

Université de Montréal

Régulation transcriptionnelle de l'opéron *foo*  
chez *Escherichia coli*: rôle de la topologie  
de l'ADN dans l'expression de F165<sub>1</sub>.

par

MARIE-CATHERINE TESSIER

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Août, 2001

©Marie-Catherine Tessier, 2001



SF

607

U54

2002

v.008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Régulation transcriptionnelle de l'opéron *foo*  
chez *Escherichia coli*: rôle de la topologie  
de l'ADN dans l'expression de F165<sub>1</sub>.

par

MARIE-CATHERINE TESSIER

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mario Jacques, président du jury

Josée Harel, directrice de recherche

Marc Drolet, codirecteur de recherche

George Szatmari, membre du jury

Mémoire accepté le .....

## Sommaire

Le facteur de virulence fimbriaire F165<sub>1</sub> (type P), codé par l'opéron *foo*, est entre autres retrouvé chez la souche pathogène porcine *Escherichia coli* 4787. L'expression de *foo* est influencée par le degré du surenroulement de l'ADN, tant au niveau local que global. Plus précisément, des études précédentes ont démontré que l'activité transcriptionnelle à partir du promoteur *fooBp* est affectée par le surenroulement local généré par l'expression de *tetA* sur un plasmide chez un mutant *topA*. L'expression à partir de *fooBp* est également sensible aux modifications du niveau global du surenroulement causées par des mutations *gyrB*.

Il a aussi été observé que l'expression de *foo* est influencée par les conditions environnementales. Puisque les facteurs environnementaux (température, osmolarité, pH, tension d'oxygène, etc.) affectent le niveau du surenroulement de l'ADN, les fluctuations du surenroulement pourraient ainsi réguler l'expression des déterminants de virulence chez les organismes pathogènes, dont, entre autres, celle du fimbriae F165<sub>1</sub> chez *E. coli* 4787.

Puisque les études précédentes sur la réponse de *foo* au surenroulement de l'ADN avaient été réalisées en multicopie sur plasmide, et que la réponse d'un promoteur au surenroulement peut varier selon le contexte plasmidique ou chromosomique, il s'avère crucial d'étudier, en simple copie, la sensibilité de la région régulatrice *foo* aux modifications du degré du surenroulement chromosomique.

Une telle étude, réalisée grâce à des souches isogéniques portant des mutations *gyrB225* et/ou  $\Delta topA$ , a révélé que le promoteur *fooBp* est sensible au surenroulement de l'ADN, tant au niveau local que global, tant dans son taux de transcription basale que dans son mécanisme de la variation de phase. De plus, il a été noté que le site GATC-I de la région intercistronique était, en proportion, plus méthylé en l'absence de topoisomérase I qu'en sa présence.

Puisque des promoteurs orientés de façon divergente peuvent mutuellement s'influencer grâce au surenroulement généré localement par la transcription et que les gènes *fooI* et *fooB* sont transcrits en directions opposées, le couplage transcriptionnel entre ces promoteurs a été étudié. L'activité du promoteur *fooBp* n'est négativement affectée par la transcription à partir du promoteur divergent *fooIp* que dans un environnement génétique  $\Delta topA$ , lorsque *fooI* est présent en *cis*. Le rôle activateur de *FooI*, un homologue de *PapI*, sur l'activité transcriptionnelle à *fooBp* a été confirmé lors son expression en *trans*.

Par ailleurs, il a été démontré que l'activité de *fooBp* est positivement influencée par la transcription divergente d'une cassette *tetA*. La substitution du promoteur divergent sauvage *fooIp* par le promoteur plus fort *trcp* a significativement accru le taux transcriptionnel à partir de *fooBp*. Ainsi, *fooBp* répond au surenroulement négatif local généré par la transcription divergente à partir d'un promoteur fort.

Ainsi, en tant que réponse adaptative aux changements environnementaux, la sensibilité de *fooBp* au degré du surenroulement de l'ADN pourrait permettre à la souche pathogène *E. coli* 4787 d'exprimer adéquatement le fimbriae F165<sub>1</sub> en vue d'établir avec succès la colonisation et l'infection d'un hôte.

**Mots clés:** *Escherichia coli* / septicémique/ fimbriae / régulation / surenroulement de l'ADN / variation de phase / méthylation / transcription divergente.

## Table des matières

<b>Identification du Jury</b> .....	<b>ii</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>xii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Dédicace</b> .....	<b>xvii</b>
<b>SECTION I - Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Revue de littérature</b> .....	<b>2</b>
1. <i>Escherichia coli</i> pathogène : les infections intestinales et extraintestinales : généralités .....	2
1.2. La souche pathogène à l'étude : <i>Escherichia coli</i> 4787 .....	3
2. L'interaction hôte-microorganisme.....	4
2.1. Le fimbriae P et la transduction du signal via AirS dans l'ITU .....	5
3. La virulence : définition, déterminants et variabilité génétique.....	7
4. Les adhésines .....	9
4.1. Les fimbriae de <i>E. coli</i> extraintestinal.....	10
4.1.2. Les fimbriae de type P.....	11
4.1.2.1. Les fimbriae de la famille P : Pap, Prs et F165 <sub>1</sub> .....	11
4.1.2.2. La structure du fimbriae Pap.....	11
4.1.2.3. La structure et l'organisation génétique de l'opéron <i>pap</i> .....	12
4.1.2.4. La biogenèse du fimbriae Pap et l'implication de Cpx et $\sigma$ E .....	13
4.1.3. La régulation de l'expression du fimbriae Pap .....	16
4.1.3.1. La variation de phase .....	17
4.1.3.2. Le mécanisme de la variation de phase chez l'opéron <i>pap</i> .....	18
4.1.3.3. La méthylation par la Dam.....	20
4.1.3.4. Lrp.....	23
4.1.3.5. Les protéines fimbriaires de régulation : PapI et PapB.....	26
4.1.3.5.1. PapB .....	26
4.1.3.5.2. PapI .....	28
4.1.3.6. La répression catabolique.....	31
4.1.3.7. La thermorégulation du fimbriae Pap .....	34
4.1.3.8. La régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm <i>papBA</i> .....	37
4.1.4. Le fimbriae F165 <sub>1</sub> : généralités.....	38
4.1.4.1. La structure et l'organisation génétique de l'opéron fimbriaire <i>foo</i> .....	38
4.1.4.2. La régulation de l'opéron fimbriaire <i>foo</i> .....	39
5. L'ARN pol et les promoteurs.....	40
5.1. La régulation génétique en relation avec la topologie de l'ADN.....	43

5.2. Influence des conditions environnementales sur le surenroulement de l'ADN....	44
6. Le génome bactérien .....	45
6.1.1. Densité superhélicoïdale .....	46
6.1.2. Domaines chromosomiques .....	48
6.1.3. Ancrage de l'ADN à la membrane cytoplasmique .....	49
6.1.4. Entassement macromoléculaire.....	50
6.1.5. Protéine HU.....	50
6.1.6. Protéine H-NS .....	51
6.1.7. IHF .....	52
6.1.8. FIS.....	53
6.2. La molécule d'ADN et ses propriétés .....	54
6.3. Topoisomérases bactériennes : généralités .....	56
6.3.1. Topoisomérase I.....	57
6.3.2. Topoisomérase II.....	59
6.3.3. Topoisomérase III .....	63
6.3.4. Topoisomérase IV .....	64
7. L'ADN et l'expression génétique .....	65
7.1. L'expression génétique et la topologie de l'ADN chez la bactérie .....	65
7.2. Le contrôle homéostatique du niveau du surenroulement de l'ADN.....	66
7.3. Les changements conformationnels de l'ADN lors de la transcription .....	67
7.3.1. Le surenroulement de la matrice d'ADN généré par la transcription .....	68
7.3.1.1. Le modèle des domaines jumeaux surenroulés.....	68
7.3.1.2. Les régions de surenroulement localisées .....	70
7.3.1.3. L'interdépendance des unités transcriptionnelles adjacentes.....	71
7.3.1.4. Le surenroulement transcriptionnel et la formation de boucles-R .....	72
7.4. Le degré de surenroulement de l'ADN et la susceptibilité transcriptionnelle .....	74
7.4.1. Certains promoteurs sensibles au surenroulement de l'ADN.....	76
7.4.1.1. Le cas du promoteur <i>leu-500p</i> .....	77
7.4.2. Les promoteurs divergents .....	81
7.4.3. Le surenroulement de l'ADN et l'expression des gènes de virulence .....	83
<b>Problématique .....</b>	<b>85</b>
<b>SECTION II-Articles .....</b>	<b>87</b>
<b>Article 1.....</b>	<b>88</b>
<i>Escherichia coli</i> 4787 <i>foo</i> Operon Responsiveness to DNA Supercoiling Level: Basal Transcription, Phase Variation, DNA Methylation Pattern, and <i>FooI</i> Activator Role. 89	
Abstract .....	90
Introduction.....	91
Material and Methods .....	93
Culture media.....	93
Plasmid fusions .....	93
Chromosomal insertion of fusions .....	95
Assays of $\beta$ -galactosidase activity .....	95
DNA Methylation Patterns.....	96
Phase Transition Rates Calculation in MT008, MT009 and MT010 Strains.....	97
Results .....	98
DNA Supercoiling Level Influence on <i>fooBp</i> Activity.....	98

DNA Supercoiling Level Influence on <i>fooIB</i> Phase Variation .....	98
DNA Supercoiling Level Influence on GATC-I and GATC-II Sites Methylation Patterns in <i>fooIB</i> Regulatory Region.....	99
Roles of <i>FooI</i> regulator and of <i>fooI</i> Divergent Transcription on <i>fooBp</i> Activity	100
Discussion .....	102
Global DNA Supercoiling Influences <i>fooBp</i> Activity .....	102
Local DNA Supercoiling Influences <i>fooBp</i> Activity .....	103
DNA Supercoiling Level Influence on <i>fooIB</i> Phase Variation .....	103
DNA Supercoiling Level Increases <i>foo</i> GATC-I Methylation Ratio in $\Delta topA$ <i>gyrB225</i> Mutant .....	104
Influence of <i>fooI</i> Divergent Transcription on <i>fooBp</i> Activity.....	105
<i>FooI</i> Activator Role on <i>fooBp</i> Activity .....	106
Conclusion.....	108
Acknowledgements .....	109
References .....	110
Tables and Figures .....	113
<b>Article 2.....</b>	<b>126</b>
Divergent Transcription Influences <i>fooBp</i> Activity in <i>Escherichia coli foo</i> Operon: the Strong <i>trcp</i> Counteracts the Requirement for <i>FooI</i> Activator Protein in <i>topA</i> <sup>+</sup> Strains and <i>tetA</i> Expression Overcomes the Effect of <i>gyrB225</i> Mutation. ....	127
Abstract .....	128
Introduction .....	129
Material and methods .....	132
Culture media .....	132
Plasmid fusions .....	132
Chromosomal insertion of fusions .....	134
Assay of $\beta$ -galactosidase activity .....	135
Results .....	136
Influence of <i>trcp</i> Divergent Promoter Strength on <i>fooBp</i> Activity .....	136
<i>tetA</i> Divergent Transcription Influence on <i>fooBp</i> Activity .....	137
Discussion .....	138
Conclusion.....	142
Acknowledgements .....	143
References .....	144
Tables and Figures .....	147

<b>SECTION III-Discussion .....</b>	<b>154</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>155</b>
1. L'effet du surenroulement global et local de l'ADN sur le promoteur <i>fooBp</i> .....	155
2. L'effet du surenroulement de l'ADN sur la variation de phase chez l'opéron <i>foo</i> .....	158
3. Le rôle activateur de FooI sur l'activité transcriptionnelle à <i>fooBp</i> .....	160
4. L'effet du surenroulement de l'ADN sur les motifs de méthylation aux sites GATC de la région régulatrice <i>foo</i> .....	162
5. Le couplage transcriptionnel des promoteurs divergents <i>fooIp</i> et <i>fooBp</i> .....	164
6. La stimulation de l'activité de <i>fooBp</i> par la transcription divergente de <i>tetA</i> .....	165
7. L'activation de <i>fooBp</i> par la transcription divergente de <i>tetA</i> en présence de FooI168 .....	168
8. L'impact négatif de la présence des plasmides pMT020 et pMT021 sur la croissance et sur l'activité de <i>fooBp</i> .....	171
<b>Conclusion.....</b>	<b>174</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>178</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	 <b>181</b>
 <b>ANNEXES.....</b>	 <b>xviii</b>
<b>ANNEXE I .....</b>	<b>xix</b>
Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M.-C. Tessier, H. Dezfoulian, and J. Harel. 2000. Effects of environmental conditions and global regulatory proteins on regulation of F165 <sub>1</sub> (Prs-like) and F165 <sub>2</sub> (F1C-like) fimbrial expression in <i>Escherichia coli</i> causing septicaemia in pigs. Res. Microbiol. 151: 563-574.....	xix
<b>ANNEXE II.....</b>	<b>xxxiii</b>
Harel, J., F. Daigle, C. Forget, M.-C. Tessier, C. Crost, and C. Martin. 2000. Phase variation of F165 <sub>1</sub> (Prs-like) fimbriae from <i>Escherichia coli</i> causing septicaemia in animals. Can. J. Microbiol. 46: 1101-1107.....	xxxiii
<b>ANNEXE III .....</b>	<b>xlii</b>
Séquence corrigée de la région régulatrice <i>fooIB</i> de <i>E. coli</i> 4787. ....	xlii
<b>ANNEXE IV .....</b>	<b>xliv</b>
Souches bactériennes et plasmides mentionnés dans les Annexes V et VI. ....	xliv
<b>ANNEXE V .....</b>	<b>xlvii</b>
Effet de l'expression de la RNase H sur l'activité du promoteur <i>fooBp</i> de la fusion <i>fooIB-lacZ</i> chez les souches topoisomérase isogéniques. ....	xlvii
<b>ANNEXE VI .....</b>	<b>xlix</b>
Effets de la transcription divergente de <i>tetA</i> , en présence de FooI, sur l'activité du promoteur <i>fooBp</i> chez les souches topoisomérase isogéniques. ....	xlix

## Liste des tableaux

<b>SECTION I - Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Revue de littérature.....</b>	<b>2</b>
<b>Tableau I. Facteurs <math>\sigma</math> chez <i>E. coli</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>SECTION II-Articles .....</b>	<b>87</b>
<b>Article 1 .....</b>	<b>88</b>
<b>Table I. Bacterial strains, phages and plasmids used in this study.....</b>	<b>114</b>
<b>Table II. Local and global DNA supercoiling influence on <i>fooBp</i> activity. ....</b>	<b>119</b>
<b>Table III. DNA supercoiling influence on <i>foo</i> phase variation.....</b>	<b>120</b>
<b>Table IV. Effects of <i>FooI</i> absence on <i>fooBp</i> activity. ....</b>	<b>123</b>
<b>Table V. Effects of <i>FooI</i> presence in <i>cis</i> or in <i>trans</i> on <i>fooBp</i> activity. ....</b>	<b>124</b>
<b>Table VI. Analysis of the effects of <i>FooI</i> presence in <i>cis</i> or in <i>trans</i> on <i>fooBp</i> activity. ....</b>	<b>125</b>
<b>Article 2.....</b>	<b>126</b>
<b>Table I. Bacterial strains, phages and plasmids used in this study.....</b>	<b>148</b>
<b>Table II. Effects of <i>trcp</i> strength and of <i>tetA</i> divergent transcription on <i>fooBp</i> activity in <i>FooI</i> topoisomerase isogenic strains.....</b>	<b>152</b>
<b>Table III. Analysis of the effects of <i>trcp</i> strength and <i>tetA</i> divergent transcription on <i>fooBp</i> activity in <i>FooI</i> topoisomerase isogenic strains.....</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>xviii</b>
<b>ANNEXE IV .....</b>	<b>xlvi</b>
<b>Tableau. Souches bactériennes et plasmides mentionnés dans les Annexes V et VI..</b>	<b>xlvi</b>
<b>ANNEXE V .....</b>	<b>xlvii</b>
<b>Tableau. Effet de l'expression de la RNase H sur l'activité du promoteur <i>fooBp</i> de la fusion <i>fooIB-lacZ</i> chez les souches topoisomérase isogéniques. ....</b>	<b>xlviii</b>
<b>ANNEXE VI .....</b>	<b>xliv</b>
<b>Tableau. Effets de la transcription divergente de <i>tetA</i>, en présence de <i>FooI</i>, sur l'activité du promoteur <i>fooBp</i> chez les souches topoisomérase isogéniques. ....</b>	<b>1</b>

## Liste des figures

<b>SECTION I - Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Revue de littérature</b> .....	<b>2</b>
<b>Figure 1.</b> Inter-communication bactérie pathogène-hôte médiée par le fimbriae P à la surface de la cellule uroépithéliale.....	6
<b>Figure 2. (A)</b> Fimbriae sur la surface d'une bactérie.....	10
<b>(B)</b> Représentation schématique de la structure de la cellule bactérienne... ..	10
<b>Figure 3.</b> Inter-communication régulatrice entre les opérons fimbriaires <i>pap</i> et <i>fim</i> ... ..	10
<b>Figure 4.</b> Organisation génétique de l'opéron <i>pap</i> codant pour le fimbriae de type P... ..	12
<b>Figure 5.</b> Modèle pour l'assemblage du fimbriae Pap de <i>E. coli</i> via le mécanisme placier/chaperone.....	14
<b>Figure 6.</b> Modèle pour les voies de transduction de signal régulant la biogenèse du fimbriae.....	15
<b>Figure 7.</b> Organisation de la région régulatrice chez l'opéron <i>pap</i> .....	17
<b>Figure 8.</b> Le mécanisme de la variation de phase chez <i>pap</i> .....	18
<b>Figure 9.</b> La répression catabolique.....	31
<b>Figure 10. (A)</b> Recrutement de l'ARN pol ( $\alpha$ CTD) par CRP (AR1) chez les promoteurs CRP-dépendants de classe I.....	33
<b>(B)</b> Recourbement de l'ADN par CRP.....	33
<b>Figure 11.</b> Organisation de la région régulatrice chez l'opéron <i>foo</i> , avec ses sites potentiels pour la liaison des régulateurs à l'ADN.....	39
<b>Figure 12.</b> Description de la région promotrice d'un gène procaryote.....	42
<b>(a)</b> Organisation d'une unité transcriptionnelle procaryote.....	42
<b>(b)</b> La reconnaissance d'un promoteur par l'ARN pol.....	42
<b>(c)</b> L'ARN pol liée à un promoteur lors de l'initiation de la transcription..	42
<b>(d)</b> Promoteurs forts chez <i>E. coli</i> reconnus par $E\sigma^{70}$ .....	42
<b>(e)</b> Séquences consensus des promoteurs $\sigma^{70}$ .....	42
<b>Figure 13. (A)</b> Nucléoïde. <b>(B)</b> Surenroulement négatif et positif. <b>(C)</b> ADN surenroulé.	47
<b>Figure 14.</b> Domaines chromosomiques.....	48
<b>Figure 15.</b> Molécules d'ADN <b>(A)</b> Formes A, B et Z. <b>(B)</b> Double hélice.....	54
<b>Figure 16.</b> Activité de relaxation de la Topo I.....	58
<b>Figure 17.</b> Activité de relaxation des supertours positifs par la gyrase.....	60
<b>Figure 18.</b> Modèle des domaines jumeaux de surenroulement de Liu et Wang.....	69
<b>Figure 19.</b> Modèle pour la formation de domaines de surenroulement positif et négatif chez pBR322 causée par l'ancrage de la protéine TetA à la membrane.....	69
<b>Figure 20.</b> Modèle de l'effet des boucles-R sur l'élongation transcriptionnelle.....	73
<b>(A)</b> Formation de la boucle-R.....	73
<b>(B)</b> La boucle-R agit comme barrière à la translocation des molécules d'ARN pol.....	73
<b>Figure 21.</b> Mécanisme de relai de promoteur pour l'activation séquentielle d'un gène à distance.....	80

<b>SECTION II-Articles .....</b>	<b>87</b>
<b>Article 1 .....</b>	<b>88</b>
<b>Figure 1. (A) The <i>foo</i> regulatory region with its putative regulatory sites.....</b>	<b>116</b>
<b>(B) Schematic representation of <i>fooIB-lacZYA</i> transcriptional fusion.....</b>	<b>116</b>
<b>(C) Schematic representation of <i>fooIp-fooBpB-lacZYA</i> transcriptional fusion.....</b>	<b>116</b>
<b>Figure 2. Schematic representation of (A) pMT010, (B) pMT020, and (C) pMT021.....</b>	<b>118</b>
<b>Figure 3. DNA supercoiling level influence on the methylation pattern of GATC-I site in <i>fooIB</i> regulatory region in <math>\Delta topA</math> mutant background. ....</b>	<b>122</b>
<b>Article 2 .....</b>	<b>126</b>
<b>Figure 1. (A) The <i>foo</i> regulatory region with its putative regulatory sites.....</b>	<b>151</b>
<b>(B) Schematic representation of <i>fooIB-lacZYA</i> transcriptional fusion.....</b>	<b>151</b>
<b>(C) Schematic representation of <i>fooIp-fooBpB-lacZYA</i> transcriptional fusion.....</b>	<b>151</b>
<b>(D) Schematic representation of <i>trcp-fooBpB-lacZYA</i> transcriptional fusion.....</b>	<b>151</b>
<b>(E) Schematic representation of <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZYA</i> transcriptional fusion.....</b>	<b>151</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>xviii</b>
<b>ANNEXE III .....</b>	<b>xlii</b>
Séquence corrigée de la région régulatrice <i>fooIB</i> de <i>E. coli</i> 4787 .....	xliii
(éditée de pIB <sub>1</sub> CR2 séquencé par M13R/T7).....	xliii

## Liste des sigles et abréviations

### Général

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique ( <i>DNA: deoxyribonucleic acid</i> )
ADN-A	ADN de forme A de pas droit
ADN-B	ADN de forme B de pas droit
ADN-Z	ADN de forme Z de pas gauche
ADP	adénosine diphosphate
A/E	<i>Attaching Effacing</i> : activité d'attachement et d'effacement
AEEC	<i>Attaching Effacing E. coli</i> : <i>E. coli</i> attachant et effaçant
AirS ou <i>airS</i>	<i>Attachment and Iron Regulator Sensor</i> : détecteur de l'attachement et de régulation du fer
Amp	<i>ampicillin</i> : ampicilline
Amp <sup>R</sup>	<i>ampicillin resistance</i> : résistance à l'ampicilline ( <i>bla</i> )
Arg	L-arginine
AMPc	AMP cyclique ou adénosine monophosphate cyclique
antigène O	antigène oligosaccharidique
antigène F	antigène fimbriaire
antigène H	antigène flagellaire
antigène K	antigène capsulaire
AR1	<i>Activation Region 1</i> : région activatrice 1
ARN	acide ribonucléique ( <i>RNA: ribonucleic acid</i> )
ARNm	ARN messager ( <i>mRNA</i> )
ARN pol	ARN polymérase ( <i>RNA polymerase</i> )
ARNr	ARN ribosomal ( <i>rRNA</i> )
ARNt	ARN de transfert ( <i>tRNA</i> )
ATP	adénosine triphosphate
[ATP]/[ADP]	ratio des concentrations d'ATP et d'ADP
αCTD	domaine C-terminal de la sous-unité alpha de l'ARN polymérase
BIMES	<i>Bacterial Interspersed Mosaic Elements</i> : éléments bactériens parsemés en mosaïque
boucle-R	<i>R-loop</i> : hybride ARN-ADN, hétéroduplex d'ARN-ADN
C	cytosine
CAP ou CRP	<i>Catabolite Activator Protein</i> ou <i>cAMP Receptor Protein</i> : répression catabolique
Cm	<i>chloramphenicol</i> : chloramphénicol
Cm <sup>R</sup>	<i>chloramphenicol resistance</i> : résistance au chloramphénicol
CNF	<i>Cytotoxic Necrosing Factor</i> : facteur nécrosant cytotoxique
C-ter	C-terminal ou carboxy-terminal
Cys	<i>cysteine</i> : cystéine
dA	désoxyadénosine
Dam	<i>Deoxyadenosine Methylase</i> , <i>DNA Adenine Methylase</i> ou <i>Deoxyadenosine Methyltransferase</i> : désoxyadénosine méthyltransférase

DB colony	<i>dark blue colony</i> : colonie bleu foncé
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAggEC ou EAEC	<i>Enteroaggregative E. coli</i> ou <i>Enteroadhesive E. coli</i> : <i>E. coli</i> adhérent agrégatif
EHEC	<i>Enterohemorrhagic E. coli</i> : <i>E. coli</i> entérohémorragique
EIEC	<i>Enteroinvasive E. coli</i> : <i>E. coli</i> entéroinvasif
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i> : <i>E. coli</i> entéropathogène
ETEC	<i>Enterotoxigenic E. coli</i> : <i>E. coli</i> entérotoxigène
FIS	<i>Factor for Inversion Stimulation</i> : facteur pour la stimulation de l'inversion
<i>foo</i>	F165 <sub>1</sub> : <i>f one hundred sixty-five one</i>
FooBBS	<i>FooB Binding Site</i> : site de liaison potentiel pour FooB
<i>fof</i>	F165 <sub>2</sub> : <i>f one hundred sixty-five two</i>
G	guanine
<i>g</i>	nombre de générations qui ont donné lieu à la colonie
Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal	$\alpha$ -D-galactosyl-(1-4)- $\beta$ -galactopyranose (Gal-Gal ou Gal $\alpha$ (1,4)Gal)
GalNAc-GalNAc	galactose-N-acétyl- $\alpha$ -(1-3)-galactose-N-acétyl
GATC-I	GATC <sup>1028</sup> ou GATC <sup>dist</sup> (GATC distal)
GATC-II	GATC <sup>1130</sup> ou GATC <sup>prox</sup> (GATC proximal)
Gb	globoside
Gly	L-glycine
GSL	<i>Glycosphingolipid Receptor</i> : récepteur de glycosphingolipide
HLP-I	<i>Histone-Like Protein I</i> : protéine de type histone I
H-NS	<i>Histone-Like Nucleoid Structuring Protein</i> : protéine de type histone de structure du nucléoïde
HPr	<i>Histidine Protein</i> : protéine histidine
IHF	<i>Integration Host Factor</i> : facteur d'intégration à l'hôte
Ile	L-isoleucine
IPTG	Isopropylthiogalactoside
IRMP	<i>Iron-Regulated Membrane Protein</i> : protéine membranaire régulée par le fer
IS	<i>Insertion Sequence</i> : éléments d'insertion
ITU	infections du tractus urinaire ( <i>UTI</i> : <i>Urinary Tract Infections</i> )
Km	<i>kanamycin</i> : kanamycine
Km <sup>R</sup>	<i>kanamycin resistance</i> : résistance à la kanamycine ( <i>kan</i> )
Lac	phénotype Lactose
LB colony	<i>light blue colony</i> : colonie bleu pâle
LB media	<i>Luria-Bertani media</i> : milieu Luria-Bertani
Lk	<i>linking number</i> : nombre de liaison
LPS	lipopolysaccharide (endotoxine)
Lrp	<i>Leucine-Responsive Protein</i> ou <i>Leucine-Responsive Regulatory Protein</i> : protéine de réponse à la leucine
LT	toxine thermolabile
<i>M</i>	nombre de cellules qui ont effectué une variation de phase
MB colony	<i>medium blue colony</i> : colonie bleu moyen
MENEC	<i>Meningopathogenic E. coli</i> : <i>E. coli</i> méningopathogène
MRHA	<i>Mannose Resistant Haemagglutination</i> : hémagglutination résistante au mannose
N	atome d'azote

<i>N</i>	nombre total de cellules évaluée
NBM	<i>New Born Meningitis</i> : méningite du nouveau-né
N-ter	N-terminal ou amino-terminal
O.D. <sub>600</sub>	<i>optical density at 600 nm</i> : densité optique à 600 nm (D.O. <sub>600</sub> )
<i>OFF</i>	phase <i>OFF</i> : phase de non-expression du fimbriae
<i>OFF</i> → <i>ON</i>	transition de <i>OFF</i> à <i>ON</i> ( $\alpha$ )
OM	<i>Outer Membrane</i> : membrane externe (ME)
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i> : protéine de la membrane externe
<i>ON</i>	phase <i>ON</i> : phase d'expression du fimbriae
<i>ON</i> ↔ <i>OFF</i>	transitions de <i>ON</i> à <i>OFF</i> et de <i>OFF</i> à <i>ON</i>
<i>ON</i> → <i>OFF</i>	transition de <i>ON</i> à <i>OFF</i> ( $\beta$ )
ORF	<i>Open Reading Frame</i> : cadre de lecture ouvert
p ( <i>abcDp</i> )	promoteur ( <i>lacZp</i> , <i>trcp</i> , <i>papBp</i> , etc.)
pABC123	plasmide (pACYC184, pRS551, etc.)
PAI	<i>Pathogenicity Island</i> : îlot de pathogénicité
Pap ou P ou <i>pap</i>	<i>Pyelonephritis Associated Pili</i> : fimbriae associé à la pyélonéphrite
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> : réaction de polymérase en chaîne
pI	point isoélectrique
PMLs	<i>Porcine Polymorphonuclear Leukocytes</i> : leukocytes polymorphonucléaires porcins
Pro	L-hydroxyproline
Prs ou <i>prs</i>	<i>pap-related sequence</i> : séquence apparentée à <i>pap</i>
PTS	<i>Phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent sugar phosphotransferase system</i> : système phosphotransférase du sucre dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP)
RNase E	ribonucléase E
RNase H	ribonucléase H
rpm	<i>revolution per minute</i> : révolutions par minute
Sec	système de sécrétion générale
SEPEC	<i>Septicaemic E. coli</i> : <i>E. coli</i> septicémique
<i>sp.</i>	espèce
<i>ssp.</i>	sous-espèce
ST	toxine thermostable
Str <sup>R</sup>	<i>streptomycin resistance</i> : résistance à la streptomycine
T	thymine
Tet	<i>tetracycline</i> : tétracycline
Tet <sup>R</sup>	<i>tetracycline resistance</i> : résistance à la tétracycline
Thi	<i>thiamine hydrochloride (B1 vitamine)</i>
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
Tn	transposon
Tn10	transposon codant pour la résistance à la tétracycline
Tn5	transposon codant pour la résistance à la kanamycine
TF	<i>Transcription Factor</i> : facteur de transcription
<i>toc</i>	<i>topoisomerase one compensation</i> : mutation compensatoire de la topoisomérase I
Top	phénotype Topoisomérase I
Topo I	topoisomérase I
Topo II	topoisomérase II ou gyrase

Topo III	topoisomérase III
Topo IV	topoisomérase IV
transition $\alpha$	$\alpha$ switch ( <i>OFF to ON switch</i> ): transition de <i>OFF</i> à <i>ON</i>
transition $\beta$	$\beta$ switch ( <i>ON to OFF switch</i> ): transition de <i>ON</i> à <i>OFF</i>
<i>ts (abc<sup>ts</sup>)</i>	<i>temperature-sensitive mutation</i> : mutation température-sensible
Tw	<i>twist</i> : torsion
U ou Ura	uracil
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i> : séquence activatrice en amont
UP	<i>Upstream Promoter</i> : en amont du promoteur
UPEC	<i>Uropathogenic E. coli</i> : <i>E. coli</i> uropathogène
Val	L-valine
W colony	<i>white colony</i> : colonie blanche
Wr	<i>writhe</i> : contorsion
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

### Organismes

CRSNG (NSERC)	Conseil national de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada / Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada
OTAN (NATO)	Organisation du Traité de l'Atlantique Nord / North Atlantic Treaty Organisation
GREMIP	Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc

### Unités de mesure

### Symboles

g	gramme	$\alpha$	alpha
kb (kpb)(kbp)	kilobase ou kilopaire de base ( <i>kilobase pair</i> )	$\beta$	bêta
kDa	kiloDalton	$\Delta$	différence ou intervalle ( $\Delta X$ pb); délétion génétique ( $\Delta abc$ )
L	litre	$\lambda$	bactériophage lambda
m	mètre	$\sigma$	facteur sigma de l'ARN polymérase
mg	milligramme ( $10^{-3}$ g)	<	plus petit que
mL	millilitre ( $10^{-3}$ L)	>	plus grand que
mg/mL	mg par mL	$\pm$	plus ou moins
mM	millimolaire ( $10^{-3}$ molaire)	+	phénotype exprimé ( $Abc^+$ ); allèle sauvage ( $abc^+$ )
nm	nanomètre ( $10^{-9}$ m)	-	phénotype non-exprimé ( $Abc^-$ ); ou allèle mutant ( $abc^-$ )
min	minutes	°	degrés
pb (bp)	paire de base ( <i>base pair</i> )	° C	degrés Celsius
S	Sievert	↓	site de clivage
$\mu$ g	microgrammes ( $10^{-6}$ g)		
$\mu$ L	microlitre ( $10^{-6}$ L)		
$\mu$ g/mL	$\mu$ g par mL		

## Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux et celles qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de maîtrise, et plus particulièrement:

à Josée Harel, directrice de recherche, pour votre soutien, votre appui, votre compréhension, votre patience, votre confiance, vos idées et vos connaissances...

à Marc Drolet, codirecteur de recherche, pour vos idées, le partage de vos connaissances et votre soutien...

à Céline Forget, pour ton amitié et pour m'avoir enseigné les rudiments et les petits trucs du travail de laboratoire...

aux membres du laboratoire, d'hier et d'aujourd'hui, que j'ai eu plaisir à côtoyer, vous qui m'avez aidée à maintes reprises et qui avez partagé votre temps et vos connaissances...

à France Daigle, qui a établi les prémices de cette étude, et à Jacinthe Bordeleau, stagiaire, qui m'a aidée à faire avancer ce projet...

à Christine Martin, pour ta disponibilité et pour ton regard acéré...

à Clarisse Desautels, pour ton amitié et pour m'avoir très souvent dépannée...

à tous les membres du GREMIP, chercheurs, collègues et ami(e)s, pour votre soutien et pour les connaissances que vous m'avez communiquées...

à Micheline St-Germain, pour ta disponibilité, ton efficacité et ta jovialité...

à Éric Massé et à Chady Raiky, pour vos conseils...

à mes amies d'une sincérité inestimable...

à Nathalie, Daniel et Kim, qui m'ont si chaleureusement accueillie...

à ma famille, Nelson, Céline, Anne-Renée, et Pierre-Stanislas, à Raymonde, à Fernand et Jacqueline, pour votre soutien et vos encouragements, ainsi qu'à mes grand-parents, à Yvonne pour ta complicité, et à François, Alphonse et Flora, pour votre soutien ...

à Jacques Darisse, mon compagnon de vie, pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études universitaires, avec ses hauts et ses bas...

au CRSNG, qui m'a accordé une bourse d'études supérieures, et au GREMIP pour le soutien financier.

*Pour Girouette et Flora.*

**SECTION I - Introduction**

## Revue de littérature

### 1. *Escherichia coli* pathogène : les infections intestinales et extraintestinales : généralités

C'est en 1885 que Theodor Escherich décrit la bactérie *Escherichia coli*, un bâtonnet Gram-négatif anaérobie facultatif et non-sporulant de la famille des *Enterobacteriaceae*. *E. coli* colonise normalement la flore intestinale des vertébrés peu après la naissance et agit généralement en tant que commensal du côlon qui, en fournissant certains métabolites à son hôte et en compétitionnant avec les pathogènes, lui est favorable. Toutefois, certaines souches de *E. coli* causent diverses maladies, tant chez l'homme que chez l'animal, et seuls certains sérotypes sont pathogènes<sup>260</sup>. *E. coli* est un pathogène très versatile dont la virulence peut être conférée par plusieurs facteurs. Les maladies attribuables à *E. coli* sont réparties en deux grandes catégories, soit les infections intestinales et extraintestinales<sup>298</sup>.

C'est selon les facteurs de virulence qu'elles possèdent de même que les lésions et les maladies qu'elles provoquent que sont classées les souches de *E. coli* responsables d'infections intestinales et causant des diarrhées<sup>189, 325</sup>. Ces facteurs de virulence correspondent tant à des toxines thermolabiles (LT) et thermostables (ST), à des hémolysines qu'à des adhésines<sup>298</sup>. Cinq virotypes de *E. coli* intestinale ont été définis à ce jour: (1) entérotoxigène (ETEC: *Enterotoxigenic E. coli*), (2) adhérent agrégatif (EAaggEC: *Enteroadhesive E. coli*; ou EAEC: *Enteroadhesive E. coli*), (3) entérotoxigène (EPEC: *Enteropathogenic E. coli*), (4) entérohémorragique (EHEC: *Enterohemorrhagic E. coli*), et (5) entéroinvasif (EIEC: *Enteroinvasive E. coli*)<sup>298</sup>. Les EPEC et les EHEC sont des *E. coli* attachants et effaçants (AEEC: *Attaching Effacing E. coli*) et ils représentent des groupes non-invasifs qui possèdent l'activité d'attachement et d'effacement (A/E).

Tant chez l'humain que l'animal, les infections généralisées, la morbidité et la mortalité sont principalement attribuables aux maladies extraintestinales à *E. coli*. Celles-ci sont, en général, réparties en trois groupes principaux : (1) les infections du tractus urinaire ou ITU (UTI: *Urinary Tract Infections*), (2) les septicémies et (3) les méningites<sup>261, 298</sup>. Ces infections respectives sont en général causées par les souches de *E. coli* extraintestinales (1) uropathogènes (UPEC: *Uropathogenic E. coli*), (2) méningopathogènes (MENECC: *Meningopathogenic E. coli*), qui sont entre autres responsables de la méningite du nouveau-né (NBM: *New Born Meningitis*), et (3) septicémiques (SEPEC: *Septicaemic E. coli*)<sup>260, 325</sup>. Plus de 95% des ITU, représentant environ 5 millions de cas par an et responsables d'importantes morbidités et mortalités humaines, impliquent les UPEC dont la plupart expriment le fimbriae P (Pap: *Pyelonephritis Associated Pili*)<sup>118, 260, 261</sup>. Parmi les facteurs de virulence associés à *E. coli* extraintestinal, on retrouve entre autres l'hémolysine- $\alpha$ , des toxines [les facteurs nécrosants cytotoxiques (*Cytotoxic Necrosing Factor*): CNF1 et CNF2; l'endotoxine LPS (lipopolysaccharide)], l'aérobactine ainsi que des adhésines fimbriaires (P, Sfa et type 1) et afimbriaires Afa (AFAI et AFAII) et Dr<sup>3, 99, 161, 298</sup>.

## 1.2. La souche pathogène à l'étude : *Escherichia coli* 4787

*E. coli* 4787 (O115:K"V165":H51:F165) est une souche pathogène septicémique porcine<sup>87</sup>. L'antigène fimbriaire F165 est généralement trouvé parmi les sérogroupes O8, O9, O101, O115 et O141 de *E. coli* isolés de porcelets et de veaux atteints de septicémie ou d'autres maladies dont la diarrhée est le signe clinique principal<sup>40, 87, 126</sup>. On retrouve aussi F165 chez des isolats de *E. coli* responsables de septicémie chez l'humain<sup>38</sup>. F165 jouerait un rôle dans la pathogénicité<sup>84, 85, 128, 247</sup> (revue<sup>57</sup>). Dans un modèle d'infection expérimentale chez le porcelet, les souches *E. coli* O115 : K"V165" peuvent induire la septicémie<sup>84</sup>. Les souches de *E. coli* O115 F165-positives possèdent plusieurs similitudes avec les souches uropathogènes, dont l'hémagglutination résistante au mannose (MRHA : *Mannose Resistant Haemagglutination*), la résistance à l'effet bactéricide du sérum, l'aérobactine et le plasmide ColV<sup>127</sup>. Toutefois, contrairement à la plupart des souches uropathogènes, elles sont non-hémolytiques, et ne produisent pas CNF<sup>87</sup>.

F165 est un complexe de deux composantes fimbriaires, soit F165<sub>1</sub> (18,5 kDa) et F165<sub>2</sub> (17,5 kDa)<sup>86, 129, 130</sup>, respectivement codés par les opérons *foo* et *fot* (revue<sup>57</sup>). Ces antigènes ne sont pas exprimés dans les mêmes conditions<sup>48, 49</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>). Le fimbriae F165<sub>1</sub>, qui est similaire à Prs (*pap-related sequence*) de la famille de fimbriae de type P<sup>48, 49, 129</sup>, serait impliqué dans la virulence<sup>84, 85, 129, 211, 212, 247</sup>. Chez *E. coli* 4787, l'opéron *foo* fait partie de l'ilôt de pathogénicité PAI I<sub>4787</sub>, qui est localisé à environ 94 min sur le chromosome de *E. coli*, soit près du gène d'ARNt *pheU* (travaux non publiés, par H. Dezfulian, I. Batisson, J.M. Fairbrother, P.C.K. Lau, G. Szatmari et J. Harel). Le système fimbriaire F165<sub>1</sub> est associé à la résistance des *E. coli* O115:K"V165" à la mort phagocytaire<sup>248</sup> grâce à l'inhibition de la réponse oxydative chez les leukocytes polymorphonucléaires porcins (PMLs : *Porcine Polymorphonuclear Leukocytes*)<sup>246</sup>. Au niveau de ses sous-unités mineures et majeures, F165<sub>2</sub> s'apparente à F1C de la famille de fimbriae de type S<sup>78, 130</sup> et son rôle n'est pas encore défini<sup>48, 130</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>).

## 2. L'interaction hôte-microorganisme

Le succès de la colonisation d'une niche particulière par un microorganisme, tant pathogène que symbiote, est facilité par divers mécanismes, tels la perception de quorum (*quorum sensing*) et les systèmes de régulation à deux composantes (revue<sup>136</sup>). La perception de quorum réfère à la capacité qu'ont les bactéries de détecter les densités cellulaires et de réguler des groupes de gènes spécifiques en conséquence<sup>102</sup>. Les systèmes de transduction de signal à deux composantes permettent quant à eux l'adaptation aux conditions constamment variables de l'environnement telles le pH, la température, l'osmolarité et la concentration ionique<sup>142</sup>. Aussi, les microorganismes peuvent moduler l'environnement de l'hôte par la sécrétion de molécules effectrices, par les systèmes de type III, interférant directement avec les fonctions cellulaires de l'hôte<sup>151</sup>. De plus, l'immunité et la susceptibilité de l'hôte jouent également un rôle important dans l'interaction hôte-bactérie<sup>136</sup>.

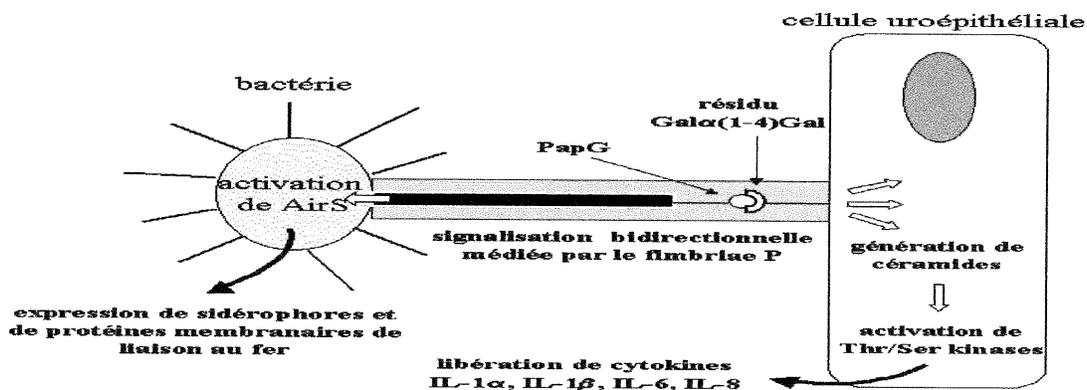
## 2.1. Le fimbriae P et la transduction du signal via AirS dans l'ITU

Les interactions entre les bactéries pathogènes et les cellules eucaryotes sont impliquées dans le contrôle de l'expression des déterminants de virulence *in vivo*, et le contact direct avec les cellules de l'hôte constitue lui-même le signal déclencheur pour l'expression des gènes de virulence<sup>45</sup>. Chez les *E. coli* causant les ITU, la régulation de gènes de virulence dépendrait d'un contact avec l'hôte par l'intermédiaire du fimbriae P<sup>378</sup>. Inversement, la liaison de l'adhésine fimbriaire PapG aux récepteurs GSL (*Glycosphingolipid Receptor*) Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal ( $\alpha$ -D-galactosyl-(1-4)- $\beta$ -galactopyranose), présents à la surface des cellules uroépithéliales, stimule les défenses de l'hôte<sup>133, 134, 326</sup>. Le fimbriae P active les cellules épithéliales par l'intermédiaire de la voie de signalisation dépendante de TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) et les récepteurs de fimbriae P, GSL, pourraient recruter TLR4 en tant que co-récepteurs<sup>100</sup>.

Suite au contact médié par l'adhésine PapG aux isorécepteurs de l'uroépithélium portant le globoside Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)Gal, ce qui constitue le signal activateur, l'expression de plusieurs gènes chez *E. coli* est induite, dont celle de *airS* (*Attachment and Iron Regulator Sensor*, aussi nommé *barA*)<sup>242, 378</sup>. AirS, le produit de ce gène, est requis pour la croissance de la bactérie dans l'urine humaine, de même que pour la production de molécules chélatrices de fer, telles les sidérophores et les récepteurs de complexes fer-sidérophores (IRMPs: *Iron-Regulated Membrane Proteins*). Ces molécules impliquées dans l'acquisition du fer sont induites en conditions limitantes de cet élément, par exemple dans l'urine et les autres fluides biologiques. Les isolats cliniques de *E. coli* produisant l'aérobactine ont une croissance plus rapide dans l'urine que les isolats dépourvus de ce sidérophore<sup>237</sup>.

Plus précisément, AirS est le détecteur, situé dans la membrane cytoplasmique, d'un système de transduction de signal à deux composantes<sup>45</sup>. Récemment, UvrY a été identifié comme un régulateur de réponse probable pour AirS<sup>266</sup>. Le gène *uvrY* est ainsi nommé par sa liaison (*linkage*) sur un transcrite bicistronique au gène *uvrC*, dont le produit UvrC est impliqué dans la réparation de l'ADN; la véritable fonction de UvrY n'est pas connue<sup>238</sup>. Une mutation dans *uvrY* cause une diminution dans la production de sidérophores, alors qu'une surexpression de la protéine UvrY induit une augmentation de la production de sidérophores<sup>266</sup>. De plus, il existe dans la littérature d'autres exemples suggérant que ce

groupe de systèmes régulateurs à deux composantes puisse contrôler la formation de sidérophores chez des bactéries phytopathogènes du genre *Pseudomonas ssp.*<sup>191, 192</sup>. Ainsi, les protéines AirS et UvrY chez *E. coli* constitueraient un système à deux composantes<sup>266</sup> analogue aux systèmes GacS-GacA et ExpS-ExpA, retrouvés respectivement chez *Pseudomonas* et *Erwinia*, lesquels contrôlent des facteurs sécrétés impliqués dans la virulence, tels des protéases, des toxines et des lipases<sup>82, 175</sup>.



**Figure 1.** Inter-communication bactérie pathogène-hôte médiée par le fimbriaire P à la surface de la cellule uroépithéliale.  
Adapté de Abraham *et coll.* (1998)<sup>1</sup>.

Ceci démontre bien l'importance des systèmes de transduction de signal à deux composantes dans l'ajustement de la bactérie pathogène aux conditions trouvées chez son hôte, ce qui inclut entre autres la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la virulence<sup>45, 79, 116, 117, 136, 234, 342</sup>. En effet, la virulence est une réponse génétique adaptative qui requiert l'expression des gènes codant pour les facteurs de virulence<sup>116</sup>. Grâce à un tel système, une bactérie pathogène peut ainsi déterminer le moment et l'endroit propices pour l'expression de certains facteurs de virulence lors de l'établissement de l'infection chez l'hôte<sup>264, 322</sup>. Ces mécanismes de signalisation sont apparemment ubiquistes chez les bactéries tant Gram-positives que Gram-négatives<sup>264, 322</sup>, ces dernières ayant besoin de percevoir leur environnement en vue de s'y adapter adéquatement. Le mécanisme par lequel le signal provenant de la portion distale de la pointe fibrillaire est transmis à la bactérie demeure inconnu. Des hypothèses ont été formulées quant à la possibilité que les sous-unités fimbriaires organisées de façon hélicoïdale agissent en tant que transducteurs de signaux, ou encore que le pore central du filament serve de conduit pour les signaux<sup>1</sup>. La transduction du signal impliquerait-elle une dépolymérisation spontanée et la rétraction des sous-unités fimbriaires<sup>1</sup>, comme cela a été suggéré pour les pili de conjugaison<sup>101</sup>?

### 3. La virulence : définition, déterminants et variabilité génétique

Les bactéries pathogènes se distinguent des espèces commensales par leur capacité à proliférer dans les fluides ou à l'intérieur des cellules d'un hôte vivant et, dans cette interaction, leurs objectifs principaux concernent la survie et la multiplication. Au sens large, un facteur de virulence décrit tout produit bactérien, ainsi que le gène dit de virulence codant pour ce dernier, qui favorise la croissance ou la survie d'une bactérie durant son interaction avec l'hôte et qui peut aussi lui causer des dommages. Toutefois, les gènes impliqués dans la réponse adaptative aux stress et facteurs environnementaux, de même que dans le contrôle des gènes de virulence bactériens, peuvent également être inclus dans cette définition. Ces régulateurs de virulence incluent certains éléments de contrôle génétique globaux qui peuvent alors être considérés comme détecteurs des signaux provenant de l'hôte et comme modulateurs de l'expression des gènes de virulence (revue<sup>210</sup>).

Les facteurs de virulence classiques sont généralement des composantes non-essentiels à la structure et aux fonctions cellulaires et il en existe une multitude<sup>210</sup>. Il s'agit entre autres des antigènes de surface tels l'antigène O (somatique), l'antigène K (capsulaire) et l'antigène H (flagellaire). Aussi, diverses protéines de la membrane externe (OMPs: *Outer Membrane Proteins*) sont responsables de phénotypes complexes de virulence (i.e. la colonisation des surfaces muqueuses ou l'invasion intracellulaire). Des facteurs d'adhérence (adhésines fimbriaires et afimbriaires), des invasines, et des toxines (*shiga-like*, hémolysines, endotoxine ou LPS, leukotoxines) peuvent faciliter l'établissement de l'infection. De plus, nombreux sont les mécanismes qui favorisent la survie et la croissance de la bactérie, certains permettent la résistance aux défenses de l'hôte (la réponse au stress oxydatif, la survie à l'intérieur des macrophages, la résistance à l'effet bactéricide du sérum), et d'autres ont trait aux diverses stratégies d'acquisition du fer (les systèmes sidérophores/récepteurs entérobactine et aérobactine; l' $\alpha$ -hémolysine).

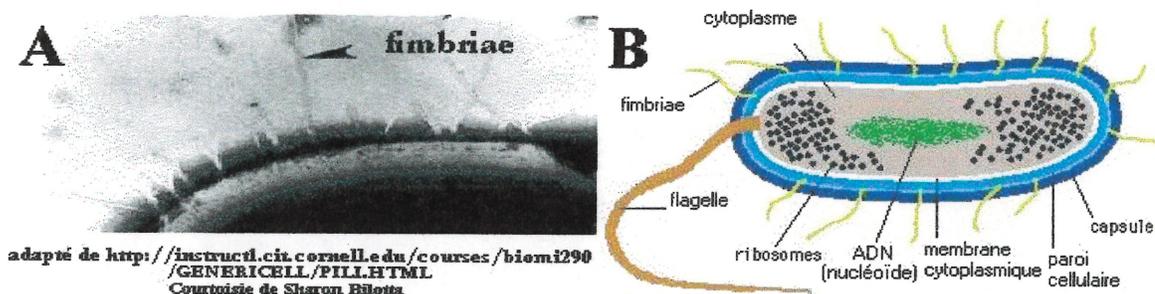
Dans l'évolution des interactions pathogènes et symbiotiques, la variabilité génétique joue un rôle important. Les procaryotes possèdent souvent, en plus du chromosome, des éléments génétiques mobiles qui permettent parfois l'acquisition, la perte ou des changements structuraux de régions importantes du génome bactérien. Le transfert horizontal des gènes est un mécanisme puissant par lequel l'aboutissement des interactions bactérie-hôte peut être altéré de façon permanente (revue <sup>136</sup>). Ce transfert horizontal des gènes s'opère par l'entremise d'îlots génomiques (PAIs; *Pathogenicity Islands*; ou îlots de pathogénicité ou de symbiose <sup>121</sup>), de plasmides, de transposons et d'éléments d'insertion IS ainsi que de phages <sup>62, 136</sup>.

Chez les bactéries pathogènes, les gènes de virulence, codant pour des adhésines, des toxines ou des invasines, peuvent se trouver sur des éléments génétiques mais aussi dans les régions particulières, pour plusieurs, que sont les PAIs <sup>62, 120, 121</sup>. Ces îlots, qu'on ne retrouve pas chez les bactéries non-pathogènes, sont présents tant chez les Gram-positives que chez les Gram-négatives. Les PAIs, de vastes régions chromosomiques où sont localisés les gènes de virulence, sont souvent associés aux gènes d'ARNt. Un PAI se caractérise donc par: la présence de gènes de virulence, en général plusieurs; un contenu en G+C différent de celui de l'ADN bactérien de l'hôte; l'occupation de grandes régions chromosomiques (souvent de plus de 30 kb); des unités génétiques compactes et distinctes généralement bordées, à leurs extrémités, par des unités répétées; l'association, à leurs frontières, avec des gènes d'ARNt (*selC* et *leuX* <sup>15</sup>) et/ou des séquences d'insertion (IS); la présence de gènes de mobilité (éléments IS, transposases); leur instabilité. Les opérons *prs* et *pap*, respectivement situés à 94 min et à 64 min sur le chromosome de la souche UPEC J96, feraient eux-mêmes partie de PAIs. L'élément contenant *prs*, contiendrait aussi les déterminants pour l' $\alpha$ -hémolysine (*hly*) et CNF1 (*cnf1*). Chez *E. coli* 4787, à environ 94 min sur le chromosome de *E. coli* et près du gène d'ARNt *pheU*, on retrouve l'opéron *foo*, lequel ferait partie du PAI I <sub>4787</sub> (travaux non publiés, par H. Dezfulian, I. Batisson, J.M. Fairbrother, P.C.K. Lau, G. Szatmari et J. Harel).

#### 4. Les adhésines

Dans le processus de la pathogenèse de *E. coli* chez les animaux et l'humain, sa capacité à adhérer aux surfaces épithéliales est une première étape essentielle <sup>12</sup>. L'expression d'adhésines spécialisées, des structures particulières permettant aux bactéries d'adhérer aux cellules eucaryotes, contribue à l'établissement de l'infection en permettant aux bactéries de résister à l'expulsion par les fluides et autres substances qui baignent ces surfaces <sup>329</sup>, ce qui facilite ainsi la colonisation de divers sites des muqueuses intestinales et extraintestinales. Cette capacité d'adhérence aux surfaces cellulaires de l'hôte est pré-requise à la colonisation et à l'invasion microbienne <sup>14, 88</sup> et cette étape importante dans la pathogenèse comporte un certain tropisme tissulaire. C'est la reconnaissance par les adhésines de récepteurs complémentaires, généralement des glycolipides et des glycoprotéines, présents à la surface de certaines cellules cibles qui détermine en partie le spectre d'hôte, la spécificité et le tropisme tissulaire d'un microorganisme. Chez la cellule-hôte, ces interactions adhésines-récepteurs activent une cascade de transduction de signaux complexe menant entre autres à l'activation des mécanismes de défense de l'hôte <sup>133, 134, 326</sup> ou encore au détournement des processus cellulaires au profit de la colonisation ou de l'invasion bactérienne <sup>95</sup>; chez la bactérie elles peuvent aussi constituer un signal lui permettant d'activer l'expression de ses gènes de virulence <sup>45</sup> (voir l'exemple de AirS <sup>378</sup>).

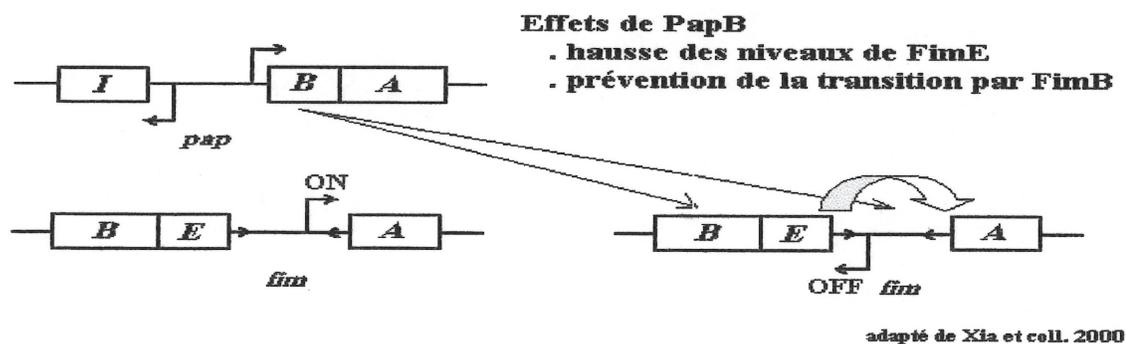
On retrouve chez *E. coli* une grande variété d'adhésines qui diffèrent entre elles au niveau des récepteurs spécifiques et de leur déterminants antigéniques (revues <sup>118, 152, 314</sup>). Ces adhésines sont réparties en deux groupes majeurs : les adhésines fimbriaires ou fimbriae (ex.: P, Sfa, de type 1), qui sont associées à des structures de surface <sup>204, 310</sup>, et les adhésines afimbriaires (ex.: Dr, AFAI, AFAII), ces dernières n'étant associées à aucune structure de surface particulière <sup>329</sup> mais plutôt directement associées à la surface microbienne.



**Figure 2.** (A) Fimbriae sur la surface d'une bactérie.  
 (B) Représentation schématique de la structure de la cellule bactérienne.  
 Adapté d'images d'Internet.

#### 4.1. Les fimbriae de *E. coli* extraintestinal

Les fimbriae sont des appendices protéiques filamenteux (non-flagellaires) de structure régulière situés à la surface bactérienne et dont le diamètre varie entre 2 et 8 nm (revues<sup>204, 314</sup>). Chez *E. coli*, on retrouve entre autres des fimbriae des types P, S, F1845 et I. Les adhésines fimbriaires produites par *E. coli* extraintestinal associées à des maladies telles que l'ITU, la septicémie et la NBM sont d'importants antigènes de surface qui permettent l'attachement aux cellules épithéliales eucaryotes<sup>118</sup>. Leur expression, qui n'est pas constitutive, est influencée par les conditions environnementales de même que par des protéines de régulation globale. La température, la composition du milieu, le pH, l'osmolarité, etc., influencent l'expression des gènes impliqués dans la formation du fimbriae<sup>210</sup>. Les souches extraintestinales de *E. coli* possèdent plusieurs déterminants d'adhésion dont l'expression pourrait mutuellement s'influencer<sup>120</sup>. Il semble exister une telle inter-communication (*cross-talk*) entre les opérons fimbriaires *pap* (Pap) et *fim* (fimbriae de type I)<sup>146, 372</sup>.



**Figure 3.** Inter-communication régulatrice entre les opérons fimbriaires *pap* et *fim*.  
 Adapté de Xia et coll. 2000<sup>372</sup>.

#### 4.1.2. Les fimbriae de type P

##### 4.1.2.1. Les fimbriae de la famille P : Pap, Prs et F165<sub>1</sub>

La famille de fimbriae P, dont fait partie F165<sub>1</sub>, inclut aussi Pap (*Pyelonephritis Associated Pili*) et Prs (*pap-related sequence*). Chez les UPEC, Pap, codé par l'opéron *pap*, joue un rôle critique dans la colonisation des tissus de l'hôte lors d'infections du tractus urinaire supérieur (ITU) <sup>195, 293</sup>. C'est la portion Gal $\alpha$ (1→4)Gal des globoséries des glycolipides, exprimée sur les érythrocytes et d'autres tissus dont l'uroépithélium du rein et du tractus urinaire, qui est reconnue par Pap (ou P) <sup>160</sup>. Quant à Prs, codé par l'opéron *prs*, il reconnaît la portion galactose-N-acétyl- $\alpha$ -(1-3)-galactose-N-acétyl (GalNAc-GalNAc) de l'antigène de Forssman (GbO5) sur les érythrocytes de mouton. Sérologiquement, plusieurs différents types de fimbriae P ont été caractérisés et clonés puis les sérotypes F7 à F13 ont été désignés <sup>118</sup>. Le fimbriae F165<sub>1</sub> est codé par l'opéron *foo* (*f* one hundred sixty-five one) <sup>48</sup> (Annexes I et II, p.xix et xxxiii <sup>50, 125</sup>), lequel est similaire à *pap* et *prs* <sup>40, 126, 211, 212</sup>. F165<sub>1</sub> est retrouvé chez les souches SEPEC porcines et il possède une sous-unité majeure semblable à celle de P et des sous-unités mineures, dont l'adhésine, similaires à celles de Prs <sup>129, 211</sup> (revue <sup>57</sup>).

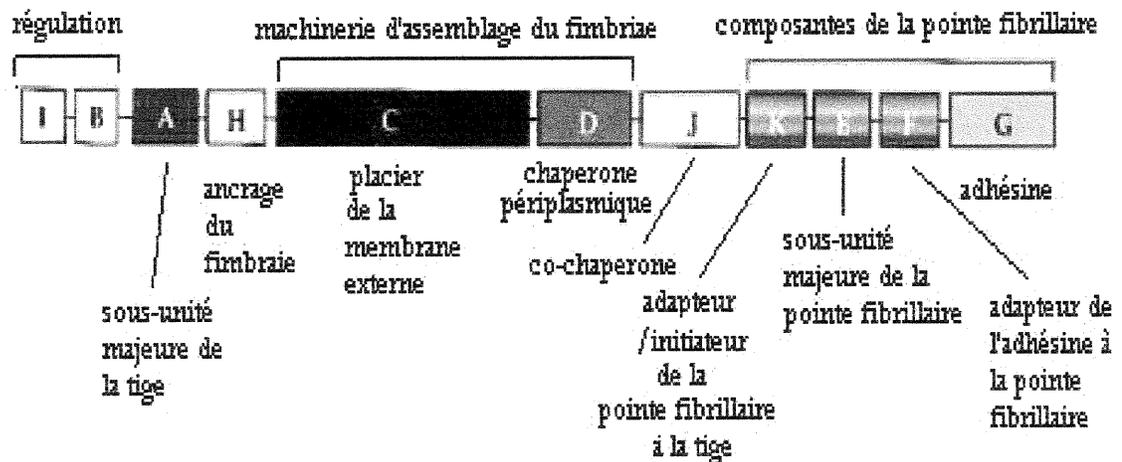
##### 4.1.2.2. La structure du fimbriae Pap

Le fimbriae Pap est composé d'une tige longue et rigide de 6 à 8 nm de diamètre et d'une pointe fibrillaire (*tip fibrillae*) courte et mince de 2 à 3 nm de diamètre (revues <sup>152, 204, 314</sup>). La pointe fibrillaire est principalement constituée de sous-unités PapE. La tige est construite de sous-unités PapA (sous-unité majeure) répétitives entassées et assemblées en hélice de pas droit. L'adhésine PapG, qui est responsable de la liaison aux portions Gal $\alpha$ (1→4)Gal des globoséries des glycolipides sur les cellules uroépithéliales et les érythrocytes, est située à l'extrémité de la pointe fibrillaire. PapG est liée à la fibrille PapE par l'entremise de PapF, un adaptateur spécialisé. Quant à PapK, il sert de lien entre la pointe fibrillaire portant l'adhésine et la tige de PapA. Situé à la base de la tige PapA, on retrouve PapH, une composante mineure dont la fonction serait de donner le signal pour la terminaison de l'assemblage.

### 4.1.2.3. La structure et l'organisation génétique de l'opéron *pap*

La formation du fimbriae P requiert les produits d'environ onze gènes impliqués dans sa biogénèse et sa régulation<sup>152, 314, 333</sup>. Ces gènes codent pour les six protéines structurales, telles la sous-unité majeure (PapA), les sous-unités mineures (PapH, PapK, PapE, PapF) et l'adhésine (PapG), la sous-unité déterminant la spécificité d'hôte; pour les protéines requises pour l'assemblage (PapC et PapD; et possiblement PapJ); et pour les régulateurs de l'opéron (PapI et PapB).

Les gènes codant pour le fimbriae de type P sont organisés en deux opérons orientés de façon divergente: l'opéron polycistronique *pap* (*papBAHCDJKEFG*) et l'opéron monocistronique *papI*<sup>10, 110</sup>. La transcription de l'opéron *papBAHCDJKEFG* est sous le contrôle du promoteur *papBAP*, et cette unité transcriptionnelle code pour la protéine régulatrice PapB ainsi que pour les gènes impliqués dans la structure et l'assemblage du fimbriae. Le promoteur *papIp* dirige l'expression du régulateur PapI, codé par le gène *papI*.



adapté de Hultgren et coll. 1996

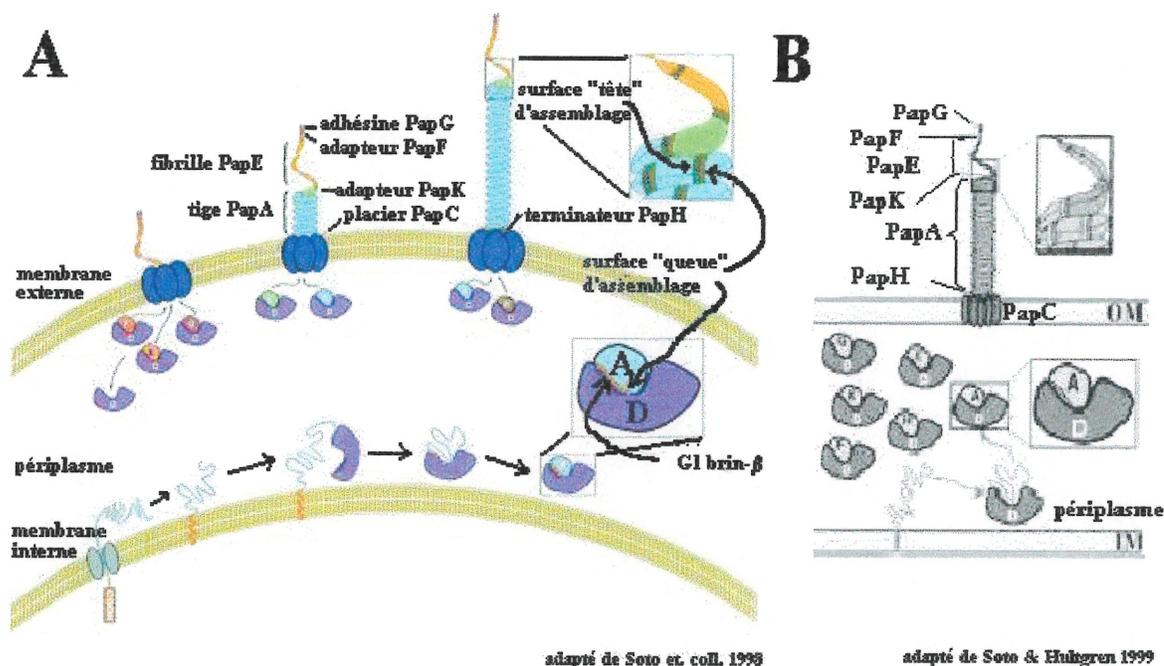
**Figure 4.** Organisation génétique de l'opéron *pap* codant pour le fimbriae de type P. Adapté de Hultgren *et coll.* (1996)<sup>152</sup>.

