007) Comparative analysis of FimB and FimE recombinase activity. *Microbiology* **153**: 4138-4149.
- Holden, N.J., M. Totsika, E. Mahler, A.J. Roe, K. Catherwood, K. Lindner, U. Dobrindt & D.L. Gally, (2006) Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **152**: 1143-1153.
- Holden, N.J., B.E. Uhlin & D.L. Gally, (2001) PapB paralogues and their effect on the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **42**: 319-330.
- Hommais, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J.P. Le Caer, A. Danchin & P. Bertin, (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* **40**: 20-36.
- Huang, S.H. & A.Y. Jong, (2001) Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. *Cell Microbiol* **3**: 277-287.
- Huang, S.H., M.F. Stins & K.S. Kim, (2000) Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect* **2**: 1237-1244.
- Huisman, T.T., D. Bakker, P. Klaasen & F.K. de Graaf, (1994) Leucine-responsive regulatory protein, IS1 insertions, and the negative regulator FaeA control the expression of the fae (K88) operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **11**: 525-536.
- Huisman, T.T. & F.K. de Graaf, (1995) Negative control of fae (K88) expression by the 'global' regulator Lrp is modulated by the 'local' regulator FaeA and affected by DNA methylation. *Mol Microbiol* **16**: 943-953.
- Hultgren, S.J., F. Jacob-Dubuisson, C.H. Jones & C.I. Branden, (1993) PapD and superfamily of periplasmic immunoglobulin-like pilus chaperones. *Adv Protein Chem* **44**: 99-123.
- Hultgren, S.J., S. Normark & S.N. Abraham, (1991) Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annu Rev Microbiol* **45**: 383-415.

- Hung, C.S., J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C.G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman & S.J. Hultgren, (2002) Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* **44**: 903-915.
- Hyde, T.B., T.M. Hilger, A. Reingold, M.M. Farley, K.L. O'Brien, A. Schuchat & N. Active Bacterial Core surveillance of the Emerging Infections Program, (2002) Trends in incidence and antimicrobial resistance of early-onset sepsis: population-based surveillance in San Francisco and Atlanta. *Pediatrics* **110**: 690-695.
- Ishizuka, H., A. Hanamura, T. Inada & H. Aiba, (1994) Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. *EMBO J* **13**: 3077-3082.
- Jallat, C., A. Darfeuille-Michaud, J.P. Girardeau, C. Rich & B. Joly, (1994) Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. *Infect Immun* **62**: 2865-2873.
- Jarboe, L.R., D. Beckwith & J.C. Liao, (2004) Stochastic modeling of the phase-variable *pap* operon regulation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **88**: 189-203.
- Johnson, J.R., (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**: 80-128.
- Johnson, J.R. & T.A. Russo, (2002a) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". *J Lab Clin Med* **139**: 155-162.
- Johnson, J.R. & T.A. Russo, (2002b) Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *J Infect Dis* **186**: 859-864.
- Johnson, J.R. & T.A. Russo, (2005) Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**: 383-404.
- Jones, C.H., J.S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, A.V. Nicholes, S.N. Abraham & S.J. Hultgren, (1995) FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2081-2085.
- Kaltenbach, L.S., B.A. Braaten & D.A. Low, (1995) Specific binding of PapI to Lrp-pap DNA complexes. *J Bacteriol* **177**: 6449-6455.
- Kaper, J.B., J.P. Nataro & H.L. Mobley, (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.
- Kawamura, T., L.U. Le, H. Zhou & F.W. Dahlquist, (2007) Solution structure of *Escherichia coli* PapI, a key regulator of the *pap* pili phase variation. *J Mol Biol* **365**: 1130-1142.
- Kawamura, T., A.S. Vartanian, H. Zhou & F.W. Dahlquist, (2011) The design involved in PapI and Lrp regulation of the *pap* operon. *J Mol Biol* **409**: 311-332.
- Koutsoumanis, K.P. & A. Lianou, (2013) Stochasticity in Colonial Growth Dynamics of Individual Bacterial Cells. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2294-2301.

- Krin, E., F. Hommais, O. Soutourina, S. Ngo, A. Danchin & P. Bertin, (2001) Description and application of a rapid method for genomic DNA direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett* **199**: 229-233.
- Kucheria, R., P. Dasgupta, S.H. Sacks, M.S. Khan & N.S. Sheerin, (2005) Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J* **81**: 83-86.
- Kuehn, M.J., J. Heuser, S. Normark & S.J. Hultgren, (1992) P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* **356**: 252-255.
- Lalioui, L., M. Jouve, P. Gounon & C. Le Bouguenec, (1999) Molecular cloning and characterization of the afa-7 and afa-8 gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect Immun* **67**: 5048-5059.
- Landgraf, J.R., J. Wu & J.M. Calvo, (1996) Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6930-6936.
- Landini, P. & A.J. Zehnder, (2002) The global regulatory hns gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol* **184**: 1522-1529.
- Lane, M.C. & H.L. Mobley, (2007) Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* **72**: 19-25.
- Lässig, M., (2007) From biophysics to evolutionary genetics: statistical aspects of gene regulation. *BMC Bioinformatics* **8 Suppl 6**: S7.
- Le Bouguenec, C. & Y. Bertin, (1999) AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* **30**: 317-342.
- Le Bouguenec, C., L. Lalioui, L. du Merle, M. Jouve, P. Courcoux, S. Bouzari, R. Selvarangan, B.J. Nowicki, Y. Germani, A. Andremont, P. Gounon & M.I. Garcia, (2001) Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J Clin Microbiol* **39**: 1738-1745.
- Lim, H.N. & A. van Oudenaarden, (2007) A multistep epigenetic switch enables the stable inheritance of DNA methylation states. *Nat Genet* **39**: 269-275.
- Lindberg, F., J.M. Tennent, S.J. Hultgren, B. Lund & S. Normark, (1989) PapD, a periplasmic transport protein in P-pilus biogenesis. *J Bacteriol* **171**: 6052-6058.
- Litwin, M.S., C.S. Saigal, E.M. Yano, C. Avila, S.A. Geschwind, J.M. Hanley, G.F. Joyce, R. Madison, J. Pace, S.M. Polich, M. Wang & P. Urologic Diseases in America, (2005) Urologic diseases in America Project: analytical methods and principal findings. *J Urol* **173**: 933-937.
- Lloyd, G., P. Landini & S. Busby, (2001) Activation and repression of transcription initiation in bacteria. *Essays Biochem* **37**: 17-31.