#### 4.1.2.4. La biogenèse du fimbriae Pap et l'implication de Cpx et $\sigma E$

La protéine chaperone PapD est impliquée dans l'assemblage du fimbriae selon une architecture de type tige (revue <sup>314</sup>). Son rôle est de former des complexes de pré-assemblage périplasmiques avec chacune des sous-unités fimbriaires avant leur incorporation dans la structure du fimbriae. La concentration de chacun des types de sous-unités est un facteur important pour la régulation et la définition de la taille de la pointe fibrillaire et de la tige du fimbriae <sup>157</sup>. La translocation initiale des sous-unités du fimbriae Pap à travers la membrane cytoplasmique se fait par l'intermédiaire de la machinerie Sec (système de sécrétion générale <sup>71</sup>), même si cette voie ne suffit pas à elle seule à libérer efficacement les sous-unités dans le périplasma <sup>162</sup>. Les sous-unités naissantes sont retenues à l'intérieur de la membrane cytoplasmique via une interaction hydrophobe médiée par leur portion C-terminale (C-ter). En présence de PapD, les sous-unités sont envoyées dans l'espace périplasmique sous la forme de complexes de préassemblage chaperone/sous-unités. Ces derniers sont alors dirigés vers le placier PapC (*usher*) localisé dans la membrane externe (OM : *Outer Membrane*) pour l'assemblage.

Le placier PapC est constitué d'au moins six sous-unités et forme un pore par lequel les sous-unités du fimbriae sont transloquées à travers la membrane externe. La pointe fibrillaire linéaire d'une largeur de 2 nm pourrait facilement passer par le canal de 2-3 nm de diamètre du placier mais la tige du fimbriae, d'une largeur de 6,8 nm, ne le pourrait pas, à moins d'y être engagée déroulée, sous la forme d'une fibre linéaire de 2 nm de diamètre <sup>334</sup>. La tige du fimbriae pourrait être transloquée à travers la membrane externe sous cette forme linéaire pour ensuite adopter sa conformation hélicoïdale finale seulement après avoir atteint la surface externe. Ce phénomène pourrait être impliqué dans le processus à l'origine de la croissance de cette organelle à la surface bactérienne. Le placier jouerait un rôle plus actif dans l'assemblage du fimbriae que la simple fonction de pore. PapC reconnaîtrait de façon différentielle les complexes chaperone/sous-unité selon leur position finale dans le fimbriae <sup>63</sup>. C'est le complexe chaperone/adhésine qui se lie le plus fortement et le plus rapidement au placier. La cinétique de séparation des complexes chaperone/adhésine au placier serait un facteur déterminant dans la localisation de l'adhésine à la pointe. De plus, pour tous les complexes chaperone/sous-unité, les taux de dissociation du placier sont faibles, ce qui suggère qu'après l'association d'un complexe

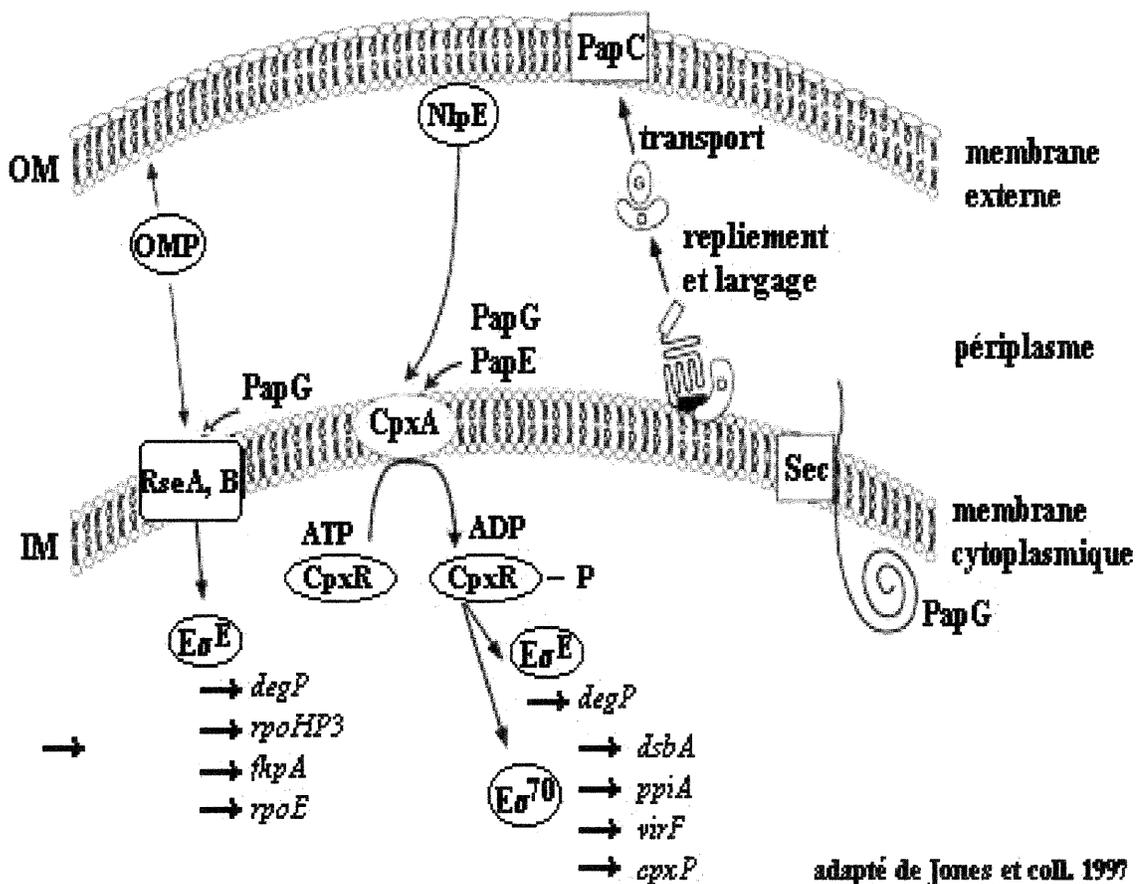
avec le placier, la sous-unité est destinée à l'assemblage du fimbriae. La complémentarité de surface sous-unité/sous-unité jouerait également un rôle-clé dans l'ordre relatif de l'incorporation des sous-unités dans le fimbriae en croissance. Les protéines adaptatrices PapF et PapK sont requises pour l'initiation efficace de la pointe fibrillaire et de la tige fimbriaire. PapK régulerait la longueur de la pointe fibrillaire<sup>157, 204</sup>. Quant à PapJ, elle serait une co-chaperone<sup>330</sup>.



**Figure 5.** Modèle pour l'assemblage du fimbriae Pap de *E. coli* via le mécanisme placier/chaperone. Adapté de Soto *et coll.* (1998 et 1999)<sup>313, 314</sup>.

Des mécanismes de transduction de signal détectent l'assemblage du fimbriae P. En l'absence de la chaperone, l'expression des sous-unités fimbriaires est toxique pour les souches de *E. coli* dépourvues de la protéase périplasmique DegP<sup>162</sup>. Cette toxicité serait attribuable à la formation d'agrégats de sous-unités dans le périplasme, lesquels sont normalement dégradés par DegP<sup>180</sup>. Cette agrégation protéique dans le périplasme est détectée par au moins deux systèmes de transduction de signal<sup>51</sup>: le système à deux composantes CpxA-CpxR, dans lequel CpxA est le détecteur/kinase associé à la membrane, et CpxR est l'effecteur/régulateur se liant à l'ADN<sup>153, 272</sup>; et la voie modulatrice  $\sigma^E$ , dans laquelle RseA et RseB régulent négativement le facteur de transcription  $\sigma^E$  (RpoE)<sup>53, 235</sup>.

Ces deux voies stimulent la transcription de *degP* ainsi que celle de plusieurs autres gènes codant pour des protéines de type chaperone, et elles sont toutes deux activées par l'agrégation des sous-unités fimbriaires <sup>162</sup>. Plus précisément, en vue de signaler la terminaison de l'assemblage selon le mécanisme placier/chaperone (voie *OFF*), les sous-unités adopteraient une conformation rendant leurs interactions improductives et conduisant à leur dégradation subséquente <sup>162</sup>. L'assemblage adéquat du fimbriae P nécessite la présence du régulateur CpxR, lequel influence positivement l'expression du promoteur *pap* <sup>153</sup>. Ainsi, la voie Cpx contrôle la réponse au stress périplasmique et l'assemblage du fimbriae et elle est aussi impliquée dans régulation de la variation de phase chez *pap* <sup>153</sup>. Il est suggéré que les voies de signalisation par Cpx et par  $\sigma^E$ , où le facteur de transcription  $\sigma^E$  (RpoE) est négativement régulé par RseA et RseB, puissent contrôler la biogenèse du fimbriae en régulant l'expression de multiples protéases périplasmiques et protéines de type chaperone, lesquelles sont ultimement requises pour la formation du fimbriae <sup>153, 333</sup>.

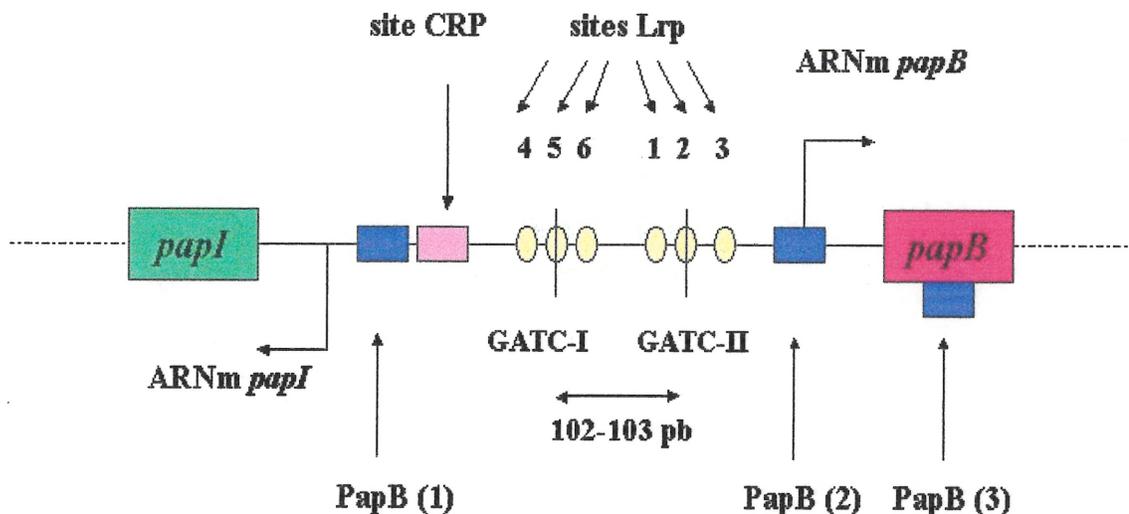


**Figure 6.** Modèle pour les voies de transduction de signal régulant la biogenèse du fimbriae.  
Adapté de Jones et coll. (1997) <sup>162</sup>.

#### 4.1.3. La régulation de l'expression du fimbriae Pap

L'expression du fimbriae Pap de *E. coli* est régie à deux niveau de régulation qui se superposent: d'abord au niveau de la transcription basale, qui détermine la quantité de fimbriae exprimée à la surface d'une seule cellule; ensuite au niveau de la variation de phase, un processus par lequel les cellules individuelles font la transition entre les états d'expression (phase *ON*) et de non-expression (phase *OFF*) du fimbriae (revue <sup>343</sup>). Chez Pap, la variation de phase est contrôlée au niveau transcriptionnel par un mécanisme épigénétique complexe impliquant la formation de motifs spécifiques de méthylation de l'ADN (revue <sup>345</sup>). La méthylation de l'ADN contrôle la liaison du régulateur global Lrp (*Leucine-Responsive Regulatory Protein*) aux séquences régulatrices de l'ADN *pap*. De plus, le co-régulateur PapI, codé par l'opéron *pap*, contrôle la liaison de Lrp à l'ADN de la région régulatrice de *pap* <sup>166, 255, 256</sup>. Des analyses génétiques ont révélé que Lrp, PapI et la Dam (*Deoxyadenosine Methyltransferase*) étaient toutes requises pour la transcription de *pap* <sup>24</sup>. Par ailleurs, l'expression de *pap* est également sujette à la thermorégulation qui implique la méthylation par la Dam et H-NS <sup>110, 112, 113, 362-364</sup>. De plus, il existe une modification endonucléotique post-transcriptionnelle du messenger polycistronique *pap* par la RNase E <sup>9, 252, 253</sup>.

L'expression du fimbriae Pap dépend de la transcription de deux opérons, soit l'opéron majeur *pap* sous le contrôle du promoteur *papBp* et l'opéron divergent *papI* <sup>10, 110</sup>. Ces deux opérons requièrent l'activation par le complexe cAMP-CRP (CRP : *cAMP Receptor Protein*) lié à un site à l'intérieur d'une séquence activatrice en amont (UAS : *Upstream Activating Sequence*) localisée entre les deux promoteurs *papBp* et *papIp* <sup>98, 111</sup>. La variation de phase de Pap requiert l'action concertée des protéines régulatrices fimbriaires PapI et PapB, ainsi que celle des régulateurs globaux Lrp et CRP <sup>345</sup>. L'interaction (attachement coopératif) entre les protéines de liaison à l'ADN (CRP, Lrp, PapB et PapI) et leur liaison à certains sites détermineraient le passage en phase *ON* ou *OFF*. La transition en phase *OFF* pourrait être initiée en bloquant l'accès de l'ARN pol aux promoteurs, soit par le masquage du promoteur causé par la liaison d'un régulateur dans cette région, soit en empêchant l'attachement coopératif requis pour la formation de la boucle dans l'ADN et pour le recrutement de l'ARN pol.



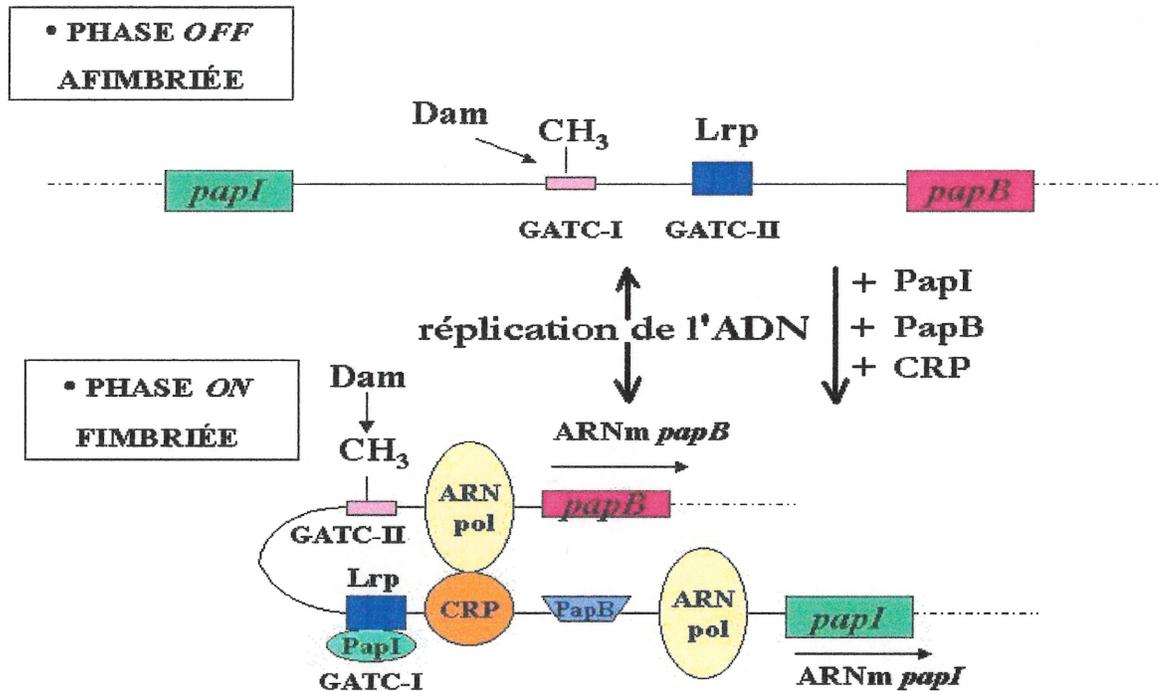
**Figure 7.** Organisation de la région régulatrice chez l'opéron *pap*.  
Adapté de van der Woude *et coll.* (1996)<sup>345</sup>.

#### 4.1.3.1. La variation de phase

Traditionnellement, la variation de phase est définie en tant que haute fréquence de *transition ON↔OFF* de l'expression phénotypique (revue<sup>135</sup>). La variation de phase, habituellement réversible, se produit généralement à une fréquence élevée ( $>10^{-5}$  par génération) et résulte en une population phénotypiquement hétérogène. Malgré leur caractère aléatoire, les événements de variations de phase peuvent aussi être considérés comme programmés puisque le génome de la cellule est généralement organisé de façon telle que certains événements ont une meilleure probabilité de se produire. La variation de phase se manifeste chez une variété de formes de vie microbienne, tant bactériennes que non-bactériennes, et elle régit entre autres l'expression de diverses structures de surface retrouvées chez les bactéries Gram-négatives (fimbriae, flagelles, OMPs et LPS). Biologiquement, la variation de phase, parce qu'elle conduit à la création d'une population mixte présentant une hétérogénéité phénotypique, constituerait une stratégie d'adaptation aux conditions environnementales sans cesse changeantes (milieu extérieur et hôte). La variation de phase peut s'opérer par l'entremise de divers mécanismes et, chez le fimbriae P de *E. coli*, elle est médiée par la méthylation différentielle<sup>16, 345</sup>. Il s'agit d'un mécanisme épigénétique puisque seuls les phénotypes sont altérés alors que les génotypes ne le sont pas: l'intégrité du génome est maintenue alors que diverses protéines régulatrices agissent de concert en vue de modifier la transcription du gène sujet à la variation de phase<sup>135</sup>.

#### 4.1.3.2. Le mécanisme de la variation de phase chez l'opéron *pap*

L'expression du fimbriae Pap, à 37° C, est soumise au mécanisme de contrôle qu'est la variation de phase, ce qui a pour conséquence que dans une population, certaines cellules sont fimbriées (phase *ON*) tandis que d'autres ne le sont pas (phase *OFF*)<sup>17, 205, 345</sup>. La variation de phase implique la participation des protéines fimbriaires PapB et PapI, des régulateurs globaux CRP et Lrp ainsi que celle de la Dam<sup>345</sup>.



**Figure 8.** Le mécanisme de la variation de phase chez *pap*.  
Adapté de van der Woude *et coll.* (1996)<sup>345</sup>.

La variation de phase de Pap est contrôlée au niveau transcriptionnel<sup>17</sup> par la méthylation différentielle des deux sites GATC situés dans la région régulatrice intercistronique de *pap*<sup>16, 23, 24</sup>. Ces deux sites sont des cibles pour la méthylation par la Dam, le site GATC-II (GATC<sup>1130</sup> ou GATC<sup>prox</sup>) étant situé à 53 pb en amont du site d'initiation de la transcription de *papBA* et le site GATC-I (GATC<sup>1028</sup> ou GATC<sup>dist</sup>) étant placé à 102 pb en amont du site GATC-II<sup>16</sup>. Chez les cellules en phase *OFF*, le site GATC-I est méthylé et le site GATC-II ne l'est pas, la situation inverse étant trouvée chez les bactéries en phase *ON*<sup>16</sup>. Lrp est un régulateur global qui active ou réprime l'expression de certains gènes<sup>29, 244, 245</sup>. Dans la variation de phase, la protéine Lrp est requise pour le blocage de la méthylation par la Dam aux deux sites GATC de l'opéron *pap*<sup>23, 206, 256, 361</sup>.

Chez les cellules afimbriées (phase *OFF*), Lrp, en se liant de façon coopérative aux sites Lrp 1, 2 et 3 localisés dans la région régulatrice de *pap*, empêche la méthylation au site GATC-II, situé dans le site Lrp 2<sup>255, 345, 348</sup>. L'inhibition de la transcription de *pap* par la liaison de Lrp aux sites 1, 2 et 3 est probablement attribuable à un encombrement stérique qui bloque l'accès de l'ARN pol au promoteur *papBAp* placé entre les sites Lrp 2 et 3. Le site GATC-I est quant à lui méthylé par la Dam, Lrp ne se liant pas dans cette région en phase *OFF*<sup>24, 255</sup>. La méthylation du site GATC-I par la Dam modifierait l'affinité de Lrp pour les sites 4 et 5 de la région régulatrice *pap*<sup>256</sup>. La liaison de Lrp aux sites 4 et 5 étant nécessaire à l'activation de la transcription de *papBA*<sup>255</sup>, la méthylation du site GATC-I bloquerait les cellules en phase *OFF* jusqu'à ce que la réplication de l'ADN survienne<sup>24</sup>.

En phase *ON*, le site GATC-I n'est pas méthylé tandis que le site GATC-II l'est<sup>16</sup>. La protéine PapI, en collaboration avec Lrp, est nécessaire pour bloquer la méthylation au site GATC-I<sup>23</sup>, PapI se liant à Lrp et accroissant l'affinité de cette dernière pour les sites 4 et 5 dans la région GATC-I<sup>255</sup>. L'altération de l'affinité de liaison de Lrp protège le site GATC-I contre la méthylation et libère ainsi le site GATC-II, lequel est alors méthylé par la Dam. De cette façon, Lrp peut agir tant en activateur (lorsque lié au site GATC-I) qu'en répresseur (lorsque lié au site GATC-II) de la transcription de *papBA*<sup>255, 348</sup>.

D'autres protéines dont PapB et CRP sont aussi impliquées dans la variation de phase fimbriaire. PapB active la transcription de *papI*<sup>10</sup> en se liant à la région régulatrice en amont du promoteur *papIp*<sup>97</sup>. En conditions où PapI est exprimé constitutivement, la variation de phase est possible même chez des cellules *papB*, ce qui démontre le rôle indirect de PapB dans l'activation de la transcription de *pap*<sup>362</sup>. Enfin, la liaison de CRP se centre à 215,5 pb en amont du promoteur *papBAp* et il est requis tant pour l'activation de la transcription à partir de *papBAp* qu'à partir de *papIp*<sup>111</sup>. CRP ne serait pas requis pour la translocation de Lrp aux sites 4, 5 et 6 mais il jouerait un rôle lors d'une étape ultérieure (résultats non-publiés<sup>362</sup>). Tant *in vitro* qu'*in vivo*, l'activation de *papBAp* requiert la liaison du complexe cAMP-CRP, pour le recrutement de l'ARN pol au promoteur, ainsi que celle de Lrp au site Lrp 4, ces deux régulateurs se liant de façon indépendante à leurs sites de liaison respectifs sur l'ADN *pap*<sup>360</sup>.

#### 4.1.3.3. La méthylation par la Dam

Chez *E. coli*, l'enzyme Dam (*Deoxyadenosine Methyltransferase*) méthyle le résidu adénine en position <sup>6</sup>N des séquences 5'-GATC-3' de l'ADN et ceci joue un rôle important dans le contrôle temporel de l'initiation de la réplication de l'ADN, dans la ségrégation des chromosomes, ainsi que dans la coordination des événements cellulaires tels que la transposition de *Tn10* et la correction des mésappariements de réplication (*mismatch repair*) avec la réplication de l'ADN (revue <sup>217</sup>). Ceci se produit à la suite de la formation de sites GATC transitoirement hémiméthylés suite au passage de la fourche de réplication. Puisque le niveau intracellulaire de Dam est bas, soit 130 molécules de Dam par cellules de *E. coli* environ, les sites GATC demeurent dans un état hémiméthylé durant 10%-20% du cycle cellulaire, ce qui permet une ouverture temporelle pendant laquelle les événements liés à la réplication de l'ADN peuvent se dérouler <sup>22</sup>. Les motifs de méthylation du chromosome peuvent être modulés par le milieu de croissance, la phase de croissance, ainsi que par la présence du régulateur global Lrp <sup>23, 123, 292</sup>. Les motifs de méthylation de l'ADN seraient formés par la liaison de protéines régulatrices telles que Lrp aux sites GATC, ou encore par des changements conformationnels de l'ADN près des sites GATC se produisant de façon naturelle ou étant induits par des protéines.

La plupart des 18 000 sites GATC estimés chez *E. coli* sont méthylés par la Dam. Jusqu'à tout récemment, on a cru que tous les sites GATC étaient ou bien complètement méthylés ou encore hémiméthylés, pour un court moment suivant le passage de la fourche de réplication. Toutefois, l'analyse de l'opéron *pap* a démontré que deux sites GATC situés dans la région régulatrice, le site GATC-II se trouvant à 53 pb en amont du site d'initiation de la transcription de *papBA* et le site GATC-I à 102 pb en amont du site GATC-II, étaient non-méthylés sous certaines conditions, ceci créant des motifs de méthylation spécifiques <sup>16</sup>. Ces deux sites GATC sont des cibles pour la Dam, leur méthylation différentielle étant impliquée dans la variation de phase qui détermine la transition entre les phases *ON* et *OFF* de l'expression du fimbriae Pap chez *E. coli* <sup>16, 23</sup>. Chez les cellules en phase *OFF*, le site GATC-I est méthylé et le site GATC-II ne l'est pas, la situation inverse étant trouvée chez les bactéries en phase *ON* <sup>16</sup>. L'évidence que ces motifs de méthylation des sites GATC contrôlent l'expression génétique de *pap* a été obtenue par l'étude de mutants *dam* de *E.*

*coli*, l'expression de *Pap* étant abolie tant chez les cellules *Dam*<sup>-</sup> que chez celles surexprimant la *Dam*<sup>16</sup>.

Lrp est une protéine de régulation globale qui est requise pour la protection spécifique de la méthylation de sites GATC-I et GATC-II<sup>23, 25</sup>. Lrp se lie seul à l'ADN non-méthylé du site GATC-II mais requiert, pour sa liaison à la région GATC-I, la présence de la protéine *PapI*<sup>256</sup>. De plus, l'activation de la transcription de *pap* nécessite que *PapI* et Lrp soient présents<sup>256</sup>. Ainsi, chez les cellules en phase *ON*, le site GATC-I est non-méthylé, ce qui permet à Lrp/*PapI* de se lier aux séquences d'ADN situées près de ce site. Puisque la liaison de Lrp/*PapI* au site GATC-I n'est pas possible lorsque l'ADN de *pap* est totalement méthylé, ceci indique que l'état de méthylation de l'ADN *pap* contrôle la liaison des protéines régulatrices Lrp et *PapI*<sup>256</sup>. Ainsi, lorsque le site GATC-I est méthylé, la formation de la phase *ON* est bloquée suite à l'inhibition de la liaison des protéines régulatrices Lrp et *PapI* à ce site et *pap* n'est alors pas transcrit<sup>24</sup>. Inversement, la méthylation du site GATC-II est requise pour la transcription en phase *ON* par l'inhibition de la liaison de Lrp aux sites de cette région chevauchant le promoteur *papBp*<sup>24</sup>.

*In vitro*, des études de protection de la méthylation ont révélé que la liaison de Lrp à *pap* est en effet suffisante pour la formation des motifs de méthylation de l'ADN observés dans la région régulatrice de *pap*: la liaison de Lrp inhibe la méthylation des sites GATC-I et GATC-II par la *Dam*<sup>346</sup>. Ces résultats confirment les études *in vivo* démontrant que Lrp est requise pour la protection des sites GATC-I et GATC-II contre la méthylation<sup>23</sup>, la protection de la méthylation du site GATC-I requérant toutefois la présence de *PapI*, même si la liaison de Lrp de façon *PapI*-indépendante au site GATC-I est possible *in vitro* avec de hauts niveaux de Lrp<sup>256</sup>.

Bien que les mutations *dam* aient des effets pléiotropiques et que la *Dam* puisse indirectement affecter la transcription de *pap*, il semble que ce ne soit pas le cas<sup>24</sup>. Des études de mutagenèse au niveau des sites GATC pour les rendre non-méthylables (GATC→GCTC) ont révélé que ces mutations n'influençaient pas la liaison de Lrp et *PapI* aux séquences régulatrices de l'ADN *pap*<sup>24</sup>. Toutefois, un isolat contenant une mutation au site GCTC<sup>1028</sup> (site I) démontrait un phénotype bloqué en phase *ON*, même avec des niveaux de *Dam* élevés, ce qui indique que la méthylation de ce site est requise pour la

transition en phase *OFF*. Chez ce mutant bloqué en phase *ON*, la régulation demeure Lrp-dépendante.

Au contraire, un phénotype bloqué en phase *OFF* était présenté par les cellules portant une mutation au site GCTC<sup>1130</sup> (site II), seule ou en combinaison avec la mutation GCTC<sup>1028</sup> (site I). La mutation au site 1130 se révélant alors épistatique à celle du site 1128, ceci démontre que la méthylation du site GATC<sup>1130</sup> (GACT-II) est requise pour la transcription de *pap*<sup>24</sup>. Cette conclusion est supportée par le fait que des mutants expriment un phénotype bloqué en phase *OFF* dans un environnement génétique *dam*<sup>-</sup>, ceci indiquant que l'activité de la Dam est nécessaire pour la transcription de *pap*. Ainsi, l'état transcriptionnel de l'opéron *pap* est déterminé par l'état de méthylation des sites GATC-I et GATC-II; la transcription ne survient que lorsque ces sites ont tous deux la configuration de méthylation appropriée<sup>24</sup>.

La surexpression de PapI (sur un plasmide; *papI* étant sous le contrôle de *lacZp* (inductible à l'IPTG) et LacI<sup>q</sup> étant exprimé sur un autre plasmide) restaurerait partiellement la transcription de *pap* chez le mutant GCTC<sup>1130</sup> (site II)<sup>24</sup>. Chez ce mutant, l'ADN est complètement méthylé au site GATC<sup>1028</sup> (GATC-I), suggérant de ce fait que la liaison de Lrp/PapI se produit rarement chez ce mutant, même si Lrp/PapI peut se lier à la région du site GATC-I lorsqu'il est non-méthylé, tel que vérifié lors d'études *in vitro* d'empreintes d'ADN. Cette contradiction entre les observations *in vivo* et *in vitro* pourrait provenir du fait que les niveaux de PapI présents chez les cellules n'ayant qu'une seule copie de l'opéron *pap* sont beaucoup plus bas que ceux utilisés *in vitro*. Le cas échéant, de niveaux intracellulaires de PapI si élevés chez les cellules bloquées en phase *OFF* devraient résulter en une occupation de la région du site GATC-I par Lrp/PapI, induisant ainsi la transition en phase *ON*. Même si la surproduction de PapI permet un haut degré de protection de la méthylation du site GATC-I du mutant GCTC<sup>1130</sup> (site II) bloqué en phase *OFF*, la liaison de Lrp/PapI au site GATC-I est requise mais insuffisante pour la transcription optimale de *pap*, la méthylation du site GATC-II étant aussi nécessaire pour le passage en phase *ON*<sup>24</sup>.

Il semble probable que Lrp doive se dissocier de l'ADN *pap* en vue de permettre la méthylation des sites GATC. On ne sait pas si cette dissociation est aléatoire ou si elle nécessite un événement cellulaire tel que la réplication de l'ADN. En résumé, selon plusieurs études, le modèle de la variation de phase chez *pap* impliquerait une compétition entre la Dam et Lrp pour les régions contenant des sites GATC, ceci constituant une étape importante pour la détermination du motif de méthylation de l'ADN ainsi que pour l'état transcriptionnel de *pap*<sup>16, 24, 255, 256, 346</sup>.

Puisque la méthylation complète des deux brins d'ADN est un événement subséquent à la réplication, le contrôle de l'initiation de cette dernière par la conformation de l'ADN pourrait constituer une forme de régulation influençant le degré de méthylation autre que celle impliquant la Dam. En effet, le niveau global de surenroulement global influence la topologie d'*oriC* et ainsi la séquence des événements lors de l'initiation de la réplication, un état relaxé du chromosome causant l'asynchronisation de l'initiation de la réplication à *oriC*<sup>351</sup>. Ainsi, une modification du degré du surenroulement de l'ADN par des mutations dans les gènes codant pour les topoisomérases pourrait de cette façon influencer l'expression des opérons de type *pap*, tant au niveau de la transcription basale que de la variation de phase.

#### 4.1.3.4. Lrp

Le régulon leucine/Lrp est un système de réponse globale gouverné par le régulateur transcriptionnel Lrp (*Leucine-Responsive Regulatory Protein*), une petite molécule basique (pI 9,2) composée de deux sous-unités identiques de 18,8 kDa qui se lie à l'ADN sous forme de dimère (revue<sup>29, 244, 245</sup>). Chez les cellules présentant une déficience pour Lrp, la transcription de 35 à 75 gènes est affectée, à la hausse pour certains et à la baisse pour d'autres. La présence de leucine dans le milieu de culture affecte parfois l'action de Lrp sur certains promoteurs-cibles, tandis que d'autres promoteurs régis par Lrp ne semblent que peu ou pas influencés par la leucine. Les opérons du régulon Lrp peuvent être affectés de façon positive ou négative et, dans certains cas, la leucine et la L-alanine peuvent moduler le contrôle, ceci possiblement par leur interaction directe avec Lrp, ce qui inhiberait sa liaison. Lrp agit en tant qu'activateur dans l'expression des opérons *papBA*<sup>23, 25, 256</sup> et *papI*<sup>256</sup>, et son expression est indépendante de la leucine<sup>25</sup>.

Comme c'est le cas pour plusieurs régulateurs transcriptionnels, Lrp s'autorégule, son expression n'est pas affectée par la présence de leucine et, en milieu riche, *lrp* est soumis à une répression significative<sup>29, 244, 245</sup>. Aussi, le niveau cellulaire de Lrp peut varier selon une relative abondance externe d'acides aminés et selon la source de carbone fournie en milieu pauvre. Puisque l'affinité de Lrp pour divers promoteurs varie grandement, Lrp pourrait constituer un important régulateur métabolique tant en milieu riche que pauvre. La différence dans les taux d'expression de *lrp* pourrait indiquer qu'il existe divers réglages dans le réseau métabolique cellulaire, où les systèmes possédant une faible affinité pour Lrp sont régulés de façon significative seulement durant la croissance en milieu minimal. Les manifestations phénotypiques associées à la perte de Lrp sont multiples et elles affectent principalement le métabolisme de la sérine et des unités à un seul carbone, l'assimilation de l'azote, la biosynthèse des certains acides aminés, les systèmes transporteurs ainsi que la synthèses d'appendices externes.

La plupart des opérons fimbriaires sont affectés par Lrp et généralement un mutant *lrp* ne peut plus synthétiser le fimbriae, ce qui suggère un défaut important dans l'adhésion aux tissus animaux. Ainsi, Lrp pourrait réguler positivement les gènes impliqués en période de carence nutritionnelle et négativement ceux qui sont actifs en temps d'abondance<sup>29</sup>. Une plus forte expression du fimbriae durant la croissance en milieu pauvre favoriserait une meilleure adhésion aux cellules épithéliales, ce qui faciliterait la maintenance de la bactérie dans l'environnement. En période d'abondance toutefois, une synthèse importante de fimbriae serait moins critique pour la survie puisque la croissance rapide des microorganismes permettrait facilement de maintenir leur présence (revue<sup>131</sup>).

Chez l'opéron *ilvIH*, qui est régulé par Lrp et qui est sensible à la leucine, la séquence consensus pour la liaison de Lrp à l'ADN est le pentamère TTTAT<sup>270</sup>, aussi retrouvé chez plusieurs gènes du régulon Lrp<sup>29, 244, 245</sup>. Puisque chez l'opéron *pap*, qui ne réagit pas à la présence de leucine, les sites Lrp ne sont pas similaires à cette séquence consensus, Lrp reconnaîtrait soit une structure de l'ADN, soit un motif répétitif de A et de T<sup>29</sup>. Le consensus du site de liaison pour Lrp chez *pap* est Gnn(n)TTT<sup>255</sup>. Il semble que Lrp se lie à l'ADN d'une façon différente selon que les opérons sont sensibles (*ilvIH*) ou non à la leucine (*pap*) (revue<sup>347</sup>). De plus, il semble que Lrp lui-même possède la capacité de courber l'ADN (135° par deux sites)<sup>29</sup>.

Six sites de liaison pour Lrp à l'ADN ont été identifiés dans la région régulatrice de l'ADN *pap* et ils sont séparés les uns des autres par environ trois tours d'hélice<sup>255</sup>. Les sites 1, 2 et 3 de liaison pour Lrp sur *pap* se trouvent autour du site GATC-II, tandis que les sites 4, 5 et 6 entourent le site GATC-I, les sites de méthylation de GATC-I et GATC-II étant localisés, respectivement, à l'intérieur des sites 2 et 5 de liaison pour Lrp<sup>255</sup>. La liaison de Lrp à l'ADN se fait de façon coopérative<sup>166, 255</sup>. Lrp participe à l'activation de la transcription de *papBA* puisque chez des mutants *lrp* « null », le fimbriae Pap n'est pas exprimé<sup>23, 24</sup>. Un domaine de Lrp, autre que celui qui est requis pour la liaison à l'ADN, est essentiel pour l'activation de *papBA*, ce qui suggère que ce domaine puisse interagir avec l'ARN pol, possiblement par un contact avec la portion l' $\alpha$ CTD de l'ARN pol<sup>269, 348, 360</sup>.

Dans la variation de phase (*ON*↔*OFF*), la liaison de Lrp à l'ADN dépend de la méthylation différentielle des deux sites GATC par la Dam. Aussi, la liaison de Lrp près d'un site GATC empêche-t-elle la Dam de le méthyler. La liaison de Lrp à son site induirait une courbure dans l'ADN<sup>29, 143, 347</sup>. Pour l'activation de la transcription de *pap*, la liaison de Lrp au site GATC-I est insuffisante<sup>269, 348</sup>. En phase *ON*, Lrp interagit avec PapI<sup>166, 256</sup> pour la protection du site GATC-I contre la méthylation par la Dam<sup>23</sup>. La liaison de Lrp aux sites 4 et 5 active la transcription de *pap*, possiblement par un contact direct avec l'ARN pol<sup>348</sup>. Lrp se lie au site GATC-II, qu'il soit méthylé ou non<sup>24</sup>. Toutefois, la liaison de Lrp au site GATC-I non-méthylé requiert la présence de PapI<sup>24, 256</sup>.

Récemment, des études *in vitro* de protection contre la méthylation ont démontré que la liaison de Lrp est à elle seule suffisante pour l'établissement des motifs de méthylation des phases *OFF* et *ON* de l'ADN *pap* mais aussi que la liaison de Lrp à la région GATC-II, située près de *papBp*, résulte en la répression de la transcription de *papBA*<sup>361</sup>. Ainsi, Lrp peut agir aussi bien en tant que répresseur qu'activateur de la transcription de l'opéron *pap*, selon que Lrp occupe les sites de liaison à l'ADN *pap* dans la région GATC-II ou GATC-I, respectivement<sup>348</sup>.

Le domaine de liaison de Lrp pour l'ADN s'étend des acides aminés 13 à 79<sup>269</sup>. Des substitutions d'acides aminés aux positions 126, 133 ou 134 dans la protéine Lrp réduisent fortement la transition *OFF*→*ON* chez Pap<sup>165</sup>. Des analyses *in vitro* ont non seulement démontré que les variants Lrp<sup>T134A</sup> et Lrp<sup>E133G</sup> conservaient une affinité pour l'ADN *pap*

similaire à Lrp sauvage mais aussi que ces mutants Lrp répondaient aussi bien à PapI que ne le fait Lrp sauvage, dont l'affinité de liaison aux sites Lrp 4, 5 et 6 de *pap* était alors accrue. De plus, des analyses *in vivo* ont révélé que les mutants Lrp<sup>T134A</sup> et Lrp<sup>E133G</sup> activaient la transcription d'un dérivé de l'opéron *pap* bloqué en phase *ON* (qui contient une mutation dans le site Lrp 3) et que le mutant Lrp<sup>T134A</sup> était bloqué dans une étape de la variation de phase n'impliquant pas PapI. Ainsi, ces mutants Lrp présentent un défaut dans une interaction inconnue requise pour la transition de la phase *OFF* vers l'état transcriptionnel de *pap* en phase *ON*<sup>165</sup>.

#### 4.1.3.5. Les protéines fimbriaires de régulation : PapI et PapB

Les protéines fimbriaires PapI et PapB contrôlent la synthèse des fimbriae et leurs gènes sont orientés et transcrits de façon divergente, le promoteur *papIp* initiant la transcription de *papI* et *papBAp* initiant celle du messenger polycistronique *papBAHC* et sûrement aussi celle de *papDJKEFG*<sup>9, 10, 109, 110</sup>. PapI régule *papBA* en *trans*<sup>10, 256</sup>, et PapB agit sur *papI* en *trans*<sup>97, 111</sup>.

##### 4.1.3.5.1. PapB

PapB<sup>371</sup> est une protéine de 11 kDa codée par le gène *papB* du messenger polycistronique transcrit à partir du promoteur *papBp*<sup>10</sup> qui possède trois sites de liaison à l'ADN nommés *PapB binding sites* 1, 2 et 3<sup>97</sup>. Deux de ces sites sont localisés dans la région intercistronique. Le premier site, qui semble préférentiel, se trouve à plus de 200 pb en amont du promoteur *papBp*, directement adjacent au site de liaison pour le complexe cAMP-CRP. PapB et cAMP-CRP agiraient façon coopérative aux séquences activatrices en amont (UAS : *Upstream Activating Sequences*) en ce qui concerne la stimulation de la transcription à partir des promoteurs *papBp* et *papIp*<sup>97</sup>. En considérant que les complexes cAMP-CRP peuvent induire des altérations conformationnelles dans l'ADN<sup>199, 367</sup>, un niveau de coopérativité pourrait impliquer des changements structuraux ou topologiques de l'ADN causés par les protéines<sup>97</sup>. Le second site de liaison PapB à l'ADN est localisé dans des séquences chevauchant celle de la région -10 du promoteur *papBp* et il pourrait agir comme site opérateur où la liaison de la protéine PapB préviendrait l'initiation de la transcription par l'ARN pol<sup>97</sup>. Un troisième site pour la liaison de PapB a été trouvé dans

la séquence codante du gène *papB* lui-même <sup>97</sup>. Bien qu'on ne sache pas si ce pourrait être aussi le cas pour l'opéron *pap*, ceci rappelle l'organisation de l'opéron *gal* pour lequel un mécanisme de répression efficace de la transcription de *galETK* a été proposé et qui impliquerait la formation d'une boucle dans l'ADN, causée par l'interaction entre des protéines répresseuses liées à deux sites <sup>2</sup>. Des études préliminaires de mutagenèse ont révélé que la délétion du site 3 n'abolit pas l'autorégulation par PapB (travaux non publiés, cité dans <sup>370</sup>).

Dès lors, PapB posséderait une double fonction en tant qu'activateur/répresseur pour la transcription de l'adhésine fimbriaire et son mode d'action autorégulateur impliquerait sa liaison différentielle à divers sites <sup>97</sup>. Le produit du gène *papB* stimule l'expression de *pap* et agit en tant que régulateur transcriptionnel des promoteurs *pap*. Lorsque la quantité de PapB s'élève au-delà d'un certain niveau, la transcription à partir du promoteur *papBp* est réprimée. Ainsi, PapB a une fonction autorégulatrice <sup>97</sup>. La liaison de PapB aux séquences d'ADN *pap* situées environ 15 pb en amont de la région -35 proposée pour le promoteur *papIp* et adjacentes au site CRP (site 1 de liaison de PapB) peut stimuler la transcription de *papI* <sup>97, 111</sup>. Ainsi, PapB régule indirectement la transcription à partir de *papBp* par la stimulation de la production de PapI. Lors de conditions où PapI est exprimé de façon indépendante, PapB n'est plus requis pour la variation de phase : ainsi, PapB semble jouer un rôle indirect (travaux non publiés par L. Kaltenbach, cité dans <sup>345</sup>). Enfin, il a été suggéré que PapB puisse activer la transcription en contrecarrant la répression causée par H-NS, un protéine de type histone <sup>98</sup>.

Selon des études *in vitro*, la protéine PapB purifiée aurait une affinité pour un motif de 9 pb qui inclut une séquence répétitive contenant des triplets T/A en position conservée, elle occuperait sur l'ADN une région de plus de 50 pb, et l'interaction PapB/ADN se ferait possiblement au niveau du sillon mineur <sup>370</sup>. Il est à noter qu'il pourrait exister un nombre variable de copies de la séquence répétée de 9 pb chez les divers opérons *pap*. PapB se lierait l'ADN de façon oligomérique et pourrait fonctionner comme facteur architectural dans le contrôle transcriptionnel de l'expression fimbriaire <sup>370, 373</sup>. Chez la souche uropathogène *E. coli* J96, il pourrait y avoir de 8 à 10 molécules PapB occupant le site 1 de liaison à l'ADN dans la région régulatrice de l'opéron *pap* <sup>370</sup>. *In vitro*, dans l'ADN de forme B, il est estimé y avoir en moyenne 10,5 pb par tour d'hélice, même s'il peut y avoir

des différences *in vivo*<sup>13, 288</sup>. La répétition hélicoïdale pourrait être de 9 pb par tour lorsque PapB est lié au site 1, ou encore PapB pourrait former une hélice de pas gauche autour de l'ADN<sup>370</sup>, de façon similaire à ce qui a été proposé pour la protéine MetJ de *E. coli*<sup>279</sup>. La protéine HU de *E. coli* se lierait aussi à l'ADN à plusieurs hétérodimères adjacents occupant chacun 9 pb<sup>18</sup>. De plus, les séquences riches en AT ont des propriétés particulières. Entre autres, les séries de A de l'oligonucléotide 5'-GGAAATTTCC-3' montrent une compression graduelle du sillon mineur dans la direction 5' vers 3'<sup>168</sup>. Aussi, des répétitions de A ou T plus longues que trois nucléotides résultent en de l'ADN courbé lorsqu'ils sont positionnés du même côté de l'hélice<sup>122, 181</sup>. La liaison de PapB à l'ADN dépendrait de la conformation de l'ADN<sup>370</sup>, et il y aurait un recourbement de l'ADN au site 1 de liaison pour PapB (travaux non publiés, cité dans Xia *et coll.* (1998)<sup>370</sup>). De plus, la région intercistronique de *pap* contenant la UAS semble avoir une courbe intrinsèque<sup>370</sup>.

Chez plusieurs systèmes fimbriaires, il existe divers homologues de la protéine PapB : SfaB chez le fimbriae S<sup>239</sup>; FanA et FanB chez le fimbriae K99<sup>295</sup>; ClpB qui régule négativement l'expression de l'antigène de surface CS31A<sup>218</sup>; FooB chez le fimbriae F165<sub>1</sub> (Annexe II, p.xxxiii<sup>125</sup>). Cette famille de protéines régulatrices est présente chez de nombreuses bactéries pathogènes d'importance. Dans l'inter-communication (*cross-talk*) entre les opérons fimbriaires *pap* (Pap) et *fim* (fimbriae de type I), PapB est un facteur clé dans le contrôle de la variation de phase de *fim* en faisant en sorte que l'expression de Pap inhibe celle du fimbriae de type 1, chez une même cellule<sup>146, 372</sup>.

#### 4.1.3.5.2. PapI

Quant à PapI, il s'agit d'une protéine de 8,8 kDa codée par le gène *papI* sous le contrôle du promoteur *papIp*<sup>10, 256</sup>. PapI est un régulateur positif fort pour la transcription initiée à partir du promoteur de *papBp*<sup>10, 256</sup> et il est aussi faiblement autorégulateur<sup>256</sup>. Toutefois, PapI n'a aucun effet sur la transcription à partir des promoteurs *papIp* ou *papBp* à moins que Lrp ne soit présent<sup>256</sup>.

PapI joue un rôle clé dans la transition entre les états transcriptionnels *ON* et *OFF*<sup>166</sup>. PapI ne se lie pas seul à l'ADN *pap*<sup>24</sup>: en phase *ON*, PapI interagit avec Lrp<sup>166, 256</sup> pour la protection du site GATC-I contre la méthylation par la Dam<sup>23</sup>. En phase *OFF*, puisque

PapI est absent, Lrp inhibe la transcription en se liant aux sites Lrp 1, 2 et 3 (région GATC-II) qui chevauchent le promoteur *papBp*, possiblement par un encombrement stérique de l'ARN pol, puisque le site Lrp 3 se trouve entre les régions consensus -35 et -10 du promoteur<sup>348</sup>. L'ajout de PapI provoque la translocation de la liaison de Lrp à partir des sites Lrp 1, 2 et 3 vers des sites localisés à plus de 100 pb en amont, soit les sites Lrp 4 et 5, ce qui résulte en un état transcriptionnel *ON*<sup>166</sup>. PapI se lie avec une très haute spécificité aux complexes Lrp-ADN *pap*, mais ne se lie que faiblement aux molécules de Lrp libres. PapI et Lrp interagissent directement l'une avec l'autre. Ainsi, PapI faciliterait la translocation entre les états transcriptionnels *OFF* et *ON* par sa liaison à Lrp et en modifiant son affinité pour les régions GATC-I et GATC-II de *pap*<sup>166</sup>. PapI réduit l'affinité de Lrp pour la région GATC-II et augmente l'affinité de Lrp pour la région GATC-I suite à la réplication<sup>166, 255</sup>. PapI pourrait, en se liant au complexe Lrp-ADN *pap*, modifier la conformation de Lrp, ce qui hausserait son affinité pour les sites 4 et 5 autour de GATC-I<sup>166</sup>. Cette hypothèse est supportée par des études démontrant que la translocation PapI-dépendante de Lrp des sites 1, 2 et 3 vers les sites 4 et 5 est inhibée chez le mutant *pap-14*<sup>166</sup> dépourvu de la séquence GATC-I<sup>255</sup>. Ceci pourrait indiquer que la séquences GATC-I pourrait elle-même être reconnue par les complexes Lrp-PapI<sup>166</sup>.

La méthylation du site GATC-II, requise pour la transition *OFF*→*ON*<sup>24</sup>, pourrait favoriser la dissociation, médiée par PapI, de Lrp des sites 1, 2 et 3 en empêchant la liaison de Lrp et de Lrp-PapI à la région GATC-II<sup>166</sup>. Des études *in vitro* indiquent que la liaison de Lrp-PapI à *pap* est inhibée lorsque le site GATC-I est complètement méthylé, tandis qu'une liaison de Lrp-PapI de faible affinité à l'ADN se produit lorsque le site GATC-I est hémiméthylé<sup>256</sup>. Ainsi, la translocation de Lrp à partir de GATC-II vers la région GATC-I serait restreinte à un court laps de temps suivant la réplication de l'ADN alors que le site GATC-I est hémiméthylé<sup>166</sup>. Il est probable que suite à la translocation de Lrp-PapI à la région GATC-I, PapI se dissocie du complexe Lrp-ADN *pap*, et qu'après un cycle de réplication additionnel, un état de phase *ON* soit généré<sup>166</sup>. La formation de complexes stables entre PapI et Lrp requiert la présence des deux régions de liaison de Lrp autour des sites GATC-I et GATC-II: les séquences GATC elle-mêmes semblent importantes pour la formation de complexes stables PapI-Lrp-ADN *pap*<sup>166</sup>. La liaison de Lrp, en présence de PapI, au site GATC-I stimulerait la transcription de *pap* au-delà de huit fois celle de la transcription basale<sup>348</sup>. La liaison de Lrp à l'ADN *pap* ne suffit pas pour

l'activation de la transcription <sup>269</sup>. Lrp, en présence de PapI, lorsque lié dans la région GATC-I, pourrait interagir directement avec la machinerie transcriptionnelle pour accroître l'affinité de l'ARN pol pour le promoteur *papBp* et/ou pour augmenter le taux de formation du complexe ouvert <sup>348</sup>.

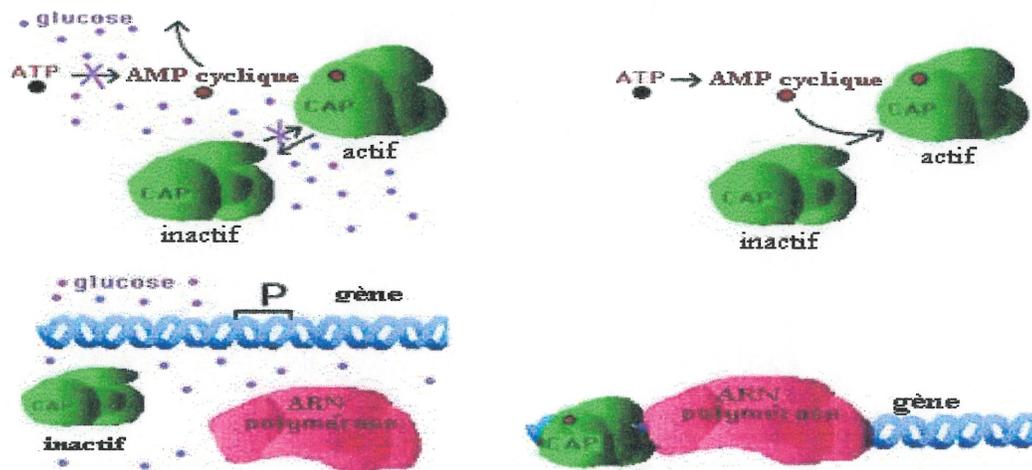
On ne sait pas si Lrp se lie à l'ADN *pap* en tant que dimère, ni combien de molécules Lrp sont présentes dans les complexes en phase *OFF* et *ON*, pas plus qu'on ne connaît la stoechiométrie de la liaison de PapI-Lrp. Des études de liaison croisée (*cross-linking*) Lrp-PapI ont été réalisées <sup>166</sup> : le complexe de 28 kDa est de la taille appropriée pour contenir une seule molécule de PapI (8 kDa) et de Lrp (19 kDa); le complexe de 50 kDa pourrait contenir deux molécules de Lrp et une ou deux molécules PapI, ce qui est en accord avec la possibilité que Lrp lie *pap* sous forme dimérique. De plus, la liaison de Lrp et de Lrp-PapI aux séquences de l'ADN *pap* est coopérative <sup>166, 255</sup>.

La transition de liaison entre les phases *ON* et *OFF* pourrait être limitée par les niveaux de PapI, puisque ceux de Lrp sont relativement abondants (environ 3000 dimères de Lrp par cellule <sup>244, 245</sup>). La transcription de *papI* étant positivement régulée par l'AMPC <sup>111</sup>, lors de conditions où les niveaux d'AMPC sont accrus, les niveaux de PapI augmenteront aussi, ce qui devrait conduire à une plus haute fréquence de transition *OFF*→*ON* <sup>24</sup>. Ceci semble être le cas puisque la fréquence de transition de *OFF*→*ON* de cellules cultivées en milieu minimal contenant du glycérol comme seule source de carbone (hauts niveaux intracellulaires d'AMPC) est 35 fois plus élevée que chez des cellules utilisant du glucose comme source de carbone (faibles niveaux intracellulaires d'AMPC) <sup>17</sup>.

Chez plusieurs opérons fimbriaires de *E. coli*, on retrouve des produits d'expression homologues à PapI : SfaC, DaaF, FaeA, PrfI <sup>166, 349</sup> et FooI (fimbriae F165<sub>1</sub>, Annexe I, p.xix <sup>125</sup>). Ces protéines régulatrices contiennent probablement des régions conservées pour la liaison de Lrp qui leur permettent de se lier aux complexes ADN-Lrp <sup>166</sup>. Toutefois, il n'est pas clair si les différences en acides aminés entre ces homologues PapI <sup>347</sup> reflètent des différences fonctionnelles, telles que des interactions altérées avec Lrp <sup>166</sup>.

#### 4.1.3.6. La répression catabolique

L'expression de plusieurs gènes et opérons est sous le contrôle de la répression catabolique ou effet glucose, un type de régulation globale de réponse aux conditions en carbone. Les gènes de ce régulon appartiennent entre autres à des opérons impliqués dans le métabolisme de diverses sources de carbone (*lac*, *ara*, *gal*, *mal*) ainsi que dans les mécanismes de virulence (*pap*) (revue<sup>311</sup>). Chez *E. coli* et d'autres bactéries entériques, le système de répression catabolique dépendant de l'AMP cyclique (AMPC) est le mieux connu. Lorsque les bactéries croissent en présence de sources réduites de carbone (lactose, maltose, etc.), les niveaux d'AMPC s'accroissent. C'est l'adénylate cyclase, codée par le gène *cya*, qui est responsable de la conversion de l'ATP en AMPC. Cette enzyme associée à la membrane interne est plus active lorsque les concentrations cellulaires de catabolites sont basses et moins active lorsqu'elles sont élevées.



adapté de <http://instructl.cit.cornelledu/courses/biomi290>

Figure 9. La répression catabolique.  
Adapté d'images d'Internet.

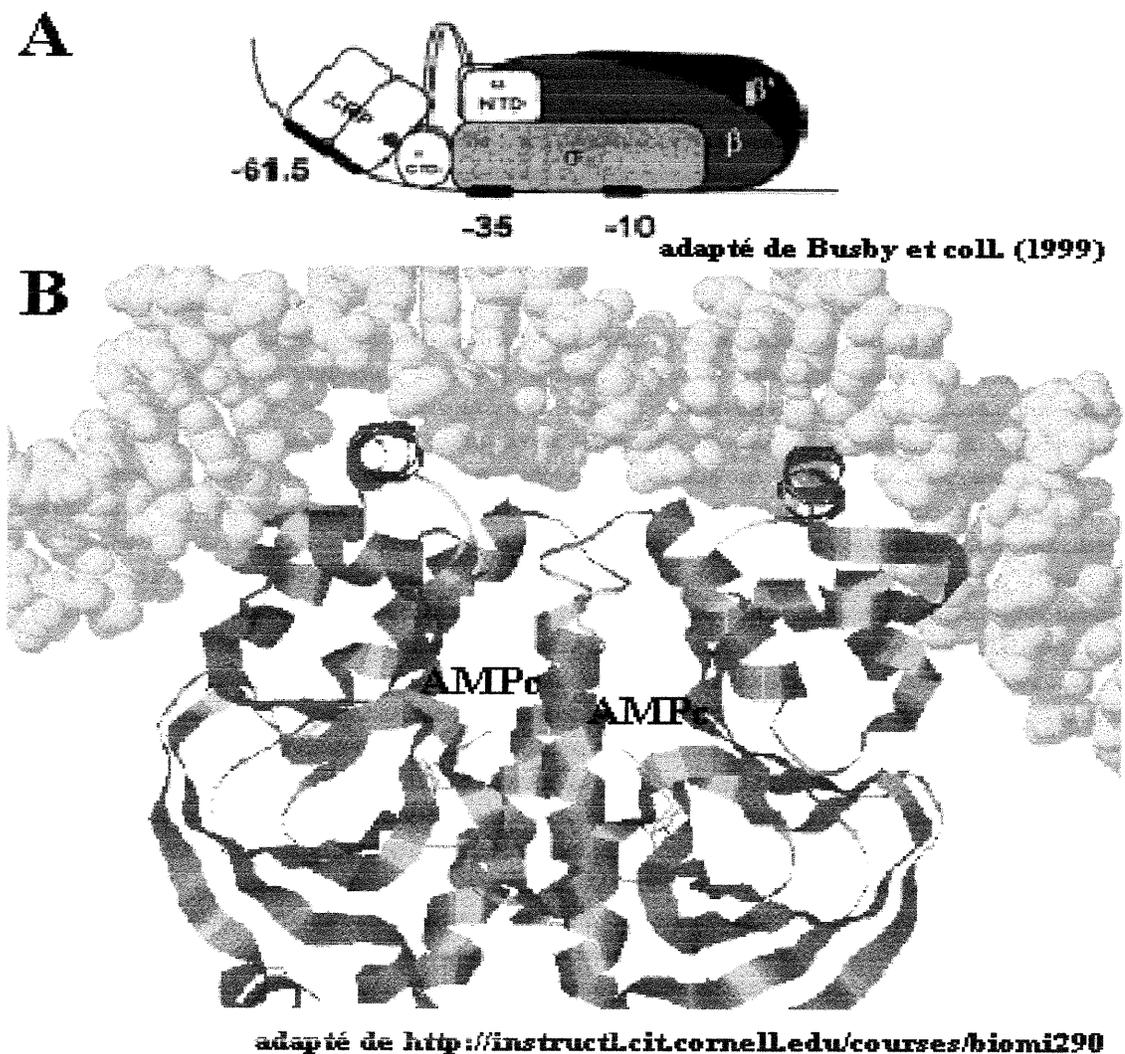
La régulation de l'activité de l'adénylate cyclase requiert la participation du système PTS (*Phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent sugar phosphotransferase system*), qui est impliqué dans l'importation de sucres (le glucose inclus) dans la cellule. La protéine  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ , une des composantes de ce système, existe tant sous la forme phosphorylée ( $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$ ) que non-phosphorylée ( $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ ). La forme  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$  active l'adénylate cyclase qui génère alors de

l'AMPc. Toutefois, la forme  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  n'existe que lorsque l'un des sucres pour lequel elle assume le transport (tel le glucose) est présent dans le milieu. La phosphotransférase HPr (*Histidine Protein*), un autre élément du système PTS, a pour rôle de transférer le phosphate de  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$  sur le sucre lors de son transport. Ainsi, la forme  $\text{IIA}^{\text{Glc}}\sim\text{P}$  activatrice de l'adénylate cyclase est en quantité moindre, ce qui fait chuter les niveaux d'AMPc. De plus, la forme  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$  inhibe d'autres perméases spécifiques à certains sucres (dont entre autres celle du lactose). De cette façon, si le glucose ou une autre source de carbone est disponible, moins de ces autres sucres pénétreront dans la cellule, et ainsi moins de ces inducteurs pourront initier la synthèse de leur opéron respectif.

L'activation des opérons sensibles à la répression catabolique implique la liaison de l'AMPc à la protéine activatrice de la transcription, soit le produit du gène *crp* appelé CRP (*cAMP Receptor Protein*) ou bien CAP (*Catabolite Activator Protein*) (revue <sup>28</sup>). CRP est une protéine dimérique de 45 kDa composée de deux sous-unités identiques, chacune de ces sous-unité consistant en deux domaines <sup>179</sup>. Le domaine amino-terminal (N-ter) (résidus 1-139) est responsable de l'interaction avec l'effecteur allostérique AMPc, qui induit alors chez CRP, en s'y liant, un changement conformationnel résultant en une forme compétente pour la liaison à l'ADN. C'est le domaine C-ter (résidus 140-209) qui est impliqué dans l'interaction avec l'ADN, laquelle interaction est médiée par un motif d'ADN hélice-boucle-hélice. CRP reconnaît un motif de 22 pb, dont le site à symétrie bilatérale possède la séquence consensus 5'-AAATGTGATCTAGATCACATTT-3'. Cette liaison de CRP-AMPc au site CRP cause également l'introduction d'une courbure dans la molécule d'ADN <sup>29, 199, 367</sup>. CRP introduit une courbure prononcée de l'ADN dans le complexe CRP-ADN, recourbant l'ADN à un angle d'environ 80°. L'orientation de la courbure dans l'ADN induite par CRP est telle que l'ADN s'enroule vers les côtés de CRP et autour d'eux <sup>28</sup>.

Le complexe CRP-AMPc interagit (à la manière d'autres protéines activatrices) avec l'ARN pol pour activer la transcription à partir des promoteurs du régulon CRP. Selon l'endroit où CRP se lie sur l'ADN, relativement au promoteur, il peut agir aussi bien en tant qu'activateur que répresseur <sup>311</sup>. Chez *E. coli*, la transcription à partir de plusieurs promoteurs peut être activée par le complexe CRP-AMPc lié à différentes positions en amont de lui <sup>28</sup>. Pour certains, la régulation par le complexe CRP-AMPc lié à un site CRP (*CRP binding site*) s'exerce entre autres par le recrutement de l'ARN pol au promoteur (ce

qui accroît alors la force du promoteur), ceci, directement lorsque le site CRP est près du promoteur, ou encore par l'intermédiaire d'autres protéines activatrices lorsqu'il en est éloigné<sup>311</sup>. La région exacte où se fait le contact entre l'ARN pol et la protéine CRP pour activer la transcription n'est pas connue. Il se ferait entre CRP et la portion C-ter des sous-unités  $\alpha$  de l'ARN pol ( $\alpha$ CTD)<sup>28</sup>. Il s'agit de la même portion que celle qui interagit avec d'autres protéines activatrices et les séquences d'ADN nommées éléments UP (lesquels se retrouvent en amont de plusieurs promoteurs très forts dont ceux des gènes d'ARNr, mais non en amont des promoteurs sensibles à la répression catabolique).



**Figure 10.** (A) Recrutement de l'ARN pol ( $\alpha$ CTD) par CRP (AR1) chez les promoteurs CRP-dépendants de classe I.  
Adapté de Busby *et coll.* (1999)<sup>28</sup>.  
(B) Recourbement de l'ADN par CRP.  
Adapté d'une image d'Internet.

En ce qui concerne l'opéron *pap*, la coopérativité entre PapB et cAMP-CRP aux séquences activatrices en amont (UAS), soit le site 1 pour la liaison de PapB (*PapB binding site 1*) et le site CRP qui sont adjacents dans la région intercistronique, activerait la transcription à partir des promoteurs *papBp* et *papIp*<sup>97, 111</sup>. Le site de liaison à l'ADN pour le complexe CRP-AMPc est situé à environ 50 pb en amont du site GATC-I (vers *papI*) et à environ 180 pb du promoteur *papBp*<sup>111</sup>. CRP pourrait interagir avec l'ARN pol via la formation d'une boucle dans l'ADN entre les sites GATC-I et GATC-II<sup>347</sup>. La conservation de la distance entre les sites GATC de la région intergénique pourrait indiquer qu'il s'agit d'une caractéristique d'importance, confirmant l'hypothèse de la formation d'une boucle<sup>223</sup>.

La transcription de *pap* pourrait être stimulée par la formation d'une boucle qui amènerait le complexe cAMP-CRP très près de l'ARN pol lié au promoteur *papBp*. Ceci pourrait favoriser la liaison de l'ARN pol à son promoteur et/ou faciliter la formation du complexe ouvert. Il est aussi possible que le recourbement de l'ADN induit par la liaison de CRP<sup>199, 306, 367</sup> joue aussi un rôle dans l'activation transcriptionnelle en permettant le positionnement adéquat de CRP de près l'ARN polymérase liée au promoteur *papBp*. Récemment, il a été démontré que la liaison du complexe cAMP-CRP à son site est essentielle à l'activation, tant *in vitro* qu'*in vivo*<sup>360</sup>. Cette activation de *papBAp* requiert aussi la liaison de Lrp au site Lrp 4. Aussi, CRP et Lrp se lient de façon indépendante à leurs sites de liaison respectifs sur l'ADN *pap*. Tout comme c'est le cas pour les promoteurs CRP-dépendants de classe I, l'activation transcriptionnelle de *papBA* implique la portion proximale de la région activatrice 1 (AR1) de CRP et le  $\alpha$ CTD de l'ARN pol. De plus, la variation de phase de *pap* est strictement dépendante de la phase hélicoïdale du site de liaison de CRP à l'ADN, par respect au site d'initiation de la transcription de *papBA*. Enfin, la région AR1 de la sous-unité proximale au promoteur de CRP est requise pour la transcription de *papB* et ce, même en l'absence de H-NS<sup>360</sup>.

#### 4.1.3.7. La thermorégulation du fimbriae Pap

À 37° C, le fimbriae Pap est soumis au mécanisme de contrôle qu'est la variation de phase. Ainsi, dans une population, certaines cellules expriment le fimbriae (phase *ON*) tandis que d'autres pas (phase *OFF*)<sup>17, 205, 345</sup>. L'expression des adhésines est souvent

dépendante de la température, étant optimale à 37° C et moindre lorsque plus basse <sup>53, 112</sup>. Hors de son hôte, à moins de 26° C, l'expression de Pap chez *E. coli* est réprimée <sup>112, 358, 359</sup>. L'expression d'autres fimbriae chez *E. coli* <sup>163, 296</sup> ainsi que celle d'autres facteurs de virulence chez plusieurs autres genres bactériens <sup>224</sup> est aussi sujette à la thermorégulation, comme chez *Bordetella* <sup>42</sup>, *Listeria* <sup>187</sup>, *Yersinia* <sup>43</sup>, *Shigella* <sup>225</sup>.

La température est un des signaux environnementaux permettant à la bactérie de déterminer si elle se trouve à l'extérieur de son hôte en vue de répondre adéquatement. Ainsi, l'inhibition de l'expression du fimbriae permet à la bactérie d'économiser ses ressources en plus d'empêcher la synthèse nuisible à l'extérieur de l'hôte, de structures protéiques requises qu'à l'intérieur de celui-ci <sup>224</sup>.

C'est au niveau transcriptionnel que s'effectue la thermorégulation du fimbriae Pap <sup>17, 112, 360</sup> et la variation de phase a lieu en l'absence de H-NS <sup>348</sup>. Plusieurs évidences confirment le rôle de H-NS dans l'expression de l'opéron *pap* <sup>98 112 348 362</sup>. Certaines études impliquent RimJ, l'acétylase N-ter de la protéine ribosomale 5S chez *E. coli*, dans la thermorégulation de la transcription de l'opéron *pap*, plus précisément dans l'expression du gène de la piline *papA* <sup>364</sup>. En effet, les ribosomes pourraient agir en tant que détecteurs environnementaux grâce à la modification de protéines ribosomales en réponse à la température <sup>350</sup>. Il ne semble pas que le régulon de réponse au choc thermique, sous le contrôle du facteur  $\sigma$  RpoH codé par *rpoH*, soit impliqué dans la thermorégulation de *pap* <sup>110</sup>.

D'autres études ont identifié le gène *papI* comme médiateur de la thermorégulation au niveau de la transcription de *pap* puisque la surexpression de PapI, en *trans* sur un plasmide, permet de contourner la thermorégulation et stimule l'expression fimbriaire à basse température <sup>110</sup>. À basse température, les niveaux d'ARN messagers (ARNm) codant pour PapI sont limitants pour l'expression fimbriaire et la thermorégulation serait attribuable à un déterminant situé dans la région intercistronique *papI-papB* <sup>110</sup>. Toutefois, ces études sur PapI, réalisées en multicopie <sup>110</sup>, ont été démenties: la thermorégulation de Pap ne requiert pas la participation de PapI, dont l'ajout bloque la réponse thermorégulatrice, ni celle de PapB <sup>362</sup>.

L'expression de l'ARNm *papBA* est soumise tant à la variation de phase qu'à la thermorégulation<sup>17</sup>. À 37° C, il y a variation de phase, tant *ON*→*OFF* que *OFF*→*ON*, tandis qu'à 23° C, toutes les cellules sont en phase *OFF*, ceci suggérant que la transcription du messenger *papBA* est inhibée à basse température, cette réponse thermorégulatoire étant rapide, l'absence de transcrits *papBA* ayant été constatée suite à une seule génération de croissance à 23° C<sup>17, 362, 364</sup>. Certaines séquences d'ADN localisées dans la région *papB*, en aval du promoteur *papBAp*, sont nécessaires à la thermorégulation<sup>362</sup>. De plus, l'implication du régulateur global H-NS dans la thermorégulation du fimbriae Pap semble essentielle puisque la thermorégulation de *pap* est abolie par des mutations situées dans le gène codant pour la protéine de type histone H-NS, tel que démontré avec des mutations spontanées dans *drdX*<sup>112</sup> ainsi qu'avec la mutation *hns651*<sup>362</sup>. H-NS est une protéine de régulation globale de 15,5 kDa qui réprime la transcription de plusieurs opérons régulés par les conditions environnementales chez *E. coli* et d'autres bactéries entériques<sup>344</sup>. De plus, non seulement H-NS est-il requis pour la thermorégulation de la transcription de *papBA* à 23° C mais il influence aussi le taux de transition *ON*→*OFF*, et *vice versa*, dans la variation de phase à 37° C<sup>362</sup>. Tant H-NS que les séquences d'ADN situées à l'intérieur ou adjacentes à *papB* sont requises pour la thermorégulation de la transcription à partir de *papBAp*, mais PapI et PapB ne le sont pas<sup>362</sup>. Des études *in vivo* d'analyse de la méthylation ont montré que H-NS ou un facteur régulé par H-NS bloque la méthylation aux sites GATC de *pap* à 23° C mais non à 37° C. Des analyses *in vitro* effectuées à 23° C ont démontré que H-NS se lie spécifiquement à la région régulatrice *pap* et qu'il bloque la méthylation aux sites GATC-I et GATC-II. L'une des étapes importantes dans la thermorégulation de l'expression du fimbriae Pap serait la formation température-dépendante d'un complexe nucléoprotéique H-NS-*pap* spécifique. À 23° C, une des fonctions de H-NS telle l'oligomérisation serait altérée, ce qui permettrait à H-NS de réprimer l'expression génétique de *pap* par la formation d'un complexe nucléoprotéique. Ainsi, H-NS, tout comme Lrp, peut agir en tant que répresseur transcriptionnel pour l'expression à partir du promoteur *papBAp*, Lrp et H-NS pouvant agir indépendamment l'un de l'autre<sup>348</sup>. Toutefois, on ne sait pas si la méthylation des sites GATC-I et GATC-II affecte la liaison de H-NS et la thermorégulation de *pap*. La protection H-NS-dépendante contre la méthylation des sites GATC par la Dam n'est pas le résultat d'une hausse des niveaux de H-NS à 23° C<sup>362</sup>.

#### 4.1.3.8. La régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm *papBA*

Le gène *papA*, codant pour la sous-unité majeure PapA du fimbriae Pap, fait partie d'une unité transcriptionnelle polycistronique qui est sujette à une modification post-transcriptionnelle spécifique. Le messenger primaire *papBA* est clivé par la RNase E, ceci donnant lieu à deux messagers<sup>253</sup>. La portion 5' de l'ARNm codant pour PapB, un régulateur fimbriaire, est instable et est dégradée avec une demi-vie d'environ 2,5 min tandis que la portion 3' de l'ARNm codant pour PapA est beaucoup plus stable, avec une demi-vie de 27 min<sup>9, 253</sup>. Cet ARNm modifié sert probablement à limiter la quantité de protéine régulatrice PapB à l'intérieur de la cellule tout en permettant par le fait même à accroître l'expression des monomères de piline PapA, laquelle est la protéine majeure qui compose la structure du fimbriae en représentant plus de 99% des protéines totales.

Les niveaux de protéines PapA dépendent du taux de transcription du gène *papA*<sup>113</sup>. La modification et la stabilité différentielle des ARNm résulte en l'accumulation des ARNm-*papA* codant pour la sous-unité fimbriaire majeure. Il s'agirait des mécanismes possibles impliqués dans l'expression différentielle des gènes de certains déterminants fimbriaires chez *E. coli*<sup>9, 253, 343</sup>. Une séquence située immédiatement en aval de la région codante *papA* pourrait déterminer la stabilité du messenger *papA* ce qui, par le fait même, en agissant comme terminateur transcriptionnel, atténuerait la progression de la transcription vers le gène *papH*, codant pour une sous-unité mineure<sup>9</sup>. De plus, cette structure secondaire de forme tige-boucle située à l'extrémité 3' du messenger et localisée entre *papA* et *papH*, préviendrait la dégradation 3'-5' exoribonucléasique de se poursuivre au-delà de *papA*. La présence d'une structure tige-boucle en 5' de l'ARNm-*papA* pourrait aussi permettre une stabilisation contre une attaque exonucléolytique<sup>252</sup>.

Si les gènes *papB* et *papA* sont régulés au niveau du promoteur *papBp*, les quantités relatives de chacune de ces protéines sont présumément corrélées avec la quantité de messagers. Ainsi, l'expression différentielle de gènes à l'intérieur d'un opéron pourrait aussi inclure la modification endo- et exonucléolytique d'ARNm. De plus, le niveau de translecture transcriptionnelle, ou transcription ininterrompue (*readthrough*), combiné à la stabilité différentielle des divers messagers (ARNm-*papBA*, ARNm-*papA* et ARNm-*papAH*) coordonne ainsi l'expression des gènes tout en permettant une modulation post-

transcriptionnelle de la production des produits de ces gènes<sup>9</sup>. Le clivage de l'ARNm-*papBA* par la RNase E s'avère un événement important dans le mécanisme résultant en l'expression différentielle des gènes de l'opéron majeur *pap*<sup>252</sup>. Dans la région intercistronique *papB-papA*, la délétion des séquences correspondant au site de clivage principal, soit UUUGU↓AUUGAUC<sup>204</sup>, a conduit à l'abolition de la modification du messager, à une expression moindre de la protéine PapA et a également résulté en une bactérie d'apparence « cheveux en brosse » (*crew-cut*) avec de courtes structures fimbriaires à la surface cellulaire<sup>252</sup>.

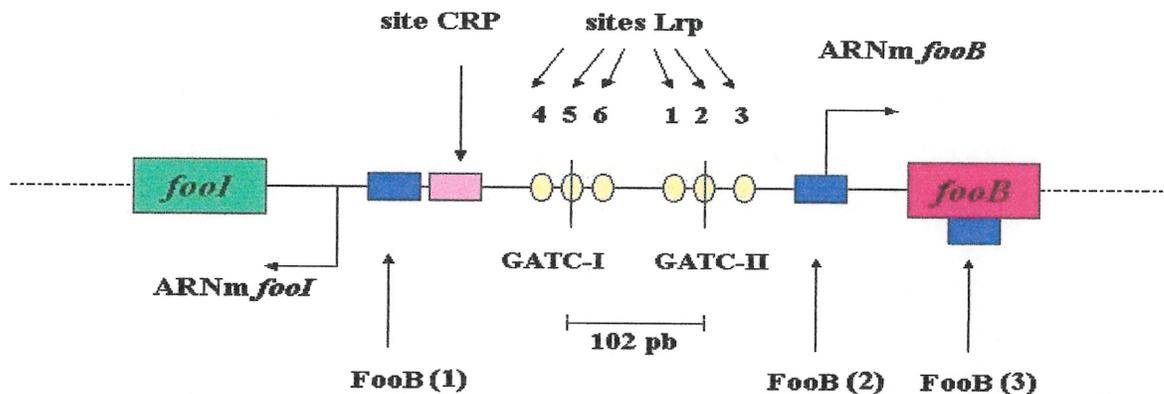
#### 4.1.4. Le fimbriae F165<sub>1</sub> : généralités

L'opéron *foo*, qui code pour le fimbriae F165<sub>1</sub> et cloné à partir de la souche 4787, exprime une sous-unité fimbriaire majeure de 18,5 kDa<sup>129</sup>. F165<sub>1</sub> est relié au fimbriae F11 (type P) et possède l'adhésine G de classe III similaire à Prs (F13, type P)<sup>48, 49, 129, 211</sup>. Cet antigène fimbriaire présente une résistance au sérum, une MRHA (*Mannose Resistant Hemagglutination*) des érythrocytes de porc, de mouton et du type A<sub>1</sub>P<sub>1</sub> d'humain, et reconnaît la portion GalNAc-GalNAc de l'antigène de Forssman (GbO5) sur les érythrocytes de mouton<sup>85, 129, 211, 212</sup>. Contrairement à Prs, F165<sub>1</sub> agglutine les globules rouges de porc. *In vitro*, à l'opposé du fimbriae P, F165<sub>1</sub> est exprimé en milieu minimal glucose<sup>86</sup>. F165<sub>1</sub> serait impliqué dans la virulence<sup>84, 128, 247</sup>. Des études de mutagenèse *TnphoA* ont démontré que la présence du système fimbriaire F165<sub>1</sub> est requise pour la pathogénicité complète d'au moins une des souches F165-positives chez les porcs axéniques<sup>128, 247</sup>. La présence de ce fimbriae conférerait la résistance à la mort phagocytaire<sup>248</sup> grâce à l'inhibition de la réponse oxydative chez les PMLs<sup>246</sup>.

##### 4.1.4.1. La structure et l'organisation génétique de l'opéron fimbriaire *foo*

L'opéron *foo* possède une organisation génétique similaire à celle de l'opéron *pap* (Annexe II, p.xxxiii<sup>125</sup>). La région régulatrice comportent deux cadres de lecture ouverts (ORFs : *Open Reading Frames*) orientés de façon divergente et correspondant aux gènes *fooI* et *fooB*<sup>111, 347, 370</sup> qui, respectivement, codent pour les protéines régulatrices FooI et FooB, lesquelles sont hautement homologues à PapI et PapB (Annexe II, p.xxxiii<sup>125</sup>). La région intercistronique située entre *fooI* et *fooB* contient deux sites GATC séparés d'une

distance de 102 pb. Ces caractéristiques sont communes aux membres de la famille régulatrice de l'opéron *pap* dont l'expression, qui est sujette à la répression catabolique, est régulée par la méthylation différentielle par la Dam des sites GATC et par Lrp<sup>25, 347, 362</sup>. De plus, des séquences similaires aux sites de liaison pour PapB dans l'opéron *pap*<sup>97</sup> sont retrouvés dans l'opéron *foo*, le premier étant situé dans la région intercistronique en amont du site CRP (près du *fooIp*), le second chevauchant la région -10 du promoteur *fooBp* mais toujours situé dans la région intercistronique et le troisième étant placé dans la séquence même codant pour *fooB*. On y reconnaît également six sites de liaison potentiels pour Lrp<sup>255</sup> (Annexes II, p.xxxiii<sup>125</sup> et III, p.xlii).



**Figure 11.** Organisation de la région régulatrice chez l'opéron *foo*, avec ses sites potentiels pour la liaison des régulateurs à l'ADN.

Adapté de Harel *et coll.* (2000)<sup>125</sup> et de van der Woude *et coll.* (1996)<sup>345</sup>.

#### 4.1.4.2. La régulation de l'opéron fimbriaire *foo*

L'expression de l'opéron fimbriaire *foo* est sujette à la régulation globale par CRP, Lrp et la Dam, qui sont impliqués dans la variation de phase<sup>48</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>). L'expression du fimbriae F165<sub>1</sub> est négativement régulée par l'ajout de glucose (répression catabolique)<sup>48, 49</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>). La température influence aussi son expression. En ce qui concerne la régulation globale de *foo* par Lrp, la leucine diminue son expression, contrairement à l'opéron *pap* qui est alors activé, de même que le fait la L-alanine, comme chez le fimbriae K99<sup>48, 49</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>). De plus, l'opéron *foo* est sujet à la variation de phase (Annexe II, p.xxxiii<sup>125</sup>) et son expression est affectée par des variations du degré du surenroulement de l'ADN, tant au niveau local que global<sup>48</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>).

## 5. L'ARN pol et les promoteurs

Chez les bactéries, un seul type d'ARN pol catalyse la synthèse des ARNm, ARNr et ARNt encodés sur le chromosome bactérien. L'ARN pol retrouvée chez *E. coli*, est l'une des plus grosses protéines de la cellule <sup>202</sup>. Lors de l'initiation de la transcription, l'holoenzyme d'ARN pol ( $E\sigma^{70}$ ) est composée de cinq sous-unités, selon une stoechiométrie  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$  (revue <sup>55</sup>). La sous-unité  $\sigma$  est attachée de façon relativement faible au reste de l'enzyme (le noyau (*core*) de la polymérase, E);  $\sigma$ , qui est responsable de la reconnaissance spécifique du promoteur par l'ARN pol, est ensuite relarguée lors du processus d'initiation. Le génome de *E. coli* code pour plusieurs facteurs  $\sigma$ , dont entre autres  $\sigma^{70}$  (ou  $\sigma^D$ , nommé ainsi de par son poids moléculaire de 70 000) qui est de loin le plus abondant. La sous-unité  $\sigma$  est un important déterminant de la reconnaissance séquence-spécifique de l'ADN d'un promoteur. Grâce à l'emploi de divers facteurs  $\sigma$ , l'ARN pol peut être dirigée vers des promoteurs de séquences différentes <sup>55</sup>.

**Tableau I.** Facteurs  $\sigma$  chez *E. coli*.

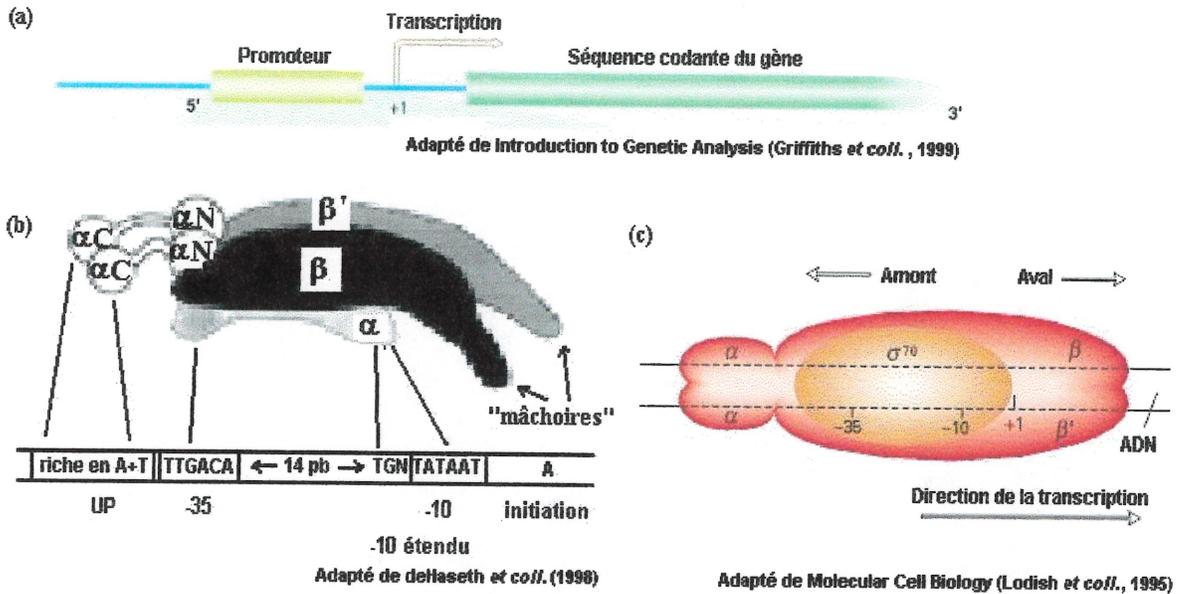
Facteur Promoteurs reconnus Sigma		Consensus du promoteur	
$\sigma^{70}$	La plupart des gènes	Région -35 TTGACAT	Région -10 TATAAT
$\sigma^{32}$	Gènes induits par un choc thermique	TCTCNCCCTTGAA	CCCCATNTA
$\sigma^{28}$	Gènes pour la motilité et le chimiotactisme	CTAAA	CCGATAT
$\sigma^{38}$	Gènes de la phase stationnaire et de la réponse au stress	?	?
$\sigma^{54}$	Gènes pour le métabolisme de l'azote et pour d'autres fonctions	Région -24 CTGGNA	Région -12 TTGCA

Adapté de *Molecular Cell Biology* (Lodish et coll., 1995) <sup>202</sup>.

Un promoteur est une séquence d'ADN qui détermine le site d'initiation de la transcription pour l'ARN pol <sup>202</sup>. Quatre éléments importants composent le promoteur reconnu par l'holoenzyme  $E\sigma^{70}$ : deux hexamères centrés à ou près des positions -10 et -35

en amont du site d'initiation de la transcription (désignés de par leur localisations aux régions -35 et -10), l'intervalle d'ADN les séparant, ainsi qu'une région entre -40 et -60 (l'élément UP)<sup>55</sup>. Diverses compilations des séquences promotrices reconnues par  $\sigma^{70}$  ont établi l'importance des régions -35 et -10. Les séquences consensus de ces deux régions, telles que lues sur le brin codant (*nontemplate*), sont, respectivement, TTGACA et TATAAT<sup>55</sup>. Une séquence consensus d'un acide nucléique (établie d'après la comparaison de séquences réelles) est la séquence idéalisée d'une région donnée dans laquelle chaque position représente la base rencontrée le plus fréquemment<sup>202</sup>. À quelques exceptions près, la règle générale soutient que plus les régions -35 et -10 sont similaires à leurs séquences consensus, mieux fonctionne le promoteur, tant *in vivo* qu'*in vitro*; à cet égard, les paires de bases les plus conservées pourraient être d'une plus grande importance que ne le sont celles qui sont moins conservées<sup>55</sup>. Ainsi, l'établissement de taux de transcription basale (non régulée) distincts chez divers gènes est permise par la capacité qu'a l'ARN pol à discriminer entre les promoteurs possédant différentes séquences aux régions -35 et -10. Une distance consensus d'une longueur de 17 pb entre les régions -35 et -10 a été établie. Les promoteurs ayant une séquence intervalle de cette taille sont plus actifs, tant *in vivo* qu'*in vitro*, que ceux qui en ont une plus longue ou une plus courte. Récemment, une région très riche en A+T située entre les positions -60 et -40 a été reconnue comme étant un déterminant additionnel important pour l'activité de certains promoteurs. Il existe également une sous-classe de promoteurs chez *E. coli* qui fonctionnent assez bien sans une séquence -35 reconnaissable ou sans l'implication des protéines activatrices quelconques. De tels promoteurs ont une région -10 étendue possédant la séquence TGNTATAAT<sup>55</sup>.

La force d'un promoteur réfère à la fréquence relative d'initiation de la transcription (fois par minutes) à un promoteur donné. Ainsi, l'ARN pol initie la transcription à une plus haute fréquence aux promoteurs dits forts et à une fréquence moindre aux promoteurs dits faibles<sup>202</sup>. Chez les promoteurs les plus forts connus (ceux pour la synthèse des ARNr), *in vivo*, l'initiation de la chaîne survient à un taux d'environ 1/s<sup>55</sup>. La force d'un promoteur est déterminée en grande partie par l'affinité de la séquence promotrice pour l'ARN pol<sup>202</sup>. Même si d'autres facteurs contribuent à la vitesse à laquelle l'ARN pol initiera la transcription, les promoteurs les plus forts ont une grande similitude avec les séquences consensus -35 et -10.



(d) Promoteurs forts chez *Escherichia coli*

tyr tRNA	TCTCAACGTAACACTTTACAGCGGCG • • CGTCATTTGATATGATGC • GCCCCGCTTCCCGATAAGGG
rrn D1	GATCAAAAAAAAACTTGTGCAAAAAA • • TTGGGATCCCTATAATGCGCCTCCGTTGAGACGACAACG
rrn X1	ATGCATTTTTCCGCTTGTCTCTCTGA • • GCCGACTCCCTATAATGCGCCTCCATCGACACGCGGAT
rrn (DXE) <sub>2</sub>	CCTGAAATTCAGGGTTGACTCTGAAA • • GAGGAAAGCGTAATATAC • GCCACCTCGCGACAGTGAGC
rrn E1	CTGCAATTTTCTATTGGCGCCTGCG • • GAGAACTCCCTATAATGCGCCTCCATCGACACGCGGAT
rrn A1	TTTTAAATTTCTCTTGTCTAGGCGG • • AATAACTCCCTATAATGCGCCACCACTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAATAAATGCTTGACTCTGTAG • • CGGGAAGGCGTATATGC • ACACCOCGCGCCTGAGAA
$\lambda$ PR	TAACACCGTGCCTGTTGACTATTTTA • • CCTCTGGCGGTGATAATGG • • TTGCATGTTACTAAGGAGGT
$\lambda$ PL	TATCTCTGGCGGTGTGACATAAATA • • CCACTGGCGGTGATACTGA • • GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAAAACGGTTGACAAATGA • • AGTAAACACGGTACGATGT • ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT • • CTAACCTATAGGATACTTA • CAGCCATCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTATTGACAAATGAAGTAAATGCAGTAAGATAC • • AAATCGCTAGGTAACACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTT • • TCGCGCTTGGTATAATCG • CTGGGGTCAAAGATGAGTG

-35
-10
+1

Adapté de Molecular Cell Biology (Lodish et coll., 1995)

(e) Séquences consensus des promoteurs  $\sigma^{70}$

région -35	15-17 pb	région -10	
TTGACAT		TATAAT	
↓ A T A	↓ Δ	↓ ↓ ↓ CC, G, C A, T	mutations du promoteur

Adapté de Molecular Cell Biology (Lodish et coll., 1995)

**Figure 12.** Description de la région promotrice d'un gène procaryote.

- (a) Organisation d'une unité transcriptionnelle procaryote. Le promoteur est localisé en amont (extrémité 5') du site d'initiation de la transcription (+1) et de la séquence codante.  
*Adapté de Introduction to Genetic Analysis (Griffiths et coll., 1999)<sup>115</sup>.*
- (b) La reconnaissance d'un promoteur par l'ARN pol.  
*Adapté de deHaseth et coll. (1998)<sup>55</sup>.*
- (c) L'ARN pol liée à un promoteur lors de l'initiation de la transcription.
- (d) Promoteurs forts chez *E. coli* reconnus par  $\sigma^{70}$ . Les bases correspondant aux séquences consensus -35 et -10 sont soulignées en jaune.
- (e) Séquences consensus des promoteurs  $\sigma^{70}$ . Les mutations qui diminuent significativement la fréquence de transcription à partir de divers promoteurs sont indiquées.  
*Adapté de Molecular Cell Biology (Lodish et coll., 1995)<sup>202</sup>.*

### 5.1. La régulation génétique en relation avec la topologie de l'ADN

Puisque l'ADN bactérien négativement surenroulé est sous stress torsionnel, ceci pourrait constituer pour la cellule un motif de régulation pour le contrôle global de l'expression génétique. Selon ce modèle, toute fluctuation dans les niveaux du surenroulement de l'ADN serait instantanément détectée par tous les promoteurs, dont la compétence pour l'initiation de la transcription serait ainsi modulée. Ceci est particulièrement attrayant puisque les niveaux du surenroulement de l'ADN sont sensibles aux conditions environnementales<sup>68</sup>. De même, le degré de surenroulement affecte l'activité transcriptionnelle<sup>30</sup>.

Une régulation globale de l'expression génétique peut aussi s'exercer par la conformation de l'ADN, tant intrinsèque qu'induite par les protéines, ceci influençant l'efficacité transcriptionnelle<sup>262</sup>. La géométrie de l'ADN contribue majoritairement au processus d'activation transcriptionnelle et l'ADN en amont du site de liaison pour l'activateur y joue un rôle<sup>56</sup>. Tant la topologie de l'ADN que les interactions protéine-protéine sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle, et l'importance relative de ces deux facteurs dépend de la nature de l'activateur et de l'emplacement sur l'ADN des sites de liaison pour les activateurs<sup>56</sup>. La liaison de protéines à l'ADN telles que CRP<sup>199, 306, 367</sup> et Lrp<sup>29</sup> peut introduire une courbure dans la double hélice.

La structure et le degré de surenroulement sont contrôlés par des enzymes appelées topoisomérases. Le déroulement optimal de nombreux processus cellulaires, tels la transcription, la réplication et la recombinaison, requièrent des niveaux physiologiques de surenroulement négatif de l'ADN. On a récemment trouvé que FIS, une protéine de la chromatine chez *E. coli*, agirait comme facteur de couplage entre le surenroulement de l'ADN et la physiologie cellulaire<sup>302-304</sup>. L'ADN sous-enroulé subit des stress torsionnels qui peuvent être relaxés (1) par la contorsion (*writhing*) de la double-hélice d'ADN dans l'espace tri-dimensionnel, cette notion référant au surenroulement de l'ADN, (2) par la liaison de protéines qui contraignent les supertours, ce qui résulte en la formation de complexes nucléoprotéiques, (3) ou par des transitions structurales à l'intérieur d'une région précise du duplex, telle la séparation des brins d'ADN qui a lieu entre autres lors de la transcription et de réplication<sup>65</sup>.

## 5.2. Influence des conditions environnementales sur le surenroulement de l'ADN

Dans la cellule, en réponse aux changements environnementaux, les niveaux de surenroulement fluctuent<sup>7, 64, 68, 113, 123, 210, 227, 231, 358</sup>. Ceux-ci incluent les altérations de la température, des conditions osmotiques, les transitions entre les conditions aérobie et anaérobie de croissance et la réponse au stress oxydatif causé par le peroxyde d'hydrogène<sup>359</sup>. La phase de croissance, ainsi que les transitions (*shifts*) nutritionnelles, comme par exemple un changement de source de carbone<sup>11</sup>, sont aussi corrélées avec des modifications du degré de surenroulement intracellulaire<sup>72, 154</sup>. Les fluctuations du ratio [ATP]/[ADP] dans la cellule, en réponse aux stress osmotique et anaérobique<sup>149</sup> par exemple, pourraient moduler l'activité ATP-dépendante de la gyrase.

Les organismes pathogènes pourraient utiliser la variation du degré du surenroulement de l'ADN comme mécanisme régulateur de l'expression de leurs gènes de virulence<sup>64, 68</sup>. Pour les bactéries pathogènes, la réussite de l'invasion et/ou de la colonisation de l'organisme de l'hôte requiert une orchestration régulée des fonctions des gènes de virulence, ce qui permet aussi une réduction des coûts énergétiques associés à leur expression. De plus, une telle régulation peut s'avérer nécessaire à l'expression différentielle des déterminants de virulence, selon les diverses étapes de l'infection de l'hôte (revue<sup>154</sup>). Un changement d'environnement et le transfert d'un hôte à un autre constituent de nombreux stimuli qui sont détectés par les bactéries et qui correspondent à des signaux pour l'activation de leur fonctions de virulence<sup>224, 231, 234</sup>. En effet, lors de l'invasion d'un hôte, la bactérie est confrontée à des hausses de température et d'osmolarité, à une transition de l'aérobiose à l'anaérobiose ou encore à un changement de pH, lesquelles conditions s'accompagnent d'une altération du degré de surenroulement de l'ADN<sup>64</sup>. Entre autres, un changement dans la température causerait une altération de la structure de l'ADN (tel le pas de la double hélice d'ADN) qui serait détectée et compensée par l'action des topoisomérases<sup>108</sup>. Par exemple, la thermorégulation des fonctions de virulence implique, chez *Yersinia enterocolitica*, la topologie de l'ADN et la structure de la chromatine bactérienne<sup>44, 294</sup>, et chez *Shigella flexneri*, la modification de la superhélicité négative, laquelle influence positivement à son tour la transcription<sup>336</sup>.

## 6. Le génome bactérien

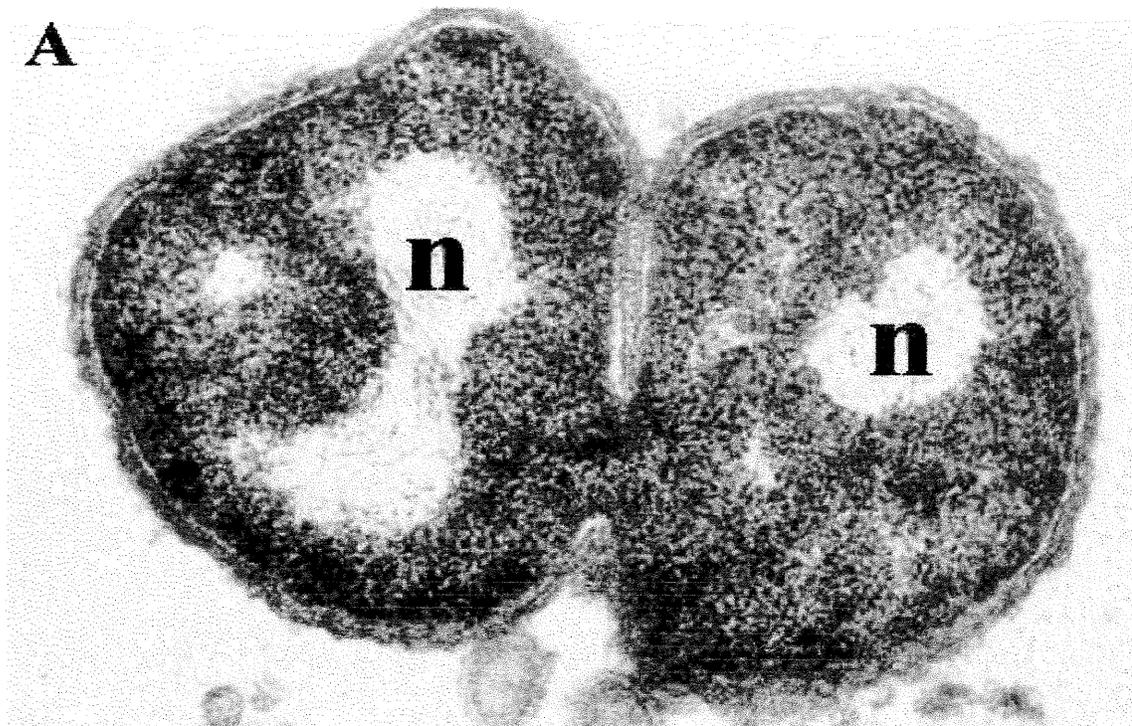
Le génome bactérien est localisé dans une région appelée le nucléoïde et plusieurs protéines liant le chromosome circulaire y sont trouvées. Chez *E. coli* K12, le chromosome est de 4750 kb et, lorsqu'il est partiellement répliqué, il peut y avoir plusieurs copies du génome dans le nucléoïde<sup>190</sup>. *E. coli* et plusieurs autres bactéries maintiennent leur ADN dans un état surenroulé négativement (revue<sup>72</sup>). Il y a donc moins de tours de duplex et l'ADN est sous-enroulé comparativement à une molécule d'ADN de même taille linéaire ou dont l'un des brins est coupé (*nicked*). Une partie de la tension de superhélicité qui en résulte peut être absorbée par l'enroulement de l'ADN autour de protéines de type histones<sup>207</sup>. À l'intérieur de la cellule, l'ADN subit des contraintes torsionnelles et, puisqu'il est négativement surenroulé, ses brins ont tendance à se dissocier (*melting*), ceci favorisant le déroulement de la transcription, de la recombinaison, de la réplication et de la transposition<sup>19, 213, 274</sup>. L'ADN positivement surenroulé n'est pas fréquent dans la nature, mais il constitue un important sous-produit des réactions où des complexes protéiques se déplacent entre les brins du duplex, comme dans la transcription et la réplication de l'ADN. L'ADN est positivement surenroulé chez certaines archéobactéries isolées d'environnements extrêmes, particulièrement ceux avec des températures très élevées, et les supertours positifs dans l'ADN sont introduits par la gyrase-réverse<sup>173, 203</sup>.

En microscopie électronique, le nucléoïde, un complexe nucléoprotéique, des bactéries traitées par cryosubstitution apparaît comme une distribution d'ADN unie et régulièrement granulée, consistant en fait en une structure irrégulière dispersée occupant plus de la moitié de l'espace intracellulaire apparent (revues<sup>267, 311</sup>). La densité de compaction de l'ADN est estimée de 20 à 50 mg/mL. Cette variation du degré de condensation étant en partie attribuable aux changements de la taille du nucléoïde selon les conditions de croissance ou d'autres traitements réversibles. Le chromosome bactérien circulaire, sans extrémité libre, est organisé en une série de boucles, chacune d'entre elles étant superenroulée. L'ADN est négativement surenroulé, lequel surenroulement a un rôle de condensation de l'ADN, et l'ADN surenroulé est équilibré par les contraintes torsionnelles dans la double hélice, ceci influençant fortement beaucoup d'interactions protéines-ADN.

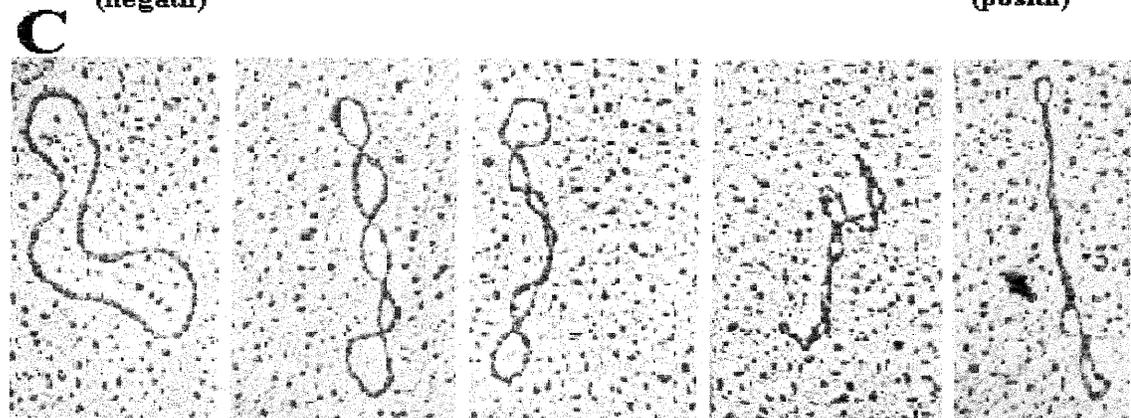
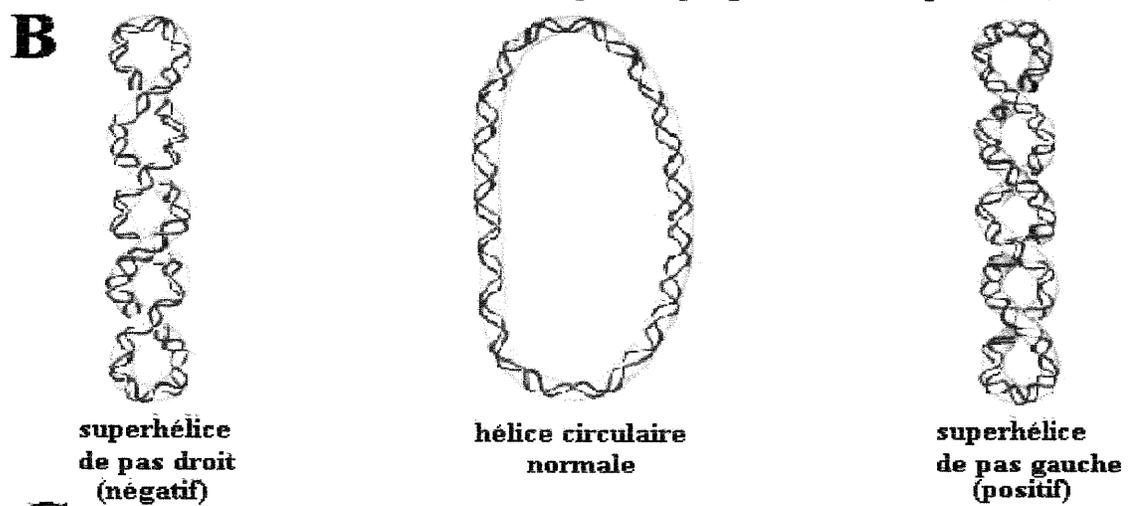
Plusieurs protéines liant l'ADN et des chaînes d'ARN naissantes sont associées au nucléoïde. Selon les méthodes employées pour l'isolation des nucléoïdes, on peut observer des molécules d'ARN pol actives emprisonnées en des positions intermédiaires sur les unités transcriptionnelles auxquelles sont attachées des chaînes naissantes d'ARN (40-50% sont de l'ARNr) ainsi que beaucoup de protéines de liaison à l'ADN impliquées dans le maintien de l'état condensé du chromosome. Les protéines majeures du nucléoïde, HU, IHF et H-NS, sont capables de courber ou d'enrouler l'ADN et/ou ont une affinité accrue pour l'ADN courbé. Elles fournissent ainsi des mécanismes pour « tordre » ou introduire une flexibilité dans la structure à faible étendue d'ADN du nucléoïde. Le rôle de l'ARN dans la stabilisation de la compaction de l'ADN par une interaction ARN-ADN reste à vérifier <sup>267</sup>.

### 6.1.1. Densité superhéliçoïdale

Les protéines HU, IHF et H-NS contraignent certaines topologies spécifiques de l'ADN, tant les supertours négatifs que les courbures (revue <sup>267</sup>). Ainsi, leur liaison à l'ADN réduirait la densité superhéliçoïdale effective ou non contrainte. Ce mécanisme réduit en effet une partie de la densité superhéliçoïdale non contrainte. Les supertours non contraints dans l'ADN consistent, dans les nucléoïdes isolés, en des supertours plectonémiques, l'axe héliçoïdal majeur d'une région de l'ADN étant enroulé autour de l'axe héliçoïdal majeur d'une autre partie de la même molécule. On parle de surenroulement toroïdal quand l'ADN est enroulé autour d'une surface imaginaire ou réelle, comme cela se produit dans le nucléosome. *In vivo*, selon des considérations énergétiques, le déficit en nombre de liaison (Lk : *linking number*) des plasmides ou des nucléoïdes s'exprimerait sous forme de surenroulement plectonémique. Cette topologie de faible étendue a pour conséquence de compacter le volume d'ADN. *In vivo*, les supertours négatifs ne sont pas tous contraints et ces derniers ne contribuent ainsi pas à la densité superhéliçoïdale effective. Les connaissances manquent quant à l'implication probable de l'une des protéines connues dans la contrainte des supertours négatifs. Il n'est pas clair si l'origine de cette contrainte provient de l'enroulement toroïdal de pas gauche de l'ADN en des structures de type nucléosome ou de noeuds stabilisants où des doubles hélices d'ADN forment des supertours plectonémiques en passant l'une par-dessus l'autre <sup>267</sup>.



adapté de <http://gene.d.emc.maricopa.edu/bio/bio18>

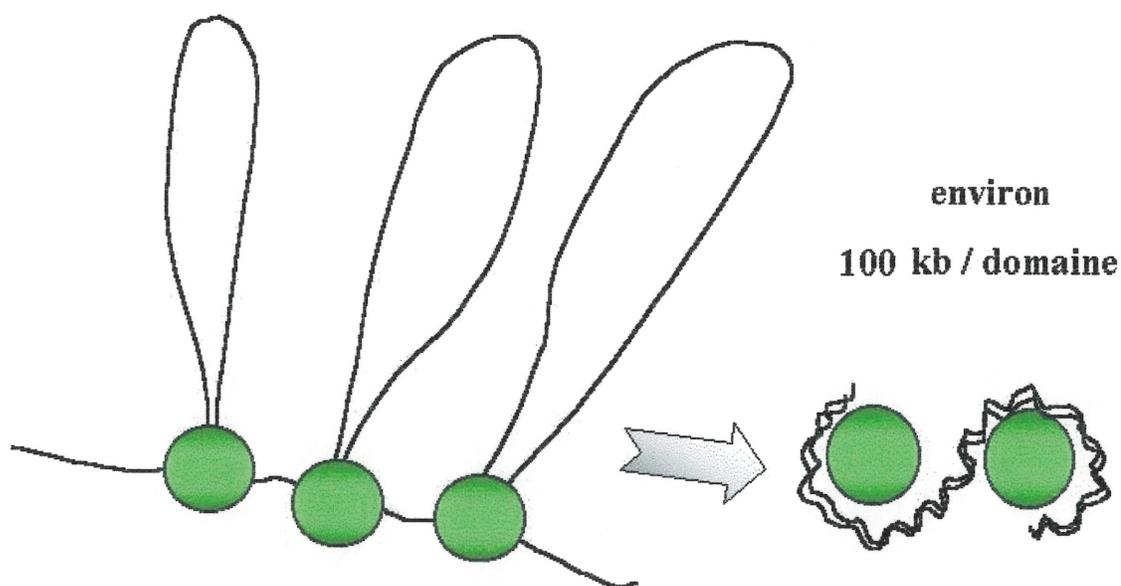


adapté de <http://cmgu.stanford.edu/biochem201/Slides>

**Figure 13. (A) Nucléotide. (B) Surenroulement négatif et positif. (C) ADN surenroulé.**  
Adapté d'images d'Internet.

### 6.1.2. Domaines chromosomiques

Dans les nucléoïdes isolés du moins, l'ADN est organisé en unités de grande étendue telles que des boucles qui préviendraient la propagation de la relaxation d'un domaine à l'autre <sup>267</sup>. Un domaine de surenroulement est défini comme une région de la molécule d'ADN délimitée par des contraintes topologiques sur la rotation de la double hélice. La taille moyenne d'un domaine est estimée à  $100 \pm 20$  kpb et il y aurait entre  $43 \pm 10$  boucles topologiquement indépendantes dans le chromosome de *E. coli* <sup>308</sup>. Biologiquement, ceci signifie que les changements topologiques qui surviennent dans un domaine, par exemple lors de la réparation, de la réplication ou de la recombinaison de l'ADN, n'affectent pas tout le chromosome. Il est donc en principe possible de contrôler de façon indépendante la tension superhéliçoïdale de différents domaines et de coordonner ainsi la régulation de batteries de gènes d'un même domaine. Ceci ne requiert pas que les domaines soient fixes ou persistants ; les gènes voisins, en raison de la grande taille du domaine, feraient à peu près toujours partie du même domaine, et ce, même si les limites définissant un domaine étaient en mouvement continu. La sous-structuration du chromosome en domaines, si les domaines sont topologiquement équivalents aux boucles, tel que le laissent envisager les micrographies électroniques de nucléoïdes isolés, constituerait une condensation à grande échelle de l'ADN en une structure organisée (revue <sup>267</sup>).



**Figure 14.** Domaines chromosomiques.  
Adapté de Gene IV <sup>190</sup> et de Pettijohn (1996) <sup>267</sup>.

Concernant le mouvement de l'ADN *in vivo*, il a été observé que les supertours plectonémiques diffusent sur une très grande distance, que la diffusion des supertours est stochastique et que les domaines changent avec la physiologie <sup>141</sup>. Le mouvement de diffusion des supertours est restreint par ces régions sous-chromosomiques. La nature de ces barrières à la diffusion des supertours (frontières des domaines) s'avère obscure. Parmi les hypothèses il y a la liaison de protéines à la base des boucles de 100 kb ainsi que l'action des topoisomérases liées à leurs sites de haute affinité <sup>267</sup>. Aussi, chez la bactérie vivante, les nœuds et les enchevêtrements dans la double hélice d'ADN pourraient prévenir la diffusion de ces supertours <sup>317</sup>.

*In vivo*, la taille des domaines chromosomiques serait modulée par la gyrase et la topoisomérase IV (Topo IV), dont les activités biochimiques sont en accord avec l'hypothèse de l'enchevêtrement <sup>317</sup>. L'enchevêtrement topologique aléatoire des brins d'ADN enroulés l'un autour de l'autre (*interwound*) expliquerait en grande partie le comportement des domaines observé chez les chromosomes bactériens <sup>317</sup>. Puisque les nœuds et enchevêtrements persistents dans l'ADN peuvent empêcher la transcription <sup>273</sup>, il serait intéressant de connaître leur impact sur l'expression génétique (*silencing*) <sup>317</sup>.

### 6.1.3. Ancrage de l'ADN à la membrane cytoplasmique

HLP-I (*Histone-Like Protein I*) est une protéine de 17 kDa de type histone codée par le gène *firA* qui est associée à la membrane et qui pourrait être importante durant la réplication de l'ADN lorsque le chromosome est en contact avec la membrane cellulaire (revue <sup>267</sup>). L'ancrage de l'ADN à la membrane cytoplasmique par des interactions directes pourrait contraindre topologiquement l'ADN du nucléoïde <sup>176</sup>. Des protéines naissantes associées à la membrane avec leur ARNm cotranscrit attaché peuvent procurer à l'ARN pol active un ancrage à la membrane et ainsi restreindre la rotation de la matrice d'ADN liée <sup>208</sup>. Les évidences pour qu'un tel site de transcription ancré puisse définir les frontières d'un domaine chromosomique manquent toujours <sup>267</sup>. Puisque l'ARN pol ancrée ne peut pas tourner autour de la matrice d'ADN durant la transcription, la rotation de l'ADN est permise par les énergies de la transcription. Chez les mutants *topA* (Topo I), la rotation de la double hélice d'ADN ne crée du surenroulement négatif dans le plasmide que lors de la transcription active de gènes codant pour des protéines d'ancrage <sup>41, 208, 275</sup>. Au moins

certaines des contraintes concernant la rotation de l'ADN du nucléoïde diffèrent de celles des plasmides et sont indépendantes du mécanisme d'ancrage décrit ci-haut <sup>267</sup>.

#### 6.1.4. Entassement macromoléculaire

De fortes concentrations de polymères neutres non liants font se replier l'ADN en une structure compacte (revue <sup>267</sup>). Cette transition structurale semble résulter des collisions entre l'ADN et le polymère non liant. À mesure que ces collisions commencent à compétitionner avec les interactions entre l'eau et l'ADN, l'ADN modifie sa structure en une forme diminuant les interactions d'entassement avec le polymère, ce processus ressemblant à l'interaction hydrophobe. Ce phénomène pourrait être impliqué dans le maintien de l'état condensé de l'ADN dans le nucléoïdes, des concentrations élevées de protéines ne liant pas l'ADN étant présentes dans le cytoplasme bactérien de cellules vivantes. L'ADN ainsi condensé réagit toujours efficacement avec des protéines et des enzymes actives sur l'ADN. La protéine HU, à de très haute concentrations physiologiques, peut condenser l'ADN et les concentrations de HU similaires à celles retrouvées dans la cellule vivante sont suffisante pour induire, en présence d'une modeste quantité de polyéthylène glycol, une telle compaction <sup>241</sup>. Il a été proposé que les protéines cytoplasmiques liant l'ADN, telles que HU et H-NS, puissent induire l'état condensé de l'ADN des nucléoïdes <sup>241, 267</sup>.

#### 6.1.5. Protéine HU

HU est la protéine bactérienne de type histone la plus abondante, soit environ 20 000 copies par équivalent de génome chez les cellules en phase exponentielle de croissance <sup>68, 297</sup>. Puisque HU est la protéine de liaison à l'ADN majeure connue, qu'elle contraint *in vitro* les supertours négatifs et qu'elle possède une spécificité de séquence (comme les histones), elle est depuis longtemps soupçonnée de jouer un rôle dans le surenroulement de l'ADN du nucléoïde (revue <sup>267</sup>). HU se lie à l'ADN, l'enroule de façon non-spécifique, et est réparti de façon égale à travers tout le nucléoïde. HU introduit des courbures dans l'ADN et lie de façon préférentielle l'ADN courbé ou noué, tel l'ADN des structures cruciformes ou celui des jonctions à quatre voies dont les intersections des brins ressemblent à l'ADN courbé. Ceci expliquerait que HU se lierait préférentiellement aux séquences d'ADN contenant des suites de dA. Un enroulement de l'ADN autour de HU est aussi possible <sup>267 58</sup>.

HU serait associé avec des gènes transcriptionnellement actifs <sup>229</sup> et les régions de contrôle de certains gènes où HU peut se lier coopérativement à des protéines régulatrices constituent une des classes de ses sites de liaison préférentiels. HU peut agir en tant que protéine auxiliaire facilitant la liaison du répresseur *lac* et de CRP <sup>96</sup>. Ceci suggère que les transitions structurales de courte étendue (telle la courbure de l'ADN) soient facilitées par HU dans la séquence cible reconnue par la protéine régulatrice. La facilitation d'autres types d'interactions protéines-ADN telles que la recombinaison site-spécifique et l'initiation de la réplication à *oriC* requerraient aussi les déformations structurales de l'ADN conférées par HU <sup>267</sup>.

Chez *E. coli*, l'absence de HU donne lieu à des colonies minuscules sur agar, à l'accumulation rapide de mutations suppressives et confère l'hypersensibilité à la novobiocine. Dans la suppression d'une déficience en HU, il y a plusieurs évidences de l'implication de la gyrase (Topo II). Aussi, en l'absence de HU, le surenroulement chromosomique diminue alors qu'il augmente par rapport aux niveaux type-sauvage en présence d'une mutation suppressive spontanée dans *gyrB*. Ainsi, HU aurait un rôle physiologique dans la topologie de l'ADN chromosomique et ce, possiblement en facilitant l'action de la gyrase <sup>214</sup>.

#### 6.1.6. Protéine H-NS

H-NS (*Histone-Like Nucleoid Structuring Protein*), une protéine neutre du nucléoïde d'un poids moléculaire de 16 kDa présente sous forme dimérique à raison de 20 000 copies par cellule, est l'une des deux protéines de type histone les plus abondantes chez *E. coli* (revues <sup>267, 366</sup>). H-NS agit sur la structure de l'ADN en le compactant, en altérant sa superhélicité en introduisant des supertours négatifs et en le courbant. Parce que H-NS peut condenser l'ADN, elle serait impliquée dans l'organisation de la structure de courte étendue de l'ADN. H-NS démontre peu de spécificité de séquence et se lie de façon préférentielle à l'ADN courbé.

Aussi, H-NS joue un rôle dynamique dans la régulation de l'expression des gènes. L'adaptation environnementale (disponibilité en oxygène, température et osmolarité) implique plusieurs gènes dont la régulation est entre autres médiée par H-NS <sup>7</sup>. H-NS est

parfois impliqué dans la régulation de l'expression génétique de facteurs de virulence (revue <sup>131</sup>) (ex. : thermorégulation de *pap* chez *E. coli* <sup>111, 358</sup>). H-NS, en modifiant la topologie de l'ADN, affecterait l'expression en modulant le degré de surenroulement requis pour la transcription. Une inhibition transcriptionnelle directe pourrait résulter de la liaison de H-NS à l'ADN qui fonctionnerait comme répresseur et interférerait avec la formation de promoteurs ouverts ou encore H-NS pourrait empêcher l'ARN pol d'interagir avec le promoteur de façon productive (revue <sup>131</sup>).

#### 6.1.7. IHF

La protéine IHF (*Integration Host Factor*) possède 30 % d'identité de séquence avec HU et ses domaines de liaison à l'ADN sont homologues au facteur transcriptionnel eucaryote TFIID (revue <sup>267</sup>). Tout comme HU, l'hétérodimère IHF favorise l'introduction d'une courbure pouvant aller jusqu'à 140° dans l'ADN de forme B. Cette courbure semble promouvoir par exemple la recombinaison site-spécifique de l'ADN du phage lambda au site *att*, soit l'intégration et l'excision de  $\lambda$  promues par Int, en favorisant les interactions protéiques de part et d'autre de la courbure. Contrairement à HU, IHF reconnaît une séquence spécifique.

L'implication de IHF dans la régulation de divers gènes, généralement en tant que régulateur positif, se ferait grâce à son interaction spécifique près d'autres promoteurs <sup>267</sup>. IHF joue un rôle dans la régulation de certains gènes de virulence (revue <sup>131</sup>) (ex. : fimbriae de type I; la capsule de type II (groupe de gènes *kps*)). Le rôle régulateur de IHF dans certaines réactions de transcription, de transposition et de recombinaison serait attribuable à sa capacité d'organiser localement la topologie de l'ADN de façon à abaisser l'énergie d'activation requise pour ces processus. Une coopérativité entre IHF et les promoteurs transcrits par l'ARN pol  $\sigma^{54}$  est fréquent retrouvée.

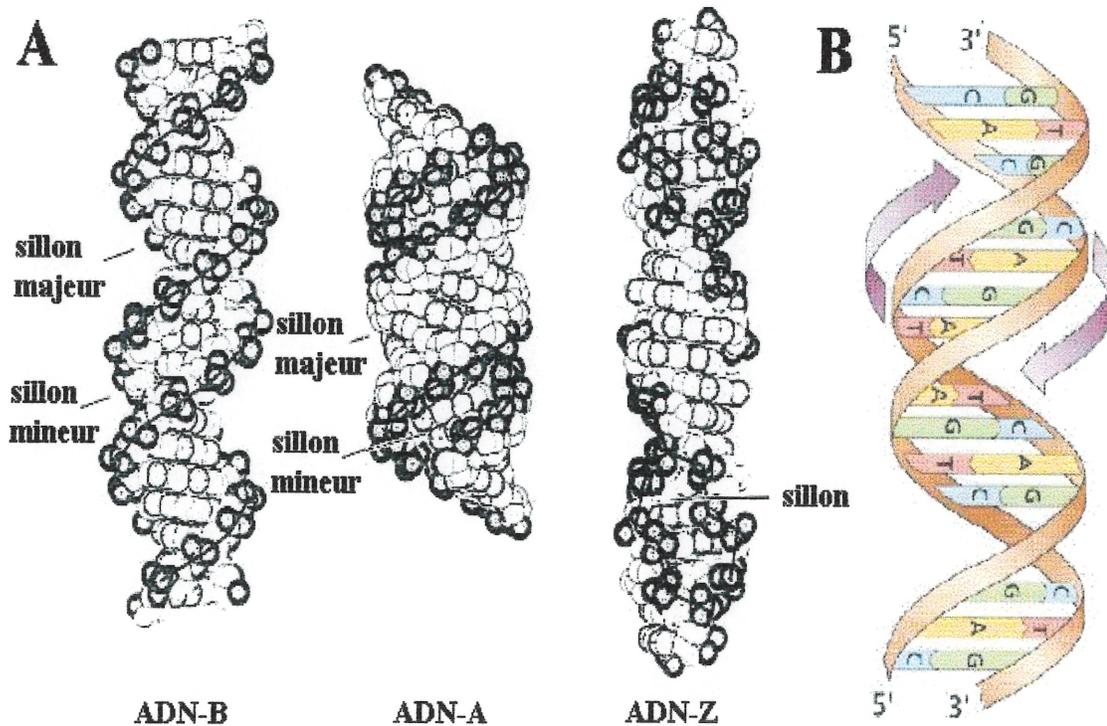
### 6.1.8. FIS

La protéine FIS (11,2 kDa) a été découverte pour son implication dans la promotion des inversions d'ADN site-spécifiques, d'où son nom *Factor for Inversion Stimulation*. FIS coopère avec HU dans la promotion de la variation de phase flagellaire chez *Salmonella*, se liant à une séquence activatrice à l'intérieur du gène *hin*<sup>107</sup>. FIS favorise aussi la transcription des gènes codant pour des ARN stables en se liant aux séquences activatrices en amont (UAS)<sup>251</sup>. Aussi, l'initiation de la réplication du chromosome de *E. coli* à *oriC* requiert l'implication de FIS et de l'ADN gyrase<sup>93</sup>. Tout comme pour IHF, la liaison de FIS est séquence-spécifique et elle introduit une courbure dans l'ADN, allant d'un angle de 40° à 90°, une propriété probablement cruciale à son activité biologique<sup>335</sup>.

Les transitions dans la topologie de l'ADN seraient couplées aux changements dans la physiologie cellulaire et FIS, une protéine de la chromatine chez *E. coli*, permettrait ce couplage entre le surenroulement de l'ADN et la physiologie cellulaire<sup>302, 304</sup>. Cet effet serait en partie médié par la gyrase, la topoisomérase responsable de la hausse du niveau de surenroulement négatif<sup>302</sup>. Aussi, la transcription de *fis* dépend fortement des variations de la topologie de l'ADN: son expression nécessite de hauts niveaux surenroulement négatif pour une activité maximale, toute déviation de ces niveaux optimum diminuant l'activité du promoteur *fisp*<sup>303</sup>. Durant la transition en phase de croissance exponentielle, les effets *fis*-dépendants sur la topologie de l'ADN sont en partie attribuables à la répression des gènes *gyrA* et *gyrB* et à une activité moindre de la gyrase<sup>302</sup>. De plus, *fis* est impliqué dans l'activation de la transcription de *topA* lors du stress oxydatif<sup>359</sup>. Ainsi, *fis* serait impliqué dans le réseau du contrôle homéostatique du surenroulement de l'ADN<sup>233, 303</sup>.

## 6.2. La molécule d'ADN et ses propriétés

Dans une molécule d'ADN de forme B (de pas droit), chaque tour de la double hélice contient 10,5 pb<sup>68, 271</sup>. Une propriété topologique inhérente à une molécule d'ADN circulaire est le nombre de liaison (*linking number*), Lk, lequel est déterminé par le nombre de fois qu'un des brins du duplex croise l'autre. Ce Lk demeure invariable tant que les brins d'ADN restent intacts, des changements dans le Lk ne pouvant survenir que par l'ouverture des brins d'ADN. On appelle topoisomères ou isomères topologiques (*topological isomers*) des molécules d'ADN circulaires dont la séquence nucléotidique est identique mais ayant des Lk différents. Ce sont les topoisomérases qui sont responsables de l'interconversion des topoisomères par l'ouverture transitoire des brins d'ADN.



adapté de <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Slides>

adapté de <http://gened.emc.maricopa.edu/bio/biol8>

**Figure 15.** Molécules d'ADN (A) Formes A, B et Z. (B) Double hélice.  
Adapté d'images d'Internet.

Un changement dans le nombre de liaison, Lk, est décrit par l'équation :

$$\Delta Lk = Lk - Lk^O \quad (1).$$

Ainsi, si  $Lk^0$  est l'état natif ou relaxé d'une molécule d'ADN circulaire fermée et que deux tours complets sont enlevés (par exemple, suite à l'action d'une topoisomérase), la valeur de  $Lk$  est réduite de 2, lequel changement dans  $Lk$  est décrit par  $\Delta Lk = -2$ .

Un changement dans l'état topologique de l'ADN peut aussi être décrit par un autre paramètre nommé torsion (*twist*),  $Tw$ , lequel décrit l'entrelacement des deux brins de l'hélice autour de leur axe commun. Si la valeur de  $Tw$  d'une molécule est réduite de 2 et que la molécule circulaire fermée est forcée de se tenir dans un plan, on voit que le nombre de liaison ( $Lk$ ) est changé par une valeur égale au changement dans la torsion ( $Tw$ ). Sous-enrouler une molécule par l'équivalent de deux tours y introduit une contrainte considérable (stress torsionnel) et ce cercle fermé n'est plus en état relaxé. Cette contrainte favorise la séparation des brins et assiste les réactions de l'ADN qui dépendent de la séparation des brins pour se dérouler. Si cette même molécule circulaire n'est plus forcée de se maintenir dans un plan parce qu'on lui permet de trouver son équilibre conformationnel, il se tordra autour de son axe hélicoïdal pour révéler une troisième propriété topologique, la contorsion (*writhe*),  $Wr$ . Le sous-enroulement de la molécule par deux tours introduit deux tours de contorsions compensatoires dans le sens négatif.

L'inter-relation entre ces trois caractéristiques topologiques est décrite par :

$$Lk = Tw + Wr \quad (2)$$

et les changements dans le nombre de liaison sont décrits par :

$$\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr \quad (3).$$

En pratique, les modifications du nombre de liaison d'une molécule circulaire fermée sont généralement réparties entre  $Tw$  et  $Wr$ . La contorsion se rapproche de la notion intuitive du surenroulement. Le surenroulement est négatif quand le changement du nombre de liaison est négatif, par rapport à l'état relaxé, c'est-à-dire que la molécule a été sous-enroulée. Le surenroulement est dit positif quand le changement du nombre de liaison est positif par rapport à l'état relaxé, soit lorsque la molécule est surenroulée.

### 6.3. Topoisomérases bactériennes : généralités

Les ADN topoisomérases bactériennes, les enzymes responsables de l'altération du degré de surenroulement de l'ADN et de la décaténation (et aussi de la caténation) des chromosomes, sont essentielles à la vie (revue <sup>207</sup>). La modification du surenroulement consiste en un événement intramoléculaire, et la décaténation est un processus intermoléculaire. *In vitro*, les topoisomérases bactériennes semblent pouvoir réaliser ces deux types de réactions. Chez *E. coli*, les quatre topoisomérases connues sont réparties en deux classes. Les topoisomérases de type 1, telles les topoisomérases I (Topo I) et III (Topo III), agissent en brisant transitoirement l'un des brins de la molécule d'ADN pour pouvoir passer à travers la cassure une autre portion d'ADN, monocaténaire ou bicaténaire. Quant aux topoisomérases de type 2, les topoisomérases II (Topo II ou gyrase) et IV (Topo IV), le bris transitoire des deux brins d'ADN sert au passage du brin. Le nombre de liaison (Lk) est ainsi modifié par un multiple de deux par les topoisomérases de type 2 tandis que celles de type 1 ne le changent que de un à la fois. Ces quatre topoisomérases semblent avoir, dans la cellule, des fonctions essentielles distinctes, et ceci pourrait apporter un contrôle plus précis de la topologie de l'ADN en permettant une régulation plus serrée des principales activités enzymatiques de ces différentes protéines.

Les réactions des topoisomérases avec l'ADN consistent typiquement en l'attachement covalent transitoire entre la protéine et l'ADN, en la coupure de l'ADN, au passage d'ADN à travers la cassure, suite à quoi l'ADN est réparé, puis le lien covalent avec l'enzyme rompu. Le passage de brin par les topoisomérases affecte apparemment des aspects différents de la conformation de l'ADN dans la cellule. Le niveau de caténation de l'ADN est changé quand le passage des brins s'effectue entre deux molécules distinctes, lesquelles deviennent alors plus ou moins entremêlées. Le niveau de surenroulement, soit le nombre de fois que les deux brins de la double hélice s'entrecroisent, est quant à lui modifié quand, à l'intérieur d'une même molécule fermée, une section de la molécule passe à travers l'autre. Une activité préférentielle de décaténation ou de relaxation des supertours indiquerait une préférence pour un substrat constitué de une ou de deux molécules.