- Loomis, W.F., Jr. & B. Magasanik, (1965) Genetic control of catabolite repression of the lac operon in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **20**: 230-234.
- Low, D.A. & J. Casadesus, (2008) Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Curr Opin Microbiol* **11**: 106-112.
- Low, D.A., N.J. Weyand & M.J. Mahan, (2001) Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun* **69**: 7197-7204.
- Maas, W.K., (1964) Studies on the Mechanism of Repression of Arginine Biosynthesis in *Escherichia coli*. Ii. Dominance of Repressibility in Diploids. *J Mol Biol* **8**: 365-370.
- Mainil, J., (2013) *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol* **152**: 2-12.
- Maiti, S.N., L. DesGroseillers, J.M. Fairbrother & J. Harel, (1994) Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165(1) of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. *Microb Pathog* **16**: 15-25.
- Marrs, C.F., L. Zhang & B. Foxman, (2005) *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett* **252**: 183-190.
- Martin, C., (1996) The clp (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level. *Mol Microbiol* **21**: 281-292.
- Martin, C., C. Boeuf & F. Bousquet, (1991) *Escherichia coli* CS31A fimbriae: molecular cloning, expression and homology with the K88 determinant. *Microb Pathog* **10**: 429-442.
- Melican, K. & A. Richter-Dahlfors, (2009a) Multiphoton imaging of host-pathogen interactions. *Biotechnol J* **4**: 804-811.
- Melican, K. & A. Richter-Dahlfors, (2009b) Real-time live imaging to study bacterial infections in vivo. *Curr Opin Microbiol* **12**: 31-36.
- Melican, K., R.M. Sandoval, A. Kader, L. Josefsson, G.A. Tanner, B.A. Molitoris & A. Richter-Dahlfors, (2011) Uropathogenic *Escherichia coli* P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. *PLoS Pathog* **7**: e1001298.
- Merckel, M.C., J. Tanskanen, S. Edelman, B. Westerlund-Wikstrom, T.K. Korhonen & A. Goldman, (2003) The structural basis of receptor-binding by *Escherichia coli* associated with diarrhea and septicemia. *J Mol Biol* **331**: 897-905.
- Mettetal, J.T. & A. van Oudenaarden, (2007) Microbiology. Necessary noise. *Science* **317**: 463-464.
- Morschhauser, J., B.E. Uhlin & J. Hacker, (1993) Transcriptional analysis and regulation of the sfa determinant coding for S fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol Gen Genet* **238**: 97-105.
- Muller, C.M., A. Aberg, J. Straseviciene, L. Emody, B.E. Uhlin & C. Balsalobre, (2009) Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog* **5**: e1000303.

- Nagy, G., A. Altenhoefer, O. Knapp, E. Maier, U. Dobrindt, G. Blum-Oehler, R. Benz, L. Emody & J. Hacker, (2006) Both alpha-haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Microbes Infect* **8**: 2006-2012.
- Nataro, J.P. & J.B. Kaper, (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Neidhardt, F.C. & R. Curtiss, (1996) *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D.C.
- Newman, E.B. & R. Lin, (1995) Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu Rev Microbiol* **49**: 747-775.
- Ngeleka, M. & J.M. Fairbrother, (1999) F165(1) fimbriae of the P fimbrial family inhibit the oxidative response of porcine neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**: 265-274.
- Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques & J.M. Fairbrother, (1992) Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect Immun* **60**: 5048-5056.
- Ngeleka, M., M. Jacques, B. Martineau-Doize, F. Daigle, J. Harel & J.M. Fairbrother, (1993) Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165(1) fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infect Immun* **61**: 836-843.
- Ngeleka, M., B. Martineau-Doize & J.M. Fairbrother, (1994) Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" F165(1) resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes in vitro: role of F165(1) fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. *Infect Immun* **62**: 398-404.
- Nielubowicz, G.R. & H.L. Mobley, (2010) Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol* **7**: 430-441.
- Nou, X., B. Braaten, L. Kaltenbach & D.A. Low, (1995) Differential binding of Lrp to two sets of pap DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **14**: 5785-5797.
- Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch & D. Low, (1993) Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. *Mol Microbiol* **7**: 545-553.
- Nudler, E. & M.E. Gottesman, (2002) Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes Cells* **7**: 755-768.
- Olsen, P.B., M.A. Schembri, D.L. Gally & P. Klemm, (1998) Differential temperature modulation by H-NS of the fimB and fimE recombinase genes which control the orientation of the type 1 fimbrial phase switch. *FEMS Microbiol Lett* **162**: 17-23.
- Ozbudak, E.M., M. Thattai, I. Kurtser, A.D. Grossman & A. van Oudenaarden, (2002) Regulation of noise in the expression of a single gene. *Nat Genet* **31**: 69-73.