Les topoisomérases contrôlent la structure et le degré de surenroulement de l'ADN. Il existe chez *E. coli*, un équilibre du niveau de surenroulement grâce aux activités antagonistes combinées de la Topo I, introduisant des supertours positifs, de la Topo II (ou gyrase), créant des supertours négatifs <sup>278</sup> ainsi que celle de la Topo IV, qui enlève des supertours négatifs <sup>376</sup>. De plus, le contrôle homéostatique du surenroulement de l'ADN implique l'induction de l'expression des gènes de *topA* <sup>340</sup>, codant pour la Topo I, ainsi que celle de *gyrA* et *gyrB* <sup>232</sup>, codant pour la gyrase, en réponse aux variations du degré de surenroulement de l'ADN (revue <sup>72</sup>). Un excès de supertours négatifs, dû à l'absence de la Topo I, est problématique pour la cellule mais une déficience modérée de la gyrase ne l'est pas <sup>61</sup>. Chez des mutants pour la Topo I ou pour la gyrase, les plasmides et les chromosomes isolés possèdent des degrés de surenroulement différents : il sont plus élevés que la normale chez les mutants *topA* <sup>61, 200, 275, 276, 282</sup>, et plus bas que normalement, i.e. relaxé, chez les mutants de gyrase <sup>200, 319</sup>.

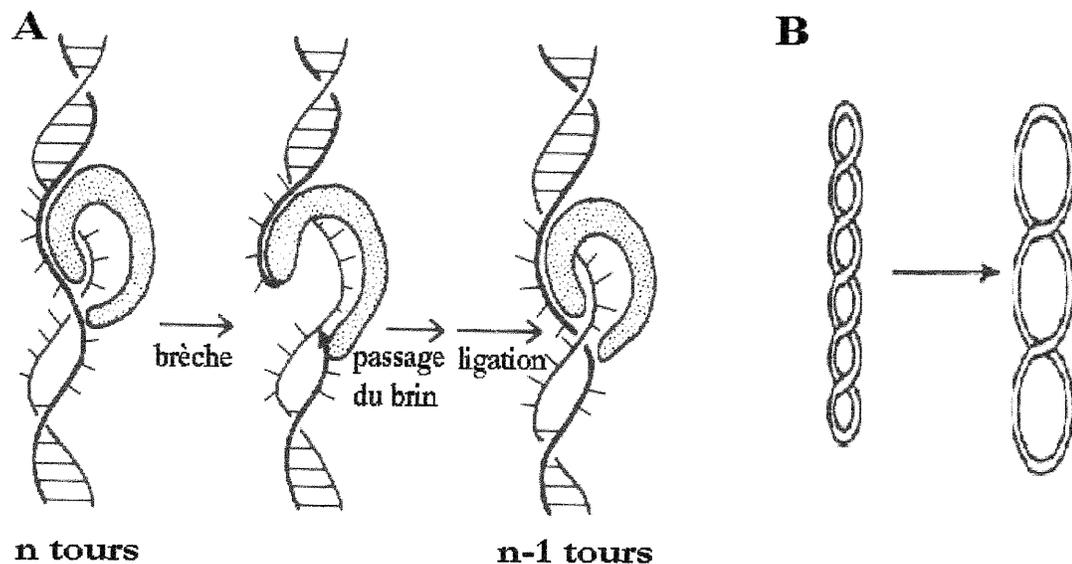
### 6.3.1. Topoisomérase I

Chez *E. coli*, le gène *topA* code pour la topoisomérase I (Topo I), un monomère de 105 kDa <sup>320</sup> qui aurait trois motifs en doigt de zinc <sup>341</sup>. Le fragment N-ter de 67 kDa possède un creux ou trou suffisamment large pour permettre le passage de l'ADN double-brin, tel que démontré par cristallographie <sup>194</sup>. La Topo I, une enzyme de type 1A, relaxe l'ADN négativement surenroulé en créant des supertours positifs <sup>352</sup>. La Topo I constitue un facteur d'initiation spécifique pour la réplication du plasmide *oriC* qui prévient qu'elle ne se fasse ailleurs <sup>164</sup>; ceci pourrait lui indiquer un rôle dans la réplication du chromosome (revue <sup>207</sup>).

Une diminution des niveaux cellulaires de Topo I, causée par la mutation non-léthale *topA10*, affecte l'abondance relative de plusieurs protéines chez *E. coli* <sup>319</sup> et provoque une hausse du niveau de surenroulement négatif de l'ADN <sup>278</sup>. Plusieurs évidences supportent l'idée que le rôle de la Topo I consiste en la réduction du surenroulement intracellulaire et que cette dernière agit en tant qu'antagoniste de la gyrase. Chez *E. coli*, les mutants de délétions pour la Topo I sont toujours viables et démontrent une croissance plus lente <sup>320</sup>. Leur survie serait permise par l'acquisition de mutations suppresseuses. Des mutations supplémentaires, survenant aux loci *gyrA*, *gyrB* et *toc* (*topoisomerase one compensation*),

permettent aux souches de délétion *topA* de croître plus rapidement<sup>61, 67, 228, 278, 282</sup>. Les mutants de délétion pour la Topo I montrent un taux de croissance normal et ce, grâce à l'acquisition de mutations compensatoires. Plusieurs de celles-ci se trouvent près ou dans les gènes *gyrA* et *gyrB* codant pour les sous-unités de la gyrase, soit dans les gènes structuraux de la gyrase ou dans ses séquences régulatrices adjacentes<sup>61, 228, 278</sup>. Une mutation de la Topo I peut être accompagnée d'une mutation compensatoire dans le domaine fonctionnel de la protéine A de la gyrase, cette diminution de l'activité de surenroulement pouvant provenir de l'altération des interactions allostériques dans le complexe de la gyrase<sup>259</sup>.

De plus, l'inhibition de la gyrase lors de la croissance en présence de faibles doses de novobiocine supprime également les effets néfastes engendrés par des délétions *topA*<sup>124</sup>. Les mutations supprimeuses de *topA* au locus *toc* sont localisées à 65 minutes sur le chromosome de *E. coli*, et celles-ci peuvent consister en des duplications. Elles couvrent une région où sont situés les gènes *parC* et *parE*, codant pour les sous-unités de la Topo IV<sup>170</sup>. La surexpression de la Topo IV peut supprimer, chez une souche *topA<sub>am-</sub> supD<sup>ts</sup>*, le défaut de croissance température-sensible<sup>171</sup>. Ainsi, dans la régulation du degré de surenroulement cellulaire, la Topo IV peut se substituer à la Topo I, probablement par la relaxation des supertours négatifs<sup>207</sup>.



adapté de <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Slides>

**Figure 16.** Activité de relaxation de la Topo I.  
Adapté d'images d'Internet.

La Topo I, puisque son activité de type 1 ne lui permet que de former des clivages transitoires dans un seul brin d'ADN, ne peut exercer la caténation et la décaténation que sur des ADN plasmidiques double-brin portant une coupure haplotomique (*nicked*) ou une brèche (*gapped*). De plus, elle est aussi capable de caténer, de décaténer et de créer des noeuds dans l'ADN simple brin <sup>207</sup>. *In vitro*, les évidences basées sur la préférence de substrat et les activités enzymatiques relatives suggèrent que le rôle de la Topo I soit la relaxation des supertours <sup>59</sup>. De plus, des études *in vitro* employant des systèmes de réplication plasmidiques ont démontré que la Topo I ne peut pas décaténer les plasmides durant la réplication <sup>138</sup>.

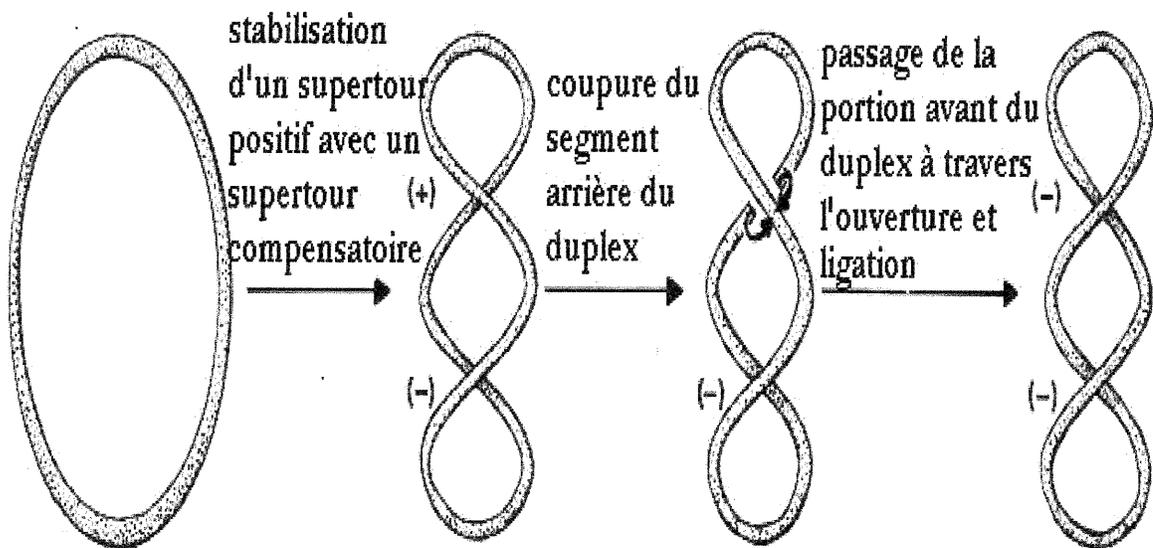
Selon le modèle des domaines jumeaux surenroulés (*twin-supercoiled-domain model*) <sup>196</sup>, il y a un niveau important de surenroulement négatif qui est généré, lors de l'élongation transcriptionnelle, derrière l'ARN pol en translocation, lequel surenroulement négatif est relaxé par l'ADN Topo I <sup>339, 368</sup>. La boucle-R (*R-loop*) (un hybride entre l'ARN naissant et le brin matrice d'ADN, le brin codant étant alors non-apparié) est aussi un site de choix pour la relaxation par la Topo I <sup>268</sup>. Il semblerait que le rôle majeur de Topo I soit d'empêcher la formation de barrières (*blocks*) transcriptionnelles boucles-R-dépendantes en agissant alors en tant que facteur d'élongation de la transcription <sup>26, 74, 75, 148, 219-221, 222, 268</sup>.

### 6.3.2. Topoisomérase II

L'ADN gyrase ou topoisomérase II (Topo II), une topoisomérase de type 2 essentielle, est responsable d'introduire du surenroulement négatif dans l'ADN bactérien <sup>46, 105</sup>, ce qui affecte les processus de réplication, de transcription, de recombinaison et de réparation de l'ADN <sup>156</sup> (revue <sup>207</sup>). Dans la cellule, la gyrase a des rôles multiples. Elle est nécessaire à la régulation du surenroulement, de la transcription, ainsi qu'à l'initiation, l'élongation et la terminaison de la réplication d'ADN, tel que l'indiquent la caractérisation des mutants de la gyrase et les études employant des inhibiteurs de la gyrase <sup>92, 184, 278</sup>. Plusieurs études suggèrent que la gyrase possède l'activité clé contribuant à la réponse environnementale au niveau du surenroulement de l'ADN <sup>65</sup>. Par contre, en raison d'une régulation extensive (contrôle inhérent et contrôle global), le niveau auquel la gyrase contrôle le surenroulement de l'ADN et le taux de croissance chez *E. coli* est compromis <sup>159</sup>.

La gyrase consiste en un tétramère composé de deux de chacune des sous-unités GyrA (105 kDa) et GyrB (95 kDa), lesquelles sont respectivement codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*. GyrA est impliquée dans la liaison, le clivage et la réunion des brins d'ADN, et il existe un lien covalent entre un résidu tyrosine de cette sous-unité et l'extrémité 5' de la coupure de l'ADN. C'est GyrB qui est responsable de l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au déroulement des réactions effectuées par la gyrase, dont celle d'introduire des supertours négatifs. La portion N-ter de GyrB possède, tel que démontré par cristallographie, un site de liaison pour l'ATP de même qu'une région creuse à travers de laquelle l'ADN pourrait possiblement passer. *In vitro*, des modifications du ratio [ATP]/[ADP] altèrent l'activité de la gyrase en affectant la compétition entre les réactions de surenroulement et de relaxation, et *in vivo*, le ratio [ATP]/[ADP] est corrélé avec l'activité de la gyrase de même qu'il est impliqué dans le contrôle du surenroulement cellulaire <sup>149</sup>. La gyrase est capable, *in vitro*, d'introduire des supertours négatifs dans les plasmides, de relaxer tant les supertours négatifs que positifs, et d'effectuer la caténation et la décaténation de plasmides. Parmi les topoisomérases connues, la gyrase est unique quant à sa capacité d'introduire des supertours négatifs (revue <sup>207</sup>).

## Inversion de signe par la gyrase



adapté de <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Slides>

**Figure 17.** Activité de relaxation des supertours positifs par la gyrase.  
Adapté d'une image d'Internet.

On ne sait pas si l'initiation de la réplication par la gyrase est directe, par l'ajout de supertours négatifs, ou bien indirecte, étant donné que la gyrase est requise pour la transcription et que l'initiation de la réplication à *oriC* est activée transcriptionnellement<sup>207</sup>. Le niveau de surenroulement influencerait la topologie d'*oriC* et, par le fait même la séquence des événements menant à l'initiation de la réplication chez *E. coli*<sup>351</sup>.

L'action de la gyrase de *E. coli* peut être altérée tant par des mutations température-sensibles que par des antibiotiques spécifiques. Les quinolones telles l'acide nalidixique, l'acide oxonolique et la norfloxacine affectent la protéine GyrA. Des bactéries mutantes résistantes à l'acide nalidixique possèdent des modifications structurales de la sous-unité A. Ces mutants présentent des efficacités de recombinaison, de liaison (*linkage*), de réparation de l'ADN et de fréquence de mutation moindres que celles retrouvées chez les souches sauvages<sup>156</sup>. Suite à la diminution de l'activité de la gyrase par l'introduction de la mutation non-léthale *gyrB226*, l'abondance relative de plusieurs protéines chez *E. coli* est modifiée et une baisse du niveau de surenroulement négatif est observée<sup>319</sup>.

L'ADN gyrase est aussi nécessaire à la ségrégation des chromosomes. Cytologiquement, certains allèles *gyrA* et *gyrB* température-sensibles (<sup>ts</sup>) montrent, après incubation à la température non-permissive, un défaut dans la partition du nucléoïde<sup>155, 169, 318</sup>. La gyrase apparaît essentielle à la décaténation des chromosomes préalable à la septation, puisque chez les nucléoïdes purifiés à partir d'un mutant *gyrB<sup>ts</sup>* à la température non-permissive, on a observé des doublets de nucléoïdes, certains de ces chromosomes enchevêtrés ayant pu être libérés l'un de l'autre par l'ajout de gyrase purifiée<sup>318</sup>. Toutefois, il est maintenant clair que l'activité de décaténation des chromosomes interreliés est plutôt attribuable à la Topo IV, un homologue de la gyrase possédant une importante activité de décaténation<sup>73</sup>. La gyrase pourrait être essentielle à la ségrégation simplement par son rôle d'introduction de supertours négatifs en avant de la fourche durant la réplication, ceci permettant alors de diminuer le nombre de liaison des chromosomes-filles résultantes et, par conséquent, leur degré de caténation<sup>318</sup>.

*In vivo*, la gyrase coupe, les éléments répétitifs BIME-2 de l'ADN, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la topologie de l'ADN et les réarrangements génomiques<sup>83</sup>. Les éléments BIME-2 sont un des deux types de BIMEs (*Bacterial Interspersed Mosaic Elements*) (les BIME-1 contiennent un site de liaison pour IHF), lesquels BIMEs sont retrouvés à environ 300 copies dans le chromosome de *E. coli*, localisés en 3' de la fin des gènes et composés de trois types de palindromes extragéniques répétitifs alternants<sup>83</sup>. En présence d'acide oxonolique, le clivage de l'ADN plasmidique pBR322 se concentre dans la région entre les extrémités 3' des gènes *tetA* et *bla*, ce clivage préférentiel dépendant de la transcription d'ARN et de l'orientation divergente de ces deux unités transcriptionnelles<sup>182</sup>. Le clivage accru par la gyrase pourrait refléter les changements locaux du surenroulement de l'ADN durant la transcription puisque le clivage par la gyrase *in vitro* est sensible à l'état de surenroulement de l'ADN. Ces effets de la transcription sur le clivage par la gyrase sont mieux expliqués par le modèle de domaines jumeaux surenroulés de la transcription de Liu et Wang<sup>196</sup>. La traduction influence aussi l'activité de clivage par la gyrase : le traitement au chloramphénicol ou l'insertion d'un terminateur traductionnel dans la région 5'-proximale du gène *tetA* abolit le clivage accru<sup>182</sup>.

### 6.3.3. Topoisomérase III

La topoisomérase III (Topo III)<sup>316</sup> est codée par le gène *topB*<sup>59, 60</sup>, lequel code pour un monomère de 73,2 kDa. Les mutants de délétions *topB* sont viables et sans défaut de croissance manifeste (revue<sup>207</sup>). Puisque l'interruption de ce gène, identifié comme l'allèle *mutR*, cause une hausse du niveau de formation de délétions spontanées, la Topo III pourrait être impliquée dans les réactions qui normalement réduisent le taux de délétions spontanées<sup>305</sup>. Tout comme la Topo I, la Topo III, puisqu'elle est de type 1, elle ne peut que caténer et décaténer les ADN plasmidiques portant une césure (*nicked*) ou une brèche (*gapped*)<sup>207</sup>. La Topo III est une décaténase, selon les évidences obtenues *in vitro* quant à la préférence de substrat et d'activité enzymatique relative<sup>59</sup> et selon les systèmes de répllication plasmidiques<sup>138</sup>. Elle pourrait aussi jouer ce rôle de décaténation *in vivo*. Toutefois, puisque cette enzyme n'est pas essentielle à la croissance et à la viabilité, d'autres topoisomérases pourraient se substituer à cette fonction<sup>207</sup>. L'observation que la Topo III puisse agir catalytiquement sur l'ARN suggère que cette enzyme pourrait exercer un rôle de décaténation de l'ARNm de l'ADN durant la transcription<sup>58</sup>.

Récemment, il a été observé que le gène *topB* est un suppresseur multicopie efficace des mutations de délétions *topA* et de la formation de boucles-R<sup>26</sup>, tout comme l'est le gène *rnhA*, codant pour la RNase H<sup>75</sup>. La Topo III peut relaxer, tant *in vitro* qu'*in vivo*, le surenroulement négatif causé par la transcription, cette relaxation s'opérant au niveau local, et non au niveau global, comme c'est le cas pour la Topo I<sup>26</sup>. Les boucles-R sont des cibles de choix pour la Topo III, et le surenroulement hypernégatif boucle-R-dépendant est empêché par l'action de cette enzyme *in vivo*. De plus, *topB* et *rnhA* agiraient en synergie dans la correction efficace du défaut de croissance des mutants  $\Delta topA$ . Cet effet synergique pourrait être expliqué par le fait que certaines des boucles-R ne doivent pas être dégradées pour que l'ARN soit disponible pour la synthèse protéique. Il est possible que la Topo III réprime la formation de boucles-R ou qu'elle provoque leur déstabilisation en vue d'empêcher leur dégradation<sup>26</sup>. Ceci est appuyé par l'observation que la surproduction de TopB corrige l'effet négatif de la surexpression de l'activité de la RNase H, à basse température, chez des mutants dépourvus de Topo I<sup>26, 75, 221</sup>.

### 6.3.4. Topoisomérase IV

Chez *E. coli*, la topoisomérase IV (Topo IV) est un tétramère composé de deux de chacune des sous-unités ParC (83,7 kDa) et ParE (70,2 kDa), respectivement codées par les gènes *parC* et *parE*, lesquelles sont respectivement homologues à GyrA et GyrB (revue<sup>207</sup>). Les sous-unités protéiques ParC et ParE présentent l'activité Topo II que lorsque combinées ensemble mais il n'existe pas de complémentarité entre les gènes des sous-unités GyrB et GyrA de la gyrase et ceux des sous-unités ParC et ParE de la Topo IV. La Topo IV a été identifiée chez des mutants température-sensibles présentant des défauts de partition des chromosomes et une perte de viabilité à température non-permissive. Une forte décaténation et relaxation de l'ADN a été démontrée chez la Topo IV reconstituée à partir des sous-unités ParC et ParE purifiées, lesquelles activités requièrent de l'ATP. La Topo IV, qui est en association avec la membrane, est responsable, durant la réplication, de la décaténation des chromosomes nouvellement formés, suite à quoi une autre topoisomérase agirait sur ces caténats<sup>73, 139, 188, 375</sup>. Une association possible entre la Topo IV et la machinerie de réplication est envisagée. La fonction de Topo IV serait d'ancrer les chromosomes sur les membranes, ParC étant spécifiquement associé avec les membranes internes seulement en présence d'ADN. La Topo IV délie aussi les caténats générés par la recombinaison site-spécifique. La décaténation par la Topo IV des intermédiaires de réplication et de recombinaison est facilitée par l'activité surenroulement négatif de la gyrase<sup>375, 377</sup>.

La Topo IV, une topoisomérase essentielle, est maintenant connue pour être impliquée, tout comme la Topo I et la gyrase le sont, dans le maintien des niveaux de surenroulement négatif global de l'ADN grâce à son activité qui lui permet de relaxer les supertours négatifs dans l'ADN<sup>376</sup>. La surexpression de Topo IV peut supprimer le défaut de croissance température-sensible chez une souche *topA<sub>am</sub>supD<sup>ts</sup>*<sup>170</sup>. La Topo IV peut en effet se substituer à la Topo I dans la régulation des niveaux cellulaires du surenroulement de l'ADN en relaxant les supertours négatifs. Ainsi, les activités des Topo I et IV contrecarrent celle de la gyrase en vue de maintenir le surenroulement de l'ADN, chacune d'elles ayant un rôle distinct. Contrairement à la Topo I, la Topo IV peut aussi relaxer les supertours positifs générés lors de la réplication et de la transcription<sup>172</sup>.

## 7. L'ADN et l'expression génétique

### 7.1. L'expression génétique et la topologie de l'ADN chez la bactérie

L'expression génétique est influencée par le niveau du surenroulement de l'ADN (revue <sup>357</sup>). D'abord, durant l'initiation de la transcription, le surenroulement négatif favorise la séparation des brins au promoteur lors de la formation du complexe ouvert. Des fluctuations des degrés du surenroulement causées par des changements dans les niveaux des topoisomérases affectent également l'expression des gènes. Le taux de transcription est entre autres déterminé par celui de la formation du complexe ouvert entre l'ARN pol et le promoteur. Les cas d'expression génétique impliquant des protéines de liaison à l'ADN, tant régulatrices qu'auxiliaires, sont aussi influencés par une modification du degré du surenroulement de l'ADN. Enfin, le taux de transcription est aussi affecté lors d'une étape ultérieure à la formation du complexe ouvert. Le modèle des domaines jumeaux de surenroulement (*twin-supercoiled-domain model*) de la transcription explique l'interrelation entre la transcription et la topologie de l'ADN <sup>196</sup>. En effet, la transcription génère des domaines de surenroulement locaux, dont les supertours sont relaxés par les actions antagonistes de la Topo I et de la gyrase. De plus, il existerait une interdépendance entre les diverses unités transcriptionnelles. Finalement, il est possible qu'il se forme un hétéroduplex entre l'ARN naissant et le brin matrice d'ADN, lequel est aussi nommé boucle-R (*R-loop*) <sup>6</sup>.

Le taux de synthèse des chaînes d'ARN de pleine longueur peut également être limité par les effets du surenroulement de l'ADN (1) sur l'initiation de la synthèse d'ARN, (2) sur la libération du facteur  $\sigma$  de l'holoenzyme d'ARN pol, (3) sur la liaison de facteurs auxiliaires au noyau (*core*) de l'enzyme, libérée de  $\sigma$ , dans le complexe d'élongation (ex. : NusA), (4) sur l'arrêt de la polymérase, lors de l'élongation, aux sites de pauses, (5) et sur la terminaison prématurée de la synthèse d'ARN <sup>357</sup>.

Ce sont les topoisomérases qui régulent, dans le nucléoïde et d'autres ADN topologiquement fermés, le degré de cette tension <sup>207</sup>. L'expression génétique est affectée par des modulations du surenroulement de l'ADN, causées entre autres par la baisse des niveaux cellulaires de la gyrase, qui surenroule négativement l'ADN, et la Topo I, qui

relaxe les supertours négatifs <sup>357</sup>. L'état du surenroulement de l'ADN est faiblement accru ou diminué par des mutations dans *topA* et *gyrB*, respectivement, sans qu'il n'y ait toutefois d'effet marqué sur le taux de croissance. L'abondance des diverses protéines diffère chez les souches mutantes et sauvages, plusieurs étant maximale exprimées au degré de surenroulement sauvage, d'autres aux niveaux relaxés, et quelques-unes à des degrés élevés de surenroulement. Des changements subtils mais non-létaux dans le degré de surenroulement de l'ADN pourraient avoir des effets généraux sur les patrons d'expression génétique <sup>319</sup>.

Même si des mutations dans les gènes structuraux des topoisomérases (Topo I et gyrase) modifient l'abondance relative de nombreuses protéines et provoquent une altération du niveau du surenroulement de l'ADN <sup>319</sup>, les effets de ces mutations sont pléiotropiques. Plusieurs des mutations compensatoires pour les mutations dans *topA* ne sont pas localisées dans aucun des gènes connus pour coder pour les topoisomérases <sup>282, 291</sup>. Puisque ces effets s'étendent aussi à la synthèse des ARNt, il faut se garder d'interpréter les changements de l'expression protéiques comme n'étant attribuables qu'aux fluctuations du degré du surenroulement de l'ADN <sup>357</sup>. De plus, même si l'expression d'un gène donné dépend des taux intracellulaires des topoisomérases, ceci ne signifie pas nécessairement que cette situation soit le reflet d'une dépendance envers la topologie de la matrice d'ADN <sup>357</sup>. En effet, une hausse ou une baisse des niveaux cellulaires de gyrase et de Topo I peut affecter l'expression d'une multitude de gènes ainsi que le déroulement de nombreux processus cellulaires, et un tel changement pourrait également influencer l'expression d'un gène particulier selon des voies qui ne sont pas directement reliées à l'état topologique de ce gène <sup>357</sup>.

## 7.2. Le contrôle homéostatique du niveau du surenroulement de l'ADN

Chez *E. coli*, un équilibre du niveau de surenroulement existe grâce aux activités antagonistes combinées de la Topo I, introduisant des supertours positifs, et de la Topo II (ou gyrase), créant des supertours négatifs <sup>278</sup> ainsi que celle de la Topo IV, qui enlève des supertours négatifs <sup>376</sup>. Fait intéressant, le contrôle homéostatique du surenroulement de l'ADN implique l'induction du promoteur de *topA* par une augmentation du degré de surenroulement négatif <sup>340</sup> ainsi que l'induction des promoteurs de *gyrA* et *gyrB* par la

relaxation de l'ADN<sup>233</sup>. De plus, l'inhibition de la gyrase réduit aussi l'expression de *topA*<sup>340</sup>. Les régions promotrices de *gyrA* et *gyrB* contiennent une séquence de 20 pb, qui inclue la région consensus -10, le site +1 d'initiation de la transcription et les quelques premières bases transcrites, laquelle séquence est responsable des propriétés d'induction de la relaxation de l'ADN. Un modèle pour la transcription stimulée par la relaxation de l'ADN où le dégagement du promoteur est l'étape limitante a été proposé<sup>232</sup>.

Récemment, il a été suggéré que FIS soit impliqué dans l'ajustement précis du mécanisme de contrôle homéostatique du surenroulement de l'ADN chez *E. coli*<sup>233, 302-304</sup>. *In vivo*, l'expression de *fis* dépend fortement d'une densité hélicoïdale négative de l'ADN<sup>303</sup> et le maintien de ces niveaux de surenroulement requiert l'activité de la gyrase. Ainsi, non seulement FIS régule-t-il l'activité de la gyrase<sup>302</sup>, mais aussi, en retour, l'expression même de *fis* dépend de l'activité de surenroulement de la gyrase<sup>303</sup>. En agissant comme répresseur transcriptionnel des gènes *gyrA* et *gyrB*, FIS pourrait répondre aux modifications du surenroulement négatif soit en dérégulant, soit en renforçant la répression.

### 7.3. Les changements conformationnels de l'ADN lors de la transcription

La transcription affecte elle-même la conformation de l'ADN, tant au niveau de la liaison de l'ARN pol, de la formation du complexe ouvert lors de l'initiation, qu'au niveau de l'élongation. Lors de la transcription, la double hélice d'ADN est significativement déroulée, tant dans le complexe ouvert de l'étape d'initiation que dans le complexe d'élongation<sup>301, 357</sup>. *In vitro*, le taux de formation du complexe ouvert au promoteur *lacps* est lui-même influencé par le surenroulement négatif<sup>20</sup>. Lors de l'élongation transcriptionnelle, il peut y avoir entre autres la création de domaines jumeaux de surenroulement<sup>196</sup>, ainsi que la formation d'hétéroduplex d'ARN-ADN (*R-loop*).

Le surenroulement négatif de l'ADN favoriserait thermodynamiquement la formation du complexe ouvert entre les promoteurs et l'ARN pol<sup>31, 52, 150, 357</sup>. Lors du processus de la formation du complexe ouvert, des changements conformationnels surviennent dans la région du promoteur<sup>55</sup>; de ceux-ci, le plus saillant concerne la séparation des brins qui s'étend à partir de la région -10 au delà du site d'initiation de la transcription<sup>27, 37, 47, 174, 300</sup>. Ces complexes se forment rapidement, sans apport externe d'énergie, et sont très stables.

En plus de stabiliser le complexe ouvert une fois formé, l'ARN pol abaisserait aussi l'énergie d'activation requise pour le processus de séparation des brins, et ce, en induisant des distorsions dans l'ADN qui déstabiliseraient la forme de la double hélice. De telles distorsions incluraient la torsion forcée de l'ADN pour le dérouler d'un tour et l'introduction d'une courbure de l'autre côté du promoteur (pour une revue <sup>54</sup>). Plusieurs évidences sont en accord avec le recourbement de l'ADN du promoteur par l'ARN pol (<sup>47, 137, 185, 250, 285</sup>; revues <sup>104, 284</sup>). Il n'a pas encore été expérimentalement établi si l'enveloppement ou le recourbement de l'ADN était requis pour abaisser la stabilité de l'hélice dans la région où a lieu la séparation des brins <sup>55</sup>.

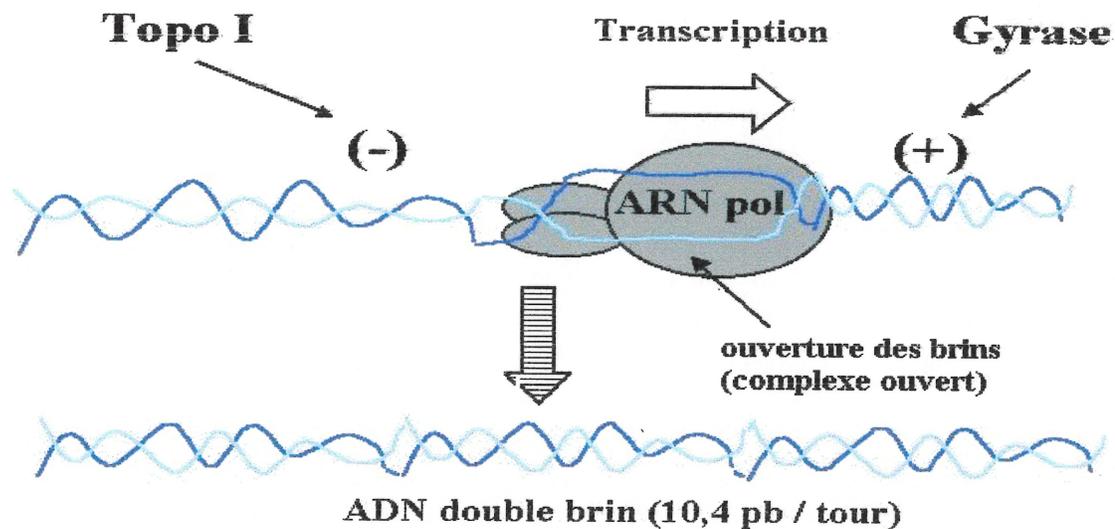
### **7.3.1. Le surenroulement de la matrice d'ADN généré par la transcription**

#### **7.3.1.1. Le modèle des domaines jumeaux surenroulés**

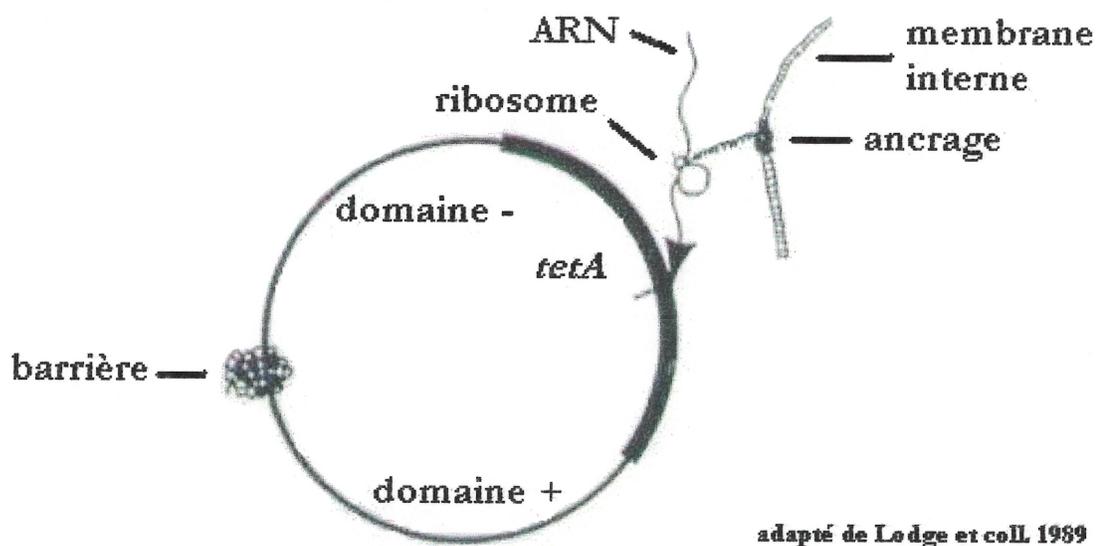
Selon le modèle des domaines jumeaux surenroulés (*twin-supercoiled domain model*) de Liu et Wang <sup>196</sup>, la transcription influence elle-même la topologie locale de l'ADN, la translocation du complexe d'élongation de l'ARN pol sur la double hélice d'ADN générant des supertours positifs devant et des supertours négatifs derrière lui <sup>41, 196, 274, 280, 339, 368</sup>. La création de ces domaines jumeaux de surenroulement ne peut survenir que si l'ADN est incapable d'effectuer une rotation rapide pour permettre la diffusion des supertours accumulés, et que si le complexe transcriptionnel n'est pas capable d'effectuer une rotation autour de l'ADN. De tels effets deviennent exagérés lorsque le gène transcrit code pour une protéine d'ancrage à la membrane. Aussi, chez les procaryotes, le couplage de la transcription et de la traduction génère un complexe en mouvement qui est incapable de tourner autour de la double hélice d'ADN.

Sous certaines conditions, la rotation d'une ARN pol en transcription autour de sa matrice peut être gênée, et l'ADN est alors contraint de tourner pendant que s'effectue sur lui la translocation de l'enzyme. Divers mécanismes peuvent nuire à la rotation d'une polymérase autour de la double hélice d'ADN (revue <sup>357</sup>). D'abord, la polymérase peut être directement ancrée sur la matrice par l'intermédiaire d'un contact avec une protéine régulatrice liée à l'ADN, ce qui peut générer du surenroulement dans l'ADN <sup>196, 354</sup>. La polymérase peut également s'ancrer à la matrice via la formation de structures en triplex ou en hétéroduplex entre l'ARN naissant et la matrice d'ADN <sup>196, 283</sup>. Enfin, ceci peut aussi

survenir par l'ancrage à la membrane cellulaire interne si une protéine constitutive de la membrane ou une protéine d'exportation est cotranscriptionnellement synthétisée<sup>41, 196, 201, 208, 209</sup>



**Figure 18.** Modèle des domaines jumeaux de surenroulement de Liu et Wang (1997)<sup>196</sup>.  
Adapté de Gene VI<sup>190</sup>.



**Figure 19.** Modèle pour la formation de domaines de surenroulement positif et négatif chez pBR322 causée par l'ancrage de la protéine TetA à la membrane.  
Adapté de Lodge *et coll.* (1989)<sup>201</sup>.

La transcription d'une molécule d'ADN à l'intérieur d'une bactérie est ainsi accompagnée de changements locaux et temporels du surenroulement de la matrice d'ADN. Le niveau de surenroulement de ces domaines peut être modulé par deux processus : par la

relaxation de ces supertours à des niveaux appropriés par les activités enzymatiques des topoisomérases, ainsi que par les voies diffusionnelles grâce auxquelles des supertours opposés peuvent se neutraliser l'un et l'autre. La gyrase et la Topo I agissent de concert, *in vivo*, pour maintenir un équilibre du niveau de surenroulement, lors de la transcription ou lors de tout autre processus impliquant la translocation d'un assemblage macromoléculaire sur l'ADN<sup>357</sup>. La gyrase introduit des supertours négatifs en avant du complexe de transcription<sup>39, 182</sup> et la Topo I agit derrière pour relaxer les supertours négatifs<sup>196, 368</sup>. Puisque la liaison de la gyrase à l'ADN induit une contorsion ( $Wr$ ) positive dans un segment d'ADN<sup>197, 198</sup>, cette enzyme se lie de façon préférentielle et plus fortement à l'ADN positivement surenroulé (relaxé), et moins favorablement à l'ADN négativement surenroulé<sup>140</sup>. En ce qui concerne la Topo I, celle-ci agit préférentiellement sur l'ADN négativement surenroulé<sup>352</sup>.

### 7.3.1.2. Les régions de surenroulement localisées

Selon le modèle des domaines jumeaux surenroulés, le degré du surenroulement de l'ADN d'une région donnée ne dépend pas que des niveaux cellulaires des topoisomérases et de leur accessibilité à cette région, mais aussi des taux transcriptionnels, de l'orientation relative des unités transcriptionnelles, ainsi que de la présence d'autres barrières à la rotation de la matrice d'ADN<sup>196</sup>. Les conformations locales d'ADN sous-enroulé par rapport à la forme B (de pas droit) sont favorisées dans l'ADN surenroulé négativement. Toutefois, la coexistence de plusieurs événements transitionnels à l'intérieur d'un même domaine topologique provoque une compétition entre eux pour l'énergie libre de surenroulement négatif disponible<sup>81</sup>. Les comportements transitionnels de séquences très distancées peuvent s'affecter les uns les autres d'une façon complexe et indépendante de l'orientation relative des segments impliqués<sup>81</sup>. Le patron des événements transitionnels dépend fortement du degré de surenroulement de l'ADN, des conditions ambiantes de même que de la nature et du nombre des séquences impliquées. Ceci pourrait, jouer un rôle dans les étapes initiales de la transcription, de la réplication et de la recombinaison<sup>81</sup>. Chez une souche Top<sup>+</sup> de *E. coli*, il a été prouvé que le surenroulement négatif généré transcriptionnellement peut affecter, *in vivo*, la structure de l'ADN sur une assez grande échelle, une vague de surenroulement transcriptionnel d'une longueur de demi-dissociation d'environ 800 pb ayant été observée<sup>183</sup>.

### 7.3.1.3. L'interdépendance des unités transcriptionnelles adjacentes

Le modèle des domaines jumeaux surenroulés a permis de prédire que le niveau de surenroulement local dépend de la transcription, ce qui a soulevé la possibilité que l'expression d'un gène puisse affecter, par le surenroulement transcriptionnel qu'il génère, l'expression d'un gène adjacent<sup>193, 355</sup>. Dans le cas de gènes avoisinants codant pour des protéines dont la localisation membranaire est cotranscriptionnelle, les effets sur le surenroulement peuvent être significatifs chez des souches mutantes pour la gyrase ou la Topo I. Cette interdépendance peut être généralisée au couplage entre n'importe quel processus sensible au surenroulement de l'ADN et tout autre processus de translocation sur l'ADN qui peut générer du surenroulement. Par exemple, des couplages entre la réplication et la transcription<sup>5</sup> ainsi qu'entre la transcription et la recombinaison site-spécifique sont probables<sup>357</sup>.

La formation de domaines jumeaux surenroulés durant la transcription se manifeste par une baisse ou une hausse marquée du nombre de liaison (Lk) d'un plasmide intracellulaire lors de l'inhibition de la gyrase ou de la topoisomérase, respectivement<sup>368</sup>. De tels changements dans le Lk dépendent fortement de la transcription du plasmide en *cis* et de l'orientation relative des unités transcriptionnelles sur le plasmide. Ceci indiquerait que l'état du surenroulement de l'ADN bactérien est fortement modulé par la transcription et que les ADN topoisomérases sont normalement impliquées dans l'étape d'élongation de la transcription<sup>368</sup>.

Lorsque ces domaines de surenroulement ne sont pas relaxés par les topoisomérases, ils peuvent influencer d'autres événements liés à l'ADN se déroulant à proximité. Ainsi, en l'absence de Topo I, les supertours négatifs induits par la transcription d'une unité transcriptionnelle peuvent moduler, *in vivo*, l'activité d'un promoteur sensible au surenroulement d'une unité transcriptionnelle avoisinante, comme c'est le cas pour le promoteur *leu-500p*, lorsqu'il est transcrit de façon divergente à *tetA*<sup>21, 34, 36</sup>.

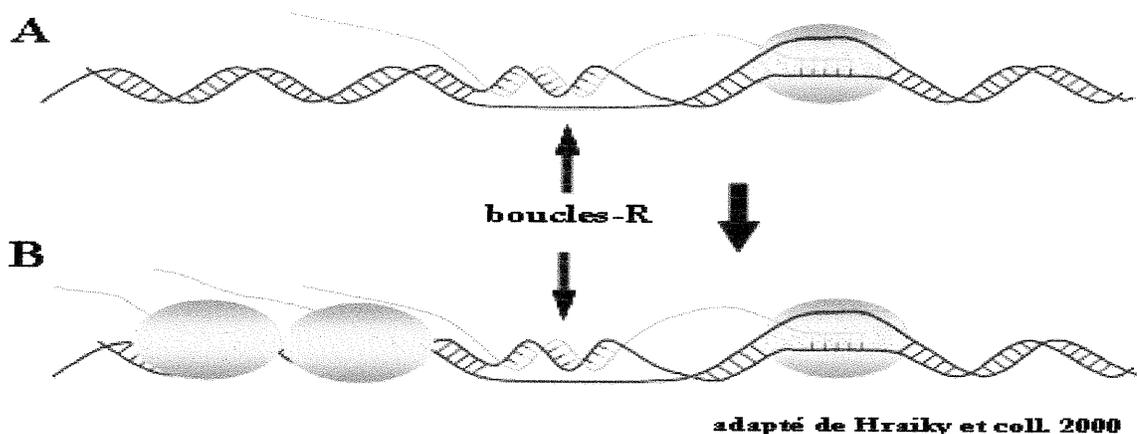
Chez des cellules de *E. coli* en phase exponentielle de croissance, l'activation de la transcription sur un plasmide est accompagnée d'une hausse du niveau de surenroulement négatif, le nombre de supertours créés étant proportionnel à la force du promoteur et à la

longueur du transcrit, ceux-ci disparaissant avec l'arrêt de la transcription <sup>91</sup>. La transcription causerait la rotation de la matrice d'ADN <sup>91</sup>. La superhélicité de l'ADN, en plus d'être sujette à un mécanisme de contrôle général, peut être modulée localement en réponse aux perturbations topologiques associées aux processus de circulation (*tracking*) sur l'ADN <sup>91</sup>.

Localement, le signe du surenroulement peut être modifié de façon spatiale et temporelle, ce qui a pour conséquence que le Lk moyen d'un plasmide est un faible indicateur du degré du surenroulement à un endroit précis sur l'ADN. En vue de mesurer le niveau du surenroulement local, on doit se servir des transitions structurales de l'ADN qui sont dépendantes du surenroulement de l'ADN. Celles-ci réfèrent à la transition rapide (*flipping*) d'une séquence G-C d'une forme d'hélice-B de pas droit vers une forme d'hélice-Z de pas gauche <sup>158, 280, 281</sup>, à l'extrusion, à partir de segment AT en alternance, d'une paire de structures en épingle <sup>21, 227</sup>, ou à la formation de structures triple-brins <sup>178</sup>.

#### 7.3.1.4. Le surenroulement transcriptionnel et la formation de boucles-R

La formation d'une boucle-R (*R-loop*) (revue <sup>6</sup>) ou d'hétéroduplex entre l'ARN naissant et le brin transcrit de la matrice d'ADN implique la portion 3' de l'ARN. Le surenroulement négatif de la matrice d'ADN est requis pour la formation et la stabilisation de l'hybride ARN-ADN. *In vitro*, lors de l'élongation transcriptionnelle, en présence de la gyrase et en l'absence de la RNase H, une ARN pol active peut générer, une boucle-R dont la longueur peut aller jusqu'à des milliers de paires de bases <sup>263</sup>. La formation de tels hétéroduplex serait responsable de l'initiation de la réplication des plasmides de type ColE1 chez les mutants de *E. coli* dépourvus de la RNase H (revue <sup>216</sup>). Similairement, chez les souches de *E. coli* présentant une déficience pour la RNase H avec un défaut additionnel soit dans la protéine DnaA, soit à l'origine de réplication *oriC*, laquelle est normalement employée lors de la réplication chromosomique, l'initiation de la réplication de l'ADN dépendrait surtout de la formation de boucle-R à des origines secondaires nommées *oriK* <sup>6</sup>. De plus, des études réalisées par Drolet *et coll.* <sup>74</sup>, ont démontré qu'il y a formation de boucles-R lorsque la transcription par l'ARN pol de *E. coli* est réalisée *in vitro*, en présence de gyrase.



**Figure 20.** Modèle de l'effet des boucles-R sur l'élongation transcriptionnelle.  
**(A)** Formation de la boucle-R. **(B)** La boucle-R agit comme barrière à la translocation des molécules d'ARN pol.  
 Adapté de Hraiky *et coll.* <sup>148</sup>.

La formation de boucles-R dépend non seulement de la topologie de l'ADN mais aussi de la structure du messager et des interactions existant entre cet ARN, la matrice et l'ARN pol transcrivante. La formation de boucles-R entre l'ADN négativement surenroulé et l'ARN qui y est attaché est thermodynamiquement favorable <sup>353</sup>. L'ARN pol transcriptionnellement active serait impliquée dans la prévention de la formation d'hétéroduplex ARN-ADN, puisqu'il y a formation de boucles-R lorsqu'on dénature la polymérase <sup>289</sup>. Toutefois, des études récentes suggèrent que ce serait plutôt la Topo I qui empêcherait la formation de boucles-R. Le rôle principal de la Topo I chez *E. coli* serait la suppression de la formation des boucles-R, durant l'étape d'élongation de la transcription <sup>26, 148</sup>. Chez des mutants portant une délétion *topA*, le défaut de croissance est partiellement corrigé par la surexpression de RNase H, une enzyme dégradant la portion ARN des boucles-R <sup>75</sup>. Ce problème de croissance est amplifié à basse température <sup>220</sup>, la formation de boucles-R étant alors favorisée <sup>221</sup>. De plus, une corrélation a pu être établie entre le niveau d'activité de la gyrase, l'enzyme surenroulant négativement l'ADN, et la quantité de RNase H requise pour stimuler la croissance de mutants dépourvus de Topo I <sup>75</sup> et pour inhiber la formation de boucles-R lors de la transcription <sup>219</sup>. Étant donné la présence, chez plusieurs mutants  $\Delta topA$ , de mutations *gyr* compensatoires, dans *gyrA* ou *gyrB*, réduisant l'activité de la gyrase et corrigeant leurs défauts de croissance <sup>61, 278</sup>, il a été déduit que l'activité de surenroulement de la gyrase favoriserait la formation de boucles-R <sup>75</sup>. Ainsi, les activités enzymatiques opposées de la Topo I et de la gyrase contrôleraient la formation de boucles-R inhibitrices pour la croissance <sup>74, 222, 268</sup>.

Lors de la transcription, ce serait le surenroulement local généré, plutôt que le surenroulement global, lequel reflète la densité superhéliçoïdale moyenne de tous les domaines de surenroulement, qui serait responsable de la formation de boucle-R et par conséquent lié à la fonction essentielle de la Topo I<sup>219, 220</sup>. L'ADN Topo I agirait comme facteur d'élongation transcriptionnel qui empêcherait la formation de barrières (*blocks*) transcriptionnelles boucle-R-dépendantes<sup>148</sup>. La Topo III jouerait un rôle similaire à celui de la Topo I dans la prévention de la formation de boucles-R pour Topo III<sup>26</sup>. Ces résultats soulignent un rôle régulateur potentiel pour le surenroulement de l'ADN au niveau de l'élongation transcriptionnelle.

De plus, le couplage entre la transcription et la traduction chez les procaryotes, grâce à la liaison des ribosomes sur les ARN naissants, serait un moyen efficace pour prévenir la formation de boucles-R<sup>219</sup>. Puisque les ARN ribosomiaux (ARNr) ne sont pas traduits, la formation de boucle-R ne peut pas être empêchée par ce mécanisme. En effet, lors de la transcription de l'opéron *rrnB*, codant pour des ARNr, la formation extensive de boucles-R en l'absence de Topo I a été observée, tant *in vitro* qu'*in vivo*<sup>222, 268</sup>.

#### 7.4. Le degré de surenroulement de l'ADN et la susceptibilité transcriptionnelle

La tension superhéliçoïdale négative favoriserait la séparation des brins nécessaire entre autres à l'initiation de la transcription (revues<sup>65, 207</sup>). Le surenroulement négatif de l'ADN influence fortement plusieurs interactions protéines-ADN, incluant celles des promoteurs avec l'ARN pol, et, par le fait même, les taux transcriptionnels<sup>20, 274</sup>. Certains promoteurs requièrent, pour être entièrement actifs, une tension superhéliçoïdale négative tandis que d'autres sont ainsi inhibés.

Pour expliquer l'implication du surenroulement de l'ADN dans la régulation de la transcription des gènes (revue<sup>357</sup>) et la sensibilité de certains promoteurs à la superhélécité de l'ADN, il a été proposé que le double-brin superenroulé puisse rapprocher les sites régulateurs agissant en *cis* du promoteur en vue de permettre l'activation ou la répression de la transcription<sup>64, 103, 338</sup>. Aussi, selon un modèle proposé par Wang et Syvanen<sup>358</sup>, le complexe transcriptionnel pourrait détecter la torsion (*Tw*), lequel est différent entre les promoteurs possédant une séquence d'intervalle de 16 pb et 18 pb entre les hexamères -10

et -35 par rapport à la majorité des promoteurs dont l'espacement est de 17 pb<sup>4, 8, 19</sup>. Chez les promoteurs dont la séquence d'intervalle est de 17 pb, les hexamères -10 et -35 sont situés du même côté de la double hélice d'ADN et l'ARN pol semble établir un contact spécifique avec chacun d'eux. Il a été suggéré que l'orientation relative de la région -10 par rapport à la région -35 soit importante et des données indirectes supporteraient cette notion<sup>8, 19</sup>. Une modification de la torsion ( $T_w$ ) de l'ADN modifie l'orientation relative des hexamères -10 et -35, ce qui par conséquent devrait influencer les interactions entre l'ARN pol et le promoteur. Les promoteurs dont l'intervalle entre les régions -10 et -35 est de 16 pb ou 18 pb, au lieu des 17 pb s'y trouvant normalement, seraient des promoteurs sensibles à la torsion ( $T_w$ )<sup>4, 358</sup>. De plus, la valeur de  $T_w$  de cet intervalle d'ADN est déterminée, en plus de l'être par sa longueur, par la composition de l'ADN environnant, soit des sites pour des éléments agissant en *trans*, ou des séquences particulières (ex. : région riche en A-T, séquences répétées inversées).

Dans le cas de promoteurs dont l'initiation de la transcription est contrôlée par la liaison de protéines régulatrices et/ou auxiliaires (FIS, IHF, H-NS, CRP, etc.), le surenroulement de la matrice d'ADN peut aussi influencer l'expression génétique par ses effets sur la liaison d'une protéine régulatrice ou auxiliaire à l'ADN, et par ses effets sur les interactions entre de telles protéines et l'ARN pol<sup>357</sup>. Lorsque des contacts entre deux protéines liées à l'ADN sont responsables de la formation d'une boucle d'ADN entre elles, l'intervalle qui existe entre ces protéines sur l'ADN et leur orientations angulaires relatives sont directement couplées à cause de la géométrie hélicoïdale de l'ADN<sup>143, 145</sup>. Le surenroulement affecte la torsion ( $T_w$ ) et la contorsion ( $W_r$ ) des segments d'ADN dans l'espace ainsi que la liaison des protéines impliquées avec l'ADN, ce qui rend par conséquent la formation d'une boucle dans l'ADN dépendante du niveau de surenroulement (revues<sup>144, 223, 357</sup>). Dans la variation de phase fimbriaire chez *pap*, le passage en état transcriptionnel actif (*ON*) requerrait la formation d'une boucle entre les promoteurs *papI<sub>p</sub>* et *papB<sub>Ap</sub>*, qui serait médiée par l'action coopérative de plusieurs protéines régulatrices<sup>345</sup>.

#### 7.4.1. Certains promoteurs sensibles au surenroulement de l'ADN

Il existe une grande variété dans les réponses des promoteurs bactériens aux changements du degré du surenroulement de l'ADN. Certains promoteurs sont stimulés par l'augmentation du surenroulement, comme le sont *topAps*<sup>340</sup> et *lacZp*<sup>19, 20, 299</sup>, d'autres préfèrent l'ADN relaxé, comme ceux de *gyrAp*, *gyrBp*<sup>232</sup> et *tonBp*<sup>66</sup>, tandis que d'autres sont indifférents aux fluctuations du surenroulement, du moins dans l'étendue possible des variations du surenroulement existant *in vivo*, comme c'est le cas pour le promoteur *trpp*<sup>299</sup>. Parfois, dans le cas du promoteur *leu-500p*, la sensibilité aux niveaux du surenroulement de l'ADN ne s'exprime que sur le chromosome mais pas sur un plasmide<sup>290</sup>. Alternativement, la sensibilité d'un promoteur peut ne s'exprimer que sur un plasmide, mais non dans son contexte chromosomique naturel, comme par exemple pour le promoteur du gène *tyrT* de *E. coli*<sup>186</sup>. Enfin, d'autres promoteurs sont sensibles à l'état du surenroulement de l'ADN, peu importe qu'ils soient situés dans leur contexte natif ou qu'ils soient présents sur des vecteurs de clonage, le promoteur *tonBp* de *S. typhimurium* en étant un exemple<sup>66</sup>.

Il existe, *in vivo*, une corrélation entre le surenroulement de l'ADN et sa susceptibilité à la transcription. Chez *E. coli*, l'activité transcriptionnelle du plasmide pMT, mesurée en fonction de la densité superhélicoïdale, est réduite suite au traitement à la coumermycine ou à l'acide oxonolique, lesquelles substances réduisent à divers degrés le niveau de surenroulement plasmidique<sup>167</sup>. L'expression de l'opéron *nrd*, qui est impliqué dans la réplication de l'ADN, est également sujette à la régulation par le niveau du surenroulement de l'ADN<sup>324</sup>.

*In vitro*, l'augmentation du surenroulement négatif réprime la transcription à partir du promoteur du gène de résistance à la tétracycline *tetA* de pBR322<sup>147</sup>. Aussi, *in vitro*, le taux de formation du complexe ouvert au promoteur *lacp*<sup>s</sup> est influencé par le surenroulement négatif et, selon le degré de surenroulement de la matrice, la transcription augmentant très vite puis étant ensuite rapidement inhibée<sup>20</sup>. En raison de l'amplitude de la réponse de l'activité transcriptionnelle, tant à la hausse qu'à la baisse, ceci suggère que des différences mineures de la superhélicité puisse, *in vivo*, modifier fortement, à la baisse ou à la hausse, le taux transcriptionnel. Ainsi, l'énergie libre de surenroulement pourrait servir tant à

l'accroissement de la dissociation des brins d'ADN que pour les changements dans la structure d'ADN modifiant la face de l'hélice avec laquelle l'ARN polymérase doit interagir<sup>20</sup>.

#### 7.4.1.1. Le cas du promoteur *leu-500p*

Chez *Salmonella typhimurium*, la mutation *leu-500*, une mutation de transition AT→GC de la région -10 du promoteur *leu*<sup>106</sup> dans l'opéron biosynthétique de la leucine, confère l'auxotrophie pour la leucine par une diminution du taux de transcription de l'opéron *leuABCD*. Une mutation suppressive de *leu-500p*<sup>240</sup>, soit *supX*<sup>77</sup>, qui permet de hausser la transcription de l'opéron dans un environnement génétique *leu-500*, a été identifiée dans *topA*, le gène structural de la Topo I<sup>215, 277, 290, 320</sup>. La hausse du surenroulement négatif au-delà des niveaux normaux, un résultat typique des mutations *topA*, permet l'activation de *leu-500p*<sup>291</sup>, possiblement en couplant l'énergie libre additionnelle du surenroulement négatif à l'ouverture de la région -10 qui est plus réfractaire chez le promoteur mutant<sup>277, 309</sup>.

L'interdépendance entre des unités transcriptionnelles adjacentes a été étudiée dans le cas de l'activation de *leu-500p* chez des mutants *topA*<sup>33-35, 193, 236, 327, 369</sup>. La transcription de séquences adjacentes résulte en la production de supertours négatifs, lesquels sont moins efficacement relaxés chez les cellules *topA*, auxquels *leu-500p* est sensible. La suppression du promoteur déficient *leu-500p* chez une souche *topA* n'est possible que lorsque *leu-500p* est localisé sur le chromosome<sup>240</sup>, et non sur un plasmide<sup>290</sup>. Ceci suggère que ce sont les changements du surenroulement au niveau local plutôt que global qui sont responsables de l'activation de *leu-500p*. Toutefois, l'activation de *leu-500p*, lorsqu'il est situé sur un plasmide, dépend complètement de la transcription adjacente<sup>34, 35, 236, 315, 327, 369</sup>, indépendamment qu'elle ait lieu en amont ou en aval<sup>35, 327</sup>. Le promoteur est entre autres actif lorsque placé à proximité du déterminant pour la résistance à la tétracycline *tetA*, lequel gène code pour une protéine d'ancrage à la membrane, ou encore lorsque situé dans la région entre deux promoteurs orientés de façon divergente<sup>34, 35</sup>. Auparavant, la synthèse et l'insertion membranaire de la protéine TetA semblaient importantes pour l'activation du promoteur divergent *leu-500p*, l'ancrage de TetA à la membrane prévenant la dissipation, par diffusion superhélicoïdale, du surenroulement induit par la transcription<sup>35, 36</sup>. Ceci était

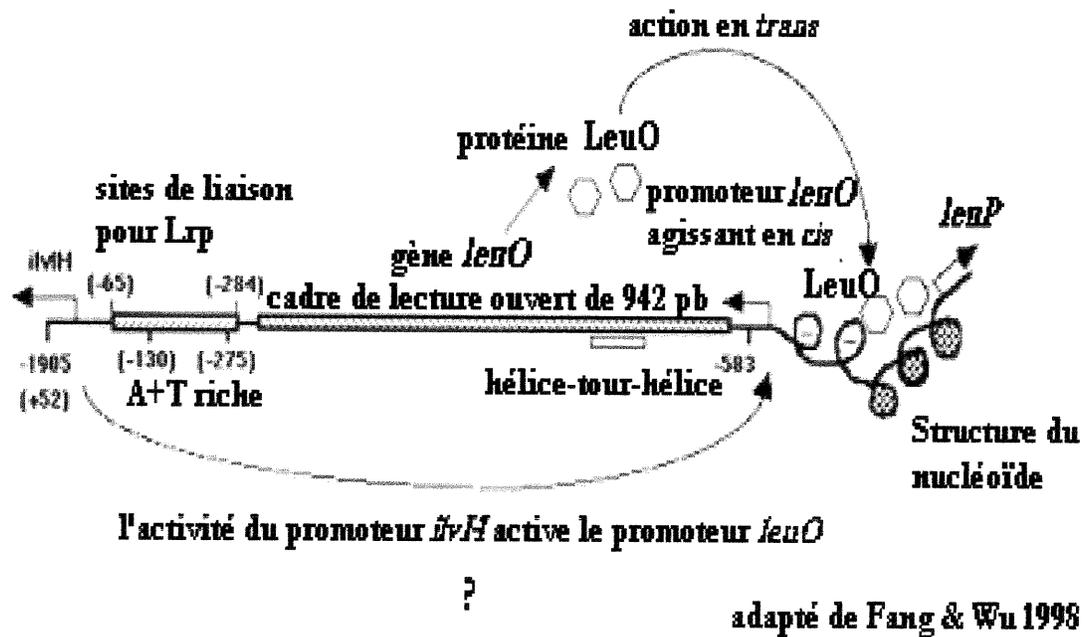
en accord avec l'observation que l'effet principal de l'expression de *tetA* sur le surenroulement plasmidique, hypernégativement surenroulé chez un mutant de délétion *topA*, requiert la traduction du messenger *tetA* et l'insertion du polypeptide naissant dans la membrane<sup>201, 208, 209, 307</sup>. Certains auteurs ont par contre noté que l'ancrage de la protéine TetA à la membrane n'est pas requise pour qu'ait lieu l'activation de *leu-500p*<sup>315, 327</sup>. Seul le couplage de la transcription et de la traduction semble requis pour cette activation<sup>327</sup>. La transcription du gène *tetA* serait la source majeure de surenroulement négatif qui active *leu-500p*, ceci étant médié par la topologie globale du plasmide<sup>33</sup>.

Les études basées sur des plasmides ont pour limitation intrinsèque que la forme circulaire de la molécule plasmidique permet la diffusion, tout autour de l'ADN plasmidique, des supertours négatifs générés par la transcription de n'importe quel gène et que ceci annihile les supertours positifs formés en aval de ce gène. Ceci peut créer des situations aberrantes où le promoteur *leu-500p* peut être activé par la transcription adjacente de gènes même situés en aval de la trajectoire transcriptionnelle, soit dans la région considérée comme étant plus positivement (ou moins négativement) surenroulée<sup>33</sup>. Ceci souligne l'importance des études concernant la suppression de *leu-500p* sur le chromosome.

L'effet du surenroulement généré par la transcription sur l'activation de *leu-500p* est généralement limité sur une courte distance, soit de moins de 250 pb<sup>34, 35, 327</sup>. L'effet du surenroulement sur courte distance peut s'étendre jusqu'à 400 pb lorsqu'un promoteur plus fort, soit *tacp*, est utilisé pour initier le surenroulement généré transcriptionnellement (travaux non publiés par M. Fang et H.-Y. Wu, cité dans<sup>90</sup>). Des effets d'interaction de longue distance sur *leu-500p* ont aussi été observés<sup>315, 369</sup>. Contrairement aux effets sur courte distance, les effets sur longue distance semblent être médiés par des déterminants de séquence d'ADN situés dans la région entre ces promoteurs<sup>369</sup>. L'expression d'une unité transcriptionnelle située à 3000 pb en aval de *leu-500p* a permis son activation sur un plasmide<sup>315</sup>. Aussi la transcription divergente à partir du promoteur *ilvIHp*, situé à 1,9 kb en amont de *leu-500p*, est majoritairement responsable de la création des supertours négatifs qui activent *leu-500p*<sup>89, 369</sup>.

Plus précisément, lorsque, sur des plasmides, on retrouve en 5' les séquences adjacentes normalement retrouvées près de *leu-500p*, l'activation *topA*-dépendante de ce promoteur requiert le fonctionnement concomitant de deux promoteurs agissant en synergie, soit les promoteurs *ilvIHp* et *leuOp*, lesquels éléments, tous deux orientés en direction opposée à celle de la transcription de l'opéron *leu*, sont respectivement situés à 1,9 kb en amont et à environ 400 pb de celui-ci<sup>89, 369</sup>. Cette interaction à distance (1,9 kb) entre *ilvIHp* et *leu-500p* est médiée par un mécanisme de relai de promoteurs où l'activité transcriptionnelle de *ilvIHp* active *leuOp* qui est situé à l'intérieur de cette région de 1,9 kb *500p*<sup>89</sup>. De plus, tant l'activité en *cis* de *leuOp* que la protéine régulatrice LeuO agissant en *trans* sont nécessaires pour l'activation subséquente de *leu-500p*<sup>89</sup>. Le remplacement de *ilvIHp* par l'inductible *lacp* a permis de déterminer que c'est l'activité du promoteur et non sa spécificité qui est importante dans l'activation de *leu-500p*<sup>369</sup>. Aussi, dans l'activation de *leu-500p*, *leuOp* peut fonctionnellement être substitué par l'inductible *tacp*<sup>89</sup>. Ceci suggère que le surenroulement de l'ADN généré par la transcription est impliqué dans ce mécanisme de relai.

Les études citées ci-haut ont été réalisées chez des mutants *topA*<sup>-</sup>. Il a récemment été démontré que la suppression de la mutation *leu-500* est également possible chez des souches *topA*<sup>+</sup> de *S. typhimurium*<sup>90</sup>. En effet, le relai de promoteurs initié par l'activité transcriptionnelle de *ilvIH* peut résulter en l'activation de *leu-500p* chez des souches *topA*<sup>+</sup>. De plus, la suppression de la mutation chromosomique *leu-500* est corrélée avec les activités transcriptionnelles de *ilvIH* et *leuO* plutôt qu'aux niveaux de TopA chez la souche *topA*<sup>+</sup>. Il semblerait que la suppression de *leu-500* chez une souche *topA*<sup>-</sup> serait attribuable à l'activité transcriptionnelle constante de *ilvIH*<sup>90</sup>. L'activation de *leu-500p* étant abolie par une mutation soit dans *ilvIHp* ou *leuOp* chez une souche *topA*<sup>-</sup><sup>89, 369</sup>, ceci suggère que l'absence de TopA (l'environnement génétique *topA*<sup>-</sup>) est à elle-seule insuffisante pour l'activation de *leu-500p*. En fait, l'absence de TopA accroît par deux fois l'activation de *leu-500p* médiée par le relai de promoteurs. Ainsi, le mécanisme de relai de promoteur initiée par l'activité transcriptionnelle de *ilvIH* joue un rôle décisif alors que TopA joue un rôle régulateur négatif dans l'activation de *leu-500p*<sup>90</sup>. Puisque ce mécanisme de relai de promoteur est très efficace, même si TopA le régule négativement, il n'abolit pas efficacement le signal de surenroulement qui pourrait être contraint par les facteurs protéiques et les éléments d'ADN durant le processus de relai.



**Figure 21.** Mécanisme de relai de promoteur pour l'activation séquentielle d'un gène à distance.  
Adapté de Fang et Wu (1998)<sup>89</sup>.

L'activation de *leu-500p*, sur le chromosome, a aussi été analysée chez des mutants *topA* portant des cassettes *tet* ou *cat* transcriptionnellement inductibles insérées dans la région en amont du promoteur. En l'absence d'inducteur, certaines insertions ont inhibé l'activation de *leu-500p*. Cet effet étant dramatique dans l'intervalle entre 1,7 kb et 0,6 kb à partir de l'opéron *leu*, ceci suggère que les insertions interfèrent physiquement avec le mécanisme responsable de l'activation. De plus, selon que le gène inséré était orienté de façon divergente à l'opéron *leu* ou dans la même direction, la transcription de ce gène stimulait ou inhibait, respectivement, l'activité de *leu-500p*. Même avec des inserts éloignés de l'opéron *leu* de 5,3 kb, l'inhibition (*silencing*) de *leu-500p* médiée par la transcription a été observée, laquelle inhibition a pu être relevée par l'introduction d'un site fort pour la gyrase entre l'élément inséré et le promoteur *leu-500p*. Ce *silencing* proviendrait de l'annulation, par les supertours positifs générés transcriptionnellement, de la hausse du surenroulement négatif *topA*-dépendante dans la région *leu*. Une stimulation du promoteur a quant à elle été détectée dans une étendue de 2 kb à partir du promoteur. Ces résultats sont en accord avec l'idée que les supertours positifs et négatifs générés par la transcription puissent diffuser le long de l'ADN du chromosome et, selon leur signe topologique, engendrer des réponses opposées de la part de *leu-500p*<sup>80</sup>.

#### 7.4.2. Les promoteurs divergents

Lorsque la transcription à partir d'un promoteur affecte celle d'un autre (couplage transcriptionnel), l'inhibition de la transcription divergente à partir de l'un des promoteurs devrait influencer l'activité de chacun d'eux <sup>286</sup>. Généralement, les promoteurs ayant de hauts optima de densité superhéliçoïdale sont faibles et la formation du complexe ouvert à ces promoteurs requiert de hauts niveaux d'énergie d'activation. Le surenroulement local d'ADN généré à partir de la transcription divergente pourrait fournir cette énergie en supplémentant la densité superhéliçoïdale globale dans le voisinage de ces promoteurs <sup>286</sup>.

Selon le modèle des domaines jumeaux <sup>196</sup>, la densité superhéliçoïdale locale dans la région de promoteurs divergents entre des ARN pol transcriptionnellement actives devrait s'accroître à un niveau supérieur à celui de la densité superhéliçoïdale globale du chromosome. Cette densité superhéliçoïdale localement plus élevée devrait être corrélée avec la fréquence de l'initiation transcriptionnelle à partir des promoteurs divergents ainsi qu'avec le niveau de surenroulement négatif causé par cette transcription. Ainsi, si l'initiation transcriptionnelle à partir de l'un ou des deux promoteurs est sensible à l'état du surenroulement de la matrice d'ADN, l'activité du promoteur devrait être déterminée par la somme du surenroulement global et de celui généré transcriptionnellement dans la région des promoteurs divergents. Le couplage transcriptionnel entre des promoteurs divergents réfère à cette interaction dépendante du surenroulement de l'ADN. Une condition au modèle des domaines jumeaux est que la rotation de l'hélice d'ADN soit entravée de façon telle à ce que le surenroulement ne puisse pas diffuser librement le long de la matrice d'ADN. Une des barrières à cette diffusion pourrait être une paire d'ARN pol transcrivant de façon divergente <sup>196</sup>. Toutefois, même en l'absence de transcription divergente, la modélisation mathématique prédit que les courbures naturelles dans l'ADN suffisent à empêcher la rotation libre de l'hélice d'ADN et facilitent l'accumulation locale de stress torsionnel <sup>243</sup>.

Tant *in vivo* qu'*in vitro*, les promoteurs divergents *ilvYp* et *ilvCp* de l'opéron *ilvYC* chez de *E. coli* sont sensibles au niveau du surenroulement de l'ADN et leur activité est transcriptionnellement couplée<sup>257, 258, 286</sup>. *In vivo*, une mutation diminuant l'activité du promoteur *ilvYp* a causé une forte baisse de la transcription à partir du promoteur *ilvCp* alors qu'une mutation diminuant l'activité de *ilvCp* n'a que très peu affecté la transcription à partir de *ilvYp*<sup>286</sup>. Ainsi, la perte de la transcription à partir du relativement faible *ilvCp* et la diminution du niveau de surenroulement négatif qu'elle a causé dans la région du promoteur *ilvYp* n'a eu que peu d'effet sur l'expression de *ilvY*. *In vitro*, la transcription à partir du promoteur *ilvCp*, qui est intrinsèquement sensible au niveau du surenroulement, a augmenté au delà de la gamme entière des densités superhéliçoïdales physiologiques. Toutefois, *ilvYp* est intrinsèquement moins sensible au niveau du surenroulement et l'initiation de la transcription à partir de ce promoteur démontre une activité optimale étendue lorsque la densité superhéliçoïdale est miphysiologique. Ce couplage transcriptionnel est dépendant du surenroulement de l'ADN puisque une baisse du niveau de surenroulement global cause une hausse de l'activité du promoteur *ilvYp* et une baisse de celle de *ilvCp*<sup>286</sup>.

*In vitro*, en l'absence de surenroulement local généré par la transcription divergente à partir de *ilvCp*, un plus haut niveau de surenroulement global de l'ADN est requis pour une transcription maximale à partir de *ilvYp*<sup>257</sup>. Inversement, une hausse de la transcription à partir de *ilvCp* fait qu'un niveau moindre de surenroulement global est nécessaire à une transcription maximale à partir de *ilvYp*. Aussi, *in vitro*, lorsque le surenroulement local généré par la transcription divergente à partir de *ilvYp* est moindre, un degré plus élevé de surenroulement négatif global de l'ADN est requis pour une transcription maximale à partir de *ilvCp*. *In vitro*, ce couplage transcriptionnel existe en l'absence d'ancrage des transcrits, l'importance du surenroulement négatif généré dans la région située entre les promoteurs divergents est proportionnelle au total du surenroulement global et transcriptionnellement induit, et enfin, l'importance du surenroulement généré par la transcription est proportionnelle à la force des promoteurs ainsi qu'à la longueur des transcrits<sup>257</sup>. La contradiction entre les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* quant à la sensibilité du promoteur *ilvYp* à la transcription divergente à partir de *ilvCp* pourrait s'expliquer par le fait que le taux de transcription basale de *ilvCp* est environ 40 fois plus faible que celui de *ilvYp*<sup>287</sup>.

Chez *Helicobacter pylori*, le gène *topA*, codant pour la Topo I, est situé à environ 170 nucléotides en amont du gène *flaB*, codant pour une des protéines requises pour la virulence, ces deux gènes étant transcrits de façon divergente, leur relation spatiale et orientation étant très conservées chez les souches de cette bactéries chez laquelle les réarrangements génomiques sont fréquents <sup>323</sup>. Chez *S. flexneri*, l'induction de la transcription divergente (condition artificielle), en créant un domaine de surenroulement négatif local, abolit la thermorégulation de transcription du gène *virB* qui est normalement réprimée à 30° C <sup>336</sup>. Les gènes adjacents transcrits de façon divergente sont aussi retrouvés chez les eucaryotes. Chez le maïs, deux gènes chloroplastiques ont, *in vitro*, différents profils densité de superhélicité/activation transcriptionnelle, la transcription maximale à partir des deux promoteurs se produisant à des densités de surenroulement négatif distinctes et la transcription des deux gènes étant stimulée à des taux différents <sup>321</sup>. Ceci suggère que la modification conformationnelle de l'ADN constitue un mécanisme possible pour la régulation différentielle des gènes.

#### 7.4.3. Le surenroulement de l'ADN et l'expression des gènes de virulence

Chez *E. coli*, l'expression de l'hémolysine (*hly*), qui régulée au niveau transcriptionnel, est accrue par des mutations de la gyrase, par des inhibiteurs de la gyrase, tel la novobiocine, ainsi que par des conditions de croissance réduisant le niveau de surenroulement négatif, comme un milieu de faible osmolarité <sup>30</sup>. Aussi, l'expression de *fim*, codant pour le fimbriae de type 1 de *E. coli*, est influencée par le degré du surenroulement de l'ADN <sup>70</sup>. En l'absence de la Topo I, la variation de phase de *fim*, qui requiert la recombinaison site-spécifique, est affectée, une forte baisse des taux d'inversion ayant été notée, tant de *ON*→*OFF* que de *OFF*→*ON*.

Chez *Bordetella pertussis*, les promoteurs d'un locus de régulation de la virulence et de plusieurs facteurs de virulence sont sensibles à la topologie de l'ADN, tel que démontré suite à l'inhibition de la gyrase par certaines substances où une baisse de l'expression transcriptionnelle a été observée chez la plupart de ces gènes, sauf pour un impliqué dans l'adhésion bactérienne aux cellules eucaryotes qui a ainsi été induit <sup>114</sup>.

La topologie de l'ADN et la structure de la chromatine bactérienne, chez *Y. enterocolitica*, joueraient un rôle dans la thermorégulation des fonctions de virulence dont entre autres celle du régulon de virulence *yop* ainsi que celle d'une adhésine<sup>43, 44</sup>. La température a un effet pléiotropique sur l'expression génétique et promouvoit phénotypiquement entre autres la synthèse de gènes impliqués dans l'invasion des cellules eucaryotes<sup>294</sup>. L'expression des gènes de virulence étant induite en présence de concentrations sous-inhibitrices de novobiocine (un inhibiteur de la gyrase) à la température permissive de 25° C, ceci suggère que l'addition de novobiocine simulerait, du moins partiellement, un environnement de haute température<sup>294</sup>. Aussi, les altérations de la topologie de l'ADN coïncidaient avec les changements phénotypiques induits par la température. De plus, un des mutants de la gyrase résistant à la novobiocine exprimait à 25° C un phénotype normalement retrouvé à 37° C. Tout ceci supporte un modèle où la conformation de l'ADN est un facteur contribuant à la thermorégulation chez *Y. enterocolitica*<sup>294</sup>.

De même, chez *S. flexneri*, l'expression des gènes de virulence est influencée par de facteurs qui provoquent une altération du niveau du surenroulement de l'ADN<sup>69, 230, 249</sup>. Plus précisément, la transcription du gène *virB*, un régulateur de la transcription de gènes d'invasion, est activée par VirF (codé par le même plasmide) et ce, d'une façon dépendante de la conformation de l'ADN<sup>69, 336</sup>. Tant *in vivo* qu'*in vitro*, le promoteur *virBp* est sensible aux modulations du degré du surenroulement de l'ADN<sup>336</sup>. La superhélicité négative, qui est impliquée dans la thermorégulation de la transcription de *virB*, s'exerce par la réduction du surenroulement négatif autour de la région promotrice de *virB* à 30° C, ce qui réprime alors la transcription de ce gène<sup>336</sup>. La transcription à partir du promoteur *virB* est aussi activée par l'induction de la transcription divergente (condition artificielle), laquelle crée un domaine de surenroulement négatif local, et ce, même à 30° C<sup>336</sup>. Des mutations dans le gène *virR* altèrent la thermorégulation de l'expression des gènes impliqués dans l'invasion<sup>69, 226</sup>. Chez *S. typhimurium*, des mutations dans le gène *topA* affectent l'expression des gènes impliqués dans de l'invasion<sup>103</sup> et des mutations dans *osmZ* (*hns*) atténuent la virulence du microorganisme *in vivo*<sup>68, 132</sup>. Aussi, l'expression des gènes de virulence *acfA* et *acfD* chez *Vibrio cholerae*, qui sont transcrits de façon divergente, est influencée par le surenroulement de l'ADN<sup>265</sup>.

## Problématique

Puisque l'initiation de la transcription à partir de plusieurs promoteurs bactériens est influencée par le niveau du surenroulement négatif de l'ADN<sup>19, 20, 66, 186, 232, 290, 299, 340</sup>, la variation du degré du surenroulement de l'ADN pourrait constituer un mécanisme régulateur de l'expression des gènes de virulence chez les organismes pathogènes<sup>64, 68</sup>. Lors du processus d'invasion d'un hôte, les bactéries détectent plusieurs stimuli environnementaux (température, osmolarité, pH, tension d'oxygène, etc.) qui, en altérant entre autres le degré du surenroulement de l'ADN, constituent des signaux pour l'activation de leurs fonctions de virulence<sup>207, 224, 231, 234</sup>.

L'expression du facteur de virulence fimbriaire F165<sub>1</sub> (type P), codé par l'opéron *foo* et retrouvé entre autres chez les souches pathogènes porcines *E. coli* 4787 et 5131, est influencée par les conditions environnementales<sup>48</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>). Le fimbriae F165<sub>1</sub> possède plusieurs similitudes avec Pap et Prs, et l'organisation génétique de *foo* ainsi que la régulation de son expression ressemblent à *pap*<sup>48</sup> (Annexes I et II, p.xix et xxxiii,<sup>50, 125</sup>). Lors d'études précédentes réalisées en multicopie sur plasmide, il a aussi été observé que l'expression de *foo* est influencée par le degré du surenroulement de l'ADN ainsi qu'aux conditions environnementales<sup>48</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>). Plus précisément, l'activité transcriptionnelle à partir du promoteur *fooBp* est affectée par l'expression de *tetA* chez un mutant *topA*, ce qui révèle un effet du surenroulement local sur l'activité de *fooBp*. L'expression à partir de *fooBp* est également sensible aux modifications du niveau global du surenroulement<sup>48</sup> (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>).

Puisque selon le contexte plasmidique ou chromosomique, la réponse d'un promoteur au surenroulement de l'ADN peut varier<sup>66, 186, 290</sup>, il s'avère crucial d'étudier la réponse de la région régulatrice *foo* aux fluctuations du degré du surenroulement chromosomique. Cette étude sera réalisée en simple copie chromosomique à l'aide d'une fusion transcriptionnelle entre la région régulatrice *foo* et le gène rapporteur *lacZ*, ce dernier étant sous le contrôle du promoteur *fooBp*. La réponse de *foo* au surenroulement de l'ADN, tant au niveau local que global, sera évaluée grâce aux souches isogéniques *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup>

(sauvage), *topA*<sup>+</sup> *gyrB225*, et  $\Delta$ *topA gyrB225*. Le taux de transcription basale à partir du promoteur *fooBp*, la variation de phase (Annexe II, p.xxxiii<sup>125</sup>) et l'état de méthylation des sites GATC de la région intercistronique permettront de connaître l'influence du surenroulement de l'ADN sur la régulation de l'expression du fimbriae F165<sub>1</sub>.

Un couplage transcriptionnel peut exister entre des promoteurs orientés de façon divergente grâce au surenroulement généré localement par la transcription<sup>81, 183, 193, 196, 257, 258, 286, 355</sup>. Puisque les gènes *fool* et *fooB* sont transcrits en directions opposées, le couplage transcriptionnel entre ces promoteurs divergents sera également étudié. Plus précisément, puisque *fooBp* contrôlerait l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse du fimbriae F165<sub>1</sub>, on se penchera sur l'impact de la transcription divergente de *fool* sur l'activité du promoteur *fooBp*. Pour ce faire, on abolira la transcription à partir du promoteur divergent *foolp*: seul *foolp* sera présent pour ne pas empêcher la liaison de l'ARN pol à ce promoteur et le gène fimbriaire *fool* sera absent en *cis*.

Puisque F165<sub>1</sub> est très similaire à Pap et que la régulation de Pap requiert la participation de la protéine régulatrice fimbriaire PapI pour le passage en phase ON<sup>166</sup>, Fool, un homologue de PapI (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>), sera fourni en *trans* sur un plasmide à nombre moyen de copies. Ainsi, parallèlement, le rôle de Fool sur l'activité transcriptionnelle à *fooBp* pourra être analysé.

Par la suite, on s'attardera à la stimulation de l'activité de *fooBp* par la transcription divergente de *tetA*, et ce, en relation avec le degré du surenroulement de l'ADN chromosomique. On analysera également l'impact de la substitution du promoteur divergent sauvage *foolp* par le promoteur plus fort *trcp* sur l'activité transcriptionnelle à partir de *fooBp*.

Ensuite, le gène *tetA* sera placé sous le contrôle de *trcp*, cette construction artificielle étant orientée en direction opposée à celle de *fooBp*. Ainsi, la réponse de *fooBp* au surenroulement négatif local généré par la transcription divergente à partir du promoteur fort sera évaluée. Finalement, on étudiera l'influence de la transcription divergente de *tetA* sur l'activation de *fooBp* en présence du régulateur fimbriaire Fool.

**SECTION II-Articles**

**Article 1**

***Escherichia coli* 4787 *foo* Operon Responsiveness to DNA Supercoiling Level: Basal Transcription, Phase Variation, DNA Methylation Pattern, and *FooI* Activator Role.**

**Running title:** Regulation of *E. coli* F165 fimbriae

**Key words:** *E. coli*, fimbriae, regulation, septicaemia, DNA supercoiling

**Subject category:**

**Marie-Catherine Tessier<sup>1</sup>, Marc Drolet<sup>2</sup>, Christine Martin<sup>3</sup>, Josée Harel<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Département de pathologie et microbiologie, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

<sup>2</sup>Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

<sup>3</sup>Laboratoire de microbiologie, INRA Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Author for correspondence: Josée Harel. Tel: +1 450 773 8521 ext. 8233

Fax: +1 450 778 8108

E-mail: [josee.harel@umontreal.ca](mailto:josee.harel@umontreal.ca)

**Abstract**

The responsiveness of *foo* (*prs*-like) fimbrial operon to DNA supercoiling level on the chromosome was studied using *lacZ* transcriptional fusions with the *fooIB* regulatory region and a set of isogenic strains carrying *topA* and/or *gyrB* mutations. It was found that a reduction of the global supercoiling level due to the *gyrB225* mutation, decreases *fooB* promoter activity. A deletion of the *topA* gene in this strain further reduced *fooB* promoter activity, without however altering the global supercoiling level, suggesting a local supercoiling effect. This supercoiling effect appears to be mediated at least in part by divergent transcription from the *fooI* promoter, since its deletion increased *fooB* promoter activity in  $\Delta topA$  mutant. Phase variation was also studied using this system and was found to respond in a similar way to DNA supercoiling. Indeed, an increase in the  $\beta$  (ON to OFF) switch frequency was noted for the *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strain and was even higher for the  $\Delta topA$  *gyrB225* strain. Interestingly, an increase in the methylation of the GATC-I site that overlaps with a putative Lrp binding site within the *fooIB* regulatory region, was observed in the  $\Delta topA$  strain, suggesting that local alterations in DNA topology affects Lrp-DNA interactions and GATC-I site protection from methylation by Dam. Further supporting the conclusion that local DNA supercoiling fluctuations can disrupt regulation of *fooB* expression is the fact that *fooB* promoter was insensitive to FooI protein in the absence of DNA topoisomerase I. Altogether, these results demonstrate that DNA supercoiling is an important determinant of *foo* fimbrial operon expression.

**Key words:** *Escherichia coli* / fimbriae/ phase variation/ regulation/ septicaemia/ DNA supercoiling.

## Introduction

*E. coli* 4787 (O115:K<sup>-</sup> V165<sup>-</sup>:H51:F165) pathogenic strain causes septicemia in pigs. It shares many characteristics with other uropathogenic strains like mannose resistant hemagglutination (MRHA), serum resistance, aerobactin and ColV production<sup>21</sup> but it is however non-haemolytic and it does not produce cytotoxic necrotizing factors<sup>17</sup>. This strain expresses F165<sub>1</sub> (Prs-like; 18,5 kDa) fimbrial antigen encoded by *foo* operon<sup>30</sup>. F165<sub>1</sub> fimbriae is related to F11 (P-like) and bears a class III G-adhesin similar to Prs (F13, P-like) with slightly different binding capacities<sup>22, 30</sup>. F165 is a complex of fimbriae produced by *E. coli* isolates associated with septicemia in piglets, calves<sup>10, 17, 20</sup> and humans<sup>9</sup> which could play a role in the process of pathogenesis.

As with many other virulence determinants, fimbriae are not expressed constitutively and are subjected to a phase variation mechanism, defined as the ability to switch between ON (fimbriae-positive) and OFF (fimbriae-negative) states<sup>41</sup>. Following the example of Pap, F165<sub>1</sub> fimbrial expression is transcriptionally controlled by two mechanisms that determine the level of fimbrial antigens at the surface of a single cell (basal transcription) and the percentage of bacteria from a colony expressing fimbriae (phase variation). These two types of regulation are superimposed and they are governed by many *trans*-regulators. Like other P fimbriae, F165<sub>1</sub> is under a phase variation control and its expression, which is not constitutive, is modulated by the environment (nutrients, osmolarity, temperature), global regulators (catabolite responsive protein (CRP), leucine responsive protein (Lrp), and deoxyadenosine methylase (Dam))<sup>6, 28, 33</sup>.

The *foo* regulatory region has several features in common with other members of the P regulatory family, including *papI* and *papB* homologues that are divergently transcribed, respectively named *fooI* and *fooB*, two GATC sites separated by 102 bp, that are targets for differential Dam methylation, and putative CRP, FooB (a PapB homologue) and Lrp binding sites<sup>12, 19</sup>. The presence of regulatory sites for global regulators, together with the fact that *fooI* and *fooB* are divergently transcribed, may suggest an important role for DNA topology in the regulation of *fooB* expression. Indeed, our previous results have revealed that this might be the case<sup>11</sup>.

In the present work, we sought to study in detail the effect of DNA topology on *fooB* expression. To this end, we used a set of isogenic strains with altered topoisomerase functions that allowed us to study the effects of global and local (transcription-induced supercoiling<sup>27</sup>) supercoiling on *fooB* expression. Our results show that *fooB* expression is easily perturbed by both global and local supercoiling fluctuations, which suggest that DNA topology is an important determinant for the regulation of *fooB* expression.

## Material and Methods

### Culture media

Luria-Bertani (LB) and M9 broth and agar were prepared as described previously by Miller<sup>32</sup>. M9 minimal media was supplemented with: D-glucose and glycerol at 0,2% each or 0,4% glycerol as carbon sources; 40 µg/mL of amino acids cysteine (Cys), L-arginine (Arg), L-hydroxyproline (Pro), L-glycine (Gly), L-isoleucine (Ile) and L-valine (Val); 20 µg/mL uracil (Ura); 0,0005% thiamine hydrochloride (B1) (Thi). Ura was provided because of a pyrimidine starvation due low *pyrE* expression levels caused by an *rph* frameshift mutation in a *E. coli* K12 strain W3110, of which DM800 is a derivative<sup>24,39</sup>. For MC4100<sup>7</sup>, TOP10 (Invitrogen) and Mew 60 (*dam::Tn5*)<sup>12</sup> derivative strains, when required, antibiotics were added, at these final concentrations: 10 µg/mL tetracycline (Tet); 50 µg/mL kanamycin (Km); 50 µg/mL ampicillin (Amp); and 50 µg/mL chloramphenicol (Cm). Since DM800 derivative strains carry the *acrA13* mutation that renders these strains more permeable to many antibiotics<sup>13</sup>, the following antibiotics were used at these final concentrations: 3,33 µg/mL Tet; 16,67 µg/mL Km; and 15 µg/mL Cm. When necessary 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) was added at 40 µg/mL final concentration to the culture media.

### Plasmid fusions

The *fooIB-lacZYA* fusion comprises the whole *foo* regulatory region of *E. coli* 4787 strain (GenBank: L07420), including *fooI* and *fooB* genes, divergently transcribed, and the whole intercistronic region. Using *Taq* polymerase (Life Technologies Inc.) PCR reactions with primers including *Bam*HI or *Bgl*III sites were done to amplify *fooIB* and *fooIp-fooBpB*. The restriction sites added for cloning are indicated in bold characters in the sequences of primers described in this section. The 1038 pb *fooIB* PCR fragment (the whole regulatory region, containing *fooIp-fooI-fooBpB*) was obtained with *Bam*HI For (5'-**GGA TCC TTT TAT CTG TTT CAG T**-3') and *Bgl*<sub>I</sub>Rev (5'-**AGA TCT AAG GGC TTC TTT TTT T**-3') primers. In order to investigate the role of *fooI* divergent transcription on *fooBp* expression, a *fooIpB-lacZYA* fusion was made. In this fusion, transcription elongation from *fooIp* and thus the expression of *fooI* were abolished. The 787 bp *fooIp-fooBpB* (the regulatory region deleted of *fooI*) PCR fragment was obtained with *FooliniFor* (5'-**GGA TCC GTA TTC**

ACT CAT CTC ACT G-3') and *Bgl*<sub>I</sub>Rev primers. This fusion is similar to *fooIB-lacZYA* except that the *fooIp* promoter is followed by a few codons and by 4 tandem T<sub>1</sub> ribosomal transcription terminator sequence, provided by pRS551<sup>38</sup>. In both fusions, the *lacZ* reporter gene is under the control of *fooBp* promoter (Figure 1).

The PCR products were cloned into pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO (Invitrogen) and pGEM<sup>®</sup>-T vectors (Promega). These plasmids have cohesive T-ends that allow an easy cloning of A-end-tailed PCR fragments. The clones were verified by Sanger sequencing. The *fooIB* and *fooIpB* inserts were then introduced in pRS551 *Bam*HI site<sup>38</sup>. Electrotransformation was used to perform the cloning experiments in TOP10 strain (Invitrogen) and all plasmid intermediates were analysed by restriction analysis and PCR.

*Fool* was expressed in *trans* by a plasmid pACYC184-derivative, pMT021, carrying *fooI* under the control of the *lacZp* promoter (Figure 2). As positive control, the *fooIB-lacZ* fusion previously described and harboring pMT020 was chosen and *fooIpB-lacZ* fusion harboring pMT020 (same plasmid as pMT021 without *fooI*) was used as negative control. Plasmid pMT020 is a derivative of pMT010. pMT010 is derived from pACYC184<sup>8</sup> where the *tetA* gene was removed by an *Hind*III-*Ava*I digestion (reconstituting *Hind*III site), the sequence was end-filled with *E. coli* DNA polymerase I Klenow fragment and self-religated. In pMT020, *lacI*<sup>q</sup> was introduced into the *Bcl*II site of pMT010 and *lacZp* was inserted into the reconstituted *Hind*III site. The Klenow end-filled *Ssp*I-*Sph*I 1386 bp fragment from pTrc99A (Pharmacia Biotech) containing *lacI*<sup>q</sup> was inserted in the Klenow end-filled CIP dephosphorylated *Bcl*II site of pMT010. Furthermore, and a *Pfu* polymerase PCR product of *lacZp*, using pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) as template and primers with *Bam*HI and *Bgl*II sites, was cloned in the *Hind*III site Klenow end-filled in order to obtain pMT020. The 78 bp *lacZp* PCR fragment was obtained with Plac Begin Rev (5'-GGA TCC GGC ACC CC-3') and Plac End (5'-AGA TCT CCT GTG TGA AAT TGT TAT-3') primers.

Finally, pMT021 was constructed by introducing the *fooI* open reading frame (ORF), produced by PCR with *Pfu* polymerase with primers harboring *Bam*HI and *Bgl*II sites, into the *Bgl*II site provided by the *lacZp* amplicon of pMT020. The 353 bp fragment of *fooI* gene ORF PCR fragment was obtained with *Bgl*I PIF (5'-AGA TCT GAG TTA TTA

AGT TGT GGA-3') and *Bam*HI Rev ICDS (5'-**GGA TCC CTA ATC** GAA GAA ACT-3') primers. A TAA stop codon (underlined) was introduced between the *Bam*HI restriction site and the *foo* complementary sequence in order to prevent a *fool* translation misreading. pMT020 was used to complement lysogens with *fooIB-lacZ* fusion, since recombination was observed between pTB01, a pMT010 derivative containing *fooIB* in *Bcl*I, and  $\lambda$ MT01 lysogens, also carrying the *fooIB* fragment (data not shown).

### Chromosomal insertion of fusions

All  $\lambda$ RS45<sup>38</sup> recombinant phages were obtained by lytic growth in MC4100<sup>7</sup> transformant strains containing the pRS551<sup>38</sup> derivative plasmid fusions, pMT001 (*fooIB-lacZYA*), and pMT007 (*fooIp-fooBpB-lacZYA*) (Figure 1). MC4100  $\lambda$  lysogens (with single prophage integration) were then produced, induced and amplified to obtain, respectively, recombinant  $\lambda$ MT01 (*fooIB-lacZYA*) and  $\lambda$ MT03 (*fooIp-fooBpB-lacZYA*) phage stocks (Table I). These recombinant  $\lambda$  phages then lysogenized strains PH613, PH615 and PH617 (Table I). All the fusions were done as described by Simons *et al.*<sup>38</sup>. Single prophage integration was verified by PCR, as described by Powell *et al.*<sup>34</sup>, on overnight cultures in LB broth washed twice in sterile water. Amplification was done in a total volume of 50  $\mu$ L containing 10  $\mu$ L of template DNA, each of the primers at 50 mM, the four dNTPs (each at 200  $\mu$ M), 1X of PCR buffer (Life Technologies Inc.), and 2 U of *Taq* DNA polymerase (Life Technologies Inc.). PCR, using a PE 2400 or 9700 thermal cycler (Perkin Elmer), was done under the following conditions: 1 min of denaturation at 95° C followed by 25 cycles (denaturation at 95° C for 1 min, annealing at 56° C for 1 min, extension at 72° C for 1 min) and a final extension at 72° C for 5 min. Amplification products (10  $\mu$ L) were visualised on 2% agarose containing ethidium bromide.

### Assays of $\beta$ -galactosidase activity

DM800<sup>13</sup> derivative bacterial cultures (Table I) were grown in M9 minimal broth<sup>32</sup> containing Cys, Arg, Pro, Gly, Ile, Val, Ura, Thi (B1) and the required antibiotics. Cultures were first inoculated, from -80° C glycerol stocks, on LB agar plates containing Cys, X-Gal and antibiotics, and grown overnight at 37° C. Colonies were used to inoculate 5 mL of M9 broth supplemented with 0,2% glycerol 0,2% glucose and all the required factors and

the appropriate antibiotics. The cultures were grown approximately 16 hours at 37° C at 150 rpm in Rosi 1000 incubator. These pre-cultures were diluted 20 fold and grown to logarithmic phase (O.D.<sub>600</sub> 0,5 to 0,7) in 5 mL of M9 0,4% glycerol broth and grown at 37° C at 150 rpm in Rosi 1000 incubator. The  $\beta$ -galactosidase assays were done according Miller's method<sup>32</sup>. At least three assays were done for each strain in both with and without IPTG induction. Microsoft Excel 2000 program was used to perform bilateral Student's-t test supposing unequal variances.

### DNA Methylation Patterns

The methylation pattern of GATC-I and GATC-II sites of *foo* intergenic region in strains MT008, MT009 and MT010 was studied using a PCR method. Three oligonucleotide primer pairs were used for these studies. The 1038 bp *fooIB* PCR fragment, covering the whole regulatory region and including both GATC-I and GATC-II sites, was obtained with *Bam*HI For and *Bgl*<sub>1</sub>Rev (see "Plasmid fusions" section) primers. For the region covering the GATC-I site, a 508 bp amplicon was obtained with *Bam*HI For and GATC-I *Bgl*II Rev (5'-**AGA TCT CAT CAT GGT GAA TT**-3') primers. Finally, for the region covering the GATC-II site, a 533 bp fragment was obtained with GATC-II *Bam*HI For (5'-**GGA TCC GAG TGT ATT CTT**-3') and *Bgl*<sub>1</sub>Rev primers. Chromosomal DNA was isolated from strains MT008, MT009 and MT010 that were grown in the same conditions used for the  $\beta$ -galactosidase assays. Genomic DNA was extracted according to the procedure described by Harel *et al.* (1992)<sup>22</sup>. The purity and the quantification of DNA were verified by spectrophotometry and by gel electrophoresis.

For each sample, DNA was digested to completion with the following restriction enzymes: *Dpn*I (cuts methylated GATC sites), *Mbo*I (cuts non-methylated GATC sites), *Eco*RI (digestion negative control that does not cut in *fooIB* region) and *Sau*3A I (digestion positive control that cuts all GATC sites, whether they are methylated or not). After incubation, the enzymes were inactivated. The complete digestion was verified by electrophoresis on 0,8 % agarose gel containing ethidium bromide. Then, the PCR reactions were done on each of the digested DNA (*Dpn*I, *Mbo*I, *Eco*RI, and *Sau*3A I). The reactions were performed with Taq polymerase (Life Technologies Inc.) in PE 9700 apparatus, with 2,5 mM final concentration of each primer. The bands were visualized after electrophoresis

of 10  $\mu\text{L}$  of PCR samples on 1,2 % agarose gel containing ethidium bromide, and the bands intensities were measured using the Alpha Imager. This procedure of digestion and PCR was repeated three times for each DNA.

### **Phase Transition Rates Calculation in MT008, MT009 and MT010 Strains**

$\text{Lac}^+$  to  $\text{Lac}^-$  and  $\text{Lac}^-$  to  $\text{Lac}^+$  transition rates were measured in  $\lambda\text{MT01}$  lysogens MT008, MT009 and MT010, carrying the *fooIB-lacZ* fusion, as described by Harel *et al.* (2000)<sup>19</sup>. These strains were first inoculated on LB Cys Tet Km X-Gal plates and grown overnight at 30° C. Colonies showing a complete blue ( $\text{Lac}^+$ ) or white ( $\text{Lac}^-$ ) phenotype were excised from the agar and resuspended in 1 mL of 0,1 M PBS (phosphate buffer saline) pH 7,4. Appropriate dilutions were inoculated onto M9 X-Gal glycerol agar supplemented with Cys, Arg, Pro, Gly, Ile, Val, Ura, Thi (B1) and Km at 30° C. After 48 hours of growth, the colonies were scored for the LacZ phenotype. Transition rates were calculated by the formula  $(M/N)/g$ , where  $M$  is the number of cells that underwent a phase variation,  $N$  the total number of cells evaluated and  $g$  the total number of generations that gave rise to the colony (for MT008  $g = 25,70$  ; MT009  $g = 22,82$  ; and MT010  $g = 19,51$ ). The weighted average of frequencies was calculated based on the frequency switch of 3 colonies.

## Results

### DNA Supercoiling Level Influence on *fooBp* Activity

In the *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> wild-type genetic background, *fooIB-lacZ* fusion expression was the highest where an optimal DNA negative supercoiling degree was conserved (Table II). A lower LacZ expression was found in the *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strain, which corresponds to 62% of the expression measured for the wild-type strain. The decrease in global negative supercoiling level due to the *gyrB225* mutation might be responsible for this. With the  $\Delta$ *topA* additional topoisomerase mutation, *fooIB-lacZ* fusion expression was further reduced. In MT010 ( $\Delta$ *topA gyrB225*) double mutant, LacZ levels are 45% of that of MT009 *gyrB225* mutant and 28% of that of wild-type strain MT008. This suggests that *fooBp* activity is also influenced by local changes in DNA supercoiling level.

We also evaluated the effect of F<sub>oo</sub>I absence on *fooB* expression in the different strains. From the results shown in Table V, it can be seen that F<sub>oo</sub>I stimulated *fooB* expression only when DNA topoisomerase I was present. Possibly, in the absence of DNA topoisomerase I, local supercoiling fluctuations in the *fooB* regulatory region does not allow appropriate F<sub>oo</sub>I-DNA interactions.

### DNA Supercoiling Level Influence on *fooIB* Phase Variation

In Table III, observations concerning phase variation of MT008, MT009 and MT010 isogenic strains are listed. Interestingly, different Lac phenotypes were found. MT008 *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> strain presented clearly white Lac<sup>-</sup> colonies and dark blue Lac<sup>+</sup> colonies. In MT009 *gyrB225* strain, Lac<sup>+</sup> colonies were dark blue but Lac<sup>-</sup> colonies showed a light blue phenotype. Colonies with different blue intensities, varying from light to dark, were seen for the  $\Delta$ *topA gyrB225* MT010 mutant.

The percentage of Lac<sup>+</sup> colonies was also calculated, dark blue colonies being considered to be Lac<sup>+</sup>, and white, light and medium blue colonies to be Lac<sup>-</sup>. For the *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> wild-type strain MT008, in both colony  $\alpha$  and  $\beta$  phase transitions, ON state predominated with more than 99% Lac<sup>+</sup> colonies. Single mutant *gyrB225* MT009 strain showed a preference towards ON state, around 98% Lac<sup>+</sup> colonies were counted in the ON

to OFF switch, and a lower Lac<sup>+</sup> colonies percentage of 88,70% in the OFF to ON switch. Finally, in  $\Delta topA gyrB225$  MT010 double mutant, lower percentages of ON colonies were found in both phase transitions with 72,63% Lac<sup>+</sup> for  $\alpha$ , and with 85,40% Lac<sup>+</sup> for  $\beta$ .

The  $\alpha$  switch frequency (OFF to ON switch), around  $4 \times 10^{-2}$ /cell/generation, was the highest and similar in MT008, MT009 and MT010 strains. This is reflected by the fact that colonies exhibited in majority the Lac<sup>+</sup> phenotype. The main differences in phase variation were seen in  $\beta$  switch. The ON to OFF transition was less frequent for MT008  $topA^+ gyrB^+$  wild-type strain ( $\beta = 7,37 \times 10^{-5}$ /cell/generation) than it was for MT009 ( $\beta = 6,82 \times 10^{-4}$ /cell/generation) and MT010 ( $\beta = 9,23 \times 10^{-3}$ /cell/generation) mutant strains. This is in accordance with the results concerning the methylation state of GATC sites in MT010 DNA (see below). Thus the repressive mechanism of fimbrial expression is apparently affected by DNA supercoiling level alterations caused by topoisomerase mutations.

#### **DNA Supercoiling Level Influence on GATC-I and GATC-II Sites Methylation Patterns in *fooIB* Regulatory Region**

The PCR intensity ratio of undigested versus *EcoRI* (does not cut within *fooIB*) digested *fooIB* DNA was about 1 (Figure 3). The restriction enzyme *DpnI* cuts at methylated GATC sites. In wild type MT008 and *gyrB225* mutant MT009, the PCR intensity ratio of *DpnI* versus *EcoRI* treated DNA was equal. In the double mutant MT010 ( $\Delta topA gyrB225$ ), this ratio was much lower. Thus *DpnI* cuts GATC sites more frequently in *fooIB* of strain MT010. To distinguish the methylation states of the GATC sites within *fooIB*, PCRs covering the GATC-I and GATC-II regions were performed after digestion. In wild type MT008 and *gyrB225* mutant MT009, the intensity ratios of PCRs of GATC-I and GATC-II sites of DNA restricted by *DpnI* or *EcoRI* were similar. However, in the double mutant MT010, the GATC-I site is more susceptible to *DpnI* than the GATC-II sites. It appears that when the topoisomerase I is absent, the GATC-I site is more methylated than in  $topA^+$  strains. These results were confirmed using *MboI* which cuts unmethylated DNA. These experiments were performed three times, and each PCR was made on independent digestions of the same DNA extraction.

### **Roles of FooI regulator and of *fooI* Divergent Transcription on *fooBp* Activity**

The FooI activator appears to be important for *fooIB-lacZ* expression in *topA*<sup>+</sup> strains. The  $\beta$ -galactosidase levels were lower in the absence of FooI (Tables IV and VI). As demonstrated with *fooIp-fooBpB-lacZ* fusion, the *fooBp* activity was reduced by 2 fold in *fooI* strains MT067 wild-type (44%) and *gyrB225* mutant MT068 (56%), when compared, respectively, to MT008 and MT009 *fooI*<sup>+</sup> positive controls. However, FooI does not seem to be required for *fooBp* activation in *fooI* MT069 ( $\Delta$ *topA gyrB225*) double mutant strain, since its  $\beta$ -galactosidase activity was similar to the  $\beta$ -galactosidase activity of MT010 *fooI*<sup>+</sup> positive control (83%). In the absence of topoisomerase I, the local increase in DNA negative supercoiling level might prevent FooI binding to *foo* regulatory region.

Supplying wild-type levels of FooI in *trans* on pMT021 restored the wild-type LacZ expression in *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> strain (Tables V and VI: MT079 vs MT076 (106%)). Furthermore, the *fooI* negative control MT088 showed a lower  $\beta$ -galactosidase activity than *fooI*<sup>+</sup> positive controls MT079 (*fooI* in *trans*) (27%) and MT076 (*fooI* in *cis*) (29%). Altogether, these results confirm the influence of FooI as an activator on *fooBp* in *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> strains.

LacZ expression levels were similar no matter FooI was provided in *cis* on *fooIB-lacZ* fusion (MT077) or in *trans* on pMT021 (MT080). The expression of FooI in *trans* in MT080 strain restored 87% of the  $\beta$ -galactosidase expression of MT077 positive control. However, in the absence of FooI, MT089 negative control expressed 94% of the MT077 LacZ levels. Surprisingly, when pMT020 or pMT021 was introduced in *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strains, *fooBp* activity appeared relatively independent of FooI presence (Table VI: MT068 vs MT009 (56%); MT089 vs MT080 vs MT077). The presence of pMT020 and pMT021 plasmids in topoisomerase isogenic strains (Tables II: MT076, MT077, MT078, IV: MT088, MT089, MT090) also decreased the  $\beta$ -galactosidase activity, when compared with the same strains without plasmids (Tables II: MT008, MT009, MT010; Table IV: MT067, MT068, MT069).

MT089 strain (pMT020) expressed only 45% of the LacZ levels measured for MT009 strain (no plasmid, *fooI* in *cis*) and (Tables V vs II), similarly, MT089 strain (pMT020) expressed only 76% of the LacZ levels measured for MT068 strain (no plasmid). Since *fooBp* transcriptional activity is already so low when these plasmids are present in *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strains (Table V), this might indicate that FooI activator role on *fooBp* cannot be detected. Moreover, it is possible that FooI regulator presence in *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strains is not as much crucial for *fooBp* activation than it is for wild type strains because the global supercoiling level is lower.

In contrast, an inhibiting effect of *fooI* divergent transcription on *fooBp* activity was noted for  $\Delta topA$  *gyrB225* strains (Tables V and I). Higher LacZ expression levels were obtained when FooI was either absent (230% for MT090) or expressed in *trans* (128% for MT081), when compared to MT078 positive control strain expressing FooI in *cis* (Tables V and VI). Moreover higher LacZ expression measurements were obtained in *fooI*<sup>-</sup> negative control strain MT090 than in *fooI*<sup>+</sup> strains MT081 (*fooI* in *trans*) and MT078 positive control (*fooI* in *cis*). This might indicate that FooI expression in *trans* acts also negatively on *fooBp* activation in  $\Delta topA$  strain.

Interestingly, in *fooI*<sup>-</sup> negative control background, the wild-type and mutant isogenic strains harboring pMT020 control vector showed similar  $\beta$ -galactosidase levels (Table V: MT088, MT089, MT090). Moreover, in *fooI*<sup>-</sup> strains not harboring this plasmid, similar  $\beta$ -galactosidase levels were obtained among the *topA*<sup>+</sup> strains (MT067 and MT068), and among the *gyrB225* strains (MT068 and MT069) (Table IV). These observations suggest that *fooBp* activity remains quite insensitive to  $\Delta topA$  and *gyrB225* topoisomerase mutations in the absence of FooI activator.

## Discussion

### Global DNA Supercoiling Influences *fooBp* Activity

It was previously observed that F165<sub>1</sub> fimbrial expression is affected by the level of DNA supercoiling<sup>12</sup>. In a *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> wild-type strain, since topoisomerase I can exert its action behind and gyrase ahead the transcription complex, optimal global and local supercoiling levels in DNA are conserved. This situation seems to be favorable for all the required molecular interactions for an optimal transcriptional expression from *fooBp* in *fooIB-lacZ* fusion (Tables II and V).

The DNA template superhelicity favours the RNA polymerase binding on the promoter and the chromosome negative supercoiling state provides the free energy for strand separation during the open complex formation in transcription initiation step<sup>5, 35, 44, 45</sup>. Earlier observations<sup>12</sup> indicated that the lower global negative supercoiling level found in *gyrB*<sup>Ts</sup> and  $\Delta$ *topA-gyrB*<sup>Ts</sup> mutants at 37° C<sup>16, 31</sup> caused a drop in the level of expression from *fooBp*. The activity from *fooBp* is reduced in *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* and  $\Delta$ *topA gyrB225* strains (Tables II and V). The *gyrB225* mutation lowers the global negative supercoiling level of both plasmid DNA and chromosomal DNA<sup>36</sup>.

Since the changes in the level of global DNA supercoiling influence protein-protein interactions as well as DNA loop formation<sup>23</sup>, the *gyrB225* mutation probably modifies the efficiency of the molecular interactions required for *fooBp* stimulation. In the absence of gyrase, an accumulation of positive supercoils in front of the transcription complex could decrease the rate of RNA polymerase translocation on the DNA template. Moreover, the RNA polymerase interaction with *fooBp* could also be influenced by lower global negative supercoiling level, because changes in the DNA twist modify the relative orientation of -10 and -35 promoter regions that normally lie on the same side of DNA helix<sup>2</sup>. In addition, promoters with a 16 bp or 18 bp spacing between -10 and -35 regions would be responsive to DNA twist (Tw) while those with a 17 pb spacing would not<sup>1, 2, 43</sup>. Thus, since the spacing between -10 and -35 regions is 16 bp at *fooBp*, one might suspect that transcriptional activity at *fooBp* is influenced by DNA supercoiling level.

### Local DNA Supercoiling Influences *fooBp* Activity

The *fooBp* promoter sensitivity to local changes in DNA supercoiling is revealed by the differences in  $\beta$ -galactosidase expression of *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* and  $\Delta$ *topA* *gyrB225* mutants, as DM800 derivatives have the same global supercoiling levels<sup>36</sup> (Tables II and V). It was also earlier reported that the *foo* operon is responsive to local supercoiling levels modifications while using *foo-lacZ* fusion carried by a vector harboring *tetA* gene<sup>12</sup>. This latter encodes a membrane-bound protein causing transcription-induced negative supercoiling of plasmid DNA in *topA* mutants<sup>29</sup>. The DNA distortion, in  $\Delta$ *topA* *gyrB225* double mutant, caused by an increase of local DNA negative supercoiling level in the promoter proximity, might be such that interactions between the protein regulators and with DNA itself are not possible or are less optimal for the activation of *fooBp*.

### DNA Supercoiling Level Influence on *fooIB* Phase Variation

Phase variation control not only regulates the expression of F165<sub>1</sub> (Prs-like) fimbriae in 4787 and 5131 septicemic wild-type strains<sup>19</sup> but also *fooIB-lacZ* fusion expression in the isogenic DM800 derivatives. Among these strains, different Lac phenotypes were found, *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> wild-type presented distinct white Lac<sup>-</sup> and dark blue Lac<sup>+</sup> colonies, *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strain showed dark blue Lac<sup>+</sup> but also light blue Lac<sup>-</sup> colonies and  $\Delta$ *topA* *gyrB225* double mutant having colonies with varying intensities of blue (from light to dark) (Table III). In general, ON state colonies were predominant. In 5131 strain, the bacterial population is mostly in ON phase too, 97% of cells expressing F165<sub>1</sub> fimbriae, with around 97% of PhoA<sup>+</sup> colonies found in the ON to OFF switch, but only around 50% positive colonies were observed during the OFF to ON transition<sup>19</sup>.

In topoisomerase isogenic strains, the  $\alpha$  switch frequency (OFF to ON) is relatively constant and higher ( $10^{-2}$ /cell/generation) than the  $\beta$  switch frequency (ON to OFF) (Table III). The OFF to ON switch is more frequent, and this explains why most colonies present a Lac<sup>+</sup> phenotype. There are also more cells turning OFF in gyrase and topoisomerase I mutations background (respectively  $10^{-5}$ /cell/generation and  $10^{-3}$ /cell/generation). Interestingly, the OFF to ON switch frequencies of topoisomerase isogenic strains are

similar to that of F165<sub>1</sub> in 5131 wild-type pathogenic strain. However, this latter ON to OFF switch frequency is also of  $10^{-3}$ /cell/generation<sup>19</sup>, alike the switch frequency observed in  $\Delta topA gyrB225$  double mutant strain. In the  $\Delta topA gyrB225$  strain, the  $\beta$  switch transition (ON to OFF) is the more frequent. Maybe in the absence of topoisomerase I there is an accumulation of negative supercoils in the *foo* intercistronic region that does not allow the OFF phase state establishment by the binding of Lrp to putative Lrp sites on *foo* DNA, if *foo* operon phase variation mechanism is similar to the one occurring for *pap*. Therefore, the topoisomerase mutations alter the DNA supercoiling state such that the repressive mechanism of fimbrial expression is affected. In type 1 fimbriae, although Fim phase switching is mediated by site-specific recombination, topoisomerase I and gyrase also influence its phase variation; a *topA* mutation reduces the rate of fragment inversion in both ON to OFF and OFF to ON switch while a gyrase inhibition introduces a bias towards OFF to ON inversion, the ON to OFF inversion being only slightly changed<sup>15</sup>.

#### **DNA Supercoiling Level Increases *foo* GATC-I Methylation Ratio in $\Delta topA gyrB225$ Mutant**

Pap fimbriae phase variation requires differential methylation of adenine residues in GATC-I and GATC-II sites located in the intercistronic regulatory region of *pap* operon<sup>4,6</sup>. In the phase variation mechanism, Dam (deoxyadenosine methyltransferase) is in competition with Lrp and PapI transcriptional activators. Dam methylation inhibits the binding of Lrp or Lrp/PapI to GATC sites while Dam cannot methylate the GATC sites when Lrp or Lrp/PapI regulators are bound to these regions. The methylation protection requires the binding of Lrp at GATC-II and the binding of Lrp and PapI at GATC-I<sup>42</sup>.

It is observed that the GATC-I site is more methylated in double mutant MT010 ( $\Delta topA gyrB225$ ), than it is for the *topA*<sup>+</sup> isogenic strains (Figure 3). The ON to OFF switch transition frequency ( $\beta$ ) is also higher in MT010 than in the *topA*<sup>+</sup> strains (Table III). This last observation could correlate with the methylation state of the GATC sites within *fooIB*. Thus, if GATC-I site is more strongly methylated in the  $\Delta topA$ , the transition from ON to OFF is more frequent. Moreover, in a  $\Delta topA$  mutant, the binding of different regulators and the interaction of proteins with the *fooIB* region are strongly altered (Table VI). We

hypothesize that the DNA distortion in the double mutant is such that Lrp cannot efficiently bind to the GATC-I site in order to prevent the formation of the OFF phase methylation pattern resulting from Dam action. Consequently, since the GATC-I site is more accessible to methylation, there is a repression of transcription from *fooBp*. It was also observed that the presence of the FooI regulator was not required for the expression from *fooBp* in the double mutant. However, in *topA*<sup>+</sup> strains, FooI is necessary for an optimal expression at *fooBp*. In the P-like systems, the I regulator is required for the OFF to ON phase transition by giving Lrp an affinity for the GATC-I region<sup>25,33</sup>. It is not yet known if Lrp is necessary for the transcriptional activation at *fooBp* in the double mutant.

### **Influence of *fooI* Divergent Transcription on *fooBp* Activity**

The divergent orientation of *fooIp* and *fooBp* promoters suggests that there might exist a DNA supercoiling-dependent transcriptional coupling between them. When transcription from one promoter affects transcription from the other (transcriptional coupling), inhibiting divergent transcription from one promoter should affect the transcriptional activity of each promoter<sup>37</sup>. To assess whether the divergent transcription from *fooIp* influences *fooBp* activity, a *fooIp-fooBpB-lacZ* chromosomal fusion was used. In this fusion, the divergent transcription of the *fooI* regulator gene was abolished while *fooIp* was conserved in order to allow RNA polymerase binding to it (Tables IV, V, and VI).

A *fooI* divergent transcription impact of the on *fooBp* activity could not be detected in neither *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> nor *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strains. When providing FooI in *trans* (wild-type levels of FooI obtained without IPTG induction), *fooBp* activity is completely restored in *topA*<sup>+</sup> strains (Table VI). Thus, in a *topA*<sup>+</sup> background, divergent transcription from *fooI* does not appear to influence *fooBp* activation as much as FooI activator does. This is probably related to a weak activity of *fooIp*. In contrast, for  $\Delta topA$  *gyrB225* strains, divergent transcription from *fooIp* appears to negatively influence *fooBp* activity because the *fooI* negative impact on *fooBp* stimulation is more important when *fooI* is chromosomally transcribed (Table VI). Possibly, in a  $\Delta topA$  strain, *fooBp* cannot tolerate

further local distortion in DNA, which could be caused by the local negative supercoiling resulting from the divergently transcribed *fooI* gene.

Thus, it does not seem that divergent transcription from *fooIp* influences *fooBp* activity in *topA*<sup>+</sup> strains. It is possible that the low activity of the *fooIp* promoter does not influence *fooBp* because it is the regulatory machinery taking place in the intercistronic region that has a major influence on the transcription from *fooBp*. Rhee *et al.* 1999<sup>37</sup> observed that the loss of transcription from the relatively weak *ilvCp* and the decrease it caused on the negative superhelical density in *ilvYp* region had only little effect on *ilvY* expression. However, this does not exclude the possibility that divergent transcription from *fooBp* can influence *fooIp* activity nor that *fooBp* can be activated by divergent transcription from a stronger promoter. Generally, promoters with high superhelical density optima are weak and the open complex formation at these necessitates high levels of energy activation<sup>37</sup>. Local DNA supercoiling generated from divergent transcription could provide this required energy by supplementing the global superhelical density in the vicinity of the promoters. According to the twin-domain model<sup>27</sup>, the local superhelical density in a divergent promoter region between transcribing RNA polymerases should be increased to a level greater than the chromosomal global superhelical density. This latter should be linked to the transcription frequency from divergent promoters and to the level of negative supercoiling caused by this transcription. A transcriptional coupling between divergent promoters refers to this DNA supercoiling-dependent interaction.

### **FooI Activator Role on *fooBp* Activity**

Because *fooBp* activity is completely restored in *topA*<sup>+</sup> strains when FooI was provided *in trans* (wild-type levels of FooI obtained without IPTG induction), the role of FooI as an activator is confirmed for the *topA*<sup>+</sup> strains (Table VI). Therefore, *fooBp* stimulation in *topA*<sup>+</sup> background relies more on the presence of FooI activator than on divergent transcription from *fooIp*. In contrast, in  $\Delta topA$  *gyrB225* strains, *fooBp* activity is higher in the absence of FooI than its presence (Table VI). This suggests that FooI protein represses *fooBp* in  $\Delta topA$  strain. It is possible that the binding of FooI in conjunction with Lrp adds more constraints to the locally distorted DNA in  $\Delta topA$  background. This might

decrease *fooBp* recognition by RNA polymerase by altering the relative orientation of -35 and -10 promoter regions. By these observations, one can suspect that DNA-protein and protein-protein interactions cannot correctly activate transcription from *fooBp* in the absence of topoisomerase I that could remove the excess of negative supercoils.

Although the role of FooI as an activator on *fooBp* is confirmed for the *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* mutant, surprisingly, when these strains carry pMT020 or pMT021 vectors, *fooBp* activity is not increased in the presence of FooI (Table VI). Indeed, in a *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* mutant background, *fooBp* activation seems quite insensitive to FooI absence or presence, either in *cis* (*fooIB-lacZ* fusion) or in *trans* (pMT021). This could indicate that the role of FooI as an activator is not as much crucial for *fooBp* when the global supercoiling level is lowered by the *gyrB225* mutation. It is also possible that the low levels of detection of *fooBp* activity in  $\Delta topA$  and/or *gyrB225* backgrounds do not allow one to adequately measure the action of FooI.

## Conclusion

It appears that F165<sub>1</sub> expression is sensitive to both global and local changes in DNA supercoiling. The *foo* operon responsiveness to DNA superhelicity modifications exists at the transcription level as well as in the phase variation mechanism. In addition, Fool protein, a PapI homologue, is required for *fooBp* activity in a *topA*<sup>+</sup> background. If Fool acts on *foo* operon expression following the example of PapI in *pap* phase variation model, this could correlate with double mutant independence towards Fool activator since it shows a higher ON to OFF switch frequency than *topA*<sup>+</sup> strains and with GATC-I higher methylation ratio. The divergent orientation of *fooIp* and *fooBp* leads to suspect the existence of a transcriptional coupling between them, as suggested by the negative impact of *fooI* transcription on *fooBp* activity in  $\Delta$ *topA* strains. Moreover, preliminary results indicate that substituting *fooIp* by the much stronger promoter *trcp* (independently of IPTG induction) increases the activity of the divergently arranged *fooBp* (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>40</sup>). It has been proposed that the local superhelicity generated by transcription from a divergent promoter could affect a nearby superhelicity sensitive promoter<sup>27</sup>. This is interesting in the context of pathogenicity islands (PAIs)<sup>18</sup>, which are large chromosomal regions, sometimes unstable, containing virulence genes clusters often flanked by insertion sequence elements or tRNA genes, commonly found in bacterial pathogens<sup>18</sup>. In *E. coli* natural isolates, *pap*, *prf* and *sfa* fimbrial operons, *hlyI* and *hlyII* hemolysin-encoding genes and *kps* encoding type II capsule, are among the virulence determinants found in PAIs<sup>3</sup>. Thus, the independence of *fooBp* towards *fooI* divergent transcription in a wild type background of supercoiling and *fooBp* sensitivity to DNA supercoiling levels may allow *fooBp* to respond to environmental changes. Therefore, during the pathogenesis process, the expression of virulence genes could be coordinate in this way in order to successfully achieve host colonization and infection<sup>14</sup>.

**Acknowledgements**

This work was supported in part by grant to J.H. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (OGP0025120), M.D., and by a NATO grant to C.M.. M.-C.T. was funded by a scholarship from NSERC.

## References

1. **Aoyama, T., and M. Takanami.** 1988. Supercoiling response of *E. coli* promoters with different spacer lengths. *Biochim. Biophys. Acta* **949**: 311-317.
2. **Auble, D. T., and P. L. deHaseth.** 1988. Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase: influence of DNA structure in the spacer separating the -10 and -35 regions. *J. Mol. Biol.* **202**: 471-482.
3. **Blum, G., V. Falbo, A. Caprioli, and J. Hacker.** 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and  $\alpha$ -hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**: 189-196.
4. **Blyn, L. B., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1990. Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential *dam* methylation states. *EMBO J.* **9**: 4045-4054.
5. **Borowiec, J. A., and J. D. Gralla.** 1987. All three elements of the *lac ps* promoter mediate its transcriptional response to DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.* **195**: 89-97.
6. **Braaten, B. A., X. Nou, L. S. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1994. Methylation patterns in *pap* regulatory DNA pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**: 577-588.
7. **Casadaban, M. J.** 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**: 541-555.
8. **Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1156.
9. **Cherifi, A., M. Contrepolis, N. Picard, P. Gouillet, J. de Rycke, J. M. Fairbrother, and J. Barnouin.** 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicaemia. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**: 279-284.
10. **Contrepolis, 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.* **59**: 319-324.
11. **Daigle, F., C. M. Dozois, M. Jacques, and J. Harel.** 1997. Mutations in the *fl65<sub>1A</sub>* and *fl65<sub>1E</sub>* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microb. Pathogen.* **22**: 247-252.
12. **Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M.-C. Tessier, H. Dezfoulian, and J. Harel.** 2000. Effects of environmental conditions and global regulatory proteins on regulation of F165<sub>1</sub> (Prs-like) and F165<sub>2</sub> (F1C-like) fimbrial expression in *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Res. Microbiol.* **151**: 563-574.
13. **DiNardo, S., K. A. Voelkel, R. Sternglanz, A. E. Reynolds, and A. Wright.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**: 43-51.
14. **Dorman, C. J., N. Ní Bhriain, and C. F. Higgins.** 1990. DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *Nature* **344**: 789-792.
15. **Dove, S. L., and C. J. Dorman.** 1994. The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit gene is sensitive to changes in DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **14**: 975-988.

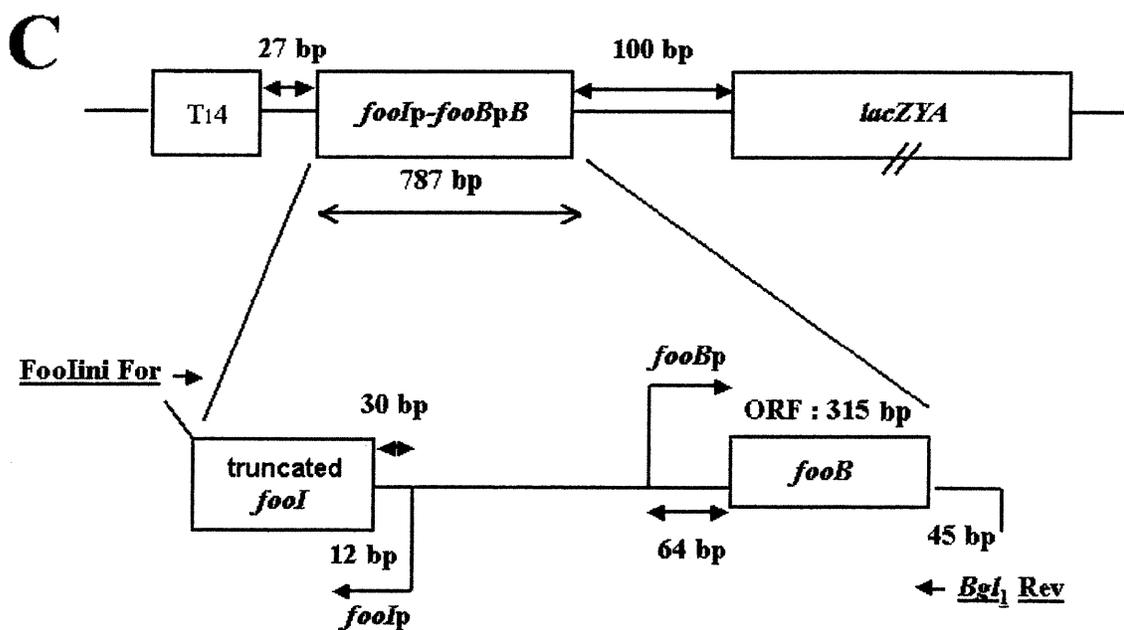
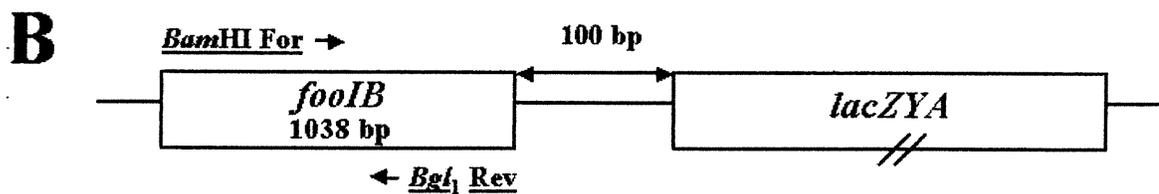
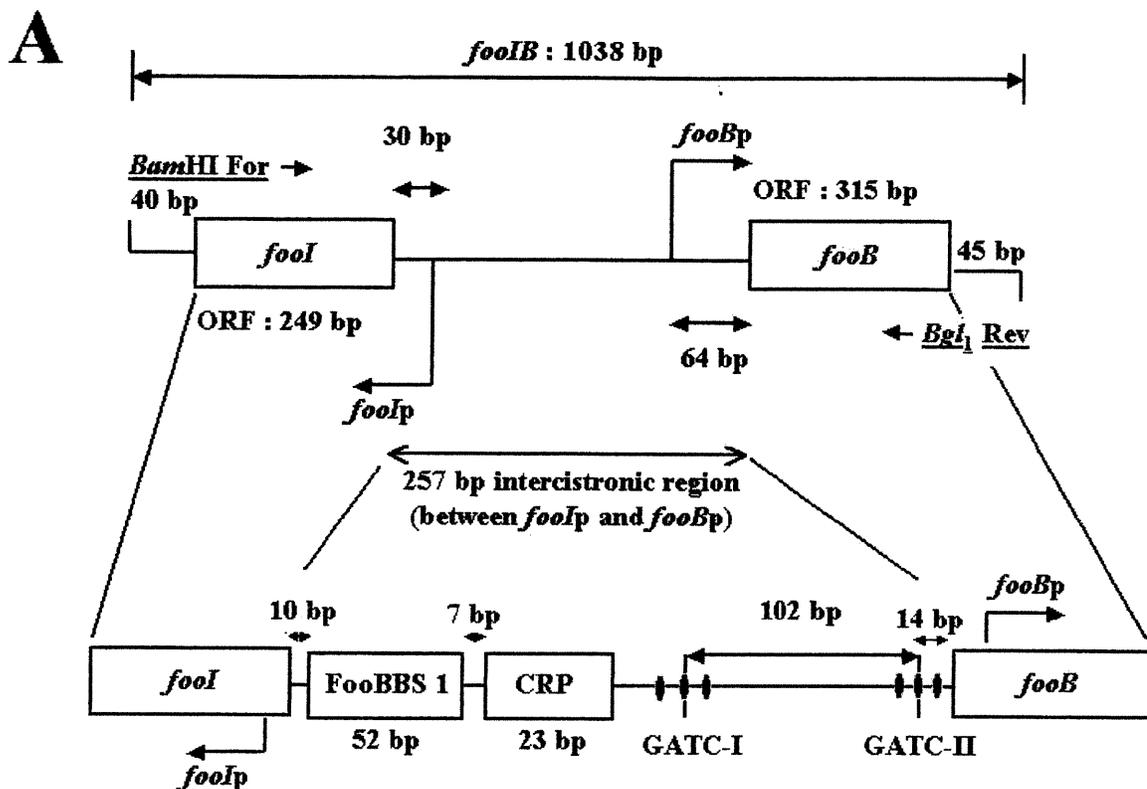
16. **Drolet, M., P. Phoenix, R. Menzel, E. Massé, L. F. Liu, and R. J. Crouch.** 1995. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli*  $\Delta topA$  mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3526-3530.
17. **Fairbrother, J. M., S. Larivière, and R. Lallier.** 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains Isolated from pigs with diarrhea. *Infect. Immun.* **51**: 10-15.
18. **Hacker, J., I. Blum-Oehler, I. Mühlendorfer, and H. Tschäpe.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
19. **Harel, J., F. Daigle, C. Forget, M.-C. Tessier, C. Crost, and C. Martin.** 2000. Phase variation of F165<sub>1</sub>(Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. *Can. J. Microbiol.* **46**: 1101-1107.
20. **Harel, J., F. Daigle, S. Maiti, C. Desautels, A. Labigne, and J. M. Fairbrother.** 1991. Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*- related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**: 177-182.
21. **Harel, J., J. M. Fairbrother, C. Forget, C. Desautels, and J. Moore.** 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet. Microbiol.* **38**: 139-155.
22. **Harel, J., C. Forget, J. Saint-Amand, F. Daigle, D. Dubreuil, M. Jacques, and J. Fairbrother.** 1992a. Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165<sub>1</sub>, a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1495-1502.
23. **Hochschild, A.** 1990. Protein-protein interactions and DNA loop formation, p. 107-138. *In* N. R. Cozzarelli and J. C. Wang (ed.), *DNA topology and its biological effects*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
24. **Jensen, K. F.** 1993. The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J. Bacteriol.* **175**: 3401-3407.
25. **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.
26. **Lin, R. T., R. D'Ari, and E. B. Newman.** 1990. The leucine regulon of *Escherichia coli*: a mutation in *rblA* alters expression of leucine-dependent metabolic operons. *J. Bacteriol.* **172**: 4529-4535.
27. **Liu, L., and J. Wang.** 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 7024-7027.
28. **Low, D. A.** 1994. Methylation-dependent and Lrp-dependent fimbrial gene regulation in *Escherichia coli*, p. 423-436. *In* V. L. Miller, J. B. Kaper, D. A. Portnoy, and R. R. Isberg (ed.), *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
29. **Lynch, A. S., and J. C. Wang.** 1993. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **175**: 1645-1655.
30. **Maiti, S. N., L. DesGroseillers, J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1994. Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165<sub>1</sub> of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. *Microb. Pathogen.* **16**: 15-25.