- Phillips, A.D., J. Giron, S. Hicks, G. Dougan & G. Frankel, (2000) Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface. *Microbiology* **146** ( Pt 6): 1333-1344.
- Piston, D.W., (1999) Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy. *Trends Cell Biol* **9**: 66-69.
- Pourbakhsh, S.A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, C.M. Dozois, C. Desautels & J.M. Fairbrother, (1997a) Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis* **41**: 221-233.
- Pourbakhsh, S.A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize & J.M. Fairbrother, (1997b) Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol* **58**: 195-213.
- Pourbakhsh, S.A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize & J.M. Fairbrother, (1997c) Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **22**: 331-341.
- Pucciarelli, M.G., A.I. Prieto, J. Casadesus & F. Garcia-del Portillo, (2002) Envelope instability in DNA adenine methylase mutants of *Salmonella enterica*. *Microbiology* **148**: 1171-1182.
- Reisenauer, A., L.S. Kahng, S. McCollum & L. Shapiro, (1999) Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator? *J Bacteriol* **181**: 5135-5139.
- Remaut, H., R.J. Rose, T.J. Hannan, S.J. Hultgren, S.E. Radford, A.E. Ashcroft & G. Waksman, (2006) Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted beta strand displacement mechanism. *Mol Cell* **22**: 831-842.
- Rodionov, D.A., (2007) Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in bacteria. *Chem Rev* **107**: 3467-3497.
- Rodionov, D.A., P.S. Novichkov, E.D. Stavrovskaya, I.A. Rodionova, X. Li, M.D. Kazanov, D.A. Ravcheev, A.V. Gerasimova, A.E. Kazakov, G.Y. Kovaleva, E.A. Permina, O.N. Laikova, R. Overbeek, M.F. Romine, J.K. Fredrickson, A.P. Arkin, I. Dubchak, A.L. Osterman & M.S. Gelfand, (2011) Comparative genomic reconstruction of transcriptional networks controlling central metabolism in the *Shewanella* genus. *BMC Genomics* **12 Suppl 1**: S3.
- Rodriguez-Siek, K.E., C.W. Giddings, C. Doetkott, T.J. Johnson, M.K. Fakhr & L.K. Nolan, (2005a) Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* **151**: 2097-2110.
- Rodriguez-Siek, K.E., C.W. Giddings, C. Doetkott, T.J. Johnson & L.K. Nolan, (2005b) Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* **36**: 241-256.
- Ron, E.Z., (2006) Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr Opin Microbiol* **9**: 28-32.
- Rosen, D.A., T.M. Hooton, W.E. Stamm, P.A. Humphrey & S.J. Hultgren, (2007) Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med* **4**: e329.



- Russo, T.A. & J.R. Johnson, (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* **181**: 1753-1754.
- Russo, T.A. & J.R. Johnson, (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* **5**: 449-456.
- Saif, Y.M. & H.J. Barnes, (2008) *Diseases of poultry*. Blackwell Pub. Professional, Ames, Iowa.
- Salyers, A.A., A. Gupta & Y. Wang, (2004) Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* **12**: 412-416.
- Sauer, F.G., M. Barnhart, D. Choudhury, S.D. Knight, G. Waksman & S.J. Hultgren, (2000) Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 548-556.
- Scaletsky, I.C., M.L. Silva & L.R. Trabulsi, (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* **45**: 534-536.
- Schembri, M.A., P.B. Olsen & P. Klemm, (1998) Orientation-dependent enhancement by H-NS of the activity of the type 1 fimbrial phase switch promoter in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **259**: 336-344.
- Schrödinger, E., (1935) Die gegenwärtige Situation in der Quantenmechanik. *Naturwissenschaftern* **23**: 807-812; 823-823, 844-849.
- Schwartz, D.J. & S.J. Hultgren, (2012) Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and gene regulation. In: Regulation of bacterial virulence. M.L. Vasil & A.J. Darwin (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 135-155.
- Servin, A.L., (2005) Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **18**: 264-292.
- Simms, A.N. & H.L. Mobley, (2008a) Multiple genes repress motility in uropathogenic *Escherichia coli* constitutively expressing type 1 fimbriae. *J Bacteriol* **190**: 3747-3756.
- Simms, A.N. & H.L. Mobley, (2008b) PapX, a P fimbrial operon-encoded inhibitor of motility in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **76**: 4833-4841.
- Smith, J.L., P.M. Fratamico & N.W. Gunther, (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* **4**: 134-163.
- Smits, W.K., T.T. Hoa, L.W. Hamoen, O.P. Kuipers & D. Dubnau, (2007) Antirepression as a second mechanism of transcriptional activation by a minor groove binding protein. *Mol Microbiol* **64**: 368-381.
- Stulke, J. & W. Hillen, (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**: 195-201.
- Tessier, M.C., R. Graveline, C. Crost, J.A. Desabrais, C. Martin, M. Drolet & J. Harel, (2007) Effects of DNA supercoiling and topoisomerases on the expression of genes coding for F165(1), a P-like fimbriae. *FEMS Microbiol Lett* **277**: 28-36.
- Thattai, M. & A. van Oudenaarden, (2001) Intrinsic noise in gene regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8614-8619.

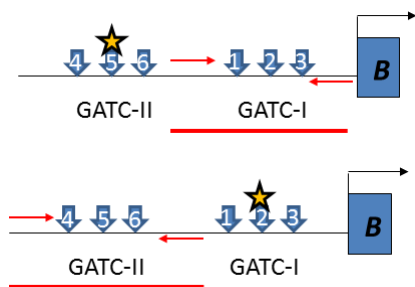
- Totsika, M., S.A. Beatson, N. Holden & D.L. Gally, (2008) Regulatory interplay between pap operons in uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **67**: 996-1011.
- Vallance, B.A. & B.B. Finlay, (2000) Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8799-8806.
- van der Woude, M.W., (2006) Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 190-197.
- van der Woude, M.W., (2011) Phase variation: how to create and coordinate population diversity. *Curr Opin Microbiol* **14**: 205-211.
- van der Woude, M.W. & A.J. Baumler, (2004) Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**: 581-611, table of contents.
- van Hijum, S.A., M.H. Medema & O.P. Kuipers, (2009) Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 481-509, Table of Contents.
- Veening, J.W., W.K. Smits & O.P. Kuipers, (2008) Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **62**: 193-210.
- Vergnano, S., M. Sharland, P. Kazembe, C. Mwansambo & P.T. Heath, (2005) Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **90**: F220-224.
- Waksman, G. & S.J. Hultgren, (2009) Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**: 765-774.
- Wheeler, J.A. & W.H. Zurek, (1983) *Quantum theory and measurement*, p. xxviii, 811 p. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- White-Ziegler, C.A., M.L. Angus Hill, B.A. Braaten, M.W. van der Woude & D.A. Low, (1998) Thermoregulation of *Escherichia coli* pap transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol Microbiol* **28**: 1121-1137.
- White-Ziegler, C.A., A. Villapakkam, K. Ronaszeki & S. Young, (2000) H-NS controls pap and daa fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J Bacteriol* **182**: 6391-6400.
- Wiles, T.J., R.R. Kulesus & M.A. Mulvey, (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **85**: 11-19.
- Wion, D. & J. Casadesus, (2006) N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol* **4**: 183-192.
- Xia, Y., D. Gally, K. Forsman-Semb & B.E. Uhlin, (2000) Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO J* **19**: 1450-1457.
- Xie, J., B. Foxman, L. Zhang & C.F. Marrs, (2006) Molecular epidemiologic identification of *Escherichia coli* genes that are potentially involved in movement of the organism from the intestinal tract to the vagina and bladder. *J Clin Microbiol* **44**: 2434-2441.

- Xie, Y., K.J. Kim & K.S. Kim, (2004) Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* **42**: 271-279.
- Yokoyama, K., S.A. Ishijima, L. Clowney, H. Koike, H. Aramaki, C. Tanaka, K. Makino & M. Suzuki, (2006) Feast/famine regulatory proteins (FFRPs): *Escherichia coli* Lrp, AsnC and related archaeal transcription factors. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 89-108.
- Yokoyama, K., H. Nogami, M. Kabasawa, S. Ebihara, A. Shimowasa, K. Hashimoto, T. Kawashima, S.A. Ishijima & M. Suzuki, (2009) The DNA-recognition mode shared by archaeal feast/famine-regulatory proteins revealed by the DNA-binding specificities of TvFL3, FL10, FL11 and Ss-LrpB. *Nucleic Acids Res* **37**: 4407-4419.
- Zhang, H., Y. Yin, V. Olman & Y. Xu, (2012) Genomic arrangement of regulons in bacterial genomes. *PLoS One* **7**: e29496.
- Zhou, B., D. Beckwith, L.R. Jarboe & J.C. Liao, (2005) Markov Chain modeling of pyelonephritis-associated pili expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Biophys J* **88**: 2541-2553.
- Zupan, J., (2005) Perinatal mortality in developing countries. *N Engl J Med* **352**: 2047-2048.

## Annexes

### 1. Méthylation différentielle

#### 1.1 Principe général



Les sites GATCprox et GATCdist de l'opéron *pap* et ses homologues *foo* et *clp*, subissent l'action de la méthylase Dam et sont protégés de son action par la protéine régulatrice Lrp. Les sites protégés par Lrp ne sont pas méthylés alors que ceux non protégés le sont. C'est cette compétition entre Dam et Lrp qui donne la variation de phase des fimbriae de type P (Pap).

En utilisant des enzymes qui coupe différentiellement les sites méthylés et non-méthylés (tel DpnI qui ne clive que les sites GATC méthylés), nous pouvons obtenir un profil de méthylation en amplifiant par qPCR chacun des sites (prox et dist) après digestion enzymatique. En normalisant le nombre de copies amplifiées ainsi obtenu avec un gène de ménage (*rpoA*), on peut définir le % de protection de chacun des sites dans notre population d'ADN. Ce % est donc un reflet du phénotype d'expression de l'opéron *pap*, ON ou OFF, des cellules.