31. **Massé, É., P. Phoenix, and M. Drolet.** 1997. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 12816-12823.
32. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. USA.
33. **Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch, and 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.
34. **Powell, B. S., D. L. Court, Y. Nakamura, M. P. Rivas, and C. L. Turnbough, Jr.** 1994. Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucl. Acids Res.* **22**: 5765-5766.
35. **Pruss, G., and K. Drlica.** 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**: 521-523.
36. **Pruss, G. J., S. H. Manes, and K. Drlica.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**: 35-42.
37. **Rhee, K. Y., M. Opel, E. Ito, S. P. Hung, S. M. Arfin, and G. W. Hatfield.** 1999. Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 14294-14299.
38. **Simons, R. W., F. Houman, and N. Kleckner.** 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.
39. **Sternglanz, R., S. DiNardo, K. A. Voelkel, Y. Nishimura, Y. Hirota, K. Bechera, L. Zumstein, and J. C. Wang.** 1981. Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 2747-2751.
40. **Tessier, M.-C., M. Drolet, C. Martin, and J. Harel.** Divergent transcription influences *fooBp* activity in *Escherichia coli foo* operon: the strong *trecp* counteracts the requirement for Fool activator protein in *topA*<sup>+</sup> strains and *tetA* expression overcomes the effect of *gyrB225* mutation. *In preparation*.
41. **van der Woude, M., B. Braaten, and D. Low.** 1996. Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*. Review. *Trends Microbiol.* **4**: 5-9.
42. **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*. MicroReview. *Mol. Microbiol.* **6**: 2429-2435.
43. **Wang, J. Y., and M. Syvanen.** 1992. DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol. Microbiol.* **6**: 1861-1866.
44. **Wood, D. C., and J. Lebowitz.** 1984. Effect of supercoiling on the abortive initiation kinetics of the RNA-I promoter of ColE1 plasmid DNA. *J. Biol. Chem.* **259**: 11184-11187.
45. **Yang, H.-L., K. Heller, M. Gellert, and G. Zubay.** 1979. Differential sensitivity of gene expression *in vitro* to inhibitors of DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 3304-3308.

**Tables and Figures**

**Table I.** Bacterial strains, phages and plasmids used in this study.

Strains, phages or plasmids	Description	Reference and source
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
MC4100	F- <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacIPOZYA</i> ) <i>UI169 rpsL150</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>relA1 deoC1 rbsR22 flhD5301 fruA25</i> $\lambda$ -	7
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
Mew 1	$\Delta$ <i>ilvA</i> $\Delta$ <i>lac</i>	26
Mew 20	Mew 1 <i>dam</i> ::Tn5 (Km <sup>R</sup> )	12
DM800	$\Delta$ ( <i>topA - cysB</i> )204 <i>gyrB225 acrA13</i>	13
PH613	DM800 <i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup> (Km <sup>R</sup> ) <i>lacZ</i> ::Tn10	This work
PH615	DM800 <i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225 lacZ</i> ::Tn10	This work
PH617	DM800 ( $\Delta$ <i>topA gyrB225</i> ) <i>lacZ</i> ::Tn10	This work
MT008	PH613 $\lambda$ MT01 lysogen [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT009	PH615 $\lambda$ MT01 lysogen [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT010	PH617 $\lambda$ MT01 lysogen [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT067	PH613 $\lambda$ MT03 lysogen [ <i>foolp-foobpB-lacZ</i> ]	This work
MT068	PH615 $\lambda$ MT03 lysogen [ <i>foolp-foobpB-lacZ</i> ]	This work
MT069	PH617 $\lambda$ MT03 lysogen [ <i>foolp-foobpB-lacZ</i> ]	This work
MT076	PH613 $\lambda$ MT01 lysogen (pMT020) [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT077	PH615 $\lambda$ MT01 lysogen (pMT020) [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT078	PH617 $\lambda$ MT01 lysogen (pMT020) [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
MT079	PH613 $\lambda$ MT03 lysogen (pMT021) [ <i>foolp-foobpB-lacZ, fool</i> in <i>trans</i> ]	This work
MT080	PH615 $\lambda$ MT03 lysogen (pMT021) [ <i>foolp-foobpB-lacZ, fool</i> in <i>trans</i> ]	This work
MT081	PH617 $\lambda$ MT03 lysogen (pMT021) [ <i>foolp-foobpB-lacZ, fool</i> in <i>trans</i> ]	This work
MT088	PH613 $\lambda$ MT03 lysogen (pMT020) [ <i>foolp-foobpB-lacZ</i> ]	This work
MT089	PH615 $\lambda$ MT03 lysogen (pMT020) [ <i>foolp-foobpB-lacZ</i> ]	This work
MT090	PH617 $\lambda$ MT03 lysogen (pMT020) [ <i>foolp-foobpB-lacZ</i> ]	This work
<b>Phages</b>		
$\lambda$ RS45	<i>bla</i> '- <i>lacZYA imm</i> <sup>21</sup> <i>ind</i> <sup>+</sup>	38
$\lambda$ MT01	$\lambda$ RS45-pMT001 recombinant phage [ <i>foolB-lacZ</i> ]	This work
$\lambda$ MT03	$\lambda$ RS45-pMT007 recombinant phage [ <i>foolp-foobpB-lacZ</i> ]	This work
<b>Plasmids</b>		
pRS551	<i>bla-kan-lacZYA</i> pMB1 replicon	38
pMT001	pRS551 containing <i>foolB</i> ( <i>lacZ</i> under <i>foobp</i> control)	This work
pMT007	pRS551 containing <i>foolp foobpB</i> ( <i>lacZ</i> under <i>foobp</i> control)	This work
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO	Plasmid for PCR products cloning	Invitrogen
pGEM <sup>®</sup> -T	Plasmid for PCR products cloning and <i>lacZp</i> source	Promega
pTrc99A	pBR322 derivative vector for protein expression, used as <i>lacI</i> <sup>q</sup> and <i>trcp</i> source	Pharmacia Biotech
pACYC184	p15A replicon, Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , used as <i>tetA</i> source	8
pMT010	pACYC184 $\Delta$ <i>tetA</i> : $\Delta$ <i>HindIII-AvaI</i>	This work
pMT020	pMT010 with <i>lacI</i> <sup>q</sup> in <i>BclI</i> and <i>lacZp</i> in <i>HindIII</i>	This work
pMT021	pMT020 with <i>fool</i> ORF under <i>lacZp</i>	This work



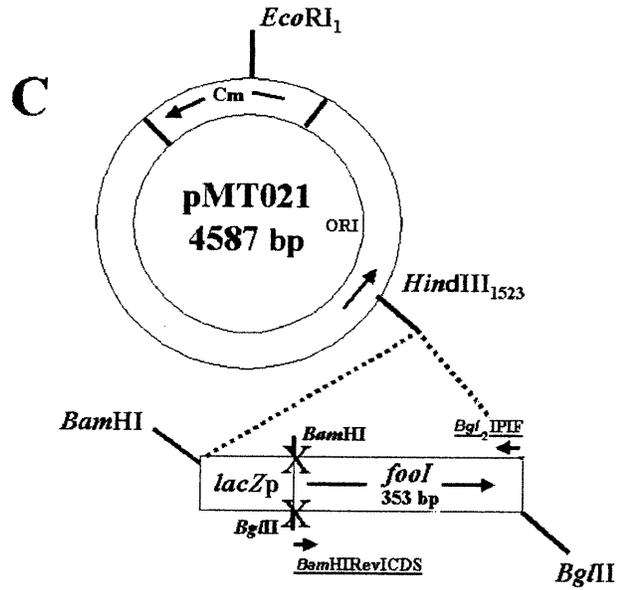
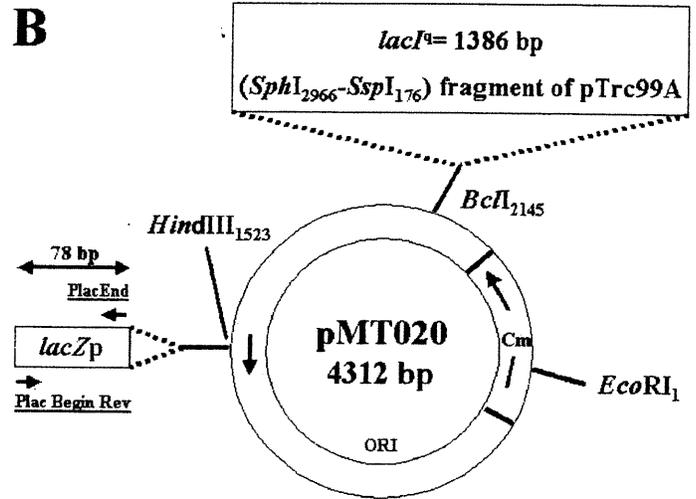
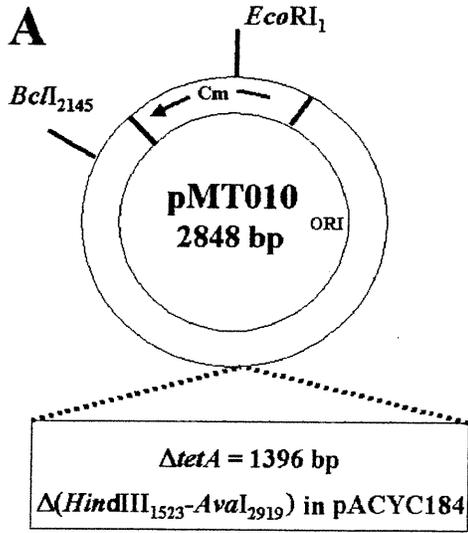
**Figure 1. (A)** The *foo* regulatory region with its putative regulatory sites.

The *fooIB* regulatory region with its putative CRP binding site and putative Lrp binding sites are shown. Black dots refer to Lrp sites and FooBBS 1 site refers to a putative PapB homologous binding site. The GATC-I and GATC-II sites, separated by 102 bp, and the *fooIp* and *fooBp* divergent promoters are also indicated. The putative FooBBS sites 2 and 3 in the region of *fooBp* promoter and *fooB* gene are not shown.

**(B)** Schematic representation of *fooIB-lacZYA* transcriptional fusion.

**(C)** Schematic representation of *fooIp-fooBpB-lacZYA* transcriptional fusion.

This latter is similar to *fooIB-lacZYA* fusion except that *fooI* gene is deleted. However, the binding of the RNA polymerase to *fooIp* promoter remains unaffected. The transcriptional elongation from *fooIp* divergent promoter was blocked by four tandem repeats of the rho-independent transcriptional terminator *rrnBT<sub>1</sub>* (T<sub>1</sub>4) provided by pRS551 plasmid<sup>38</sup>. **ORF**: Open Reading Frame; **bp**: base pairs. The primers used for the amplification of *foo* regions are underlined. For details about the sequence of the primers and cloning procedures, see “Material and Methods” section.



**Figure 2.** Schematic representation of (A) pMT010, (B) pMT020, and (C) pMT021.

For details about the construction procedure and the sequence of the primers, see “Material and Methods” section. The pMT021 plasmid was used for *Fool* expression in *trans* in strains carrying the *foolpB-lacZ* fusion. The pMT020 positive control vector was introduced in strains harboring *foolB-lacZ* positive control fusion and in *foolpB-lacZ* negative control fusion. The primers used for the amplification of *fool* and of *lacZp* are underlined.

**Table II.** Local and global DNA supercoiling influence on *fooBp* activity.

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype	$\beta$ -galactosidase activity <sup>a</sup> , <sup>b</sup> (Miller units)	% of $\beta$ -galactosidase activity (mutant to wild-type)
<i>fooIB-lacZ</i> fusion			
<b>FooI in cis</b>			
MT008	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	1516 ± 268	<b>100</b>
MT009	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	939 ± 262	<b>62</b>
MT010	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	425 ± 187	<b>28</b>

<sup>a</sup> The  $\beta$ -galactosidase-specific activities measurements and the growth of cultures were done as described in the “Material and Methods” section.

<sup>b</sup> Mean and standard deviation were calculated with the data of at least three independent cultures.

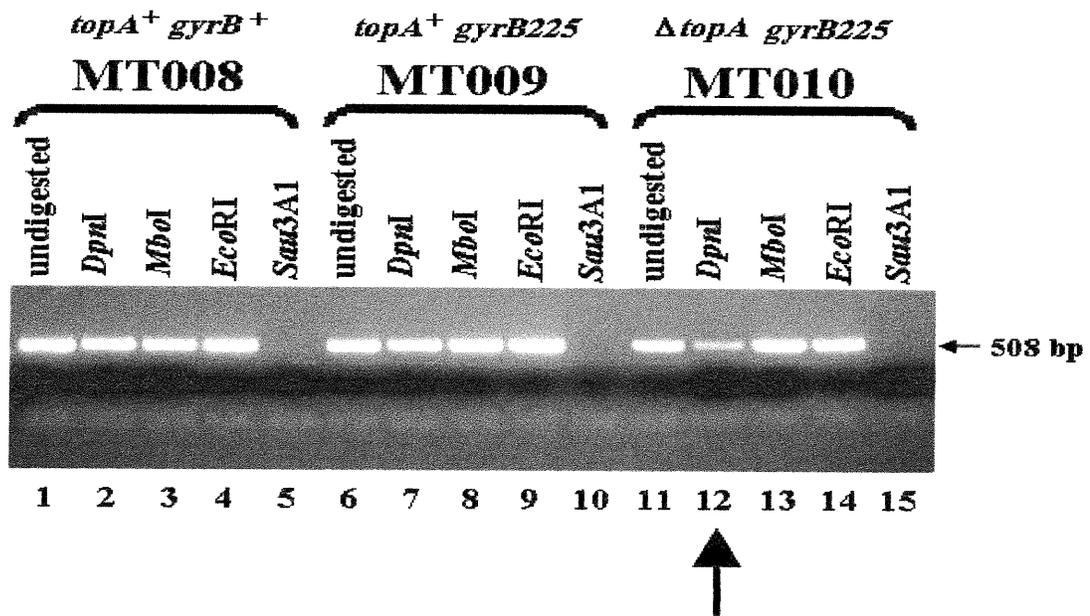
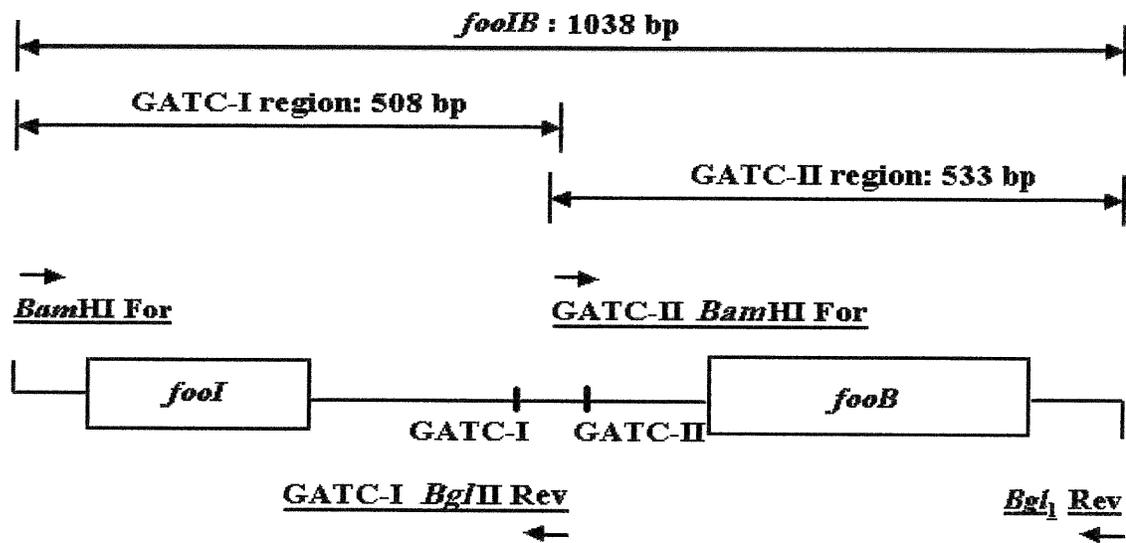
**Table III.** DNA supercoiling influence on *foo* phase variation.

Strain	Colony			Switch frequency ( $\alpha$ or $\beta$ ) <sup>a</sup> (/cell/generation)			
	Phenotype	Total	Lac <sup>+</sup> / Lac <sup>-</sup>	Lac <sup>+</sup> %	Mean Lac <sup>+</sup> %	Value	Average mean
<b>MT008</b> <i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>  g = 25,70	1 <sup>st</sup> DB	938	936 DB/ 2 W	99,79	<b>99,75</b>	$\beta = 8,30 \times 10^{-5}$	<b><math>\beta = 7,37 \times 10^{-5}</math></b>
	2 <sup>nd</sup> DB	844	841 DB/ 3 W	99,64		$\beta = 1,38 \times 10^{-4}$	
	3 <sup>rd</sup> DB	231	231 DB/ 0 W	100,00		$\beta = 0$	
	1 <sup>st</sup> W	716	713 DB/ 3 W	99,58	<b>99,63</b>	$\alpha = 3,87 \times 10^{-2}$	<b><math>\alpha = 3,87 \times 10^{-2}</math></b>
	2 <sup>nd</sup> W	4268	4254 DB/ 14 W	99,67		$\alpha = 3,88 \times 10^{-2}$	
	3 <sup>rd</sup> W	1168	1162 DB/ 6 W	99,49		$\alpha = 3,87 \times 10^{-2}$	
<b>MT009</b> <i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> 225  g = 22,82	1 <sup>st</sup> DB	2716	2646 DB/ 70 LB	97,42	<b>98,04</b>	$\beta = 1,13 \times 10^{-3}$	<b><math>\beta = 6,82 \times 10^{-4}</math></b>
	2 <sup>nd</sup> DB	833	826 DB/ 7 LB	99,16		$\beta = 3,68 \times 10^{-4}$	
	3 <sup>rd</sup> DB	1051	1038 DB/ 13 LB	98,76		$\beta = 5,49 \times 10^{-4}$	
	1 <sup>st</sup> W	306	300 DB/ 6 LB	98,04	<b>88,70</b>	$\alpha = 4,30 \times 10^{-2}$	<b><math>\alpha = 3,61 \times 10^{-2}</math></b>
	2 <sup>nd</sup> W	641	626 DB/ 15 LB	97,66		$\alpha = 4,28 \times 10^{-2}$	
	3 <sup>rd</sup> W	230	118 DB/ 112 LB	51,30		$\alpha = 2,25 \times 10^{-2}$	
<b>MT010</b> <i><math>\Delta</math>topA</i> <i>gyrB</i> 225  g = 19,51	1 <sup>st</sup> DB	1565	1433 DB/ 1 W + 131 LB	91,57	<b>72,63</b>	$\beta = 4,32 \times 10^{-3}$	<b><math>\beta = 9,23 \times 10^{-3}</math></b>
	2 <sup>nd</sup> DB	1601	1493 DB/ 108 MB	93,25		$\beta = 3,46 \times 10^{-3}$	
	3 <sup>rd</sup> DB	5481	3354 DB/ 2 W + 1 LB + 2124 MB	61,19		$\beta = 1,99 \times 10^{-2}$	
	1 <sup>st</sup> W	968	789 DB/ 1 LB + 178 MB	81,51	<b>85,40</b>	$\alpha = 4,18 \times 10^{-2}$	<b><math>\alpha = 4,31 \times 10^{-2}</math></b>
	2 <sup>nd</sup> W	246	205 DB/ 41 MB	83,33		$\alpha = 4,27 \times 10^{-2}$	
	3 <sup>rd</sup> W	2478	2159 DB/ 319 MB	87,13		$\alpha = 4,47 \times 10^{-2}$	

<sup>a</sup> The Lac<sup>-</sup> to Lac<sup>+</sup> switch frequency is designated  $\alpha$  and the Lac<sup>+</sup> to Lac<sup>-</sup> switch frequency is designated  $\beta$ . The switch frequency is calculated by the formula  $(M/N)/g$ , where  $M$  is the number of cells that underwent a phase variation,  $N$  is the total number of cells evaluated, and  $g$  is the total number of generations.

<sup>b</sup> White (W), light (LB) and medium blue (MB) colonies were considered to be of Lac<sup>-</sup> phenotype and mostly composed of cells in OFF phase; dark blue (DB) colonies were considered to be of Lac<sup>+</sup> phenotype and mostly composed of cells in ON phase.

<sup>c</sup> For details about the procedure concerning the phase transition rate calculation, see “Material and Methods” section.



Mean PCR intensity ratios

Strains	<i>Eco</i> RI/undigested	<i>Dpn</i> I/undigested	<i>Mbo</i> I/undigested
MT008	1,04	0,98	0,97
MT009	0,99	0,99	1,05
MT010	1,11	<b>0,64</b>	1,13

**Figure 3.** DNA supercoiling level influence on the methylation pattern of GATC-I site in *foolB* regulatory region in  $\Delta topA$  mutant background.

PCR reactions were performed on chromosomal DNA with a pair of primers for the region covering the GATC-I site (508 pb fragment) as described under “Material and methods”. *DpnI*: cuts methylated GATC sites; *MboI* cuts non-methylated GATC sites; *EcoRI*: digestion negative control in *foolB* region; and *Sau3A I*: digestion positive control that cuts both methylated and unmethylated GATC sites. The scheme shows the annealing of the primers on *foolB* region and the length of the PCR products (**top**). For details about the sequence of each primer, see “Material and Methods” section. An arrow (**middle, lane 12**), and bold characters (**bottom**) show the PCR results indicating a higher methylation ratio at GATC-I site in MT010 ( $\Delta topA$  *gyrB225*) double mutant than in MT008 ( $topA^+$  *gyrB^+*) and MT009 ( $topA^+$  *gyrB225*) strains.

**Table IV.** Effects of *FooI* absence on *fooBp* activity.

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype	$\beta$ -galactosidase activity <sup>a, b</sup> (Miller units)	% of $\beta$ -galactosidase activity (mutant to wild-type)	% of $\beta$ -galactosidase activity ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> to <i>FooI</i> <sup>-</sup> ) <sup>d</sup>
<i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> fusion <sup>c</sup>				
<b><i>FooI</i></b>				
MT067	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	668 $\pm$ 66	100	<b>44</b>
MT068	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	523 $\pm$ 191	78	<b>56</b>
MT069	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	354 $\pm$ 33	53	<b>83</b>

<sup>a</sup> The  $\beta$ -galactosidase-specific activities measurements and the growth of cultures were done as described in the “Material and Methods” section.

<sup>b</sup> Mean and standard deviation were calculated with the data of at least three independent cultures.

<sup>c</sup> For the description of *fooIp-fooBpB-lacZ* fusion, see “Material and Methods” section.

<sup>d</sup> Percentages calculated by comparison with the  $\beta$ -galactosidase-specific activities of *FooI*<sup>+</sup> strains presented in Table II, with respect to topoisomerase background, i.e. MT008 with MT067, MT009 with MT068, and MT010 with MT069.

**Table V.** Effects of FooI presence in *cis* or in *trans* on *fooBp* activity.

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype	Plasmids present	$\beta$ -galactosidase activity <sup>a, b</sup> (Miller units)	% of $\beta$ -galactosidase activity (mutant to wild-type)
<b><i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> fusion<sup>c</sup></b>				
<b>FooI in <i>trans</i><sup>d</sup></b>				
MT079	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT021 (FooI <sup>+</sup> )	938 ± 56	100
MT080	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT021 (FooI <sup>+</sup> )	369 ± 140	39
MT081	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT021 (FooI <sup>+</sup> )	134 ± 39	14
<b>Negative control</b>				
<b><i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> fusion<sup>c</sup></b>				
<b>FooI<sup>-</sup></b>				
MT088	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT020 (vector control)	256 ± 56	100
MT089	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vector control)	396 ± 110	155
MT090	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vector control)	242 ± 83	95
<b>Negative control</b>				
<b><i>fooIB-lacZ</i> fusion</b>				
<b>FooI in <i>cis</i></b>				
MT076	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT020 (vector control)	882 ± 148	100
MT077	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vector control)	422 ± 96	48
MT078	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vector control)	105 ± 24	12

<sup>a</sup> The  $\beta$ -galactosidase-specific activities measurements and the growth of cultures were done as described in the “Material and Methods” section.

<sup>b</sup> Mean and standard deviation were calculated with the data of at least three independent cultures.

<sup>c</sup> For the description of *fooIp-fooBpB-lacZ* fusion, see “Material and Methods” section.

<sup>d</sup> FooI activator was expressed in *trans* on pMT021. Because a *lacI*<sup>q</sup> deletion is found in the DM800 derivatives used in this work, the *lacI*<sup>q</sup> gene from pTrc99A (Pharmacia Biotech) is provided on pMT020 (vector control) and pMT021 medium copy number plasmids. For a description of these vectors, see “Material and Methods” section.

**Table VI.** Analysis of the effects of *FooI* presence in *cis* or in *trans* on *fooBp* activity.

<i>E. coli</i> strain	<i>FooI</i> phenotype	% of $\beta$ -galactosidase activity (compared to <i>FooI</i> in <i>cis</i> <sup>b</sup> )
<b><i>topA</i><sup>+</sup> <i>gyrB</i><sup>+</sup></b>		
MT008	<i>FooI</i> in <i>cis</i>	100
MT067 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	44
MT076	<i>FooI</i> in <i>cis</i>	100
MT079 <sup>a, b</sup>	<i>FooI</i> in <i>trans</i>	106
MT088 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	29
<b><i>topA</i><sup>+</sup> <i>gyrB225</i></b>		
MT009	<i>FooI</i> in <i>cis</i>	100
MT068 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	56
MT077	<i>FooI</i> in <i>cis</i>	100
MT080 <sup>a, b</sup>	<i>FooI</i> in <i>trans</i>	87
MT089 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	94
<b><math>\Delta</math><i>topA</i> <i>gyrB225</i></b>		
MT010	<i>FooI</i> in <i>cis</i>	100
MT069 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	83
MT078	<i>FooI</i> in <i>cis</i>	100
MT081 <sup>a, b</sup>	<i>FooI</i> in <i>trans</i>	128
MT090 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	230

<sup>a</sup> For the description of *fooIp-fooBpB-lacZ* fusion, see “Material and Methods” section.

<sup>b</sup> *FooI* activator was expressed in *trans* on pMT021. Because a *lacI*<sup>q</sup> deletion is found in the DM800 derivatives used in this work, the *lacI*<sup>q</sup> gene from pTrc99A (Pharmacia Biotech) is provided on pMT020 vector control and pMT021 medium copy number plasmids. For a description of these vectors, see “Material and Methods” section.

**Article 2**

**Divergent Transcription Influences *fooBp* Activity in *Escherichia coli foo* Operon: the Strong *trcp* Counteracts the Requirement for FooI Activator Protein in *topA*<sup>+</sup> Strains and *tetA* Expression Overcomes the Effect of *gyrB225* Mutation.**

**Running title:** Regulation of *E. coli* F165 fimbriae

**Key words:** *E. coli*, fimbriae, regulation, DNA supercoiling, divergent transcription

**Subject category:**

**Marie-Catherine Tessier<sup>1</sup>, Marc Drolet<sup>2</sup>, Christine Martin<sup>3</sup>, Josée Harel<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Département de pathologie et microbiologie, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6.

<sup>2</sup>Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

<sup>3</sup>Laboratoire de microbiologie, INRA Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Author for correspondence: Josée Harel. Tel: +1 450 773 8521 ext. 8233

Fax: +1 450 778 8108

E-mail: josee.harel@umontreal.ca

**Abstract**

Previous results indicate that both global and local supercoiling level modifications influence *foo* operon expression, encoding F165<sub>1</sub> (Prs-like) fimbriae. Moreover, *fooI* divergent transcription has an inhibiting effect on *fooBp* activity in a  $\Delta topA$  strain. The *fooBp* responsiveness to local negative supercoiling generated by *tetA* divergent transcription, which is under *trcp* control, was studied using a chromosomal fusion with *lacZ* reporter gene in isogenic strains harboring *topA* and/or *gyrB* mutations. First, the substitution of the divergently arranged *fooIp* native promoter by the stronger *trcp* promoter importantly increased the *fooBp* transcriptional expression in all isogenic strains. Second, *tetA* divergent transcription appears to counteract the *gyrB225* mutation negative impact on *fooBp* transcriptional activity. It seems that the lower global level of negative supercoiling found in *gyrB225* mutants is locally compensated by *tetA* divergent transcription, which is thought to generate an important amount of negative supercoils in the regulatory region. Moreover, the higher local supercoiling level found when *trcp* and *tetA* are divergently oriented to *fooBp* promoter overcomes its requirement for FooI activator protein in the *foo* operon phase variation mechanism, accordingly to the *pap* model. This suggests that local changes in DNA topology alter DNA-protein and protein-protein interactions in the *foo* regulatory region and that a higher negative supercoiling level alters the repressive mechanism of fimbrial expression.

**Key words:** *E. coli*, fimbriae, regulation, DNA supercoiling, divergent transcription.

## Introduction

Fimbrial gene expression, as in many other virulence genes, is not constitutive. It is subjected to two transcriptional control mechanisms, which are superimposed and are governed by many *trans*-regulators. The regulation of basal transcription determines the level of fimbrial antigens at the surface of a single cell, while the phase variation mechanism regulates the percentage of bacteria in a colony expressing fimbriae. The fimbrial phase variation phenomenon refers to the switch between fimbriated (ON) and non-fimbriated (OFF) states<sup>28</sup>. The expression of F165<sub>1</sub> fimbriae, encoded by *foo* operon, is under phase variation control and is affected by different environmental factors<sup>9, 22</sup> (minireview<sup>11</sup>). Many characteristics found in other fimbrial operon members of the P regulatory family are also shared by the *foo* regulatory region<sup>9, 22</sup>. These include the divergently transcribed *fooI* and *fooB* genes (respectively homologous to *papI* and *papB*); two GATC sites separated by 102 bp, targets of differential Dam methylation; and putative CRP, PapB (in this case FooB) and Lrp binding sites. The F165<sub>1</sub> antigen (Prs-like; 18,5 kDa) is related to F11 (P-like) and bears a class III G-adhesin similar to Prs (F13, P-like) with slightly different binding capacities<sup>31</sup>. F165<sub>1</sub> is produced by *E. coli* isolates associated with septicemia in piglets (like strain 4787), calves<sup>7, 18</sup> and humans<sup>6</sup> which could play a role in the process of pathogenesis<sup>8, 35</sup>.

Environmental conditions (temperature, nutrients, osmolarity), global regulators like CRP (catabolite responsive protein), Lrp (leucine responsive protein), and Dam (deoxyadenosine methylase)<sup>28</sup> as well as DNA topology modulate *foo* fimbrial operon expression<sup>8, 9</sup> (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>). The expression of several bacterial virulence genes is regulated through the level of DNA supercoiling, which can influence transcriptional activity<sup>13, 16</sup>. In addition, DNA topology is influenced by environmental conditions<sup>13, 14</sup> such as temperature, pH, anaerobic conditions, high osmolarity, nutrient-poor media, and [ATP]/[ADP] ratio. Therefore, in pathogenic bacteria, the expression of virulence genes might be modulated by environmental signals through alterations in the level of DNA supercoiling<sup>13, 25, 36</sup>.

DNA topoisomerases are involved in several processes related to DNA (replication, transcription, recombination, etc.<sup>16</sup>) (MicroReview<sup>29</sup>). An equilibrium in the DNA supercoiling level is essential for bacterial survival. In *E. coli*, this is achieved by the antagonistic activities of topoisomerases I, IV and gyrase<sup>48</sup>. Topoisomerase I (encoded by *topA*) introduces positive supercoils, gyrase (or topoisomerase II, encoded by *gyrA* and *gyrB*) generates negative supercoiling, while topoisomerase IV (encoded by *parC* and *parE*) relaxes negative supercoils<sup>48</sup>. The topoisomerase I acts locally as a transcription factor by relaxing hypernegative supercoiling, and prevents extensive R-loop formation in *topA* null mutants in the presence of gyrase<sup>15, 23, 32, 38</sup>. DM800 derivatives have acquired compensatory mutations in response to the absence of topoisomerase I, like *gyrB225* and possibly one other unknown mutation<sup>12</sup>.

In bacteria, transcription initiation at several promoters<sup>12, 40</sup> as well as some repressor-operator interactions are under the influence of the state of DNA negative supercoiling (MiniReview<sup>10</sup>). The DNA template superhelicity could facilitate RNA polymerase binding to promoters and open complex formation. Moreover, transcription itself influences local DNA topology, first by RNA polymerase causing DNA bending, at initiation by the formation of the open complex but also during elongation<sup>10</sup>.

According to the twin-supercoiled domain model, transcriptional elongation leads to the creation of positive and negative supercoiling domains respectively ahead and behind the RNA polymerase complex<sup>27</sup>. These supercoils are relaxed by gyrase and topoisomerase I respective activities. A transcriptional coupling might exist between divergently arranged promoters: the transcription-induced local supercoiling generated at one promoter could influence the activity of a nearby superhelicity sensitive promoter<sup>27</sup>. An example of this is found in the *E. coli ilvYC* operon, in which *ilvYp* and *ilvCp* divergent promoters are subjected to a transcriptional coupling DNA supercoiling-dependent where both global and transcriptionally generated local superhelical density are implicated<sup>42</sup>. This amount of transcription-induced negative supercoiling is proportional to the promoter strength and to length of the transcripts<sup>37</sup>. Even though divergently arranged operons are quite common in prokaryotes<sup>1</sup>, this does not necessarily mean that a regulatory or a physiological relationship exists between them.

The *leu-500p* activation is achieved through the increase of local negative supercoiling level above the normal levels, what is a typical result of *topA* mutations<sup>4, 34, 47</sup>. The analysis of *leu-500p* activity on the chromosome revealed that, in *topA* mutants, transcription from a *tetA* cassette divergently arranged to *leu* operon caused the stimulation of *leu-500p*, and stimulation was detected as far as 2 kb away. In addition, it appears that the transcription-induced positive and negative supercoils can diffuse along the chromosome and, accordingly to their topological sign, lead to opposite *leu-500p* responses<sup>17</sup>. The *leu-500* mutation suppression is also possible in *topA*<sup>+</sup> strains due to the promoter relay mechanism initiated by *ilvIH* transcriptional activity<sup>20</sup> located at 1,9 kb upstream *leu-500p*<sup>19, 47</sup>. Both short distance (< 400 pb)<sup>5, 20</sup> and long distance (up to 1,9 kb<sup>19, 47</sup>, and even 3 kb<sup>44</sup>) interactions involving transcription-induced supercoiling influence on *leu-500p* activation were observed<sup>44, 47</sup>. In contrast to the short distance effects, long distance effects appear to be mediated by DNA sequence determinants located in the region between these promoters<sup>47</sup>.

The divergent orientation of *fooIp* and *fooBp* promoters suggests the possibility of a DNA supercoiling-dependent transcriptional coupling between them. It was earlier observed that the expression of the *foo* operon is responsive to both global and local supercoiling levels<sup>9</sup>, that the expression of *Fool* and *fooI* divergent transcription exert a negative influence on *fooBp* activity in  $\Delta topA$  strain (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>), and that *tetA* transcription affects *fooBp* promoter activity in *topA* mutant<sup>9</sup>. It is now known that *tetA* encodes a membrane-bound protein causing transcription induced hypernegative supercoiling of plasmid DNA in *topA* mutants<sup>30</sup>.

The responsiveness of *fooBp* to the local negative supercoiling generated by the divergent transcription of *tetA*, under the control of the promoter *trcp*, was investigated using a single copy chromosomal fusion with *lacZ* in isogenic strains harboring *topA* and/or *gyrB* mutations. It was found that both *trcp* promoter strength and *tetA* transcript length act positively on transcriptional activation from *fooBp*. In particular, it was observed that the strong *trcp* promoter counteracts the *fooBp* activational requirement for the regulator *Fool* in *topA*<sup>+</sup> strains and that the expression of *tetA* expression overcomes the effect of a *gyrB225* mutation on the activation of *fooBp*.

## Material and methods

### Culture media

Luria-Bertani (LB) and M9 broth and agar were prepared as described previously by Miller<sup>33</sup>. M9 minimal media was supplemented with, at the following final concentrations: D-glucose and glycerol at 0,2% each; 0,4% glycerol; 40 µg/mL of amino acids cysteine (Cys), L-arginine (Arg), L-hydroxyproline (Pro), L-glycine (Gly), L-isoleucine (Ile) and L-valine (Val); 20 µg/mL uracil (Ura); 0,0005% thiamine hydrochloride (B1) (Thi). Ura was provided because of a pyrimidine starvation due low *pyrE* expression levels caused by an *rph* frameshift mutation in a *E. coli* K12 strain W3110, of which DM800 is a derivative<sup>24, 45</sup>. For MC4100<sup>2</sup>, TOP10 (Invitrogen) and Mew 60 (*dam::Tn5*)<sup>9</sup> derivative strains, when required, antibiotics were added, at these final concentrations: 10 µg/mL Tet; 50 µg/mL Km; 50 µg/mL Amp. Since DM800 derivative strains carry the *acrA13* mutation<sup>12</sup> that renders these strains more permeable to many antibiotics, the following antibiotics were used at these final concentrations: 3,33 µg/mL Tet; 16,67 µg/mL Km. When necessary X-Gal was added at 40 µg/mL final concentration.

### Plasmid fusions

The fusion *fooIB-lacZYA* comprises the whole *foo* regulatory region of *E. coli* 4787 strain (GenBank: L07420), including *fooI* and *fooB* genes, divergently transcribed, and the whole intercistronic region. Using *Taq* polymerase (Life Technologies Inc.), PCR reactions with primers including *Bam*HI or *Bgl*II sites were done to amplify *fooIB*. The restriction sites added for cloning are indicated in bold characters in the sequences of primers described in this section. The 1038 pb *fooIB* PCR fragment (the whole regulatory region, containing *fooIp-fooI-fooBpB*) was obtained with *Bam*HI For (5'-**GGA TCC** TTT TAT CTG TTT CAG T-3') and *Bgl*I<sub>1</sub>Rev (5'-**AGA TCT** AAG GGC TTC TTT TTT T-3') primers.

To investigate the role of *tetA* divergent transcription on *fooBp* expression, a *tetA-trcp-fooBpB-lacZYA* fusion was made. In this fusion, *tetA* expression is under *trcp* control (IPTG inducible but DM800 strains have a *lacI<sup>r</sup>* mutation), divergently oriented to *fooBp*, and it comprises the whole *foo* intercistronic region and *fooB* gene from *E. coli* 4787 strain (GenBank: L07420). Thus, in this fusion, *fooIp-fooI* was replaced by *trcp-tetA*.

Using Taq polymerase (Life Technologies Inc.), PCR reactions with primers including *Bam*HI or *Bgl*II sites were done to amplify *foo* DNA from strain 4787 (GenBank: L07420), *tetA* gene from pACYC184<sup>3</sup>, and *trcp* from pTrc99A (Pharmacia Biotech). The restriction sites added for cloning are indicated in bold characters in the sequences of primers described in this section. The PCR products were cloned into pGEM<sup>®</sup>-T vector (Promega). The 721 bp FooBBS (the regulatory region deleted of *fooIp-fooI*, containing the whole intercistronic region and *fooBp-fooB*) PCR fragment was obtained with FooBBS For (5'-**GGA TCC** ATC AAC GGA AAG GTA T-3') and *Bgl*<sub>1</sub>Rev (5'-**AGA TCT** AAG GGC TTC TTT TTT T-3') primers. This FooBBS was already inserted into pRS551 *Bam*HI site<sup>43</sup>, where *lacZ* reporter gene was under the control of *fooBp* promoter (Figure 1). A construct *trcp-tetA* fusion was cloned into the *Bam*HI site of FooBBS fragment, in the opposite orientation of the *fooBp* promoter. To do this, the 1191 pb PCR fragment of *tetA* ORF from pACYC184<sup>3</sup> containing *Bam*HI and *Bgl*II sites was obtained with TetA For (5'-**GGA TCC** GCG GTA GTT TAT-3') and TetA Rev (5'-**AGA TCT** AAT CCG TTA GCG AGG-3') primers. A 295 bp *trcp* amplicon was obtained with PTrc For (5'-**GGA TCC** GAT CTG GTT TGA-3') and PTrc Rev (5'-**AGA TCT** CCG AGC TCG AAT-3') primers. The *tetA* gene was then inserted into the *Bam*HI site of the *trcp* PCR product. The *tetA-trcp-fooBpB-lacZYA* fusion was thus constructed. Similar steps were involved to create a fusion lacking the *tetA* gene named *trcp-fooBpB-lacZYA* fusion except the *tetA* gene was not included. This latter fusion was used as a *tetA*<sup>-</sup> negative control. In the *trcp-fooBpB-lacZ* fusion, the binding sites of the RNA polymerase in *trcp* promoter are intact. The divergent transcription from *trcp* promoter was blocked by four tandem repeats of the rho-independent transcriptional terminator *rrnBT*<sub>1</sub> in pRS551 plasmid<sup>43</sup>.

The clones were verified by Sanger sequencing. Electrotransformation was used to perform the cloning experiments in TOP10 strain (Invitrogen) and all plasmid intermediates were analysed by restriction analysis and PCR.

The fusion *fooIB-lacZYA* was used as positive control and it comprises the whole *foo* regulatory region of *E. coli* 4787 strain (GenBank: L07420), including *fooI* and *fooB* genes, divergently transcribed, and the whole intercistronic region (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>). As a *trcp*<sup>-</sup> negative control, the *fooIp-fooBp-fooB-lacZYA* fusion, where transcription elongation from *fooIp* was abolished (identical to *fooIB-lacZYA* fusion but without *fooI* gene) (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>), was used. In the *fooIp-fooBpB-lacZ* fusion, where *fooI* gene is absent, the binding of the RNA polymerase to *fooIp* promoter remains unaffected. The divergent transcription from *fooIp* promoter was blocked by four tandem repeats of the rho-independent transcriptional terminator *rrnBT*<sub>1</sub> provided by pRS551 plasmid<sup>43</sup>. In all those fusions, *lacZ* reporter gene is under the control of *fooBp* promoter (Figure 1).

### Chromosomal insertion of fusions

All  $\lambda$ RS45<sup>43</sup> recombinant phages were obtained by lytic growth in MC4100<sup>2</sup> transformant strains containing the pRS551<sup>43</sup> derivative plasmid fusions, pMT017 (*tetA-trcp-fooBpB-lacZ*) and pMT016 (*trcp-fooBpB-lacZ*). MC4100  $\lambda$  lysogens (with a single prophage integration) were then produced, induced and amplified to obtain, respectively, recombinant  $\lambda$ MT04 (*tetA-trcp-fooBpB-lacZ*) and  $\lambda$ MT05 *trcp-fooBpB-lacZ* phage stocks (Table I). These recombinant  $\lambda$  phages then lysogenized strains PH613, PH615 and PH617 (Table I). All the fusions were done as described by Simons *et al.*<sup>43</sup>. Single prophage integration was verified by PCR, as described by Powell *et al.*<sup>39</sup>, on overnight cultures in LB broth washed twice in sterile water. Amplification was done in a total volume of 50  $\mu$ L containing 10  $\mu$ L of template DNA, each of the primers at 50 mM, the four dNTPs (each at 200  $\mu$ M), 1X of PCR buffer (Life Technologies Inc.), and 2 U of *Taq* DNA polymerase (Life Technologies Inc.). PCR, using a PE 2400 or 9700 thermal cycler (Perkin Elmer), was done under the following conditions: 1 min of denaturation at 95° C followed by 25 cycles (denaturation at 95° C for 1 min, annealing at 56° C for 1 min, extension at 72° C for 1 min) and a final extension at 72° C for 5 min. Amplification products (10  $\mu$ L) were visualised on 2% agarose containing ethidium bromide.

### Assay of $\beta$ -galactosidase activity

DM800<sup>12</sup> derivative bacterial cultures (Table I) were grown in M9 minimal broth<sup>33</sup> containing Cys, Arg, Pro, Gly, Ile, Val, Ura, Thi (B1) and the required antibiotics. Cultures were first inoculated, from  $-80^{\circ}$  C glycerol stocks, on LB agar plates containing Cys, X-Gal and antibiotics, and grown overnight at  $37^{\circ}$  C. Colonies were used to inoculate 5 mL of M9 broth supplemented with 0,2% glycerol 0,2% glucose and all the required factors and the appropriate antibiotics. The cultures were grown approximately 16 hours at  $37^{\circ}$  C at 150 rpm in Rosi 1000 incubator. These pre-cultures were diluted 20 fold and grown to logarithmic phase (O.D.<sub>600</sub> 0,5 to 0,7) in 5 mL of M9 0,4% glycerol broth and grown at  $37^{\circ}$  C at 150 rpm in Rosi 1000 incubator. The  $\beta$ -galactosidase assays were done according Miller's method<sup>33</sup>. At least three assays were done for each strain in both with and without IPTG induction. Microsoft Ecel 2000 program was used to perform bilateral Student's-t test supposing unequal variances.

## Results

### Influence of *trcp* Divergent Promoter Strength on *fooBp* Activity

The *fooI* gene and its promoter were replaced by the *tetA* gene under *trcp* promoter. The presence of *trcp-tetA* increased the activity of *fooBp* in all strains, when compared to the *fooIB-lacZ* positive control (Tables II and III). Moreover, the presence of the *trcp* promoter is sufficient to increase the level of *fooBp* activity. The activity *fooBp* increased in the fusion *trcp-fooBpB-lacZYA* when compared to *fooIB-lacZYA* and *fooIp-fooBp-fooB-lacZYA* fusions, revealing the impact of the presence of *trcp* strength on *fooBp* promoter. In Table III, the activities of the  $\beta$ -galactosidase in *trcp*<sup>+</sup> strains (harboring *tetA-trcp-fooBpB-lacZYA* and *trcp-fooBpB-lacZYA* fusions) and in *fooIp*<sup>+</sup> control strains (harboring *fooIB-lacZYA* and *fooIp-fooBp-fooB-lacZYA* fusions) were compared.

In *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> strains, the LacZ levels were much higher in both *trcp*<sup>+</sup> strains MT070 (146%) and MT073 (120%), respectively to the LacZ expression levels of *fooIp*<sup>+</sup> positive control MT008 (100%) and to *fooIp*<sup>+</sup> negative control MT067 (44% of MT008). A more important increase in  $\beta$ -galactosidase activity was observed in *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strains, when both *trcp*<sup>+</sup> strains MT071 (217%) and MT074 (134%) were compared to *fooIp*<sup>+</sup> positive control MT009 (100%) and to *fooIp*<sup>+</sup> negative control MT068 (56% of MT009). As well, in the double mutant strains  $\Delta$ *topA gyrB225*, the LacZ expression was stronger in both *trcp*<sup>+</sup> strains MT072 (171%) and MT075 (181%), than in to *fooIp*<sup>+</sup> positive control MT010 (100%) and to *fooIp*<sup>+</sup> negative control MT069 (83% of MT010). The effect of *trcp* strength on *fooBp* activity is thus increased in topoisomerase mutant backgrounds (Table III).

In addition, it seems that the substitution of *fooIp* by *trcp* overcomes the requirement for the FooI activator, especially in *topA*<sup>+</sup> strains (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>). Among the strains not producing FooI, those harboring *trcp* had much higher expression levels from *fooBp* than those of strains harboring *fooIp* (Table III). In *topA*<sup>+</sup> strains, using the fusion *fooIp-fooBp-fooB-lacZYA* where FooI is absent, there is a 2 fold decrease in expression, when compared to the *fooIB-lacZYA* fusion where FooI is expressed. However, the absence of FooI does not decrease LacZ expression in *trcp*<sup>+</sup> strains harboring *tetA-trcp-fooBpB-lacZYA* and *trcp-fooBpB-lacZYA* fusions (Table III).

### ***tetA* Divergent Transcription Influence on *fooBp* Activity**

As revealed by the comparison of *tetA-trcp-fooBp-fooB-lacZ* fusion with *trcp-fooBp-fooB-lacZ* fusion (*tetA*<sup>-</sup> negative control), *fooBp* activity is positively influenced by the divergent transcription of *trcp-tetA* in both *topA*<sup>+</sup> isogenic strains (Table III: MT070 (146%) vs MT073 (120%); MT071 (217%) vs MT074 (134%)). In *topA*<sup>+</sup> strains, the effects of the transcription of *tetA* and of the strength of *trcp* are important, and they overcome the *fooBp* stimulatory requirement for F<sub>o</sub>oI activator protein (Table III: MT067 (44%); MT068 (56%)) (Tables II and III) (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>).

In the *gyrB225* mutant, the presence of the divergently oriented *trcp-tetA* fusion, relative to *fooBp*, apparently compensated for the decrease in the transcription level at *fooBp* previously noted in this background. In the *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* mutant, the  $\beta$ -galactosidase activity of the *trcp-tetA* fusion is almost similar to that of wild type (Table II: MT070 vs MT071) whereas the mutant strain harbouring the *fooIB-lacZ* fusion (positive control) showed only 62% of the LacZ level seen for the *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> strain (MT009 vs MT008). Therefore, the transcriptional activity of the supercoiling-sensitive *fooBp* can be restored by increasing the level of negative supercoiling. This is supported by the results obtained with *fooB-lacZ* expression, which was lower in *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* mutants than in wild type (Table II: MT073 vs MT074 (69%); MT068 vs MT067 (78%)).

In  $\Delta$ *topA gyrB225* double mutants, the presence of *trcp* increased the activity of *fooBp*; *fooBp* was apparently insensitive to *tetA*. Indeed, for  $\Delta$ *topA* mutants, similar low transcriptional levels from *fooBp*, comparatively to *topA*<sup>+</sup> strains, were obtained, irrespective of *tetA* presence (Tables II and III: MT072 and MT075). Therefore, *fooBp* activity appears insensitive to *tetA* expression in the absence of topoisomerase I, although the strong divergent promoter *trcp* stimulates *fooBp*.

## Discussion

Previous results showed that alterations of both global and local DNA supercoiling levels influence *foo* operon expression, which encodes F165<sub>1</sub> (Prs-like) fimbriae. Indeed, the decrease in the global negative supercoiling level due to *gyrB* mutations<sup>41</sup> and the local DNA distortion caused by *topA* mutations reduce the transcriptional activity at *fooBp*<sup>9</sup> (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>). High negative supercoiling levels caused by *tetA* gene transcription and translation in *topA* mutants<sup>30</sup> also influence *fooBp* activation<sup>9</sup>.

Divergent transcription from the strong promoter *trcp* positively influences *fooBp* activity. An important increase in *fooBp* activity was obtained by substituting the divergently arranged *fooIp* native promoter by the stronger *trc* promoter. Furthermore this arrangement overcomes the requirement of FooI activator (Tables II and III). The binding of RNA polymerase to the divergent promoter *trcp* and *fooBp* could interfere with the diffusion of the transcription-induced negative supercoils along the chromosome molecule<sup>27</sup>. According to this mechanism, in the presence of highly active *trcp*, there might be an important accumulation of negative supercoiling in the region between *trcp* and *fooBp* divergent promoters. This could locally increase the negative supercoiling to a level that in turn is favorable to a higher transcriptional activity from *fooBp*. Thus it appears that amount of transcription-induced supercoiling is proportional to promoter strength *in vitro*<sup>37</sup>.

The supercoiling-responsive promoter *leu-500p* is activated by divergent transcription of a *tetA* cassette located as far as 2 kb<sup>17</sup>. Similarly, the responsiveness of the superhelical-sensitive *fooBp* promoter to transcription-induced local negative supercoiling, originating from a divergently oriented *tetA* gene, was assessed. Although the spacing between *trcp* and *fooBp* (*trcp-fooBpB-lacZ* and *trcp-tetA-fooBpB-lacZ*) is 498 bp, *fooBp* supercoiling sensitive promoter should react to *tetA* divergent transcription. Since the *fooIp* and *fooBp* spacing is 257 bp in the *foo* native regulatory region, one might suspect that a transcriptional coupling might exist between them (Figure 1).

In all isogenic strains, an important increase in *fooBp* transcriptional expression is obtained by the substitution of the divergently arranged *fooIp* native promoter by the stronger *trcp* promoter which seems to overcome the *fooBp* requirement for FooI activator protein (Tables II and III). This confirms that the amount of transcription-induced supercoiling is proportional to promoter strength *in vitro*<sup>37</sup>. Thus, divergent transcription from a stronger promoter positively influences *fooBp* activation, although RNA polymerase rapidly encounters, in the *trcp-fooBpB-lacZ* fusion, the *rrnBT14* transcriptional terminators that are located just downstream the *trcp*. The binding of RNA polymerase to the divergent promoter *trcp* and *fooBp* could interfere with the diffusion of the transcription-induced negative supercoils along the chromosome<sup>27</sup>. According to this mechanism, with *trcp* high activity, there might be an important accumulation of negative supercoiling in the region between *trcp* and *fooBp* divergent promoters. This could locally increase the negative supercoiling to a level that is in turn favorable to a higher transcriptional activity from *fooBp*.

The introduction of *tetA* gene cassette, under *trcp* control, in an opposite orientation to *fooBp* further raised this latter activity in all *topA*<sup>+</sup> strains. When FooI is not present, *tetA* divergent transcription positively influences *fooBp* activity in *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> wild-type and *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* mutant strains. This is accordance with the level of transcription-induced supercoiling being proportional to transcripts length, *in vitro*<sup>37</sup>. Moreover, at *ilvYC* operon, a lower global supercoiling level is necessary for an optimal transcription from *ilvYp*, and transcription from *ilvCp* is higher<sup>37</sup>. Consequently, similarly to case of *ilvYC* operon, an increase in local supercoiling level caused by *tetA* divergent transcription would compensate for the lower global supercoiling level, attributable to *gyrB225* mutation, concerning *fooBp* stimulation in *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* mutants (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>). *In vitro*, the level of negative supercoiling created in the region between divergent promoters is proportional to the sum of global and transcriptionally-induced supercoiling<sup>37</sup>.

The promoter *fooBp* was shown to be sensitive to transcription-induced local negative supercoiling from a divergently oriented *tetA* gene. The introduction of *tetA* gene cassette, under *trcp* control, in the orientation opposite to *fooBp* increased the activity of *fooBp* in all *topA*<sup>+</sup> strains. Similarly, the supercoiling responsive promoter *leu-500p* is activated by

divergent transcription of a *tetA* cassette located as far as 2 kb<sup>17</sup>. *In vitro*, the level of negative supercoiling created in the region between divergent promoters is proportional to the sum of global and transcriptionally-induced supercoiling<sup>37</sup>. Moreover, for the *ilvYC* operon, a lower global supercoiling level is necessary for an optimal transcription from *ilvYp* as well as a higher transcriptional activity from *ilvCp*<sup>37</sup>. In the same way, an increase in local supercoiling level caused by *tetA* divergent transcription would compensate for the lower global supercoiling level, due to *gyrB225* mutation, concerning *fooBp* stimulation in *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* mutants (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>).

The influence of *tetA* divergent transcription was independent of FooI in wild-type and *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* strains. The FooI is an activator protein homologous to I regulators involved in phase variation of fimbriae, such as Pap. The non-requirement of FooI suggests that local changes in DNA topology by transcription-induced negative supercoiling may alter DNA-protein and protein-protein interactions in the *foo* regulatory region. Not only does the higher local negative supercoiling level interferes with these interactions but it also largely compensates for their loss since it increases *fooBp* transcriptional activity above the level normally obtained with the native *fooIB* regulatory region in a wild-type supercoiling context. Similar results were found in  $\Delta topA$  *gyrB225* strains, which are also quite independent towards FooI activator presence (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>).

In the  $\Delta topA$  *gyrB225* double mutant, the replacement of *fooIp* by *trcp* increases the activity of *fooBp*. However, in this background, *fooBp* remains apparently insensitive to the expression of *tetA* (Table II and III). In a topoisomerase I negative background ( $\Delta topA$ ), there would be an accumulation of negative supercoiling in the intercistronic region such that negative supercoils generated locally by the divergent transcription of *tetA* cannot furthermore influence *fooBp* activity. The insensitivity of *fooBp* to the influence of *tetA*, in the double mutant strain is explained by a lower global DNA negative supercoiling level due to a reduced gyrase activity (*gyrB225*) but also by a higher local negative supercoiling level caused by the absence of topoisomerase I ( $\Delta topA$ ). The changes in DNA supercoiling levels appear to interfere with the DNA-regulators and protein-protein interactions required for the activation of *foo* expression but also with its phase variation repressive mechanism,

particularly in  $\Delta topA$  mutants (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *in preparation*<sup>46</sup>).

## Conclusion

These results suggest a possible mechanism of a transcriptional coupling between *fooBp* and divergent strong promoters such as *trcp* but not with the weak promoter *fooIp*. The relative insensitivity of *fooBp* towards divergent transcription from *fooIp* may allow *fooBp* to modulate its activity according to environmental changes through wild-type levels of chromosome supercoiling. This is interesting in the context of the chromosomal location of pathogenicity islands (PAIs)<sup>21</sup>. Indeed, in *E. coli* 4787, the *foo* operon is part of a PAI, PAI I<sub>4787</sub>, which is located at approximately 94 min on *E. coli* chromosome, near the *pheU* tRNA gene (unpublished results of H. Dezfulian, I. Batisson, J.M. Fairbrother, P.C.K. Lau, G. Szatmari and J. Harel). Therefore, the sensitivity of virulence determinants to DNA supercoiling levels would constitute an adaptative response for a successful achievement of host colonization and infection.

**Acknowledgements**

This work was supported in part by grant to J.H. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (OGP0025120), M.D., and by a NATO grant to C.M. M.-C.T. was funded by a scholarship from NSERC.

## References

1. **Beck, C. F., and R. A. Warren.** 1988. Divergent promoters, a common form of gene organization. Review. *Microbiological Reviews* **52**: 318-326.
2. **Casadaban, M. J.** 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**: 541-555.
3. **Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1156.
4. **Chen, D., S. Bachellier, and D. M. J. Lilley.** 1998. Activation of the *leu-500* promoter by a reversed polarity *tetA* gene. *J. Biol. Chem.* **273**: 653-659.
5. **Chen, D., R. Bowater, and D. M. J. Lilley.** 1993. Activation of the *leu-500* promoter: a topological domain generated by divergent transcription in a plasmid. *Biochem.* **32**: 13162-13170.
6. **Cherifi, A., M. Contrepois, N. Picard, P. Goulet, J. de Rycke, J. M. Fairbrother, and J. Barnouin.** 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicaemia. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**: 279-284.
7. **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.* **59**: 319-324.
8. **Daigle, F., C. M. Dozois, M. Jacques, and J. Harel.** 1997. Mutations in the *fl65<sub>1A</sub>* and *fl65<sub>1E</sub>* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microb. Pathogen.* **22**: 247-252.
9. **Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M.-C. Tessier, H. Dezfulian, and J. Harel.** 2000. Effects of environmental conditions and global regulatory proteins on regulation of F165<sub>1</sub> (Prs-like) and F165<sub>2</sub> (F1C-like) fimbrial expression in *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Res. Microbiol.* **151**: 563-574.
10. **deHaseth, P. L., M. L. Zupancic, and M. T. Record, Jr.** 1998. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. MiniReview. *J. Bacteriol.* **180**: 3019-3025.
11. **Dezfulian, H., C. Crost, and J. Harel.** 2001. A mini review on F165 fimbriae. *Recent Res. Devel. Microbiol.* **5**: 123-137.
12. **DiNardo, S., K. A. Voelkel, R. Sternglanz, A. E. Reynolds, and A. Wright.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**: 43-51.
13. **Dorman, C. J.** 1995. Fleming Lecture. DNA topology and the global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. *Microbiol.* **141**: 1271-1280.
14. **Drlica, K.** 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **6**: 425-433.
15. **Drolet, M., P. Phoenix, R. Menzel, E. Massé, L. F. Liu, and R. J. Crouch.** 1995. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli*  $\Delta$ *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3526-3530.
16. **Drolet, M., H.-Y. Wu, and L. F. Liu.** 1994. Roles of DNA topoisomerases in transcription. *Adv. Pharmacol.* **29A**: 134-146.

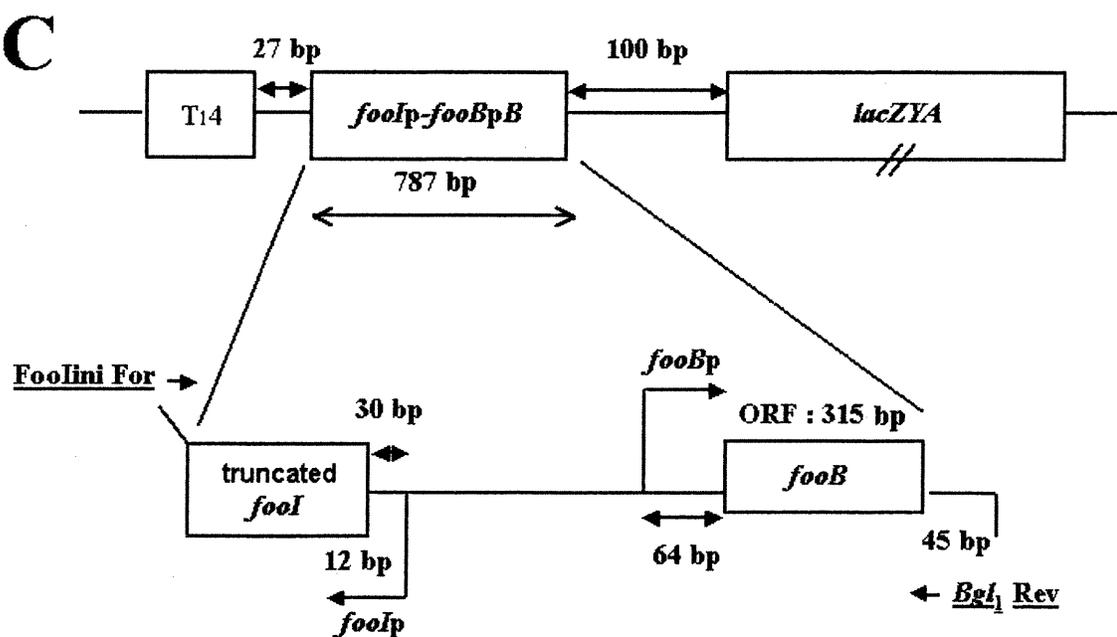
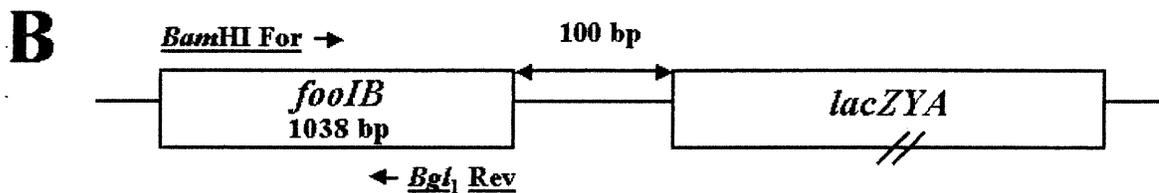
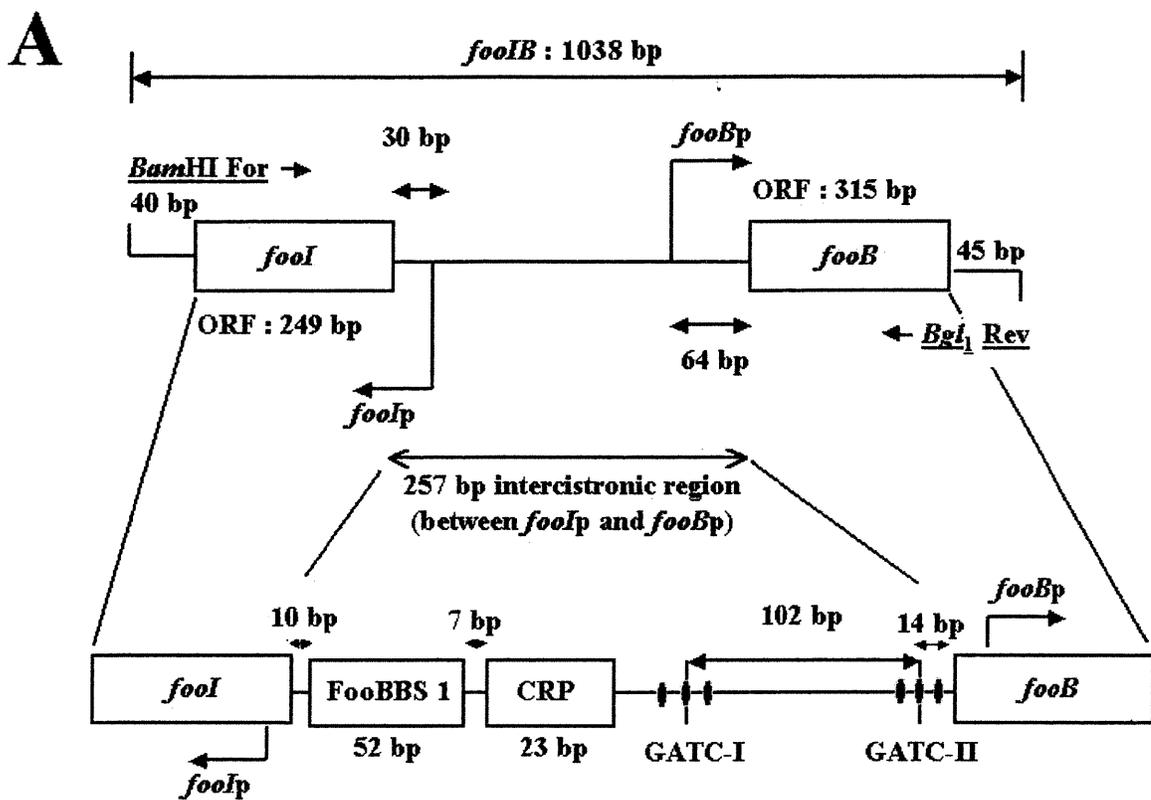
17. **El Hanafi, D., and L. Bossi.** 2000. Activation and silencing of *leu-500* promoter by transcription-induced DNA supercoiling in the *Salmonella* chromosome. *Mol. Microbiol.* **37**: 583-594.
18. **Fairbrother, J. M., S. Larivière, and R. Lallier.** 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains Isolated from pigs with diarrhea. *Infect. Immun.* **51**: 10-15.
19. **Fang, M., and H.-Y. Wu.** 1998. A promoter relay mechanism for sequential gene activation. *J. Bacteriol.* **180**: 626-633.
20. **Fang, M., and H.-Y. Wu.** 1998. Suppression of *leu-500* mutation in *topA*<sup>+</sup> *Salmonella typhimurium* strains. *J. Biol. Chem.* **273**: 29929-29934.
21. **Hacker, J., I. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, and H. Tschäpe.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
22. **Harel, J., F. Daigle, C. Forget, M.-C. Tessier, C. Crost, and C. Martin.** 2000. Phase variation of F165<sub>1</sub>(Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. *Can. J. Microbiol.* **46**: 1101-1107.
23. **Hraiky, C., M.-A. Raymond, and M. Drolet.** 2000. RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 11257-11263.
24. **Jensen, K. F.** 1993. The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J. Bacteriol.* **175**: 3401-3407.
25. **Jensen, P. R., C. C. Van Der Weijden, L. B. Jensen, H. V. Westerhoff, and J. L. Snoep.** 1999. Extensive regulation compromises the extent to which DNA gyrase controls DNA supercoiling and growth rate of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **266**: 865-877.
26. **Lin, R. T., R. D'Ari, and E. B. Newman.** 1990. The leucine regulon of *Escherichia coli*: a mutation in *rblA* alters expression of leucine-dependent metabolic operons. *J. Bacteriol.* **172**: 4529-4535.
27. **Liu, L., and J. Wang.** 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 7024-7027.
28. **Low, D., B. Braaten, and M. van der Woude.** 1996. Fimbriae, p. 146-157. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, Second ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
29. **Luttinger, A.** 1995. The twisted 'life' of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. *MicroReview. Mol. Microbiol.* **15**: 601-606.
30. **Lynch, A. S., and J. C. Wang.** 1993. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **175**: 1645-1655.
31. **Maiti, S. N., L. DesGroseillers, J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1994. Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165<sub>1</sub> of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. *Microb. Pathogen.* **16**: 15-25.
32. **Massé, É., and M. Drolet.** 1999. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem.* **274**: 16659-16664.