#### 1.2 Protocole de méthylation différentielle

##### Souches

L14 (*foo*+)

DL4388 (*pap*+)

DL844  $\lambda$ 01 ( $\Delta$ lrp *foo*+)

MC4100  $\lambda$ 06 (*clp*+)

MC4100  $\lambda$ 06 + ptrf1 (clp+ afaF+)

### Amorces

Couple A (pour site distal de *foo*)

- fooDI (5'-GTATTTGCTTTATTTGCG-3')
- fooR<sub>1</sub> (5'-CAAACAACAAGAATACAC-3')

Couple B (pour site proximal *foo*)

- Foo\_prox-F (5'-CACCATGATGTTTTATCTGAGTGTATTCTTGTTGTTTGTG-3')
- fooR<sub>2</sub> (5'-GTGTATTCTTGTTGTTTG-3')

Couple C (pour site distal de *pap*)

- Pap4-6 F (5'-TTCTCTATGTTTGCTTTATTTGTT-3')
- Pap4-6 R (5'-TAATAGCAAGAGGGTACTCAGATA-3')

Couple D (pour site proximal de *pap*)

- Pap\_prox-F (5'-TGCCATGATGTTTTATCTGAGTACCCTCTTGCTATTAGTG-3')
- Pap1-3 R (5'-TACTCTTCACGCAATAAGTTAAAT-3')

Couple E (pour site distal de *clp*)

- Clp\_dist\_R2 (5'-CAAACAACAGCAAAAGCCACC-3')
- Clp\_dist\_F2 (5'-GATGAAAATCTAAATTAACGCAAAAAAC-3')
- Clp\_dist\_R (5'-ACAACAAACAACAGCAAAAGCCACC-3')
- Clp\_dist\_F (5'-GACTCTCCCTGTTTGATTTTCGTGCTT-3')

Couple F (pour site proximal de *clp*)

- Clp\_prox\_R (5'-CTCTGTTGCCGTCCTGTTTTCTGC-3')
- Clp\_prox\_F (5'-TGGTGGCTTTTGCTGTTGTTTGTGTTGT-3')

Couple Standard (pour *rpoA*)

- rpoA-F (5'-CGTATCAAAGTTCAGCGCGGTCGT-3')
- rpoA-R (5'-CAGCTTGTCCAGGTCCGTACGC-3')

### Milieu de croissance

Milieu M9 supplémenté

Pour 500ml de M9 :

- 400ml H<sub>2</sub>O milliQ,
- 100ml milieu M9 5x
- (envoyer les deux à l'autoclave séparément avant de les mélanger)
- 1000  $\mu$ l Glycérol 100%
- 1000  $\mu$ l Solution minérale (MgSO<sub>4</sub> 1g, MnCl<sub>2</sub> 0,1g, FeCl<sub>3</sub> 0,0135g, CaCl<sub>2</sub> 0,04g dans 100 ml H<sub>2</sub>O milliQ, le tout est filtré pas autoclavé)
- 1000  $\mu$ l X-gal 2% (2g de X-gal dans 100ml de NN-diméthylformamide)

- 500 µl de MgSO<sub>4</sub> 1M
- + ATB\*
- Si on fait M9-Agar, ajouter 10g d'Agar à 400ml d'H<sub>2</sub>O avant d'autoclaver

ATB	Volume dans 500 ml de milieu	Concentration	Concentration finale
Kan	400 µl	50 mg/ml	40 µg/ml
Cm			
Amp	500 µl		
Tet			
Gen			

### Standardisation

- 1- Variation de phase des 5 souches, et ce de la G0 à la G3 (le passage de la G2 à la G3 se fait de gélose à bouillon)
- 2- Extraction de l'ADN des différents bouillons (un ON et un OFF par souche), avec le DNeasy Blood & Tissue Kit.
- 3- Dosage au Nanodrop afin d'obtenir la concentration d'ADN pour l'échantillon DL4388.
- 4- De notre ADN génomique on prélève de 2 µg d'ADN (donc si la concentration est de 100 ng/µl on prend 20µl) que l'on traite par digestion enzymatique.

	Souche ON	Souche OFF	Souche ON	Souche OFF
ADN	x	x	x	x
Tampon 10x (en µl)	5	5	5	5
Sau3a (en µl)	0	0	1	1
BSA (en µl)	0	0	1	1
H2O qsp 50 µl	45 - x	45 - x	43 - x	43 - x
Total (en µl)	50	50	50	50

X = qnt de l'extrait d'ADN qui donne 2 µg

Tampon = 1 ou 4 pour Sau3a, guide indique tampon 1 comme préférentiel

La digestion se fait à 37°C pendant 1h.

Nous avons 2 réactions où il n'y a aucune digestion, mais qui forment le contrôle positif (les amorces devraient en théorie amplifier tous les fragments) et nous les traitons comme ceux sont digérés.



## Digestion par Mbo1

	L14 ON	L14 OFF	DL4388 ON	DL4388 OFF	MC4100 λ06	MC4100 λ06 + ptrf1 ON	MC4100 λ06 + ptrf1 OFF	DL844
ADN	X	X	x	x	x	x	x	x
Mbo1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tampon 4 10x (en µl)	5	5	5	5	5	5	5	5
BSA (en µl)	0	0	0	0	0	0	0	0
H2O qsp 50µl	44 - x	44 - x	44 - x	44 - x	44 - x	44 - x	44 - x	44 - x
Total (en µl)	50	50	50	50	50	50	50	50

## Digestion par Sau3a

	L14 ON	L14 OFF	DL4388 ON	DL4388 OFF	MC4100 λ06	MC4100 λ06 + ptrf1 ON	MC4100 λ06 + ptrf1 OFF	DL844
ADN	x	X	x	x	x	x	x	x
Enzyme	1	1	1	1	1	1	1	1
Tampon 1 10x (en µl)	5	5	5	5	5	5	5	5
BSA (en µl)	1	1	1	1	1	1	1	1
H2O qsp 50µl	43 - x	43 - x	43 - x	43 - x	43 - x	43 - x	43 - x	43 - x
Total (en µl)	50	50	50	50	50	50	50	50