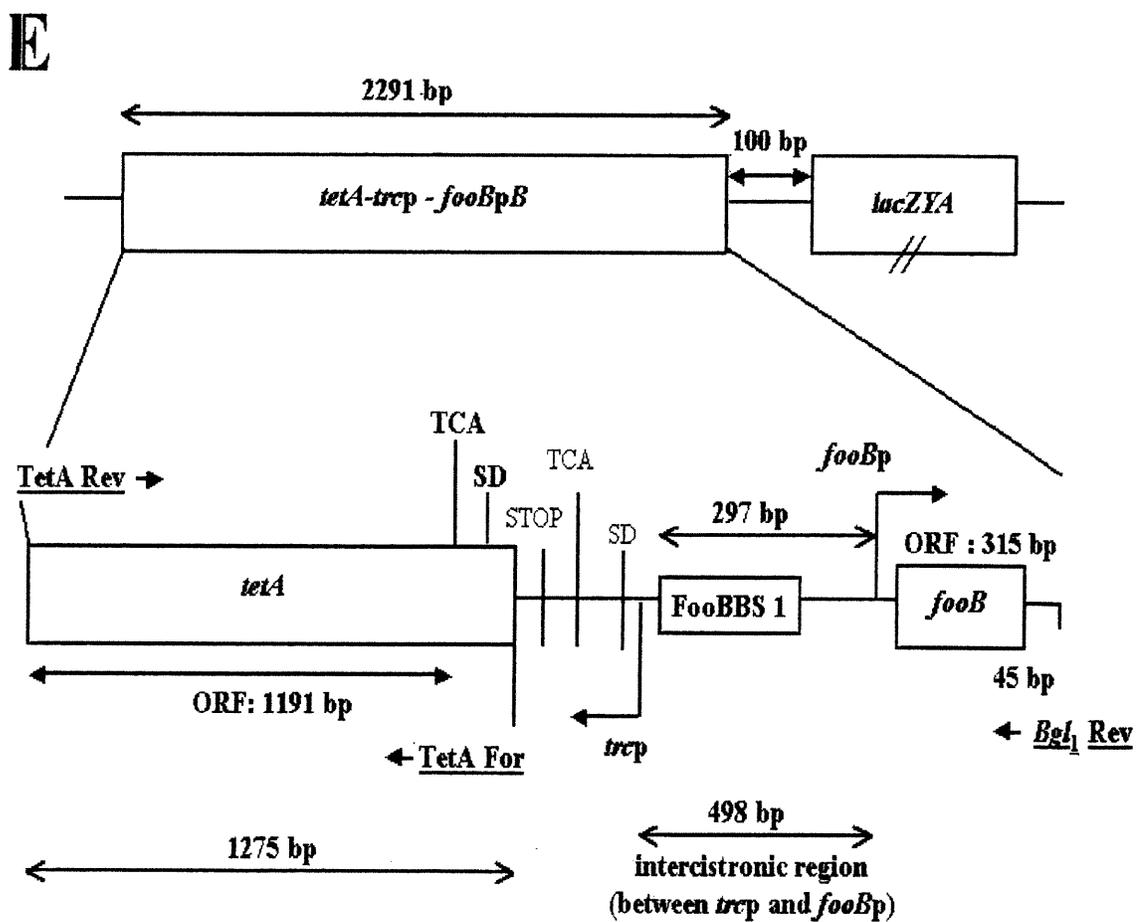
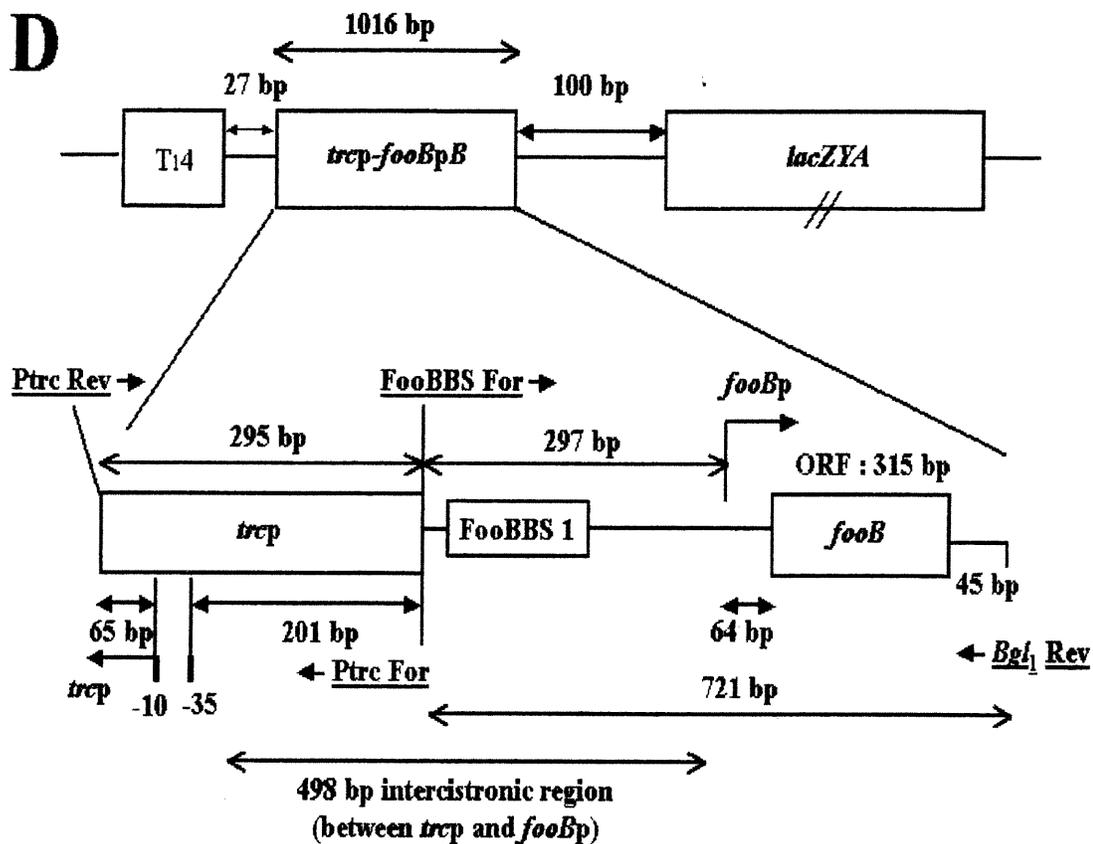
33. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. USA.
34. **Mojica, F. J. M., and C. F. Higgins.** 1996. Localized domains of DNA supercoiling: topological coupling between promoters. *Mol. Microbiol.* **22**: 919-928.
35. **Ngeleka, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. F165<sub>1</sub> fimbriae of the P fimbrial family inhibit the oxidative response of porcine neutrophils. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **25**: 265-274.
36. **Ní Bhriain, N., and C. J. Dorman.** 1993. Isolation and characterization of a *topA* mutant of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **7**: 351-358.
37. **Opel, M. L., and G. W. Hatfield.** 2001. DNA supercoiling-dependent transcriptional coupling between the divergently transcribed promoters of the *ilvYC* operon of *Escherichia coli* is proportional to promoter strengths and transcript lengths. *Mol. Microbiol.* **39**: 191-198.
38. **Phoenix, P., M.-A. Raymond, É. Massé, and M. Drolet.** 1997. Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **272**: 1473-1479.
39. **Powell, B. S., D. L. Court, Y. Nakamura, M. P. Rivas, and C. L. Turnbough, Jr.** 1994. Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucl. Acids Res.* **22**: 5765-5766.
40. **Pruss, G., and K. Drlica.** 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**: 521-523.
41. **Pruss, G. J., S. H. Manes, and K. Drlica.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**: 35-42.
42. **Rhee, K. Y., M. Opel, E. Ito, S. P. Hung, S. M. Arfin, and G. W. Hatfield.** 1999. Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 14294-14299.
43. **Simons, R. W., F. Houtman, and N. Kleckner.** 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.
44. **Spirito, F., and L. Bossi.** 1996. Long-distance effect of downstream transcription on activity of the supercoiling-sensitive *leu-500* promoter in a *topA* mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**: 7129-7137.
45. **Sternglanz, R., S. DiNardo, K. A. Voelkel, Y. Nishimura, Y. Hirota, K. Bechera, L. Zumstein, and J. C. Wang.** 1981. Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 2747-2751.
46. **Tessier, M.-C., M. Drolet, C. Martin, and J. Harel.** *Escherichia coli* 4787 *foo* operon responsiveness to DNA supercoiling level: basal transcription, phase variation, DNA methylation pattern, and Fool activator role. *In preparation*.
47. **Wu, H.-Y., J. Tan, and M. Fang.** 1995. Long-range interaction between two promoters: activation of the *leu-500* promoter by a distant upstream promoter. *Cell* **82**: 445-451.
48. **Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, S. Bachellier, R. Schneider, D. Chen, D. M. Lilley, and N. R. Cozzarelli.** 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 8103-13.

**Tables and Figures**

**Table I.** Bacterial strains, phages and plasmids used in this study.

Strains, phages or plasmids	Description	Reference and source
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
MC4100	F- <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacIPOZYA</i> )U169 <i>rpsL150</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>relA1 deoC1 rbsR22 flhD5301 fruA25</i> $\lambda$ -	2
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 mupG</i>	Invitrogen
Mew 1	$\Delta$ <i>ilvA</i> $\Delta$ <i>lac</i>	26
Mew 60	Mew 1 <i>dam::Tn5</i> (Km <sup>R</sup> )	9
DM800	$\Delta$ ( <i>topA - cysB</i> )204 <i>gyrB225 acrA13</i>	12
PH613	DM800 <i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup> (Km <sup>R</sup> ) <i>lacZ::Tn10</i>	46
PH615	DM800 <i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225 lacZ::Tn10</i>	46
PH617	DM800 ( $\Delta$ <i>topA gyrB225</i> ) <i>lacZ::Tn10</i>	46
MT008	PH613 $\lambda$ MT01 lysogen [ <i>fooIB-lacZ</i> ]	46
MT009	PH615 $\lambda$ MT01 lysogen [ <i>fooIB-lacZ</i> ]	46
MT010	PH617 $\lambda$ MT01 lysogen [ <i>fooIB-lacZ</i> ]	46
MT067	PH613 $\lambda$ MT03 lysogen [ <i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> ]	46
MT068	PH615 $\lambda$ MT03 lysogen [ <i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> ]	46
MT069	PH617 $\lambda$ MT03 lysogen [ <i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> ]	46
MT070	PH613 $\lambda$ MT04 lysogen [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	This work
MT071	PH615 $\lambda$ MT04 lysogen [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	This work
MT072	PH617 $\lambda$ MT04 lysogen [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	This work
MT073	PH613 $\lambda$ MT05 lysogen [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	This work
MT074	PH615 $\lambda$ MT05 lysogen [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	This work
MT075	PH617 $\lambda$ MT05 lysogen [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	This work
<b>Bacteriophages</b>		
$\lambda$ RS45	<i>bla'-lacZYA imm</i> <sup>21</sup> <i>ind</i> <sup>+</sup>	43
$\lambda$ MT01	$\lambda$ RS45-pMT001 recombinant phage [ <i>fooIB-lacZ</i> ]	46
$\lambda$ MT03	$\lambda$ RS45-pMT007 recombinant phage [ <i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> ]	46
$\lambda$ MT04	$\lambda$ RS45-pMT017 recombinant phage [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	This work
$\lambda$ MT05	$\lambda$ RS45-pMT016 recombinant phage [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	This work
<b>Plasmids</b>		
pRS551	<i>bla-kan-lacZYA</i> pMB1 replicon	43
pMT001	pRS551 containing <i>fooIB</i> ( <i>lacZ</i> under <i>fooBp</i> control)	46
pMT007	pRS551 containing <i>fooIp fooBpB</i> ( <i>lacZ</i> under <i>fooBp</i> control)	46
pMT017	pRS551 containing <i>tetA-trcp-fooBpB</i> ( <i>lacZ</i> under <i>fooBp</i> control)	This work
pMT016	pRS551 containing <i>trcp-fooBpB</i> ( <i>lacZ</i> under <i>fooBp</i> control)	This work
pGEM <sup>®</sup> -T	Plasmid for PCR products cloning and <i>lacZp</i> source	Promega
pTrc99A	pBR322 derivative vector for protein expression, used as <i>lacI</i> <sup>q</sup> and <i>trcp</i> source	Pharmacia Biotech





**Figure 1. (A)** The *foo* regulatory region with its putative regulatory sites.

The *fooIB* regulatory region with its putative CRP binding site and putative Lrp binding sites are shown. Black dots refer to Lrp sites and FooBBS 1 site refers to a putative PapB homologous binding site. The GATC-I and GATC-II sites, separated by 102 bp, and the *fooIp* and *fooBp* divergent promoters are also indicated. The putative FooBBS sites 2 and 3 in the region of *fooBp* promoter and *fooB* gene are not shown.

**(B)** Schematic representation of *fooIB-lacZYA* transcriptional fusion.

**(C)** Schematic representation of *fooIp-fooBpB-lacZYA* transcriptional fusion.

This latter is similar to *fooIB-lacZYA* fusion except that *fooI* gene is deleted.

**(D)** Schematic representation of *trcp-fooBpB-lacZYA* transcriptional fusion.

**(E)** Schematic representation of *tetA-trcp-fooBpB-lacZYA* transcriptional fusion.

The primers used for the amplification of *foo* regions, *tetA* gene and *trcp* promoter are underlined. In **C** and **D**, the binding of the RNA polymerase to divergent promoters remains unaffected whenever the transcriptional elongation was blocked by four tandem repeats of the rho-independent transcriptional terminator *rrnBT<sub>1</sub>* (T<sub>14</sub>) provided by pRS551 plasmid<sup>43</sup>. In **D** and **E**, since a *lacI<sup>q</sup>* deletion is found in the DM800 derivatives used in this work, the divergent *trcp* promoter transcriptional activity does not require IPTG induction. **ORF**: Open Reading Frame; **bp**: base pairs. The primers used for the amplification of *foo* regions are underlined. For details about the sequence of the primers and cloning procedures, see “Material and Methods” section.

**Table II.** Effects of *trcp* strength and of *tetA* divergent transcription on *fooBp* activity in *FooI* topoisomerase isogenic strains.

<i>E. coli</i> strain	Relevant genotype	$\beta$ -galactosidase activity (Miller units) <sup>a, b</sup>	% of $\beta$ -galactosidase activity (mutant to wild-type)
<b><i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> fusion<sup>c, d</sup></b>			
<b><i>tetA</i><sup>+</sup>, <i>trcp</i><sup>+</sup>, <i>FooI</i></b>			
MT070	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	2216 ± 157	100
MT071	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	2035 ± 402	92
MT072	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	727 ± 22	33
<b>Negative controls</b>			
<b><i>trcp-fooBpB-lacZ</i> fusion<sup>c, d</sup></b>			
<b><i>tetA</i><sup>+</sup>, <i>trcp</i><sup>+</sup>, <i>FooI</i></b>			
MT073	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	1826 ± 253	100
MT074	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	1260 ± 188	69
MT075	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	771 ± 91	42
<b><i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> fusion<sup>d</sup></b>			
<b><i>tetA</i><sup>+</sup>, <i>trcp</i><sup>-</sup>, <i>FooI</i></b>			
MT067	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	668 ± 66	100
MT068	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	523 ± 191	78
MT069	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	354 ± 33	53
<b>Positive control</b>			
<b><i>fooIB-lacZ</i> fusion<sup>d</sup></b>			
<b><i>tetA</i><sup>+</sup>, <i>trcp</i><sup>-</sup>, <i>FooI</i> in <i>cis</i></b>			
MT008	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	1516 ± 268	100
MT009	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	939 ± 262	62
MT010	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	425 ± 187	28

<sup>a</sup> The  $\beta$ -galactosidase-specific activities measurements and the growth of cultures were done as described in the “Material and Methods” section.

<sup>b</sup> Mean and standard deviation were calculated with the data of at least three independent cultures.

<sup>c</sup> A *lacI*<sup>q</sup> deletion is found in the DM800 derivatives used in this work. Therefore, although *tetA* gene expression is under the IPTG-inducible *trcp* promoter transcriptional control, IPTG is not required for the activation of *trcp* promoter in both *tetA-trcp-fooBpB-lacZ* and *trcp-fooBpB-lacZ* fusions.

<sup>d</sup> For the description of the fusions, see “Material and Methods” section.

**Table III.** Analysis of the effects of *trcp* strength and *tetA* divergent transcription on *fooBp* activity in *FooI* topoisomerase isogenic strains.

<i>E. coli</i> strain	<i>FooI</i> phenotype	<i>fooIp</i> or <i>trcp</i> presence	<i>tetA</i> presence	% of $\beta$ -galactosidase activity (compared to <i>FooI in cis</i> <sup>b</sup> )
<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>				
MT008	<i>FooI in cis</i>	<i>fooIp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	100
MT067	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>fooIp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	44
MT070 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>trcp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>+</sup>	146
MT073 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>trcp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	120
<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>				
MT009	<i>FooI in cis</i>	<i>fooIp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	100
MT068	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>fooIp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	56
MT071 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>trcp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>+</sup>	217
MT074 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>trcp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	134
$\Delta$ <i>topA gyrB225</i>				
MT010	<i>FooI in cis</i>	<i>fooIp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	100
MT069	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>fooIp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	83
MT072 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>trcp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>+</sup>	171
MT075 <sup>a</sup>	<i>FooI</i> <sup>-</sup>	<i>trcp</i> <sup>+</sup>	<i>tetA</i> <sup>-</sup>	181

<sup>a</sup>A *lacI*<sup>q</sup> deletion is found in the DM800 derivatives used in this work. Therefore, although *tetA* gene expression is under the IPTG-inducible *trcp* promoter transcriptional control, IPTG is not required for the activation of *trcp* promoter in both *tetA-trcp-fooBpB-lacZ* and *trcp-fooBpB-lacZ* fusions.

### **SECTION III-Discussion**

## Discussion

### 1. L'effet du surenroulement global et local de l'ADN sur le promoteur *fooBp*

Les promoteurs dont l'intervalle entre les régions -10 et -35 est de 16 pb ou 18 pb, au lieu des 17 pb s'y trouvant normalement, seraient sensibles à la torsion ( $T_w$ )<sup>4, 8, 19, 358</sup>. Puisque l'intervalle entre les régions -10 et -35 est de 16 pb au promoteur *fooBp* et de 17 pb au promoteur *fooIp*, on soupçonne fortement que *fooBp* soit sensible au surenroulement de l'ADN et que *fooIp* ne le soit pas (Annexe III, p.xlii). Il a précédemment été observé que l'expression du fimbriae F165<sub>1</sub> est influencée par le niveau du surenroulement de l'ADN (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>). Chez la souche sauvage *topA<sup>+</sup> gyrB<sup>+</sup>*, les supertours positifs et négatifs générés derrière et devant le complexe de transcription à *fooBp* sont respectivement relaxés par la Topo I et la gyrase. Ainsi, des niveaux optimum du surenroulement global et local sont conservés dans ADN, ce qui semble favorable à l'établissement de toutes les interactions ADN-protéine et protéine-protéine requises pour une expression transcriptionnelle maximale de la fusion *fooIB-lacZ* à partir de *fooBp* (Tables II et V, p.119 et 124, Article 1) (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *en préparation*<sup>332</sup>).

Les souches dérivées de DM800 ont acquis des mutations compensatoires en réponse à l'absence de Topo I, telles *gyrB225* et possiblement une autre mutation inconnue<sup>61</sup>. Des mutations dans les gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour les sous-unités de la gyrase, provoquent une baisse du surenroulement négatif de l'ADN<sup>278</sup>. Par ailleurs, le surenroulement négatif du chromosome favorise l'initiation de la transcription en facilitant la séparation des brins<sup>19, 213, 274</sup>. Ainsi, la diminution du degré du surenroulement négatif de l'ADN résultant d'une activité moindre de la gyrase (*gyrB225*) pourrait affecter l'expression de *foo* à ce niveau, c'est-à-dire en défavorisant l'ouverture du duplex, puisque l'activité à partir de *fooBp* est réduite chez les souches isogéniques *gyrB225* et  $\Delta topA gyrB225$  (Tables II et V, p.119 et 124, Article 1<sup>332</sup>). Selon les observations précédentes (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>), le niveau plus faible de surenroulement négatif global trouvé chez les mutants *gyrB<sup>Ts</sup>* et  $\Delta topA-gyrB<sup>Ts</sup>$  à 37° C<sup>75, 222</sup> a également causé une baisse du taux d'expression à partir de *fooBp*.

Les fluctuations dans le niveau global du surenroulement de l'ADN provoquées par la mutation *gyrB225* ont aussi probablement altéré l'efficacité avec laquelle les interactions protéine-protéine et protéine-ADN requises pour la stimulation de *fooBp* ont lieu (Tables II et V, p.119 et 124, Article 1<sup>332</sup>). Ces interactions réfèrent tant à la reconnaissance du promoteur par l'ARN pol qu'à l'établissement du complexe nucléoprotéique de la phase *ON*. Ainsi, l'effet de la mutation *gyrB225* sur l'activité de *fooBp* pourrait être attribuable à un recrutement moins efficace de l'ARN pol à ce promoteur à cause de changements dans l'orientation relative, sur l'hélice d'ADN, de ses régions -10 et -35<sup>8, 19, 324</sup>. De façon similaire, il est raisonnable de croire que l'orientation relative des sites de contact des régulateurs protéiques sur l'ADN soit également modifiée à cause un changement dans la torsion (*Tw*) dû à la baisse du surenroulement négatif global, laquelle est attribuable à la mutation *gyrB225*. Ceci pourrait alors diminuer l'efficacité de la liaison des régulateurs à l'ADN ainsi que celle des interactions protéiques. Par conséquent, puisque l'expression fimbriaire en phase *ON* requiert l'établissement de nombreuses interactions protéine-protéine et protéine-ADN (adoption d'une structure d'ADN en forme de boucle), il est probable qu'un tel phénomène soit responsable de l'expression moindre à partir de *fooBp* notée chez les mutants *gyrB225*.

Enfin, il est possible qu'en la présence d'une activité de relaxation moindre de la gyrase, une accumulation de supertours positifs devant le complexe de transcription survienne. Ce surenroulement positif pourrait ralentir la vitesse de translocation de l'ARN pol sur la matrice d'ADN, ce qui par conséquent abaisserait l'expression à partir de *fooBp* (Tables II et V, p.119 et 124, Article 1<sup>332</sup>). Il se peut que ces supertours positifs agissent sur la progression du complexe d'élongation transcriptionnel en ne favorisant pas la dissociation des brins de la matrice d'ADN, laquelle est facilitée par le surenroulement négatif<sup>19, 213, 274</sup>. Une telle barrière au mouvement de l'ARN pol sur l'ADN pourrait causer l'avortement de la transcription initiée à ce promoteur par d'autres molécules d'ARN pol. Ceci, en raison d'un entassement des molécules d'ARN pol qui agirait alors sur la progression des polymérase actives en amont. Ainsi, à la manière des sites de pause transcriptionnelle, ceci pourrait conduire à la dissociation des complexes d'élongation de leur matrice.

Puisque les souches isogéniques  $\Delta topA gyrB225$  et  $topA^+ gyrB225$  (DM800 dérivées) ont le même niveau de surenroulement global <sup>278</sup>, les différences notées dans leur expression de la  $\beta$ -galactosidase reflètent une sensibilité de  $fooBp$  aux changements locaux du surenroulement de l'ADN (Tables II et V, p.119 et 124, Article 1 <sup>332</sup>). Il a déjà aussi été observé que l'opéron  $foo$  répond aux modifications du niveau de surenroulement local causé par la présence du gène  $tetA$  sur un vecteur portant la fusion  $foo-lacZ$  (Annexe I, p.xix <sup>50</sup>). Le gène  $tetA$ , conférant la résistance à la tétracycline, code pour une protéine liée à la membrane causant le surenroulement hypernégatif transcriptionnellement induit de l'ADN plasmidique chez les mutants  $topA$  <sup>208</sup>. Ce serait un changement dans la torsion ( $T_w$ ), causé cette fois par la hausse du surenroulement négatif local attribuable à la mutation  $\Delta topA$ , qui pourrait altérer l'activité de  $fooBp$ . Ceci, en nuisant à la liaison de l'ARN pol à ce promoteur <sup>8, 19, 324</sup>, à celle des régulateurs protéiques sur l'ADN, ainsi qu'aux interactions protéiques en phase  $ON$ . Ainsi, la distorsion de l'ADN, chez le double mutant  $\Delta topA gyrB225$ , causée l'augmentation du niveau local du surenroulement négatif de l'ADN à proximité du promoteur, pourrait être d'une telle ampleur que les interactions entre les régulateurs protéiques et avec l'ADN s'avèrent impossibles ou moins optimales pour l'activation de  $fooBp$  (Tables II et V, p.119 et 124, Article 1 <sup>332</sup>). La formation de la boucle en phase  $ON$ , qui serait médiée par l'action coopérative de plusieurs protéines régulatrices <sup>345</sup>, par l'introduction de courbures dans l'ADN suite à la liaison de protéines telles que CRP <sup>199, 306, 367</sup> et Lrp <sup>29</sup>, ainsi que par le recrutement de l'ARN pol grâce au complexe AMPc-CRP <sup>360</sup> et à Lrp <sup>269, 348, 360</sup>, serait probablement compromise par l'altération du surenroulement de l'ADN.

Chez un mutant  $pap$ , l'insertion d'un segment d'ADN de 21 pb entre le site de liaison pour CRP et le site Lrp 4 a presque totalement aboli la transcription de  $papBA$  en l'absence de PapI exogène (en  $trans$ ) <sup>360</sup>. Ceci suggère que les niveaux d'expression de PapI en  $cis$  sont bas, possiblement à cause d'une transcription réduite de  $papI$  attribuable à l'insertion <sup>360</sup>, laquelle nuit à l'activation de  $fooIp$  par Lrp aux sites Lrp 4-6 (travaux non publiés par A. Brinkman & B. Braaten, cité dans <sup>360</sup>). On peut aisément établir un parallèle entre le changement de phase hélicoïdale résultant de l'insertion d'un segment d'ADN chez  $pap$  <sup>360</sup> et celui provenant d'altérations globales et locales du degré de surenroulement

chromosomique résultant des effets des mutations topoisomérases chez *foo* (Article 1, p.88<sup>332</sup>) (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>).

Il a été récemment observé que chez les mutants *topA*, la transcription des opérons *rrnB*, en présence d'une gyrase totalement active, résultait en un surenroulement hypernégatif de l'ADN attribuable à la formation extensive de boucles-R (*R-loops*) à proximité du complexe transcriptionnel<sup>148, 219, 221, 268</sup>. Il a été démontré que le défaut de croissance chez ces souches était partiellement complété par la surexpression de la RNase H, laquelle ne permet pas la formation extensive de boucles-R en l'absence de Topo I<sup>75</sup>. De plus, il a été démontré que lorsque la transcription était couplée à la traduction, ces boucles-R extensives n'étaient pas formées<sup>219</sup>. La surexpression de la RNase H n'a pas d'influence sur l'expression de la fusion *fooIB-lacZ* chez aucune des souches topoisomérases étudiées (Annexe V, p.xlvii). Enfin, il n'y a pas formation extensive de boucles-R chez les mutants de Topo I en l'absence de gyrase et lorsqu'il y a traduction<sup>219</sup>, comme c'est le cas pour la souche  $\Delta topA$  *gyrB225*, chez laquelle la fusion *fooIB-lacZ* est à la fois transcrite et traduite (Article 1, p.88<sup>332</sup>).

L'effet d'une mutation simple pour le gène *topA* sur l'expression de l'opéron fimbriaire *foo* n'a pas été étudié car, en présence d'une gyrase pleinement active, les simples mutants *topA* accumulent des mutations compensatoires et ne sont donc pas des souches génétiquement stables<sup>61</sup>.

## 2. L'effet du surenroulement de l'ADN sur la variation de phase chez l'opéron *foo*

Le contrôle par la variation de phase régule non seulement l'expression du fimbriae F165<sub>1</sub> (Prs-like) chez les souches septicémiques sauvages 4787 et 5131 (Annexe II, p.xxxiii<sup>125</sup>) mais aussi celle de la fusion *fooIB-lacZ* chez les souches topoisomérases isogéniques *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup>, *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* et  $\Delta topA$  *gyrB225*. Parmi celles-ci, divers phénotypes Lac ont été observés. La souche sauvage *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> présentant des colonies Lac<sup>-</sup> franchement blanches et des colonies Lac<sup>+</sup> d'un bleu foncé, la souche *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* formant des colonies Lac<sup>+</sup> d'un bleu foncé et des colonies Lac<sup>-</sup> d'un bleu pâle et le double mutant  $\Delta topA$  *gyrB225* ayant des colonies avec des intensités de bleu variables (Table III, p.120, Article 1<sup>332</sup>). En général, les colonies en état *ON* sont prédominantes, sauf pour une colonie trouvée

chez la souche *topA<sup>+</sup> gyrB225* et pour une autre chez  $\Delta topA gyrB225$  (Table III, p.120, Article 1<sup>332</sup>). Chez la souche 5131, la population bactérienne est également surtout en phase *ON*, 97% des cellules exprimant le fimbriae F165<sub>1</sub>, avec près de 97% de colonies Lac<sup>+</sup> trouvées lors de la transition *ON*→*OFF*, alors qu'environ 50% de colonies Lac<sup>+</sup> ont été observées lors de la transition *OFF*→*ON* (Annexe II, p.xxxiii<sup>125</sup>). Il semblerait que la mutation *gyrB225* seule affecterait surtout la proportion de colonies Lac<sup>+</sup>/Lac<sup>-</sup> dans la transition *OFF*→*ON* et que la mutation additionnelle  $\Delta topA$  modifierait le pourcentage de colonies de phénotype Lac<sup>+</sup>, tant dans les transitions  $\alpha$  que  $\beta$  (Table III, p.120, Article 1<sup>332</sup>).

Chez les souches topoisomérases, la fréquence de transition  $\alpha$  (*OFF*→*ON*) est relativement constante et elle est plus élevée ( $10^{-2}$ /cellule/génération) que la fréquence de transition  $\beta$  (*ON*→*OFF*) (Table III, p.120, Article 1<sup>332</sup>). La fréquence de transition  $\beta$  (*ON*→*OFF*) augmente (de  $10^{-5}$ /cellule/génération à  $10^{-3}$ /cellule/génération) à mesure qu'apparaissent respectivement les mutations de la gyrase et de la Topo I. La transition *OFF*→*ON* étant la plus fréquente, ceci explique l'expression d'un phénotype Lac<sup>+</sup> par la plupart des colonies. Fait intéressant, chez la souche sauvage 5131, la fréquence de transition *OFF*→*ON* de F165<sub>1</sub> est aussi de  $10^{-2}$ /cellule/génération (71-fois plus élevée que chez Pap-21) et la fréquence de transition *ON*→*OFF* est de  $10^{-3}$ /cellule/génération (semblable à celle de Pap-21), comme c'est le cas chez la souche double mutante  $\Delta topA gyrB225$  (Annexe II, p.xxxiii<sup>125</sup>). Il est possible que la mutation *gyrB225*, en augmentant la fréquence de transition *ON*→*OFF*, accroisse la proportion de colonies Lac<sup>-</sup> et ainsi diminue le pourcentage moyen de colonies Lac<sup>+</sup> (Table III, p.120, Article 1<sup>332</sup>). En ce qui concerne le double mutant  $\Delta topA gyrB225$ , cet impact semble encore plus considérable. Si le mécanisme de la variation de phase chez l'opéron *foo* est similaire à celui qui gouverne *pap*, l'absence de Topo I pourrait mener à une accumulation de supertours négatifs dans la région intercistronique de *foo* ne permettant pas l'établissement de la phase *OFF*, grâce à la liaison de Lrp à l'ADN aux sites Lrp 1, 2 et 3. Ainsi, il apparaît que les mutations topoisomérases provoquent des altérations de l'état du surenroulement de l'ADN affectant le mécanisme de répression de l'expression fimbriaire (Table III, p.120, Article 1<sup>332</sup>).

La Topo I et la gyrase influencent aussi la variation de phase du fimbriae de type 1, dont la transition de phase est médiée par la recombinaison site-spécifique<sup>70</sup>. Chez *Fim*, une mutation *topA* réduit le taux d'inversion de fragment tant dans les transitions  $ON \rightarrow OFF$  que  $OFF \rightarrow ON$ , tandis que l'inhibition de la gyrase introduit un penchant pour l'inversion  $OFF \rightarrow ON$ , l'inversion  $ON \rightarrow OFF$  n'étant que peu altérée<sup>70</sup>. Contrairement à ce qui a lieu chez *fim*, la perte d'activité de la gyrase (*gyrB225*) conduit, chez *foo*, à une hausse de la transition  $ON \rightarrow OFF$  alors que la fréquence de transition  $OFF \rightarrow ON$  demeure intacte. Aussi, chez *foo*, une mutation *topA*, ici accompagnée de la mutation *gyrB225*, accroît davantage, à l'inverse de ce qui se passe pour *fim*, la fréquence de transition  $ON \rightarrow OFF$  alors que la transition  $OFF \rightarrow ON$  reste pratiquement inchangée. Puisque l'expression basale de la fusion transcriptionnelle *fooIB-lacZ* est moindre chez les souches mutantes qu'elle l'est chez la souche sauvage (Tables II et V, p.119 et 124, Article 1<sup>332</sup>), le plus grand nombre de colonies Lac<sup>-</sup> détectées chez ces mutants (Table III, p.120, Article 1<sup>332</sup>) pourrait simplement découler d'une plus lente scission du X-Gal par moins de molécules de  $\beta$ -galactosidase.

### 3. Le rôle activateur de FooI sur l'activité transcriptionnelle à *fooBp*

La transition de phase  $OFF \rightarrow ON$  chez l'opéron *pap* est activée par PapI<sup>256</sup>, codée par ce même opéron, laquelle protéine faciliterait la translocation de Lrp à partir du site GATC-II vers la région GATC-I de façon à stimuler l'expression de Pap<sup>166</sup>. Grâce à une fusion chromosomique *fooI* (*fooIp-fooBpB-lacZ*), le rôle activateur de FooI sur *fooBp* a été confirmé chez les souches *topA*<sup>+</sup> alors que ce régulateur ne semble pas requis chez le mutant  $\Delta topA$  (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>). En effet, chez les souches *topA*<sup>+</sup>, une forte diminution de l'activité à partir de *fooBp* a été notée en l'absence d'expression de FooI. De plus, grâce à l'expression de FooI en *trans* (niveaux sauvages de FooI supposés être obtenus sans l'induction à l'IPTG) l'activité de *fooBp* est complètement restaurée chez les souches *topA*<sup>+</sup>.

Par contre, chez les mutants  $\Delta topA$ , en raison des taux similaires d'activité de *fooBp* chez les souches *fooI*<sup>+</sup> et *fooI*, la présence de FooI ne semble alors pas requise (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>). Ainsi, on suspecte plus sérieusement que les interactions ADN-protéine et protéine-protéine ne puissent pas correctement activer la transcription à partir de

*fooBp* lorsque la Topo I n'est pas là pour relaxer l'excès de supertours négatifs. Contrairement aux souches *topA*<sup>+</sup>, chez les mutants  $\Delta topA gyrB225$ , l'activité de *fooBp* est plus élevée lorsque FooI est absent que lorsqu'il est présent, soit fourni en *cis* ou en *trans*. Ceci suggère une influence négative de la protéine FooI sur l'activation de *fooBp* chez la souche  $\Delta topA$ . Puisqu'il existerait déjà une forte distorsion locale de l'ADN en l'absence de Topo I, il est possible que la liaison de FooI à l'ADN, avec Lrp, introduise des contraintes supplémentaires dans l'ADN. Ces contraintes additionnelles au niveau local seraient néfastes pour la stimulation de *fooBp* car elles pourraient interférer avec la reconnaissance du promoteur par l'ARN pol et/ou avec l'établissement du complexe nucléoprotéique en phase *ON*. De plus, PapI accroît la transcription de *pap* en facilitant la translocation de Lrp à la région GATC-I<sup>166</sup>. Par conséquent, l'indépendance du double mutant  $\Delta topA gyrB225$  envers l'activateur FooI pourrait être corrélée non seulement avec la plus haute fréquence de transition *ON*→*OFF* notée chez cette souche montre, mais aussi avec sa plus forte proportion de sites GATC-I méthylés, comparativement aux souches *topA*<sup>+</sup>.

L'expression constitutive exogène de PapI, i.e. en *trans* à partir du plasmide pDAL468 (dérivé Cm<sup>R</sup> de pACYC184 *papI*<sup>+</sup>) accroît le taux de transition de phase *OFF*→*ON* de *pap* ainsi que la transcription de *papBA*<sup>360</sup>. Ceci confirme que l'activation de *pap* nécessite que PapI se lie à Lrp en phase *ON*<sup>24, 166, 360</sup>. Les plasmide pDAL468<sup>360</sup> et pMT021 (cette étude) partagent des caractéristiques similaires : ils sont tous deux des dérivés Cm<sup>R</sup> de pACYC184 exprimant respectivement les régulateurs PapI et FooI de façon constitutive. Par contre, sur pMT021, l'expression de *fooI* est sous le contrôle de *lacZp*, lui-même régulé par le répresseur LacI<sup>q</sup>, dont le gène est présent sur ce même plasmide. Ainsi, les niveaux de FooI obtenus à partir de pMT021, en l'absence d'induction à l'IPTG, sont probablement moindres que ceux de PapI, exprimé à partir de pDAL468.

Il a été surprenant de constater que lorsque les souches *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* étaient porteuses des vecteurs pMT020 ou pMT021 (sans induction à l'IPTG), la stimulation de *fooBp* démontrait une indépendance relative envers l'absence ou la présence du régulateur FooI en *cis* (fusion *fooIB-lacZ*) ou en *trans* (pMT021) (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>). Ceci pourrait indiquer que le rôle activateur de FooI, lorsque le niveau de surenroulement global est diminué par la *gyrB225*, n'est pas aussi crucial pour la

stimulation de *fooBp* que ce l'est pour les souches *topA<sup>+</sup> gyrB<sup>+</sup>*. Il se peut, puisque l'expression de LacZ est beaucoup plus faible chez les souches portant les plasmides pMT020 et pMT021 que chez celles qui en sont dépourvues, que l'activité de *fooBp* soit déjà si basse que le besoin activationnel de ce promoteur pour FooI ne soit plus détectable.

Aussi, une relative indépendance des souches *fooI<sup>-</sup>* envers les mutations des topoisomérases a été notée puisque qu'elles montrent des activités de *fooBp* similaires, respectivement de la présence de pMT020 (Table V, p.124, Article 1<sup>332</sup>). Ces résultats pourraient signifier que les mutations des topoisomérases exercent un effet important sur l'activité de *fooBp* seulement lorsque l'activateur FooI est présent. En effet, lorsque la stimulation transcriptionnelle à partir de *fooBp* est moindre à cause de l'absence de FooI, il est possible que les niveaux de transcription soient déjà si bas que des mutations dans les gènes de la Topo I et de la gyrase ne puissent provoquer une baisse additionnelle de l'expression de la fusion *fooB-lacZ*.

#### **4. L'effet du surenroulement de l'ADN sur les motifs de méthylation aux sites GATC de la région régulatrice *foo***

La variation de phase du fimbriae Pap requiert la méthylation différentielle des résidus adénine des sites GATC-I et GATC-II localisés dans la région régulatrice de l'opéron *pap*<sup>16, 24</sup>. Dans le mécanisme de la variation de phase, la Dam (désoxyadénosine méthyltransférase) est en compétition avec les activateurs transcriptionnels Lrp et PapI. La protection de GATC-II contre la méthylation requiert Lrp et celle de GATC-I nécessite la présence de Lrp et PapI<sup>347</sup>. Ainsi, l'ADN hémiméthylé suite à la réplication et la méthylation par la Dam<sup>217</sup> est nécessaire à la transition de la cellule bactérienne entre les états fimbriés (phase *ON*) et afimbriés (phase *OFF*)<sup>345</sup>. Puisque les ADN topoisomérases sont impliquées dans les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison du processus de réplication de l'ADN<sup>164, 207, 254, 274</sup> et que la méthylation de l'ADN par la Dam requiert la réplication, les mutations de la Topo I et de la gyrase pourraient possiblement altérer la variation de phase fimbriaire à ce niveau.

Chez la souche *topA*<sup>-</sup> MT010, le motif de méthylation de l'ADN est différent, le site GATC-I étant plus fréquemment méthylé que ne l'est celui des souches *topA*<sup>+</sup> MT008 et MT009 (Figure 3, pp.121-122, Article 1<sup>332</sup>). Il semblerait donc qu'en l'absence de Topo I, la proportion des résidus adénine méthylés soit haussée au site GATC-I. Aussi, lors de la variation de phase chez la souche  $\Delta topA$ , la fréquence de transition de phase  $\beta$  (*ON*→*OFF*) est plus élevée qu'elle ne l'est chez les souches isogéniques *topA*<sup>+</sup> (Table III, p.120, Article 1<sup>332</sup>). Cette dernière observation pourrait être corrélée avec l'état de la méthylation des sites GATC de la région intercistronique *foo*. Ainsi, puisque le site GATC-I est proportionnellement plus méthylé chez le double mutant qu'il ne l'est chez les souches isogéniques *topA*<sup>+</sup>, ceci explique la haute fréquence de transition *ON*→*OFF* ( $\beta$ ) notée en ce qui concerne le mutant  $\Delta topA$ .

Par ailleurs, chez la souche mutante  $\Delta topA$ , la liaison des divers régulateurs de même que l'interaction des protéines avec la région *fooIB* seraient fortement altérées. La distorsion de l'ADN chez le double mutant serait telle que Lrp ne s'y lierait pas efficacement. Par conséquent, Lrp ne pourrait plus prévenir la formation du motif de méthylation en phase *OFF* résultant de l'action de la Dam au site GATC-I. En raison de cette distorsion locale, le site GATC-I serait plus accessible pour la méthylation. Ceci résulte alors en la répression de la transcription à partir de *fooBp*. Ainsi, dans les conditions mutantes, Lrp aurait moins d'affinité pour le site GATC-I ce qui faciliterait l'établissement de l'état *OFF*.

De plus, il a aussi été observé que la présence de FooI n'était pas requise pour l'expression à partir de *fooBp* chez le double mutant *gyrB225*  $\Delta topA$ . Par contre, chez les souches *topA*<sup>+</sup>, FooI est nécessaire à l'expression maximale de *fooIB* (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>). L'indépendance relative des souches  $\Delta topA$  envers l'activateur FooI s'expliquerait par la liaison inefficace de FooI à l'ADN en raison d'une distorsion locale considérable. Ainsi, Lrp et/ou Lrp et FooI ne pourraient pas agir en tant que facteur bloquant la méthylation lorsque le surenroulement négatif local est très élevé. De plus, il est possible que l'état du surenroulement de l'ADN existant dans la région *fooIB* de la souche  $\Delta topA$ , comparativement aux souches *topA*<sup>+</sup>, permette à la Dam une méthylation plus aisée du site GATC-I.

## 5. Le couplage transcriptionnel des promoteurs divergents *fooIp* et *fooBp*

Lorsque la transcription à partir d'un promoteur affecte la transcription qui s'opère à partir d'un autre promoteur (couplage transcriptionnel), l'inhibition de la transcription divergente à partir de l'un des promoteurs devrait affecter l'activité transcriptionnelle de chacun des promoteurs <sup>286</sup>. Le surenroulement local de l'ADN généré à partir de la transcription divergente pourrait fournir cette énergie requise en supplémentant la densité superhéliçoïdale globale dans le voisinage des promoteurs. Selon le modèle des domaines jumeaux de surenroulement <sup>196</sup>, la densité superhéliçoïdale locale de la région de promoteurs divergents entre des ARN pols en transcription devrait s'accroître à un niveau situé au-delà de la densité superhéliçoïdale globale chromosomique. Cette densité superhéliçoïdale locale plus élevée devrait être reliée à la fréquence de transcription à partir de promoteurs divergents et ainsi qu'au degré du surenroulement négatif causé par cette transcription. Un couplage transcriptionnel entre des promoteurs divergents réfère à cette interaction dépendante du surenroulement de l'ADN.

Puisqu'en fournissant *FooI* en *trans* l'activité de *fooBp* est complètement restaurée chez les souches *topA<sup>+</sup> gyrB<sup>+</sup>*, la transcription divergente à partir de *fooI* ne paraît pas influencer l'activation de *fooBp* autant que ne le fait l'activateur *FooI*, ce qui est probablement relié à une faible activité intrinsèque de *fooIp* (Table VI, p.125, Article 1 <sup>332</sup>). Aucun impact de la transcription divergente de *fooI* sur l'activité de *fooBp* n'a été détecté chez les souches *topA<sup>+</sup> gyrB<sup>+</sup>* ni chez les mutants *topA<sup>+</sup> gyrB225*. Enfin, la transcription divergente à partir de *fooIp* semble négativement influencer l'activité de *fooBp* chez les souches  $\Delta topA gyrB225$  puisque l'impact négatif de l'expression de *FooI* sur la stimulation de *fooBp* est plus important lorsque *fooI* est chromosomiquement transcrit (en *cis*). Il se peut que chez la souche  $\Delta topA$ , *fooBp* ne puisse pas tolérer une distorsion locale supplémentaire de l'ADN, laquelle pourrait être causée par le surenroulement négatif local résultant de la transcription divergente du gène *fooI*.

Ainsi, il ne semble pas que la transcription divergente à partir de *fooIp* influence l'activité de *fooBp* chez les souches *topA<sup>+</sup>*, du moins pas autant qu'escompté (Article 1, p.88 <sup>332</sup>). Si la variation de phase chez *foo* est semblable à celle retrouvée chez *pap*, ce n'est pas surprenant car plusieurs régulateurs protéiques agissent de concert dans la région

régulatrice de façon à permettre la transcription à partir de *fooBp*. Peut-être que dans l'environnement génétique *topA*<sup>+</sup>, l'absence de réponse de *fooBp* à l'abolition de la transcription divergente de *fooI* pourrait être attribuée à la faible activité de *fooIp* ? Rhee *et coll.*<sup>286</sup> ont observé que la perte de la transcription à partir du relativement faible *ilvCp* et la baisse que cela a engendré sur la densité de la superhélicité négative dans la région de *ilvYp* n'a eu qu'un faible effet sur l'expression de *ilvY*. Toutefois, ceci n'exclut pas la possibilité que la transcription divergente à partir de *fooBp* puisse influencer l'activité de *fooIp* ni que *fooBp* puisse être stimulé par la transcription divergente à partir d'un promoteur plus fort. Généralement, les promoteurs ayant un haut optima de densité superhéliçoïdale sont faibles et la formation du complexe ouvert à ceux-ci nécessite de hauts niveaux d'énergie d'activation<sup>286</sup>.

## 6. La stimulation de l'activité de *fooBp* par la transcription divergente de *tetA*

L'analyse de l'activation du promoteur *leu-500p*, sur le chromosome, a révélé que, chez des mutants *topA*, la transcription d'une cassette *tetA* orientée de façon divergente à l'opéron *leu* stimulait l'activité de *leu-500p*, laquelle stimulation a été détectée dans une étendue de 2 kb à partir du promoteur. De plus, il semblerait que les supertours positifs et négatifs générés par la transcription puissent diffuser le long de l'ADN du chromosome et, selon leur signe topologique, engendrer des réponses opposées de la part de *leu-500p*<sup>80</sup>. Aussi la transcription divergente à partir du promoteur *ilvIHp*, situé à 1,9 kb en amont de *leu-500p*, est majoritairement responsable de la création des supertours négatifs qui activent *leu-500p*<sup>89, 369</sup>.

L'activation de *leu-500p* est permise par la hausse du surenroulement négatif au-delà des niveaux normaux, un résultat typique des mutations *topA*<sup>291</sup>, et ce promoteur a servi à l'étude de l'interdépendance entre des unités transcriptionnelles adjacentes<sup>33-35, 193, 236, 327, 369</sup>. Les supertours négatifs générés par la transcription de séquences adjacentes, puisqu'ils sont moins efficacement relaxés chez les mutants *topA*, affectent l'activité de *leu-500p*. Ce sont les changements du surenroulement au niveau local plutôt que global qui s'avèrent responsables de l'activation de *leu-500p* puisque la suppression de ce promoteur déficient chez une souche *topA* n'est possible que lorsqu'il est localisé sur le chromosome<sup>240</sup>, et non sur un plasmide<sup>290</sup>. La suppression de la mutation *leu-500* est également possible chez des

souches *topA*<sup>+</sup>, grâce au mécanisme de relai de promoteurs initié par l'activité transcriptionnelle de *ilvIH*<sup>90</sup>. Des effets d'interaction tant sur courte (< 400 pb)<sup>34, 35, 90, 327</sup> que sur longue distance (jusqu'à 1,9 kb<sup>89, 369</sup> et même 3 kb<sup>315</sup>) quant à l'influence du surenroulement généré par la transcription sur l'activation de *leu-500p* ont été observés<sup>315, 369</sup>. Contrairement aux effets sur courte distance, les effets sur longue distance semblent être médiés par des déterminants de séquence d'ADN situés dans la région entre ces promoteurs<sup>369</sup>.

Il a été démontré que chez une souche *Top*<sup>+</sup> de *E. coli*, le surenroulement négatif généré transcriptionnellement peut affecter, *in vivo*, la structure de l'ADN sur une assez grande échelle, une vague de surenroulement transcriptionnel d'une longueur de demi-dissociation d'environ 800 pb ayant été observée<sup>183</sup>. Puisque *fooBp* s'avère sensible au surenroulement de l'ADN, tant au niveau local que global, que la distance entre les promoteurs *fooIp* et *fooBp* (fusions *fooIB-lacZ* et *fooIp-fooBpB-lacZ*) est de 257 pb et que la distance entre les promoteurs *trcp* et *fooBp* (fusions *trcp-fooBpB-lacZ* et *trcp-tetA-fooBpB-lacZ*) est de 498 pb (Figure 1, pp.149-151, Article 2<sup>331</sup>), on peut suspecter l'existence d'un couplage transcriptionnel entre ces promoteurs orientés en directions opposées (M.-C. Tessier, M. Drolet, C. Martin, J. Harel, *en préparation*<sup>332</sup>).

Il a été observé lors d'études précédentes que l'expression de F165<sub>1</sub> est également sensible aux changements locaux du surenroulement de l'ADN, tels les hauts niveaux de surenroulement négatif causé par l'expression du gène *tetA* (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>)<sup>48</sup>. Plus précisément, la transcription à partir du promoteur *fooBp* est influencée par l'expression de *tetA* chez un mutant *topA*, ce qui révèle un effet du surenroulement local sur l'activité de *fooBp* (Annexe I, p.xix<sup>50</sup>)<sup>48</sup>. En effet, chez les mutants *topA*, l'expression de *tetA*, codant pour une protéine d'ancrage à la membrane, cause un surenroulement hypernégatif induit par la transcription de l'ADN plasmidique<sup>201, 208</sup>.

L'impact de l'induction de l'expression de *tetA* sur l'activité du promoteur *fooBp* orienté de façon divergente a alors été étudié (Article 2, p.126<sup>331</sup>). La simple substitution du promoteur divergent *fooIp* par le promoteur fort *trcp* (fusion *trcp-fooBpB-lacZ*), semble à elle seule largement compenser pour l'absence de *FooI* puisque sa présence permet un accroissement significatif de l'expression à partir de *fooBp* (Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>).

Ceci confirme que le surenroulement généré par la transcription est, *in vitro*, d'une importance proportionnelle à la force des promoteurs <sup>257</sup>. Ainsi, il semblerait que la transcription divergente à partir d'un promoteur plus fort influence positivement l'activation de *fooBp*, et ce, même si dans la fusion *trcp-fooBpB-lacZ*, l'ARN pol rencontre rapidement les terminateurs transcriptionnels *rrnBT14* avoisinants, lesquels sont localisés immédiatement en aval de *trcp*. Il se pourrait que la liaison de l'ARN pol à un promoteur suffise à empêcher la dissipation des supertours négatifs générés par la transcription en agissant comme barrière à la diffusion <sup>196</sup>. Selon ce mécanisme et grâce à la forte activité de *trcp*, il est possible qu'il y ait une importante accumulation de supertours négatifs dans la région située entre les promoteurs divergents *trcp* et *fooBp*. Le haut degré de surenroulement négatif local ainsi généré stimulerait fortement l'activité transcriptionnelle à partir de *fooBp*.

De plus, l'introduction du gène *tetA* sous le contrôle de *trcp*, en orientation divergente par rapport à *fooBp*, a provoqué une hausse encore plus marquée de l'activité de *fooBp* chez les toutes souches *topA*<sup>+</sup> (Table III, p.153, Article 2 <sup>331</sup>). En l'absence de *FooI*, la transcription divergente de *tetA* influence positivement l'activité de *fooBp* chez les souches sauvages *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup> et mutantes *topA*<sup>+</sup> *gyrB225*. Ceci est en accord avec l'observation qu'*in vitro*, lors d'un couplage transcriptionnel, l'importance du surenroulement généré par la transcription est proportionnelle à la longueur des transcrits <sup>257</sup>. Aussi, chez l'opéron *ilvYC*, une hausse de la transcription à partir de *ilvCp* fait qu'un niveau moindre de surenroulement global est nécessaire à une transcription maximale à partir de *ilvYp* <sup>257</sup>. Par conséquent, à l'instar de ce qui se passe chez l'opéron *ilvYC*, l'augmentation du surenroulement local généré par la transcription divergente de *tetA* semble compenser pour la baisse du niveau de surenroulement global causée par la mutation *gyrB225* dans la stimulation de *fooBp* chez les souches mutantes *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* (Table II, p.152, Article 2 <sup>331</sup>). *In vitro*, l'importance du surenroulement négatif généré dans la région située entre les promoteurs divergents est proportionnelle au total du surenroulement global et transcriptionnellement induit <sup>257</sup>.

L'expression du gène *tetA* n'a apparemment aucune influence sur l'activité de *fooBp* chez le double mutant  $\Delta topA$  *gyrB225* (Table III, p.153, Article 2 <sup>331</sup>). Seule la présence de *trcp* au lieu de *fooIp* augmente l'activité de *fooBp* orienté de façon divergente. Il semblerait

qu'en l'absence de Topo I, il y aurait une telle accumulation de surenroulement négatif dans la région intercistronique que les supertours négatifs générés localement par la transcription de *tetA* ne puissent pas davantage influencer positivement l'activité de *fooBp*. Chez les souches  $\Delta topA$  *gyrB225*, *fooBp* demeure apparemment insensible à la présence du gène *tetA* de même qu'il s'avère plutôt indifférent face à la présence de l'activateur FooI. Le plus faible niveau de surenroulement négatif global de l'ADN attribuable à l'activité moindre de la gyrase (*gyrB225*) mais également le plus haut niveau de surenroulement négatif local causé par l'absence de Topo I ( $\Delta topA$ ) pourraient être tenus responsables de l'insensibilité de *fooBp* envers l'influence de l'expression de *tetA* chez le double mutant. Par ailleurs, la présence de FooI ne semble pas non plus affecter particulièrement l'activité de *fooBp* chez les souches  $\Delta topA$  *gyrB225* (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>). Encore une fois, ces résultats pourraient être expliqués par une incapacité de la protéine activatrice FooI, en raison d'une forte distorsion locale de l'ADN en l'absence de Topo I, à interagir avec l'ADN et les protéines en vue de stimuler efficacement la transcription à partir de *fooBp* en phase *ON*. Il est possible que l'absence de la Topo I conjuguée à l'effet *tetA* conduise à une accumulation démesurée de supertours négatifs dans la région intercistronique qui altérerait les interactions ADN-protéine et protéine-protéine s'y établissant, telles la liaison à l'ADN de Lrp et de FooI aux sites Lrp 1, 2 et 3. Ainsi, il semblerait que les mutations topoisomérases donnent lieu à des modifications de l'état du surenroulement de l'ADN influençant le mécanisme d'expression fimbriaire. Évidemment, cette hypothèse n'est valable qu'à la condition que le mécanisme de la variation de phase chez *foo* soit similaire à celui de *pap*.

### **7. L'activation de *fooBp* par la transcription divergente de *tetA* en présence de FooI**

Les effets de la transcription divergente de *tetA* sur l'activité de *fooBp* sont totalement différents lorsqu'on fournit FooI en *trans* (Annexe VI, p.xlix). En raison des multiples variables influençant l'expression de *foo* dans ces conditions expérimentales, les résultats obtenus s'avèrent difficiles à interpréter. Ces variables réfèrent : (1) à l'effet négatif de la présence des plasmides pMT020 et pMT021 sur l'expression transcriptionnelle et sur la croissance, (2) à l'absence ou à la présence de FooI, exprimé soit en *cis* ou en *trans*, et ce à des niveaux supposés sauvages (sans IPTG) ou en surexpression (IPTG), (3) à l'effet de l'IPTG, tant sur l'expression générale que sur la dérèpression de *lacZp* (sur pMT020 et

pMT021) et de *trcp* (sur les fusions chromosomiques), (4) ainsi qu'à l'influence des mutations topoisomérases sur l'expression génétique. Aussi, la diminution de la superhélicité négative causée par la mutation *gyrB225* provoque l'activation de l'expression du gène *lacI*<sup>299</sup>. De plus, la liaison de régulateurs à l'ADN pourrait être altérée par un plus bas niveau de surenroulement négatif, et la liaison du répresseur LacI à l'opérateur est affectée par le degré du surenroulement de l'ADN<sup>365</sup>. Malgré tout, certaines conclusions peuvent quand même être dégagées.

Chez les souches sauvages, en l'absence d'induction de la fusion *trcp-tetA* et lorsque FooI est absent ou fourni à des niveaux physiologiques, l'expression de *tetA* semble correctement réprimée par LacI<sup>q</sup> (Annexe VI, p.xlix). Puisque l'activité accrue de *fooBp* suite à l'induction de l'expression de *tetA* observée en l'absence de FooI n'est pas reproduite lorsque FooI est suppléé en *trans*, soit à des niveaux sauvages (sans IPTG) ou à des niveaux très élevés (IPTG), un effet antagoniste entre *tetA* et FooI sur la stimulation de *fooBp* est suspecté. De plus, l'observation que l'activité transcriptionnelle à partir de *fooBp* est similaire tant chez les souches *tetA*<sup>+</sup> *fooI*<sup>+</sup> et *tetA*<sup>-</sup> *fooI*<sup>-</sup>, indépendamment de l'induction à l'IPTG, renforce cette idée. On peut alors conclure que chez les souches *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup>, l'expression de *tetA* compense pour l'absence de FooI en ce qui a trait à l'activation transcriptionnelle de *fooBp*. Par ailleurs, les effets positifs de la transcription divergente de *tetA* ou du régulateur FooI sur l'activité de *fooBp* ne sont révélés que lorsqu'ils agissent indépendamment l'un de l'autre sur la stimulation de ce promoteur.

En ce qui concerne le simple mutant *topA*<sup>+</sup> *gyrB225*, l'activité à partir de *fooBp* est augmentée par l'induction de l'expression de *tetA* (Annexe VI, p.xlix). Toutefois, la transcription à partir de ce promoteur est plus élevée chez les souches *fooI*<sup>-</sup> que chez les souches *fooI*<sup>+</sup> (en *trans*). Ceci signifierait que la présence de FooI abaisse l'étendue des effets de l'expression de *tetA* sur la stimulation de *fooBp*, même si cela s'avère d'une ampleur moindre chez les souches *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* que dans l'environnement génétique sauvage *topA*<sup>+</sup> *gyrB*<sup>+</sup>. Il est possible que la liaison de Lrp en conjonction avec FooI à l'ADN *foo* prévienne la propagation, dans la région intercistronique, des supertours négatifs générés par la transcription divergente de *tetA*. Ainsi, *tetA* ne pourrait guère exercer son influence positive sur l'activité de *fooBp*. Il se peut également qu'en présence de l'activateur FooI, lequel accroît la transcription à partir de *fooBp*, que le surenroulement

négatif soit si important dans la région régulatrice que l'influence de *tetA* soit de la sorte réduite. Puisque les effets antagonistes de *tetA* et *FooI* sur l'activité de *fooBp* sont plus significatifs chez les souches *topA<sup>+</sup> gyrB<sup>+</sup>* que chez les souches *topA<sup>+</sup> gyrB225*, ceci signifie que la mutation *gyrB225* influence elle-même l'impact de *tetA* et de *FooI* sur *fooBp*. Possiblement, l'expression de *tetA* hausse le surenroulement négatif local à proximité de *fooBp*, ce qui semble positivement influencer son activité et compenser pour la réduction du surenroulement négatif global causé par la mutation *gyrB225*. Ceci, puisque parmi les souches *tetA<sup>+</sup> fooI<sup>+</sup>*, la souche sauvage présente un taux transcriptionnel à *fooBp* similaire à celui du mutant *topA<sup>+</sup> gyrB225*, respectivement de l'induction à l'IPTG. La confirmation que la fusion *trcp-tetA* est correctement réprimée est amenée par l'observation que des activités de *fooBp* équivalentes ont été notées lorsque l'expression de *tetA* est réprimée en l'absence de *FooI* et lorsque *trcp* est réprimé alors que *tetA* est absent, peu importe que *fooI* soit ou non fourni.

Ni la présence de la protéine activatrice *FooI* ni la transcription divergente de *tetA* ne semblent influencer l'activité de *fooBp* chez le double mutant  $\Delta topA gyrB225$  (Table VI p.125, Article 1<sup>332</sup>; Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>; Annexe VI, p.xlix). Seule la substitution de *fooIp* par *trcp*, indépendamment de l'induction à l'IPTG, stimule l'activité du promoteur *fooBp* orienté de façon divergente. Comme on l'a déjà constaté, ici encore, chez les souches  $\Delta topA gyrB225$ , *fooBp* demeure apparemment insensible à l'induction du gène *tetA* ou à sa présence (Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>), mais aussi plutôt indépendant face à la présence de l'activateur *FooI* (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>). Chez ces souches, le niveau plus faible de surenroulement global de l'ADN attribuable à une activité moindre de la gyrase (*gyrB225*) mais aussi le degré plus élevé de surenroulement négatif local causé par la mutation  $\Delta topA$  pourraient être tenus responsables de l'insensibilité de *fooBp* envers l'influence de *tetA* (Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>). De plus, comme on l'a déjà observé la présence de *FooI* ne semble pas affecter particulièrement l'activité de *fooBp* chez les souches  $\Delta topA gyrB225$  (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>). Encore une fois, ces résultats peuvent être expliqués par une incapacité de la protéine activatrice *FooI*, en raison de la forte distorsion locale de l'ADN régnant en l'absence de Topo I absence, à interagir avec l'ADN et les protéines en vue de stimuler efficacement la transcription à partir de *fooBp*. Puisque l'expression concomitante de *tetA* et de *fooI* conduit à l'obtention de niveaux

transcriptionnels à partir de *fooBp* similaires à ceux obtenus lorsqu'aucun de ces gènes n'est présent, ceci supporte l'hypothèse des influences antagonistes de *tetA* et *FooI* sur l'activité de *fooBp* en phase *ON*. De plus, les effets de *FooI* et de la transcription divergente de *tetA* sur la stimulation transcriptionnelle de *fooBp* seraient aussi modulés par le surenroulement de l'ADN.