## Aucune digestion

	L14 ON	L14 OFF	DL4388 ON	DL4388 OFF	MC4100 λ06	MC4100 λ06 + ptrf1 ON	MC4100 λ06 + ptrf1 OFF	DL844
ADN	x	X	x	x	x	x	x	x
Enzyme	0	0	0	0	0	0	0	0
Tampon 4 10x (en µl)	5	5	5	5	5	5	5	5
BSA (en µl)	0	0	0	0	0	0	0	0
H2O qsp 50µl	45 - x	45 - x	45 - x	45 - x	45 - x	45 - x	45 - x	45 - x
Total (en µl)	50	50	50	50	50	50	50	50

X = qnt en µl requise pour avoir 2 µg d'ADN



- 3- Cleanup de la réaction avec le MinElute Reaction Cleanup Protocol. Excepté qu'à la fin du protocole, l'on effectue la dernière étape du protocole dans 20 µl d'H<sub>2</sub>O.
- 4- On dose l'ADN au Nanodrop.
- 5- En vertu de la concentration, on effectue une dilution jusqu'à 50 ng/µl, de sorte que pour la réaction qPCR l'on prenne toujours 4 µl, afin d'avoir le 200ng d'ADN.
- 6-

	Échantillon	Contrôle -
ADN	4 µl	4 µl (H <sub>2</sub> O ajouté en même temps que ADN)
*Amorce Forward	1,25 µl	1,25 µl
*Amorce Reverse	1,25 µl	1,25 µl
*RNase-free H <sub>2</sub> O	3,5 µl	3,5 µl
*SYBR Green MasterMix	12,5 µl	12,5 µl
*MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	2,5 µl
Total	25 µl	25 µl

\*Mélange pour préparer le mastermix auquel on ajoutera l'ADN par la suite dans chaque tube. On en prépare pour le nombre d'échantillons+1 dans un eppendorf duquel on prendra 16 µl (20-4) à mettre dans chaque tube pour le qPCR.

- 1) L14(ON) sans enzyme + Couple A
- 2) L14(ON) +Dpn1+Couple A
- 3) L14(ON) +Sau3a+Couple A
- 4) L14(ON) +EcoR1/BamH1+Couple A (uniquement pour le premier réplikat)
- 5) L14(ON) sans enzyme + Couple B
- 6) L14(ON) +Dpn1+Couple B
- 7) L14(ON) +Sau3a+Couple B
- 8) L14(ON) +EcoR1/BamH1+Couple B (uniquement pour le premier réplikat)
- 9) L14(OFF) sans enzyme + Couple A
- 10) L14(OFF) +Dpn1+Couple A
- 11) L14(OFF) +Sau3a+Couple A
- 12) L14(OFF) +EcoR1/BamH1+Couple A (uniquement pour le premier réplikat)
- 13) L14(OFF) sans enzyme + Couple B
- 14) L14(OFF) +Dpn1+Couple B
- 15) L14(OFF) +Sau3a+Couple B
- 16) L14(OFF) +EcoR1/BamH1+Couple B (uniquement pour le premier réplikat)
- 17) DL4388(ON) sans enzyme+ Couple C
- 18) DL4388(ON) +Dpn1+Couple C
- 19) DL4388(ON) +Sau3a+ Couple C

- 20) DL4388(ON) sans enzyme+ Couple D
- 21) DL4388(ON) +Dpn1+Couple D
- 22) DL4388(ON) +Sau3a+ Couple D
- 23) DL4388(OFF) sans enzyme+ Couple C
- 24) DL4388(OFF) +Dpn1+Couple C
- 25) DL4388(OFF) +Sau3a+ Couple C
- 26) DL4388(OFF) sans enzyme+ Couple D
- 27) DL4388(OFF) +Dpn1+Couple D
- 28) DL4388(OFF) +Sau3a+ Couple D
- 29) MC4100  $\lambda$ 06 sans enzyme+ Couple E
- 30) MC4100  $\lambda$ 06 +Dpn1+Couple E
- 31) MC4100  $\lambda$ 06 +Sau3a+ Couple E
- 32) MC4100  $\lambda$ 06 sans enzyme+ Couple F
- 33) MC4100  $\lambda$ 06 +Dpn1+Couple F
- 34) MC4100  $\lambda$ 06 +Sau3a+ Couple F
- 35) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (ON) sans enzyme+ Couple E
- 36) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (ON) +Dpn1+Couple E
- 37) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (ON) +Sau3a+ Couple E
- 38) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (ON) sans enzyme+ Couple F
- 39) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (ON) +Dpn1+Couple F
- 40) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (ON) +Sau3a+ Couple F
- 41) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (OFF) sans enzyme+ Couple E
- 42) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (OFF) +Dpn1+Couple E
- 43) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (OFF) +Sau3a+ Couple E
- 44) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (OFF) sans enzyme+ Couple F
- 45) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (OFF) +Dpn1+Couple F
- 46) MC4100  $\lambda$ 06+ptrf1 (OFF) +Sau3a+ Couple F
- 47) DL844 sans enzyme+ Couple A
- 48) DL844+Dpn1+Couple A
- 49) DL844+Sau3a+ Couple A
- 50) DL844 sans enzyme+ Couple B
- 51) DL844+Dpn1+Couple B
- 52) DL844+Sau3a+ Couple B

- 7- On passe les 52 (48 pour les réplicats subséquents) échantillons précédents au qPCR.
  - 1) Sans enzyme est notre contrôle positif puisque les 2 couples d'amorces vont amplifier la totalité de la population
  - 2) Sau3a est notre contrôle négatif, car comme cet enzyme coupe les brins qu'ils soient méthylé, hémiméthylé ou non-méthylé
  - 3) Dpn1 est le test, puisqu'il coupe les sites totalement méthylés, il coupera donc les sites qui ne sont pas protégés par Lrp. Un site ainsi clivé ne permettra pas l'amplification. C'est le ratio entre l'amplification du résultat de la digestion et le non digéré qui nous donnera une idée du niveau de protection de chaque site (selon les amorces).
- 8- On répète l'expérience à partir de la variation de phase, mais sans l'étape de standardisation.

### 1.3 Protocole extraction ADN

#### **Lyse bactérienne**

- 1- Culture en LB de 18h (O/N), 5ml
- 2- Centrifuger les bactéries dans des eppendorfs (par coups de 1.5 mL) 5 min à 8000 rpm (centri de table) pour culoter
- 3- Rejet du surnageant
- 4- Resuspension du culot dans 50 µl de Tris-EDTA (TE), pH 7,4
- 5- Ajout de 200 µl de Tampon de Lyse (Tris 50mM, pH 7,3 , NaCl 0,3 M, SDS 1%, EDTA 10 mM), 5 min à 37°C)
- 6- Ajout de 10 µl RNase (1 mg/ml) par 100 µl de la suspension et incubé 30 min à 37°C
- 7- Ajout de 10ul de proteinase K (20mg/ml) et incubé 30min à 65°C

**Tampon de Lyse**

Tris 50 mM pH 7,3	25ml (Tris 1M)
NaCl 0,3 M	30ml (de 5 M)
SDS 1%	5ml à 10%
EDTA 10 mM	10ml à 0,5M
QSP 500ml	430 ml H <sub>2</sub> O milliQ

10 ou 100 ml sont suffisants

**\*\*\* Tampon de Lyse :****Concentration finale**

- Tris-Cl 1M pH7,4	500ul	- Tris-Cl pH7,4	50mM
- NaCl	0,175g	- NaCl	0,3M
- SDS 10%	1 ml	- SDS	1%
- EDTA 0,5M pH8	200ul	- EDTA	10mM

Compléter le volume à 10 ml avec de l'eau

**Déprotéinisation**

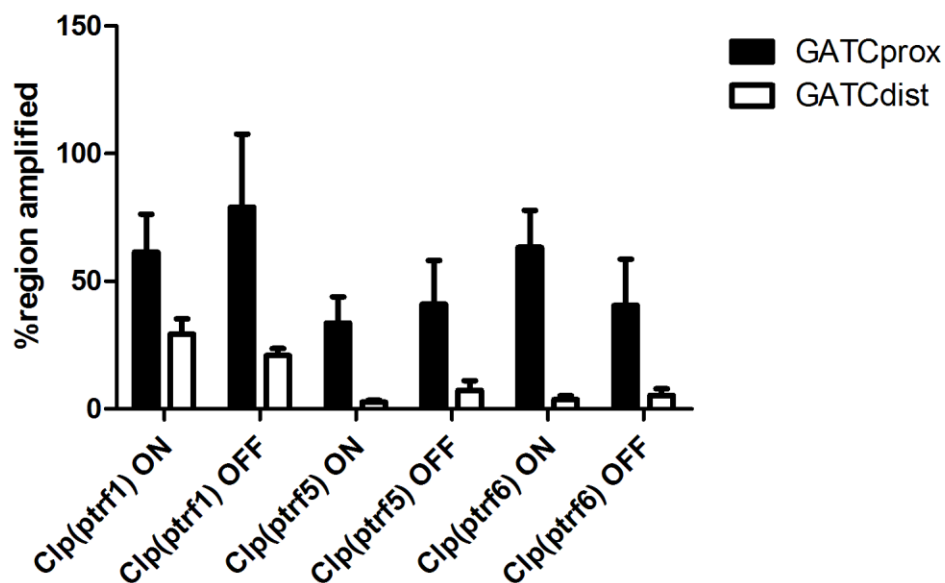
- 1- Ajout de 250 µl de phenol saturé en tampon de lyse/TE/TES
- 2- Agitation douce (par inversion) 10 min
- 3- Centrifugation 10 min à 8000 rpm
- 4- Récupération du surnageant, si nécessaire ajouter de l'eau pour remettre le volume à 250 µl  
(Refaire les Étapes 1 à 4 une deuxième fois)
- 5- Ajout de 250 µl phénol-chloroforme-isoamylalcool
- 6- Agitation douce 5 min
- 7- Centrifugation 10 min à 8000 rpm
- 8- Récupération du surnageant, si nécessaire ajouter de l'eau pour remettre le volume à 250ul
- 9- Ajout de 250 µl de chloroforme+isoamylalcool
- 10- Agiter légèrement par inversion
- 11- Centrifugation 10 min à 8000 rpm
- 12- Récupération du surnageant

### **Precipitation à l'alcool**

- 1- Ajout de 2.5 volumes d'éthanol absolu (conserve à -20°C) + acétate de sodium () à une concentration finale de X% au surnageant
- 2- Précipitation de l'ADN durant 30 min à -80°C ou une nuit à -20°C, ou bain ethanol/glace sèche 5 min
- 3- Centrifugation 15 min à 10000 rpm à 4°C
- 4- Culot resuspendu dans ethanol 70° (70%) (préparer l'alcool frais et conserve à 4°C ou -20°C
- 5- Centrifugation 15 min à 10000 rpm à 4°C
- 6- Élimination du surnageant
- 7- Culot sécher à l'air 10-20 min
- 8- Resuspendre dans 100-200 ul d'H<sub>2</sub>O ou TE
- 9- Dosage au nanodrop

### **Purification** \*uniquement si qualité de l'ADN n'est pas satisfaisante

- 1- Ajout de phénol-chloroforme-isoamylalcool (v/v)
  - 2- Agitation douce 10 min
  - 3- Centrifugation 15 min à 10000 rpm
  - 4- Récupération du surnageant
  - 5- Ajout d'acétate de sodium 0,3 M à 10%, pH 5,2
  - 6- Ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu (conserve à -20°C), 30 min à -80°C ou une nuit à -20°C, ou bain ethanol/glace sèche 5 min
  - 7- Centrifugation 15 min à 10000 rpm à 4°C
  - 8- Culot repris dans de l'éthanol à 70° (70%)
  - 10-Centrifugation 15 min à 10000 rpm à 4°C
  - 11-Élimination du surnageant
  - 12-Culot sécher à l'air 10-20 min
- Culot repris dans un volume d'eau distillée ou de TE
- Moyenne 500ng/ml, 1000ng/ml

1.4 Résultats pour *clp*

## 2. Protocole de Cytométrie en flux et Microscopie à Fluorescence

**Souches Cytométrie**\*JH300 + pHL40 (*fool-foo-T7pol*)JH301 + pHL40 (*papl-foo-T7pol*)\*JH303 + pHL40 (*papl-pap-T7pol*)\*JH304 + pHL40 (*fool-pap-T7pol*)

L14 + pHL40 (contrôle négatif)

BL21DE3 + pHL40 (contrôle positif)

L14 (background bactérien)

\*souches pour microscopie

**Matériel**

Géloses LB+Gentamicin (10µg/ml)

Géloses M9+0,2% Glycérol+ Gentamicin (10µg/ml)

Agar 2% (volume d'H<sub>2</sub>O MilliQ + 2% Agar)

Solution M9-salts 5x

Solution Minérale

MgSO<sub>4</sub> = 1g

MnCl<sub>2</sub> = 0,1g

FeCl<sub>3</sub> = 0,0135g

CaCl<sub>2</sub> = 0,04g

Eau = 100 mL

Filtrer, ne pas autoclaver

Glycérol 50%

Gentamicin 25mg/ml (solution mère)

Solution de PBS 1x(150ml)

Milieu M9-glycérol liquide

0,2% Glycérol

0,2% Solution Minérale

0,1% MgSO<sub>4</sub> 1M

20% Solution M9 Minimal salts 5x

+ATB

79,5% H<sub>2</sub>O MilliQ

Milieu M9-Agar

Ingrédients idem à milieu liquide

+2% Agar pour milieu M9 solide

Glycérol, MgSO<sub>4</sub> et M9 5x sont ajoutés après l'autoclave au mélange H<sub>2</sub>O+Agar

### **Matériel Microscopie**

Isolateurs en Silicone (Grace Biolabs) (19 mm x 32 mm x 1.0 mm depth)

Sigmacote (Sigma)

Lamelles de microscope 22mm x 60mm (Fisher)

## **Protocole commun aux 2 expériences (cytométrie et microscopie)**

### Jour 1

- ensemencer les souches utilisées sur géloses LB+Gm
- incubation O/N à 37°C

### Jour 2

- passer par stries les souches du milieu LB au milieu M9+Gm
- incubation pour 24h à 37°C

## **Cytométrie**

### Jour 3

- inoculation de quelques colonies de chacune des souches dans 1ml de PBS
- séparation des cellules par BectonDickinson FACSort flow cytometer (488-nm excitation laser; 525-nm emission filter)
- De 10000 à 100000 cellules (ON et OFF) sont inoculées dans 1ml de milieu M9-glycérol liquide
- incubation à 37°C pour 20h

### Jour 4

- Collection des données pour 20000 cellules par souche avec BectonDickinson FACScalibur flow cytometer (488-nm excitation laser; 525-nm emission filter).
- Conversion des données au format ASCII avec MFI (E. Martz, University of Massachusetts, Amherst)
- Analyse par FlowJo (Tree Star, Inc.)



## Microscopie

### Jour 2

- Fixation d'un isolateur en silicone sur une lame de microscope
- Revêtement d'une lamelle de microscope (22mm x 60mm) d'une mince couche de silice avec du Sigmacote (à faire sous hotte chimique)
- Préparation de mélange pour géloses M9-glycérol dans un falcon 15ml

### Travailler Stérilement

- Déposer de 650-700µl du mélange chaud au centre de l'isolateur
- Apposer la lamelle (rapidement, mais doucement) sur l'agar de sorte à l'étendre afin d'occuper toute la surface
- Attendre 2-3 min
- Conserver les lamelles à 4°C

### Jour 3

#### JUSTE AVANT L'OBSERVATION AU MICROSCOPE

- Inoculation de quelques colonies de chacune des souches dans 1ml de PBS ou de Milieu M9 liquide
- Dilution 1/100
- Mettre dans la chambre à 37°C durant 30min
- Retirer la lamelle d'une des lames
- Couper des bouts de la surface d'agar afin d'obtenir une bande de 19 mm x 15 mm
- Déposer 5µl de la solution mère de bactéries (non diluée)
- Déposer une nouvelle lamelle
- Effectuer le focus jusqu'à 1000x sur les cellules fluorescentes
- Retirer la lamelle d'une des lames
- Couper des bouts de la surface d'agar afin d'obtenir une bande de 19 mm x 15 mm
- Déposer 5µl de la solution 1/100
- Observer à 1000x, trouver un champ où il y a des bactéries fluorescentes (ON) bien isolées
- Observation durant 10-12h, avec des photos prises aux 10 min