#### **8. L'impact négatif de la présence des plasmides pMT020 et pMT021 sur la croissance et sur l'activité de *fooBp***

Une croissance plus lente et des taux de transcription à partir *fooBp* plus faibles ont été notés chez les souches portant les plasmides pMT020 et pMT021, par comparaison avec celles qui en sont dépourvues (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>; Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>; Annexe VI, p.xlix). On peut tenter d'expliquer ce comportement par le phénomène de la répllication plasmidique incontrôlée, laquelle altère souvent les fonctions cellulaires normales. Un fardeau métabolique sévère est imposé à la cellule lorsque des plasmides à haut nombre de copies avec des promoteurs forts y sont présents. Ceci se traduit alors par une diminution spécifique du taux de croissance ainsi que par des changements dans la physiologie cellulaire. Par exemple, l'induction de la synthèse de  $\beta$ -lactamase, à partir du promoteur *tacp* sur le plasmide pKN, a causé la répllication incontrôlée du plasmide (*runaway plasmid replication*) ainsi que l'excrétion de  $\beta$ -lactamase<sup>337</sup>. La répllication plasmidique incontrôlée résulte de la translecture des transcrits du promoteur *tacp* à travers l'origine de répllication du plasmide. Tant un nombre élevé de copies plasmidiques qu'un promoteur fort (*tacp*) sont nécessaires à l'obtention du niveau de surproduction requis pour l'excrétion de  $\beta$ -lactamase, mais cette synthèse ciblée de taux élevé est néfaste pour la cellule. Toutefois, la présence du gène *lacI* sur un plasmide dérivé de pKN faciliterait la régulation<sup>337</sup>.

On peut croire qu'un phénomène semblable soit survenu chez les souches portant les plasmides pMT020 et pMT021 puisqu'on a observé que leur croissance était plus lente et que les taux de  $\beta$ -galactosidase mesurés étaient moins élevés, comparativement aux souches dépourvues de ces vecteurs (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>; Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>; Annexe VI, p.xlix). Ainsi, même si ces plasmides dérivés de pACYC184 sont présents en nombre moyen de copies dans la cellule et que *lacI*<sup>q</sup> était fourni sur ces mêmes

vecteurs, il est possible que l'expression à partir de *lacp* ait causé la réplication incontrôlée du plasmide. Par ailleurs, l'utilisation d'un milieu de culture très pauvre lors des études d'expression génétique sur l'opéron *foo* ainsi que la présence des mutations *topA* et *gyrB225*, et possiblement d'autres mutations compensatoires, sont autant de conditions adverses à la croissance des souches dérivées de DM800 (Table I, p.114, Article 1<sup>332</sup>; Table I, p.148, Article 2<sup>331</sup>; Annexe IV, p.xlv). En tenant compte de ces multiples contraintes, il est raisonnable de soupçonner que la présence des vecteurs pMT020 et pMT021 constitue en elle-même une imposante charge métabolique aux souches dérivées de DM800. Cette situation pourrait être aggravée par l'ajout, à toutes ces contraintes, de l'expression de la protéine FooI en *trans* (pMT021), soit de façon modérée ou, pire encore, surexprimée à cause de l'induction à l'IPTG. Par conséquent, il n'est alors pas étonnant de constater que les niveaux d'expression à partir de *fooBp* soient plus faibles par rapport aux souches ne portant pas ces plasmides (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>; Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>; Annexe VI, p.xlix).

En vue d'expliquer les effets de la présence des plasmides pMT020 et pMT021 et de l'IPTG sur les taux d'expression transcriptionnel à partir de *fooBp*, on peut aussi se référer à un autre exemple qui concerne l'amplification de plasmides dérivés de ColE1<sup>328</sup>. Ceux-ci possèdent différents gènes contrôlés par le promoteur *tacp* qui sont amplifiés suite à l'induction par l'IPTG, aucune amplification ne survenant par contre si la formation du produit n'est pas induite. Le nombre de copies du plasmide chez *E. coli* recombinant a augmenté de 3 à 6 fois durant la période d'environ 6 h dans des cultures en flacons avec agitation, cultures limitées en apport de glucose. L'amplification plasmidique est survenue chez les souches *E. coli* B et K12 avec différents plasmides (*rop*<sup>+</sup> et *rop*<sup>-</sup>) codant pour diverses protéines hétérologues. Cette amplification n'est pas causée par l'effet toxique de l'IPTG, mais est reliée à la forte inhibition de la traduction et de la réplication chromosomiques suite à l'induction de l'expression du gène hétérologue. De façon similaire à l'amplification après l'addition de chloramphénicol, la réplication du plasmide s'est déroulée même si la réplication à *oriC* et la traduction avaient été inhibées suite à la forte induction d'un gène recombinant. En accord avec l'effet du chloramphénicol, le niveau de ppGpp, qui est un régulateur négatif de la réplication des plasmides dérivés de ColE1, a diminué après l'induction<sup>328</sup>.

Il est possible qu'une situation semblable se soit produite suite à l'induction à l'IPTG des promoteurs *trcp*, en localisation chromosomique et orienté de façon divergente à *fooBp* (fusions transcriptionnelles *trcp-fooBpBlacZ* et *tetA-trcp-fooBpBlacZ*) et *lacZp* (plasmides pMT020 et pMT021, où, chez ce dernier, *lacZp* dirige l'expression de *fooI* en *trans*) (Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>; Annexe VI, p.xlix). Même si les plasmides pMT020 et pMT021, dérivés de pACYC184, sont des amplicons p15A, les souches DM800 sont dérivées de *E. coli* K12 et leur culture est faite en condition de glucose limitée. Ainsi, il se peut qu'il y ait eu inhibition de la traduction et de la réplication chromosomiques. Ceci expliquerait également les niveaux d'expression plus faible de  $\beta$ -galactosidase en la présence de ces plasmides portant le promoteur *lacr*.

## Conclusion

L'expression de F165<sub>1</sub> est sensible tant aux changements globaux et locaux du surenroulement de l'ADN. La réceptivité de l'opéron *foo* aux modifications de la superhélicité de l'ADN existe au niveau transcriptionnel ainsi que dans le mécanisme de la variation de phase. Puisque les promoteurs dont l'intervalle entre les régions -10 et -35 est de 16 pb ou 18 pb, au lieu des 17 pb s'y trouvant normalement, seraient des promoteurs sensibles à la torsion (Tw)<sup>4, 8, 19, 358</sup> et que cet intervalle est de 16 pb pour *fooBp* et de 17 pb pour *fooIp*, on soupçonne fortement que *fooBp* soit sensible au surenroulement de l'ADN et que *fooIp* ne le soit pas. La diminution du degré du surenroulement négatif de l'ADN résultant d'une activité moindre de la gyrase (*gyrB225*<sup>278</sup> et *gyrB*<sup>Ts</sup> à 37°C<sup>76, 219</sup>) pourrait être défavorable la séparation des brins lors de l'initiation de la transcription<sup>19, 213, 274</sup> et ainsi causer une baisse du taux d'expression à partir de *fooBp* (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>; Annexe I, p.xix<sup>50</sup>)<sup>75, 222</sup>. Il est aussi possible que la baisse de l'activité de *fooBp* en l'absence de gyrase soit causée par une accumulation de supertours positifs devant le complexe de transcription qui ralentiraient la progression du complexe d'élongation en ne favorisant pas la dissociation des brins de la matrice d'ADN.

De plus, des changements dans la torsion (Tw) et la contorsion (Wr) attribuables aux mutations *gyrB225* et *ΔtopA* pourraient nuire à l'établissement des nombreuses interactions protéine-protéine et protéine-ADN (Table VI, p.125, Article 1<sup>332</sup>) requises pour l'adoption d'une structure en forme de boucle dans l'ADN lors de l'expression fimbriaire en phase *ON* (revues<sup>144, 223, 356, 357</sup>). En présence de la mutation *ΔtopA*, la distorsion de l'ADN, causée par une hausse du niveau local du surenroulement négatif de l'ADN à proximité du promoteur, pourrait être telle que les interactions entre les régulateurs protéiques et avec l'ADN lui-même s'avèrent impossibles ou moins optimales pour l'activation de *fooBp*.

Par ailleurs, la protéine FooI, homologue à PapI, est nécessaire à l'activité optimale de *fooBp* dans l'environnement génétique *topA*<sup>+</sup>. À l'instar de ce qui se passe dans le modèle de la variation de phase chez *pap*<sup>166</sup>, FooI faciliterait la translocation de Lrp à la région GATC-I en vue d'accroître la transcription de *foo*. Si FooI agit sur l'expression de l'opéron *foo* à la manière de PapI chez *pap*, ceci pourrait être corrélé avec l'indépendance du mutant  $\Delta topA$  envers FooI, avec sa fréquence de transition *ON*→*OFF* plus élevée, ainsi qu'avec le plus haut ratio de méthylation du site GATC-I, comparativement aux souches *topA*<sup>+</sup> (Tables III et VI, p.120 et 125, Article 1<sup>332</sup>)

En raison de l'existence préalable d'une forte distorsion locale de l'ADN, attribuable à la mutation  $\Delta topA$ , il est possible que la liaison de FooI à l'ADN, avec Lrp, introduise des contraintes supplémentaires dans l'ADN qui seraient néfastes pour la stimulation de *fooBp*. Cette importante perturbation locale serait aussi responsable de l'indifférence de l'activité de *fooBp* chez le mutant  $\Delta topA$  à l'expression du gène *tetA*. L'étude approfondie du rôle de FooI, en conjonction avec celui de Lrp, aiderait comprendre l'effet du surenroulement de l'ADN sur l'expression de *fooB*. Entre autres, des expériences réalisées à l'aide de mutants *lrp* ainsi qu'une analyse quantitative et qualitative de l'influence du surenroulement sur la méthylation de l'ADN aux sites GATC-I et GATC-II (Figure 3, pp.121-122, Article 1<sup>332</sup>; Annexe I, p.xix<sup>50</sup>) pourraient être réalisées. La réplication serait aussi une avenue à considérer dans la compréhension des effets des mutations topoisomérases sur l'état de méthylation des sites GATC de l'ADN *foo*.

L'orientation divergente des promoteurs *foolp* et *fooBp* ainsi que la distance de 257 pb qui les sépare permettent de soupçonner l'existence d'un couplage transcriptionnel entre ces promoteurs (Figure 1, pp.115-116, Article 1<sup>332</sup>). Ceci est d'ailleurs suggéré par l'impact négatif de la transcription de *fool* sur l'activité de *fooBp* chez les souches  $\Delta topA$ . De plus, la substitution de *foolp* par le promoteur fort *trcp* accroît l'activité de *fooBp* orienté de façon divergente (Table III, p.153, Article 2<sup>331</sup>), ce qui confirme que le surenroulement généré par la transcription est, *in vitro*, d'une importance proportionnelle à la force des promoteurs<sup>257</sup>. Ceci semble largement compenser pour l'absence de FooI. Aussi, à l'instar du promoteur *leu-500p*<sup>257</sup>, la transcription divergente d'une cassette *tetA* stimule l'activité du promoteur *fooBp* chez les souches *topA*<sup>+</sup>, ce qui supporte l'observation

qu'*in vitro*, l'importance du surenroulement généré par la transcription est proportionnelle à la longueur des transcrits<sup>257</sup>. De plus, comme c'est le cas chez l'opéron *ilvYC*<sup>257</sup>, la hausse du surenroulement local généré par la transcription divergente de *tetA* semble compenser pour la baisse du degré de surenroulement global attribuable à la mutation *gyrB225* dans la stimulation transcriptionnelle à partir de *fooBp* chez les mutants *topA*<sup>+</sup> *gyrB225* (Table II, p.152, Article 2<sup>331</sup>; Annexe VI, p.xlix). Chez les souches *topA*<sup>+</sup>, il existerait un effet antagoniste entre la transcription divergente de *tetA* et le régulateur *Fool* sur la stimulation de *fooBp*. Une étude concernant couplage de la transcription à partir de *fooBp* sur l'activité de *fooIp* pourrait aussi être réalisée en vue d'évaluer l'importance de l'organisation divergente de ces promoteurs chez l'opéron fimbriaire *foo*. Il serait également intéressant de connaître l'impact de l'expression divergente de *tetA* sur *fooIp* ainsi que la sensibilité des promoteurs *fooIp* et *fooBp* à l'expression d'une unité transcriptionnelle adjacente transcrite cette fois la même direction.

Il a été proposé que le surenroulement local généré transcriptionnellement à partir d'un promoteur divergent puisse affecter un promoteur avoisinant sensible au surenroulement<sup>196</sup>. Ceci est intéressant en regard du contexte des îlots de pathogénicité (PAIs)<sup>119, 120, 177</sup>, de vastes régions chromosomiques, parfois instables, contenant des groupes de gènes de virulence souvent flanqués de séquences d'éléments d'insertion ou de gènes d'ARNt, qui sont fréquemment trouvés chez les bactéries pathogènes<sup>15, 32, 120</sup>. Chez les isolats naturels de *E. coli*, les opérons fimbriaires *pap*, *prf* et *sfa*, les gènes *hlyI* et *hlyII* codant pour des hémolysines et *kps* codant pour la capsule de type II, sont parmi les déterminants de virulence associés aux PAIs<sup>120, 121</sup>. Chez *E. coli* 4787, à environ 94 min sur le chromosome de *E. coli* et près du gène d'ARNt *pheU*, on retrouve l'opéron *foo* qui ferait partie du PAI I<sub>4787</sub> (travaux non publiés, par H. Dezfoulian, I. Batisson, J.M. Fairbrother, P.C.K. Lau, G. Szatmari et J. Harel). Par ailleurs, l'organisation du chromosome bactérien en domaines permettrait de contrôler de façon indépendante le surenroulement des différents domaines et de coordonner ainsi la régulation de batteries de gènes d'un même domaine<sup>267</sup>. De plus, puisque les noeuds et enchevêtrements persistants dans l'ADN peuvent empêcher la transcription<sup>273</sup>, il serait intéressant de connaître leur impact sur l'expression génétique (*silencing*)<sup>317</sup>.

Ainsi, en tant que réponse adaptative aux changements environnementaux, la sensibilité de *fooBp* au degré du surenroulement de l'ADN pourrait permettre l'expression coordonnée des gènes de virulence en vue d'établir avec succès la colonisation et l'infection d'un hôte. De plus, il est possible que l'indépendance relative de *fooBp* envers la transcription divergente à partir de *fooIp*, lorsque le surenroulement de l'ADN est à un niveau sauvage, favorise une réponse adéquate de l'activité de *fooBp* aux fluctuations du surenroulement de l'ADN causées par le milieu lors du processus de pathogenèse.

## Perspectives

Le succès de l'invasion et/ou de la colonisation d'un hôte par les bactéries pathogènes nécessite une orchestration régulée des fonctions de virulence<sup>94, 95, 131, 136</sup>. En plus de permettre une réduction des coûts énergétiques associés à leur expression, un tel contrôle peut s'avérer nécessaire à l'expression différentielle des déterminants de virulence selon les diverses étapes de l'infection de l'hôte. Lors du processus de la pathogenèse de *E. coli* chez les animaux et l'humain, les adhésines contribuent à l'établissement de l'infection en permettant aux bactéries de résister à l'expulsion par les fluides et autres substances qui baignent ces surfaces<sup>12, 329</sup>. Cette capacité d'adhérence aux surfaces cellulaires de l'hôte est pré-requise à la colonisation et à l'invasion microbienne<sup>14, 88</sup>.

Un changement d'environnement et le transfert d'un hôte à un autre constituent de nombreux stimuli qui sont détectés par les bactéries et qui correspondent à des signaux pour l'activation de leur fonctions de virulence<sup>210, 231, 234</sup>. En effet, lors de l'invasion d'un hôte, la bactérie est confrontée à des hausses de température et d'osmolarité, à une transition de l'aérobiose à l'anaérobiose ou encore à un changement de pH, lesquelles conditions s'accompagnent d'une altération du degré de surenroulement de l'ADN<sup>65, 69</sup>. L'activité transcriptionnelle de plusieurs promoteurs bactériens est influencée par le niveau du surenroulement négatif de l'ADN, lequel est contrôlé par les ADN topoisomérases<sup>76, 207, 357, 376</sup>.

L'expression de *foo*, codant pour le facteur de virulence fimbriaire F165<sub>1</sub> (type P), est influencée par le degré du surenroulement de l'ADN, tant au niveau local que global<sup>50, 331, 332</sup>, de même que par les conditions environnementales<sup>50, 57</sup>. Par conséquent, en réponse aux changements du milieu, la sensibilité de *fooBp* au degré du surenroulement de l'ADN pourrait permettre à la souche pathogène porcine *E. coli* 4787 d'exprimer adéquatement le fimbriae F165<sub>1</sub> en vue d'établir avec succès la colonisation et l'infection d'un hôte.

Les fluctuations du degré du surenroulement de l'ADN, attribuables aux mutations topoisomérases *gyrB225* et  $\Delta$ *topA-gyrB225*, influencent l'expression de l'opéron *foo*, tant au niveau de la transcription basale que de la variation de phase<sup>332</sup>. Ainsi, en interférant avec l'activité des topoisomérases, l'altération du degré du surenroulement de l'ADN pourrait, en diminuant l'expression de l'adhésine fimbriaire F165<sub>1</sub>, nuire à la colonisation de l'hôte par les *E. coli* F165-positives. De plus, puisque F165<sub>1</sub> est associé à la résistance des *E. coli* O115:K"V165" à la mort phagocytaire<sup>248</sup> grâce à l'inhibition de la réponse oxydative chez les PMLs<sup>246</sup>, cette résistance pourrait être amoindrie par une expression plus faible de F165<sub>1</sub>. Ceci faciliterait l'action efficace du système immunitaire de l'hôte lors du combat contre l'infection.

À l'instar du fimbriae P dans l'ITU (voir l'exemple de AirS<sup>1,266</sup>), il est aussi possible que la liaison du fimbriae F165<sub>1</sub> à son récepteur, par un système de transduction de signal à deux composantes, déclenche l'expression d'autres facteurs de virulence. De cette façon, en nuisant, par l'altération du niveau du surenroulement de l'ADN, à l'expression de F165<sub>1</sub>, on affecterait également l'expression d'autres facteurs de virulence requis pour la réussite de l'infection par les souches pathogènes de *E. coli* F165-positives.

L'interférence avec l'action des topoisomérases, en plus de nuire à l'expression de F165<sub>1</sub>, causerait probablement aussi une réponse inadéquate des bactéries pathogènes aux stimuli environnementaux. Ainsi, tant l'adaptation de la bactérie aux conditions du milieu que l'expression adéquatement régulée des divers déterminants de virulence seraient court-circuitées.

Plusieurs études suggèrent que la gyrase possède l'activité clé contribuant à la réponse environnementale au niveau du surenroulement de l'ADN<sup>65</sup>. Les quinolones telles l'acide nalidixique, l'acide oxonolique et la norfloxacine affectent la protéine GyrA<sup>39, 73, 299, 312, 374</sup>. Par exemple, des antibiotiques nuisant à l'activité des topoisomérases pourraient permettre le contrôle des infections causées par les souches de *E. coli* pathogènes, plus particulièrement lorsque l'expression de l'un de leurs facteurs de virulence s'avère sensible au surenroulement de l'ADN.

Ainsi, il sera intéressant d'étudier le rôle de la topologie de l'ADN et des topoisomérases sur l'expression du fimbriae F165<sub>1</sub>, en relation avec le stress que représentent les différentes conditions environnementales rencontrées par la bactérie lors du processus d'infection. Par ailleurs, afin de vérifier l'implication des ADN topoisomérases dans la pathogénie, il faudra se pencher sur les effets des mutations topoisomérases sur la virulence des souches pathogènes de *E. coli* F165-positives.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Abraham, S. N., A.-B. Jonsson, and S. Normark.** 1998. Fimbriae-mediated host-pathogen cross-talk. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 75-81.
2. **Adhya, S.** 1987. The galactose operon, p. 1503-1512. *In* F. C. Neidhardt, F. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington D.C.
3. **Andreu, A., A. E. Stapleton, C. Fennell, H. A. Lockman, M. Xercavins, F. Fernandez, and W. E. Stamm.** 1997. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. *J. Infect. Dis.* **176**: 464-469.
4. **Aoyama, T., and M. Takanami.** 1988. Supercoiling response of *E. coli* promoters with different spacer lengths. *Biochim. Biophys. Acta* **949**: 311-317.
5. **Asai, T., C.-P. Chen, T. Nagata, M. Takanami, and M. Imai.** 1992. Transcription *in vivo* within the replication origin of the *Escherichia coli* chromosome: a mechanism for activating initiation of replication. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 169-178.
6. **Asai, T., and T. Kogoma.** 1994. D-loops and R-loops: alternative mechanisms for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 1807-1812.
7. **Atlung, T., and H. Ingmer.** 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**: 7-17.
8. **Auble, D. T., and P. L. deHaseh.** 1988. Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase: influence of DNA structure in the spacer separating the -10 and -35 regions. *J. Mol. Biol.* **202**: 471-482.
9. **Båga, M., M. Göransson, S. Normark, and B. E. Uhlin.** 1988. Processed mRNA with differential stability in the regulation of *E. coli* pilin gene expression. *Cell* **52**: 197-206.
10. **Båga, M., M. Göransson, S. Normark, and B. E. Uhlin.** 1985. Transcriptional activation of a Pap pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J.* **4**: 3887-3893.
11. **Balke, V. L., and J. D. Gralla.** 1987. Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 4499-4506.
12. **Beachy, E. H.** 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* **143**: 325-345.
13. **Bellomy, G. R., and M. T. Records, Jr.** 1990. Stable DNA loops *in vivo* and *in vitro*: roles in gene regulation at a distance and in biophysical characterization of DNA. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **39**: 81-128.
14. **Bliska, J. B., J. E. Galan, and S. Falkow.** 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* **73**: 903-920.
15. **Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschäpe, and J. Hacker.** 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**: 606-614.
16. **Blyn, L. B., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1990. Regulation of *pap* pilin phase variation by a mechanism involving differential *dam* methylation states. *EMBO J.* **9**: 4045-4054.
17. **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.

18. **Bonnefoy, E., and J. Rouviere-Yaniv.** 1991. HU and IHF, two homologous histone-like proteins of *Escherichia coli*, form different protein-DNA complexes with short DNA fragments. *EMBO J.* **10**: 687-696.
19. **Borowiec, J. A., and J. D. Gralla.** 1987. All three elements of the *lac ps* promoter mediate its transcriptional response to DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.* **195**: 89-97.
20. **Borowiec, J. A., and J. D. Gralla.** 1985. Supercoiling response of the *lac p<sup>s</sup>* promoter *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **184**: 587-598.
21. **Bowater, R., D. Chen, and D. M. J. Lilley.** 1994. Elevated unconstrained supercoiling of plasmid DNA generated by transcription and translation of the tetracycline resistance gene in eubacteria. *Biochem.* **33**: 9266-9275.
22. **Boye, E., and A. Lobner-Olesen.** 1990. The role of Dam methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*. *Cell* **62**: 981-989.
23. **Braaten, B. A., L. B. Blyn, B. S. Skinner, and D. A. Low.** 1991. Evidence for a methylation-blocking factor (*mbf*) locus involved in *pap* pilus expression and phase variation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 1789-1800.
24. **Braaten, B. A., X. Nou, L. S. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1994. Methylation patterns in *pap* regulatory DNA pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**: 577-588.
25. **Braaten, B. A., J. V. Platko, M. W. van der Woude, B. H. Simons, F. K. de Graaf, J. M. Calvo, and D. A. Low.** 1992. Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the *pap* and *fan* family operons in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 4250-4254.
26. **Broccoli, S., P. Phoenix, and M. Drolet.** 2000. Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**: 58-68.
27. **Buckle, M., and H. Buc.** 1989. Fine mapping of DNA single stranded regions using base-specific chemical probes: study of an open complex formed between RNA polymerase and the *lac UV5* promoter. *Biochem.* **28**: 4388-4396.
28. **Busby, S., and R. H. Ebright.** 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**: 199-213.
29. **Calvo, J. M., and R. G. Matthews.** 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli* [erratum publié dans *Microbiol. Rev.* Jun 1995 59 (2); 323]. *Microbiol. Rev.* **58**: 466-490.
30. **Carmona, M., C. Balsalobre, F. Munoa, M. Mourino, Y. Jubete, F. De la Cruz, and A. Juarez.** 1993. *Escherichia coli hha* mutants, DNA supercoiling and expression of the haemolysin genes from the recombinant plasmid pANN202-312. *Mol. Microbiol.* **9**: 1011-1018.
31. **Chamberlin, M. J.** 1974. The selectivity of transcription. *Annu. Rev. Chem.* **43**: 721-745.
32. **Cheetham, B. F., and M. E. Katz.** 1995. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. Review. *Mol. Microbiol.* **18**: 201-208.
33. **Chen, D., S. Bachellier, and D. M. J. Lilley.** 1998. Activation of the *leu-500* promoter by a reversed polarity *tetA* gene. *J. Biol. Chem.* **273**: 653-659.
34. **Chen, D., R. Bowater, C. J. Dorman, and D. M. J. Lilley.** 1992. Activity of a plasmid-borne *leu-500* promoter depends on the transcription of an adjacent gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 8784-8788.

35. **Chen, D., R. Bowater, and D. M. J. Lilley.** 1993. Activation of the *leu-500* promoter: a topological domain generated by divergent transcription in a plasmid. *Biochem.* **32**: 13162-13170.
36. **Chen, D., R. Bowater, and D. M. J. Lilley.** 1994. Topological promoter coupling in *Escherichia coli*:  $\Delta$  *topA*-dependent activation of the *leu-500* promoter on a plasmid. *J. Bacteriol.* **176**: 3757-3764.
37. **Chen, Y.-F., and J. D. Helmann.** 1997. DNA melting at the *Bacillus subtilis* flagellin promoter nucleates near -10 and expands unidirectionally. *J. Mol. Biol.* **267**: 47-59.
38. **Cherifi, A., M. Contrepois, N. Picard, P. Goulet, J. de Rycke, J. M. Fairbrother, and J. Barnouin.** 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicaemia. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**: 279-284.
39. **Condemine, G., and C. L. Smith.** 1990. Transcription regulates oxolinic acid-induced DNA gyrase cleavage at specific sites on the *E. coli* chromosome. *Nucl. Acids Res.* **18**: 7389-.
40. **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.* **59**: 319-324.
41. **Cook, D., D. Ma, M. Pon, and J. Hearst.** 1992. Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10603-10607.
42. **Coote, J. G.** 1991. Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2493-2503.
43. **Cornelis, G. R., Biot, T., C. Lambert de Rouvoit, T. Michiels, B. Mulder, C. Sluiter, M. P. Sory, M. Van Bouchaute, and J. C. Vanooteghem.** 1989. The *Yersinia yop* regulon. Review. *Mol. Microbiol.* **3**: 1455-1459.
44. **Cornelis, G. R., C. Sluiter, I. Delor, D. Geib, K. Kaniga, C. Lambert de Rouvoit, M. P. Sory, J. C. Vanooteghem, and T. Michiels.** 1991. *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol. Microbiol.* **5**: 1023-1034.
45. **Cotter, P. A., and J. F. Miller.** 1996. Triggering bacterial virulence. *Science* **273**: 1183-1184.
46. **Cozzarelli, N. R.** 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207**: 953-960.
47. **Craig, M. L., W.-C. Suh, and M. T. Record, Jr.** 1995. HO and DNase I probing of  $E\sigma^{70}$  RNA polymerase  $-\lambda$ PR promoter open complexes: Mg<sup>2+</sup> binding and its structural consequences at the transcription start site. *Biochem.* **34**: 15624-15632.
48. **Daigle, F.** 1996. Études génétiques des facteurs de virulence de souches d'*Escherichia coli* causant des infections extraintestinales. Thèse Ph.D. Université de Montréal, Montréal.
49. **Daigle, F., C. M. Dozois, M. Jacques, and J. Harel.** 1997. Mutations in the *fl65<sub>1A</sub>* and *fl65<sub>1E</sub>* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microb. Pathogen.* **22**: 247-252.
50. **Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M.-C. Tessier, H. Dezfoulian, and J. Harel.** 2000. Effects of environmental conditions and global regulatory proteins on regulation of F165<sub>1</sub> (Prs-like) and F165<sub>2</sub> (F1C-like) fimbrial expression in *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Res. Microbiol.* **151**: 563-574.

51. **Danese, P. N., and T. J. Silhavy.** 1997. The  $\sigma$ E and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding systems in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**: 1183-1193.
52. **Davidson, N.** 1972. Effect of DNA length on the free energy of binding of an unwinding ligand to a superhelical DNA. *J. Mol. Biol.* **66**: 307-309.
53. **De Las Penas, A., L. Connolly, and C. A. Gross.** 1997. The  $\sigma$ E-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of  $\sigma$ E. *Mol. Microbiol.* **24**: 373-385.
54. **deHaseth, P. L., and J. D. Helmann.** 1995. Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Mol. Microbiol.* **16**: 817-824.
55. **deHaseth, P. L., M. L. Zupancic, and M. T. Record, Jr.** 1998. RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. MiniReview. *J. Bacteriol.* **180**: 3019-3025.
56. **Dethiollaz, S., P. Eichenberger, and J. Geiselmann.** 1996. Influence of DNA geometry on transcriptional activation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**: 5449-5438.
57. **Dezfulian, H., C. Crost, and J. Harel.** 2001. A mini review on F165 fimbriae. *Recent Res. Devel. Microbiol.* **5**: 123-137.
58. **DiGate, R. J., and K. J. Marians.** 1992. *Escherichia coli* topoisomerase III-catalyzed cleavage of RNA. *J. Biol. Chem.* **267**: 20532-20535.
59. **DiGate, R. J., and K. J. Marians.** 1988. Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 13366-13373.
60. **DiGate, R. J., and K. J. Marians.** 1989. Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* **264**: 17924-17930.
61. **DiNardo, S., K. A. Voelkel, R. Sternglanz, A. E. Reynolds, and A. Wright.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**: 43-51.
62. **Dobrindt, U., and J. Hacker.** 1999. Plasmids, phages and pathogenicity islands in relation to bacterial protein toxins: impact on the evolution of microbes, p. pp.3-23. *In* J. E. Allof and J. H. Freer (ed.), *The comprehensive sourcebook of bacterial toxins protein*. Academic Press.
63. **Dodson, K. W., F. Jacob-Dubuisson, R. T. Striker, and S. J. Hultgren.** 1993. Outer-membrane PapC molecule usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 3670-3674.
64. **Dorman, C. J.** 1991. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect. Immun.* **59**: 745-749.
65. **Dorman, C. J.** 1995. Fleming Lecture. DNA topology and the global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. *Microbiol.* **141**: 1271-1280.
66. **Dorman, C. J., G. C. Barr, N. Ní Bhriain, and C. F. Higgins.** 1988. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J. Bacteriol.* **170**: 2816-2826.
67. **Dorman, C. J., A. S. Lynch, N. Ní Bhriain, and C. F. Higgins.** 1989. DNA supercoiling in *Escherichia coli*: *topA* mutations can be suppressed by amplifications involving the *tolC* locus. *Mol. Microbiol.* **3**: 531-540.

68. **Dorman, C. J., and N. Ní Bhriain.** 1992. Global regulation of gene expression during environmental adaptation: implications for bacterial pathogens, p. 193-230. *In* C. E. Hormaeche, C. W. Penn, and C. J. Smyth (ed.), *Molecular biology of bacterial infection: current status and future perspectives*, Society for General Microbiology Symposium, vol. 49. Cambridge University Press, Cambridge.
69. **Dorman, C. J., N. Ní Bhriain, and C. F. Higgins.** 1990. DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *Nature* **344**: 789-792.
70. **Dove, S. L., and C. J. Dorman.** 1994. The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit gene is sensitive to changes in DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **14**: 975-988.
71. **Driessen, A. J. M., P. Fekkes, and J. P. W. van der Wolk.** 1998. The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 216-222.
72. **Drlica, K.** 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **6**: 425-433.
73. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 377-392.
74. **Drolet, M., X. Bi, and L. F. Liu.** 1994. Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**: 2068-2074.
75. **Drolet, M., P. Phoenix, R. Menzel, E. Massé, L. F. Liu, and R. J. Crouch.** 1995. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli*  $\Delta topA$  mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3526-3530.
76. **Drolet, M., H.-Y. Wu, and L. F. Liu.** 1994. Roles of DNA topoisomerases in transcription. *Adv. Pharmacol.* **29A**: 134-146.
77. **Dubanau, E., and P. Margolin.** 1972. Suppression of promoter mutations by the pleiotropic *supX* mutation. *Mol. Gen. Genet.* **117**: 91-112.
78. **Dubreuil, J. D., and J. M. Fairbrother.** 1992. Biochemical and serological characterization of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165-2. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**: 219-224.
79. **Dziejman, M., and J. J. Mekalanos.** 1995. Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors, p. 305-317. *In* J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington, D.C.
80. **El Hanafi, D., and L. Bossi.** 2000. Activation and silencing of *leu-500* promoter by transcription-induced DNA supercoiling in the *Salmonella* chromosome. *Mol. Microbiol.* **37**: 583-594.
81. **Ellison, M. J., M. J. Fenton, P. S. Ho, and A. Rich.** 1987. Long-range interactions of multiple DNA structural transitions within a common topological domain. *EMBO J.* **6**: 1513-1522.
82. **Eriksson, A. R. B., R. A. Andersson, M. Pirhonen, and E. T. Palva.** 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Micr. Interact.* **11**: 743-752.
83. **Espeli, O., and F. Bocard.** 1997. *In vivo* cleavage of *Escherichia coli* BIME-2 repeats by DNA gyrase: genetic characterization of the target and identification of the cut site. *Mol. Microbiol.* **26**: 767-777.
84. **Fairbrother, J. M., R. Broes, M. Jacques, and S. Larivière.** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K:"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* **50**: 1029-1036.

85. **Fairbrother, J. M., J. Harel, C. Forget, C. Desautels, and J. Moore.** 1993. Receptor binding specificity and pathogenicity of *Escherichia coli* F165-positive strains isolated from piglets and calves and possessing *pap*-related sequences. *Can. J. Vet. Res.* **57**: 53-55.
86. **Fairbrother, J. M., R. Lallier, L. Leblanc, M. Jacques, and S. Larivière.** 1988. Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 247-252.
87. **Fairbrother, J. M., S. Larivière, and R. Lallier.** 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains Isolated from pigs with diarrhea. *Infect. Immun.* **51**: 10-15.
88. **Falkow, S., R. R. Isberg, and D. A. Portnoy.** 1992. The interaction of bacteria with mammalian cells. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **8**: 333-363.
89. **Fang, M., and H.-Y. Wu.** 1998. A promoter relay mechanism for sequential gene activation. *J. Bacteriol.* **180**: 626-633.
90. **Fang, M., and H.-Y. Wu.** 1998. Suppression of *leu-500* mutation in *topA*<sup>+</sup> *Salmonella typhimurium* strains. *J. Biol. Chem.* **273**: 29929-29934.
91. **Figuroa, N., and L. Bossi.** 1988. Transcription induces gyration of the DNA template in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 9416-20.
92. **Filutowicz, M., and P. Jonczyk.** 1983. The *gyrB* gene product functions in both initiation and chain polymerization of *Escherichia coli* chromosome replication: suppression of the initiation deficiency in *gyrB*-ts mutants by a class of *rpoB* mutations. *Mol. Gen. Genet.* **191**: 282-287.
93. **Filutowicz, M., W. Ross, J. Wild, and R. L. Gourse.** 1992. Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 398-407.
94. **Finlay, B. B., and P. Cossart.** 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**: 718-725.
95. **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-169.
96. **Flashner, Y., and J. D. Gralla.** 1988. DNA dynamic flexibility and protein recognition: differential stimulation by bacterial histone-like protein HU. *Cell* **54**: 713-721.
97. **Forsman, K., M. Göransson, and B. E. Uhlin.** 1989. Autoregulation and multiple DNA interactions by a transcriptional regulatory protein in *E. coli* pili biogenesis. *EMBO J.* **8**: 1271-1277.
98. **Forsman, K., B. Sonden, M. Göransson, and B. E. Uhlin.** 1992. Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP-cAMP receptor protein transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9880-9884.
99. **Foxman, B., L. Zhang, K. Palin, P. Tallman, and C. F. Marrs.** 1995. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* **171**: 1514-1521.
100. **Freundus, B., C. Wachtler, M. Hedlund, H. Fisher, P. Samuelsson, M. Svensson, and C. Svanborg.** 2001. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol. Microbiol.* **40**: 37-51.
101. **Frost, L. S., B. B. Finlay, A. Opgenorth, W. Paranchych, and J. S. Lee.** 1985. Characterization and sequence analysis of pilin from F-like plasmids. *J. Bacteriol.* **164**: 1238-1247.

102. **Fuqua, C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Review. *Ann.Rev.Microbiol.* **50**: 727-751.
103. **Galan, J. E., and R. Curtiss III.** 1990. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.* **58**: 1879-1885.
104. **Geiselman, J.** 1997. The Role of DNA conformation in transcriptional initiation and activation in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* **378**: 599-607.
105. **Gellert, M., M. Mizuuchi, M. H. O'Dea, and H. Nash.** 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**: 3872-3876.
106. **Gemmill, R. M., M. Tripp, S. B. Friedman, and J. M. Calvo.** 1984. Promoter mutation causing catabolite repression of the *Salmonella typhimurium* leucine operon. *J. Bacteriol.* **158**: 948-953.
107. **Glasgow, A. C., K. T. Hughes, and M. I. Simon.** 1989. Bacterial DNA inversion systems, p. 637-659. *In* D. E. Berg and M. M. Howe (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
108. **Goldstein, E., and K. Drlica.** 1984. Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 4046-4050.
109. **Göransson, M., K. Forsman, and B. E. Uhlin.** 1988. Functional and structural homology among regulatory cistrons of pili-adhesin determinants in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 412-417.
110. **Göransson, M., K. Forsman, and B. E. Uhlin.** 1989. Regulatory genes in the thermoregulation of *Escherichia coli* pili gene transcription. *Genes Dev.* **3**: 123-130.
111. **Göransson, M., P. Forsman, P. Nilsson, and 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.
112. **Göransson, M., B. Sonden, P. Nilsson, B. Dagberg, K. Forsman, K. Emanuelsson, and B. E. Uhlin.** 1990. Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature (London)* **344**: 682-685.
113. **Göransson, M., and B. E. Uhlin.** 1984. Environmental temperature regulates transcription of a virulence pili operon in *E. coli*. *EMBO J.* **3**: 2885-2888.
114. **Graeff-Wohlleben, H., H. Deppisch, and R. Gross.** 1995. Global regulatory mechanisms affect virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 86-94.
115. **Griffiths, A. J. F., W. M. Gelbart, J. H. Miller, and R. C. Lewontin.** 1999. *Introduction to genetic analysis*, 7th ed. W.H. Freeman & Co., New York.
116. **Groisman, E. A., and F. Heffron.** 1995. Regulation of *Salmonella* virulence by two-component regulatory systems, p. 319-332. *In* J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington, D.C.
117. **Gross, R.** 1993. Signal transduction and virulence regulation in human and animals pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **10**: 301-326.
118. **Hacker, J.** 1990. Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins of extraintestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**: 1-27.

119. **Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre, and W. Goebel.** 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathogen.* **8**: 213-225.
120. **Hacker, J., I. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, and H. Tschäpe.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
121. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 1999. The concept of pathogenicity islands, p. pp.1-11. *In* J. B. Kaper and J. Hacker (ed.), Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. ASM Press, Washington, D.C.
122. **Hagerman, P. J.** 1985. Sequence dependence of the curvature of DNA: a test of the phasing hypothesis. *Biochem.* **24**: 7033-7037.
123. **Hale, W. B., M. W. van der Woude, and D. A. Low.** 1994. Analysis of nonmethylated GATC sites in the *Escherichia coli* chromosome and identification of sites that are differentially methylated in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* **176**: 3438-3441.
124. **Hammond, G. H., P. J. Cassidy, and K. M. Overbye.** 1991. Novobiocin-dependent *topA* deletion mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 5564-5567.
125. **Harel, J., F. Daigle, C. Forget, M.-C. Tessier, C. Crost, and C. Martin.** 2000. Phase variation of F165<sub>1</sub>(Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. *Can. J. Microbiol.* **46**: 1101-1107.
126. **Harel, J., F. Daigle, S. Maiti, C. Desautels, A. Labigne, and J. M. Fairbrother.** 1991. Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*- related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**: 177-182.
127. **Harel, J., J. M. Fairbrother, C. Forget, C. Desautels, and J. Moore.** 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet. Microbiol.* **38**: 139-155.
128. **Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992*b*. Isolation and characterization of adhesin-defective Tn*phoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F155. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2337-2345.
129. **Harel, J., C. Forget, J. Saint-Amand, F. Daigle, D. Dubreuil, M. Jacques, and J. Fairbrother.** 1992*a*. Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165<sub>1</sub>, a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1495-1502.
130. **Harel, J., M. Jacques, J. M. Fairbrother, M. Bossé, and C. Forget.** 1995. Cloning determinants encoding F165<sub>2</sub> fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiol.* **141**: 221-228.
131. **Harel, J., and C. Martin.** 1999. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Review. Vet. Res.* **30**: 131-155.
132. **Harrison, J. A., D. Pickard, C. F. Higgins, A. Khan, S. N. Chatfield, T. Ali, C. J. Dorman, C. E. Hormaeche, and G. Dougan.** 1994. Role of *hns* in the virulence phenotype of pathogenic *Salmonellae*. *Mol. Microbiol.* **13**: 133-140.
133. **Hedlund, M., M. Svensson, A. Nilsson, R. D. Duan, and C. Svanborg.** 1996. Role of the ceramide-signaling pathway in cytokine responses to P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* **183**: 1037-1044.
134. **Henderson, B., S. Poole, and M. Wilson.** 1996. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol. Rev.* **60**: 316-341.

135. **Henderson, I. R., P. Owen, and J. P. Nataro.** 1999. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. *MicroReview. Mol. Microbiol.* **33**: 919-932.
136. **Hentschel, U., M. Steinert, and J. Hacker.** 2000. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Review. Trends Microbiol.* **8**: 226-231.
137. **Heumann, H., M. Ricchetti, and W. Werel.** 1988. DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli* induces bending or an increased flexibility of DNA by specific complex formation. *EMBO J.* **7**: 4379-4381.
138. **Hiasa, H., R. J. DiGate, and K. J. Marians.** 1994. Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**: 2093-2099.
139. **Hiasa, H., and K. J. Marians.** 1996. Two distinct modes of strand unlinking during Theta-type DNA replication. *J. Biol. Chem.* **271**: 21529-21535.
140. **Higgins, N. P., and N. R. Cozzarelli.** 1982. The binding of gyrase to DNA: analysis by retention by nitrocellulose filters. *Nucl. Acids Res.* **10**: 6833-6847.
141. **Higgins, N. P., X. Yang, Q. Fu, and J. R. Roth.** 1996. Surveying a supercoil domain by using the  $\gamma\delta$  resolution system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **178**: 2825-2835.
142. **Hoch, J. A., and T. J. Silhavy (ed.).** 1995. Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.
143. **Hochschild, A.** 1991. Detecting cooperative protein-DNA interactions and DNA loop formation by footprinting. *Methods Enzymol.* **208**: 358?-364.
144. **Hochschild, A.** 1990. Protein-protein interactions and DNA loop formation, p. 107-138. *In* N. R. Cozzarelli and J. C. Wang (ed.), *DNA topology and its biological effects*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
145. **Hochschild, A., and M. Ptashne.** 1986. Cooperative binding of  $\lambda$  repressors to sites separated by integral turns of the DNA helix. *Cell* **44**: 681-687.
146. **Holden, N., C. Cotterill, and D. Gally.** 2000. Examination of regulatory cross-talk between the decay accelerating factor-binding fimbrial/afimbrial adhesins and type I fimbriae. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**: 143-150.
147. **Horwitz, M. S.** 1989. Transcription regulation *in vitro* by an *E. coli* promoter containing a DNA cruciform in the '-35' region. *Nucl. Acids Res.* **17**: 5537-45.
148. **Hraiky, C., M.-A. Raymond, and M. Drolet.** 2000. RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 11257-11263.
149. **Hsieh, L. S., R. M. Burger, and K. Drlica.** 1991. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]: changes associated with a transition to anaerobic growth. *J. Mol. Biol.* **219**: 443-450.
150. **Hsieh, T.-S., and J. C. Wang.** 1975. Thermodynamics properties of superhelical DNAs. *Biochem.* **14**: 527-535.
151. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 379-433.
152. **Hultgren, S. J., C. H. Jones, and S. Normark.** 1996. Bacterial adhesins and their assembly, p. 2730-2756. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, Second ed, vol. 2. ASM Press, Washington, D.C.
153. **Hung, D. L., T. L. Raivio, C. H. Jones, T. J. Silhavy, and S. J. Hultgren.** 2001. Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *EMBO J.* **20**: 1509-1518.

154. **Hurme, R., and M. Rhen.** 1998. Temperature sensing in bacterial gene regulation - what it all boils down to. *MicroReview. Mol. Microbiol.* **30**: 1-6.
155. **Hussain, K., E. J. Elliot, and G. P. Salmond.** 1987. The *parD*- mutant of *Escherichia coli* also carries a *gyrA<sub>am</sub>* mutation. The complete sequence of *gyrA*. *Mol. Microbiol.* **1**: 259-273.
156. **Inan, S., and A. Kalaycioglu.** 1996. Effect of nalidixic acid on recombination and DNA repair of *Escherichia coli* K-12 strains. *Indian J. Exp. Biol.* **34**: 949-953.
157. **Jacob-Dubuisson, F., J. Heuser, K. Dodson, S. Normark, and S. Hultgren.** 1993. Initiation of assembly and association of the structural elements of a bacterial pilus depend on two specialized tip proteins. *EMBO J.* **12**: 837-847.
158. **Jaworski, A., N. P. Higgins, R. D. Wells, and W. Zacharias.** 1991. Topoisomerase mutants and physiological conditions control supercoiling and Z-DNA formation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **266**: 2576-2581.
159. **Jensen, P. R., C. C. Van Der Weijden, L. B. Jensen, H. V. Westerhoff, and J. L. Snoep.** 1999. Extensive regulation compromises the extent to which DNA gyrase controls DNA supercoiling and growth rate of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **266**: 865-877.
160. **Johanson, I., R. Lindstedt, and C. Svanborg.** 1992. Roles of the *pap*- and *prs*-encoded adhesins in *Escherichia coli* adherence to human uroepithelial cells. *Infect. Immun.* **60**: 3416-3422.
161. **Johnson, J. R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 80-128.
162. **Jones, C. H., P. N. Danese, J. S. Pinkner, T. J. Silhavy, and S. J. Hultgren.** 1997. The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J.* **16**: 6394-6406.
163. **Jordi, B. J. A. M., B. Dagberg, L. A. M. de Haan, A. M. Hamers, B. A. M. vanderZijst, W. Gasstra, and B. E. Uhlin.** 1992. The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/I fimbrial operon of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**: 2627-2632.
164. **Kaguni, J. M., and A. Kornberg.** 1984. Topoisomerase I confers specificity in enzymatic replication of the *Escherichia coli* chromosomal origin. *J. Biol. Chem.* **259**: 8578-8583.
165. **Kaltenbach, L., B. Braaten, J. Tucker, M. Krabbe, and D. Low.** 1998. Use of a two-color genetic screen to identify a domain of the global regulator Lrp that is specifically required for *pap* phase variation. *J. Bacteriol.* **180**: 1224-1231.
166. **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.
167. **Kano, Y., T. Miyashita, H. Nakamura, K. Kurochi, A. Nagata, and F. Imamoto.** 1981. *In vivo* correlation between DNA supercoiling and transcription. *Gene* **13**: 173-184.
168. **Katahira, M., H. Sugeta, and Y. Kyogoku.** 1990. A new model for the bending of DNAs containing the oligo(dA) tracts based on NMR observations. *Nucl. Acids Res.* **18**: 613-618.
169. **Kato, J., Y. Nishimura, and H. Suzuki.** 1989. *Escherichia coli parA* is an allele of the *gyrB* gene. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 178-181.
170. **Kato, J., Y. Nishimura, M. Yamada, H. Suzuki, and Y. Hirota.** 1988. Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 3967-3977.

171. **Kato, J.-I., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki.** 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Cell* **63**: 393-404.
172. **Khodursky, A. B.** 1997. Probing type 2 topoisomerase function with antibiotics *in vivo*. Ph.D. Thesis. University of California, Berkeley.
173. **Kikuchi, and Asai.** 1984. Reverse-gyrase - a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature* **309**: 677-681.
174. **Kirkegaard, K., H. Buc, A. Spassky, and J. Wang.** 1983. Mapping of single-stranded regions in duplex DNA at the sequence level: single-strand-specific cytosine methylation in RNA polymerase-promoter complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 2544-2548.
175. **Kitten, T., T. G. Kinscherf, J. L. McEvoy, and D. K. Willis.** 1998. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **28**: 917-929.
176. **Kleppe, K., S. Ovrebo, and I. Lossius.** 1979. The bacterial nucleoid. *J. Gen. Microbiol.* **112**: 1-13.
177. **Knapp, S., J. Hacker, T. Jarchau, and W. Goebel.** 1986. Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J. Bacteriol.* **168**: 22-30.
178. **Kohwi, Y., S. R. Malkhosyan, and T. Kohi-Shigematsu.** 1992. Intramolecular dG-dG-dC triplex detected in *Escherichia coli* cells. *J. Mol. Biol.* **223**: 817-822.
179. **Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges, and S. Adhya.** 1993. Transcriptional regulation by cyclic AMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 749-795.
180. **Kolmar, H., P. R. H. Waller, and R. T. Sauer.** 1996. The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrates conformation. *J. Bacteriol.* **178**: 5925-5929.
181. **Koo, H. S., H. M. Wu, and D. M. Crothers.** 1986. DNA bending at adenine thymine tracts. *Nature* **326**: 501-506.
182. **Koo, H.-S., H.-Y. Wu, and L. F. Liu.** 1990. Effects of transcription and translation on gyrase-mediated DNA cleavage in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 12300-12305.
183. **Krasilnikov, A. S., A. Podtelezhnikov, A. Vologodskii, and S. M. Mirkin.** 1999. Large-scale effects of transcriptional DNA supercoiling *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **292**: 1149-1160.
184. **Kreuser, K. N., and N. R. Cozzarelli.** 1979. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.* **140**: 424-435.
185. **Kuhnke, G., H.-J. Fritz, and R. Ehring.** 1987. Unusual properties of promoter-up mutations in the *Escherichia coli* galactose operon and evidence suggesting RNA polymerase-induced DNA bending. *EMBO J.* **6**: 507-513.
186. **Lamond, A. I.** 1985. Supercoiling response of a bacterial tRNA gene. *EMBO J.* **4**: 501-507.
187. **Leimeister, M., E. Domann, and T. Chakraborty.** 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* **174**.
188. **Levine, C., and K. J. Marians.** 1998. Identification of *dnaX* as a high-copy suppressor of the conditional lethal and partition phenotypes of the *parE10* allele. *J. Bacteriol.* **180**: 1232-1240.

189. **Levine, M. M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**: 377-389.
190. **Lewin, B. (ed.)**. 1997. *Genes VI*. Oxford University Press, Inc., New York.
191. **Liao, C. H., D. E. McCallus, W. F. Fett, and G. Y. Kang.** 1997. Identification of a gene loci controlling pectate lyase production and soft-rot pathogenicity in *Pseudomonas marginalis*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 425-431.
192. **Liao, C. H., D. E. McCallus, J. M. Wells, S. S. Tzean, and G. Y. Kang.** 1996. The *repB* gene required for production of extracellular enzymes and fluorescent siderophores in *Pseudomonas viridiflava* is an analog of the *gacA* gene in *Pseudomonas syringae*. *Can. J. Microbiol.* **42**: 177-182.
193. **Lilley, D. M. J., and C. F. Higgins.** 1991. Local DNA topology and gene expression: the case of the *leu-500* promoter. *Review. Mol. Microbiol.* **5**: 779-783.
194. **Lima, C. D., J. C. Wang, and A. Mondragon.** 1994. Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature* **367**: 138-146.
195. **Lindberg, F. P., B. Lund, and S. Normark.** 1984. Genes of pyelonephritogenic *E. coli* required for diglactosidase-specific agglutination of human cells. *EMBO J.* **3**: 1167-1173.
196. **Liu, L., and J. Wang.** 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 7024-7027.
197. **Liu, L. F., and J. C. Wang.** 1978. DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme. *Cell* **15**: 979-984.
198. **Liu, L. F., and J. C. Wang.** 1978. *Micrococcus luteus* DNA gyrase: active components and a model for its supercoiling of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 2098-2102.
199. **Liu-Johnson, H.-N., M. R. Gartenberg, and D. M. Crothers.** 1986. The DNA binding domain and bending angle of *E. coli* CAP protein. *Cell* **47**: 995-1005.
200. **Lockshon, D., and D. R. Morris.** 1983. Positively supercoiled plasmid DNA is produced by treatment of *Escherichia coli* with DNA gyrase inhibitors. *Nucl. Acids Res.* **11**: 2999-3017.
201. **Lodge, J. K., T. Kazic, and D. E. Berg.** 1989. Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J. Bacteriol.* **171**: 2181-2187.
202. **Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipurski, P. Matsudaira, and J. Darnell.** 1995. *Molecular cell biology*, 3rd ed. Scientific American Books, Inc., New York.
203. **Lopez-Garcia, P., and P. Forterre.** 1997. DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol. Microbiol.* **23**: 1267-1279.
204. **Low, D., B. Braaten, and M. van der Woude.** 1996. Fimbriae, p. 146-157. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, Second ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
205. **Low, D., E. N. Robinson, Jr., Z. A. McGee, and S. Falkow.** 1987. The frequency of expression of pyelonephritis-associated pili is under regulatory control. *Mol. Microbiol.* **1**: 335-346.
206. **Low, D. A.** 1994. Methylation-dependent and Lrp-dependent fimbrial gene regulation in *Escherichia coli*, p. 423-436. *In* V. L. Miller, J. B. Kaper, D. A. Portnoy, and R. R. Isberg (ed.), *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

207. **Luttinger, A.** 1995. The twisted 'life' of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. MicroReview. Mol. Microbiol. **15**: 601-606.
208. **Lynch, A. S., and J. C. Wang.** 1993. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. J. Bacteriol. **175**: 1645-1655.
209. **Ma, D., D. N. Cook, N. G. Pon, and J. E. Hearst.** 1994. Efficient anchoring of RNA polymerase in *Escherichia coli* during coupled transcription-translation of genes encoding integral inner membrane polypeptides. J. Biol. Chem. **269**: 15362-15370.
210. **Mahan, M. J., J. M. Slauch, and J. J. Mekalanos.** 1996. Environmental regulation of virulence gene expression in *Escherichia*, *Salmonella*, and *Shigella* ssp, p. 2803-2815. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, Second ed, vol. 2. ASM Press, Washington, D.C.
211. **Maiti, S. N., L. DesGroseillers, J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1994. Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165<sub>1</sub> of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. Microb. Pathogen. **16**: 15-25.
212. **Maiti, S. N., J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 1993. Structure and copy number analyses of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related gene clusters in F165-positive bovine and porcine *Escherichia coli* isolates. Infect. Immun. **61**: 2453-2461.
213. **Malan, T. P., A. Kolb, H. Buc, and W. R. McClure.** 1984. Mechanism of CRP-cAMP activation of *lac* operon transcription initiation activation of the P1 promoter. J. Mol. Biol. **180**: 881-909.
214. **Malik, M., A. Bensaid, J. Rouviere-Yaniv, and K. Drlica.** 1996. Histone-Like Protein HU and Bacterial DNA Topology: Suppression of an HU Deficiency by DNA Gyrase Mutations. J. Mol. Biol. **256**: 66-76.
215. **Margolin, P., L. Zumstein, R. Sternglanz, and J. C. Wang.** 1985. The *Escherichia coli supX* locus is *topA*, the structural gene for DNA topoisomerase I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**: 5437-5441.
216. **Marians, K. J.** 1992. Prokaryotic DNA replication. Annu. Rev. Biochem. **61**: 673-719.
217. **Marinus, M. G.** 1996. Methylation of DNA, p. 782-791. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, Second ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
218. **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.
219. **Massé, É., and M. Drolet.** 1999. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. J. Biol. Chem. **274**: 16659-16664.
220. **Massé, É., and M. Drolet.** 1999. Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. J. Biol. Chem. **274**: 16654-16658.
221. **Massé, É., and M. Drolet.** 1999. R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperature and correlates with growth inhibition. J. Mol. Biol. **294**: 321-332.

222. **Massé, É., P. Phoenix, and M. Drolet.** 1997. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 12816-12823.
223. **Matthews, K. S.** 1992. DNA looping. *Microbiol. Rev.* **56**: 123-136.
224. **Maurelli, A. T.** 1989. Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria: a general strategy for human pathogens? *Microb. Pathogen.* **7**: 1-10.
225. **Maurelli, A. T., B. Blackmon, and I. Curtis, R.** 1984. Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella* species. *Infect. Immun.* **43**: 195-201.
226. **Maurelli, A. T., and P. J. Sansonetti.** 1988. Identification of a chromosomal gene controlling temperature-regulated expression of *Shigella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 2820-2824.
227. **McClellan, J. A., P. Boublikova, E. Palecek, and D. M. Lilley.** 1990. Superhelical torsion in cellular DNA responds directly to environmental and genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 8373-8377.
228. **McEachern, F., and L. M. Fisher.** 1989. Regulation of DNA supercoiling in *Escherichia coli*: genetic basis of a compensatory mutation in DNA gyrase. *FEBS Lett.* **253**: 67-70.
229. **McGovern, V., N. P. Higgins, and A. Jaworski.** 1994. H-NS over-expression induces an artificial stationary phase by silencing global transcription. *Biochimie* **76**: 1019-1029.
230. **McNairn, E., N. Ní Bhriain, and C. J. Dorman.** 1995. Overexpression of the *Shigella flexneri* genes coding for DNA topoisomerase IV compensates for loss of DNA topoisomerase I: effect on virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* **15**: 507-517.
231. **Mekalanos, J. J.** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. Review. *J. Bacteriol.* **174**: 1-7.
232. **Menzel, R., and M. Gellert.** 1987. Modulation of transcription by DNA supercoiling: a deletion analysis of *Escherichia coli gyrA* and *gyrB* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 4185-4189.
233. **Menzel, R., and M. Gellert.** 1983. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* **34**: 105-113.
234. **Miller, J. F., J. J. Mekalanos, and S. Falkow.** 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**: 916-922.
235. **Missiakis, D., J.-M. Betton, and S. Raina.** 1996. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* **21**: 871-884.
236. **Mojica, F. J. M., and C. F. Higgins.** 1996. Localized domains of DNA supercoiling: topological coupling between promoters. *Mol. Microbiol.* **22**: 919-928.
237. **Montgomerie, J. Z., A. Bindereif, J. B. Neilands, G. M. Kalmanson, and L. B. Guze.** 1984. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infect. Immun.*: 835-838.
238. **Moolenaar, G. F., C. A. van Sluis, C. Backendorf, and P. van de Putte.** 1987. Regulation of the *Escherichia coli* excision repair gene *uvrC*. Overlap between the *uvrC* structural gene and the region coding for a 24 kD protein. *Nucl. Acids Res.* **15**: 4273-4289.
239. **Morschhäuser, J., B.-E. Uhlin, and 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.

240. **Mukai, F. H., and P. Margolin.** 1963. Analysis of unlinked suppressors of an  $0^{\circ}$  mutation in *Salmonella*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **50**: 140-148.
241. **Murphy, L., and S. Zimmerman.** 1994. Macromolecular crowding effects on the interaction of DNA-binding proteins: a model for bacterial nucleoid stabilization. Biochim. Biophys. Acta **1219**: 277-284.
242. **Nagasawa, S., S. Tokishita, H. Aiba, and T. Mizuno.** 1992. A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptative responses in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **6**: 799-807.
243. **Nelson, P.** 1999. Transport of torsional stress in DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**: 14342-14347.
244. **Newman, E. B., and R. Lin.** 1996. The leucine/Lrp regulon, p. 419-433. In E. C. C. Lin and A. S. Lynch (ed.), Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA.
245. **Newman, E. B., R. T. Lin, and R. D'Ari.** 1996. The leucine/Lrp regulon, p. 1513-1525. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
246. **Ngeleka, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. F165<sub>1</sub> fimbriae of the P fimbrial family inhibit the oxidative response of porcine neutrophils. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **25**: 265-274.
247. **Ngeleka, M., M. Jacques, B. Martineau Doizé, F. Daigle, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 1993. Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165<sub>1</sub> fimbriae in septicaemia in gnotobiotic pigs. Infect. Immun. **61**: 836-843.
248. **Ngeleka, M., B. Martineau Doizé, and J. M. Fairbrother.** 1994. Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165": F165<sub>1</sub> resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes *in vitro*: role of F165<sub>1</sub> fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. Infect. Immun. **62**: 398-404.
249. **Ní Bhriain, N., and C. J. Dorman.** 1993. Isolation and characterization of a *topA* mutant of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. **7**: 351-358.
250. **Nickerson, C. A., and E. C. Achberger.** 1995. Role of curved DNA in binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to promoters. J. Bacteriol. **177**: 5756-5761.
251. **Nilsson, L., A. Vanet, E. Vijgenboom, and L. Bosch.** 1990. The role of FIS in *trans* activation of stable RNA operons of *E. coli*. EMBO J. **9**: 727-734.
252. **Nilsson, P., S. Naureckiene, and B. E. Uhlin.** 1996. Mutations affecting mRNA processing and fimbrial biogenesis in the *Escherichia coli pap* operon. J. Bacteriol. **178**: 683-690.
253. **Nilsson, P., and B. E. Uhlin.** 1991. Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing. Mol. Microbiol. **5**: 1791-1799.
254. **Nitiss, J. L.** 1994. Roles of DNA topoisomerases in chromosomal replication and segregation. Review. Adv. Pharmacol. **29**: 103-134.
255. **Nou, X., B. Braaten, L. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1995. Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by PapI regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. EMBO J. **14**: 5785-5797.
256. **Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch, and 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.

257. **Opel, M. L., and G. W. Hatfield.** 2001. DNA supercoiling-dependent transcriptional coupling between the divergently transcribed promoters of the *ilvYC* operon of *Escherichia coli* is proportional to promoter strengths and transcript lengths. *Mol. Microbiol.* **39**: 191-198.
258. **Opel, M. L., M. A. Stuart, and G. W. Hatfield.** 2001. The effects of DNA supercoiling on the expression of the operons of the *ilv* regulon of *Escherichia coli* suggest a physiological rationale for divergently transcribed operons. *MicroReview. Mol. Microbiol.* **39**: 1109-1115.
259. **Oram, M., and L. M. Fisher.** 1992. An *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutant has a compensatory mutation that alters two residues between functional domains of the DNA gyrase A protein. *J. Bacteriol.* **174**: 4175-4178.
260. **Orskov, F., and I. Orskov.** 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* **38**: 699-704.
261. **Orskov, I., and F. Orskov.** 1985. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. *J. Hyg.* **95**.
262. **Pagel, J. M., J. W. Winkelman, C. W. Adams, and G. W. Hatfield.** 1992. DNA topology-mediated regulation of transcription initiation from tandem promoters of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol.* **224**: 919-935.
263. **Parada, C. A., and K. J. Marians.** 1991. Mechanisms of DNA A protein-dependent pBR322 DNA replication. *J. Biol. Chem.* **66**: 18895-18906.
264. **Parkinson, J. S., and E. C. Kofoid.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
265. **Parsot, C., and J. J. Mekalanos.** 1992. Structural analysis of the *acfA* and *acfD* genes of *Vibrio cholerae*: effects of DNA topology and transcriptional activators on expression. *J. Bacteriol.* **174**: 5211-5218.
266. **Pernestig, A. K., S. J. Normark, D. Georgellis, and Ö. Melefors.** 2000. The role of the AirS two-component system in uropathogenic *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**: 137-142.
267. **Pettijohn, D. E.** 1996. The nucleoid, p. 158-166. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology, Second ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
268. **Phoenix, P., M.-A. Raymond, É. Massé, and M. Drolet.** 1997. Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **272**: 1473-1479.
269. **Platko, J. V., and J. M. Calvo.** 1993. Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *J. Bacteriol.* **175**: 1110-1117.
270. **Platko, J. V., D. A. Willins, and J. M. Calvo.** 1990. The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. *J. Bacteriol.* **172**: 4563-4570.
271. **Podtelezhnikov, A. A., N. R. Cozzarelli, and A. V. Vologodskii.** 1999. Equilibrium distributions of topological states in circular DNA: interplay of supercoiling and knotting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 12974-12979.
272. **Pogliano, J., A. S. Lynch, D. Belin, E. C. C. Lln, and J. Beckwith.** 1997. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by Cpx two-component system. *Genes Dev.* **11**: 1169-1182.
273. **Portugal, J., and A. Rodriguez-Campos.** 1996. T7 RNA polymerase cannot transcribe through a highly knotted DNA template. *Nucl. Acids Res.* **24**: 4891-4894.

274. **Pruss, G., and K. Drlica.** 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**: 521-523.
275. **Pruss, G., and K. Drlica.** 1986. Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 8952-8956.
276. **Pruss, G. J.** 1985. DNA topoisomerase I mutants. Increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.* **185**: 51-63.
277. **Pruss, G. J., and K. Drlica.** 1985. DNA supercoiling and suppression of the *leu-500* promoter mutation. *J. Bacteriol.* **164**: 947-949.
278. **Pruss, G. J., S. H. Manes, and K. Drlica.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**: 35-42.
279. **Rafferty, J. B. M., W. S. Somers, I. Saint-Girons, and S. E. V. Philips.** 1989. Three-dimensional crystal structures of *Escherichia coli met* repressor with and without corepressor. *Nature* **341**: 705-710.
280. **Rahmouni, A. R., and R. D. Wells.** 1992. Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling *in vivo*. *J. Mol. Microbiol.* **223**: 131-144.
281. **Rahmouni, A. R., and R. D. Wells.** 1989. Stabilization of Z DNA *in vivo* by localized supercoiling. *Science* **246**: 358-363.
282. **Raji, A., D. J. Zabel, C. S. Laufer, and R. E. Depew.** 1985. Genetic analysis of mutations that compensate for loss of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **162**: 1173-1179.
283. **Reaban, M. E., and J. A. Griffith.** 1990. Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature* **348**: 342-344.
284. **Record, M. T., Jr., W. S. Reznikoff, M. L. Craig, K. L. McQuade, and P. J. Schalz.** 1996. *Escherichia coli* RNA polymerase ( $E\sigma^{70}$ ), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation, p. 792-820. *In* F. C. Neidhardt, R. I. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. R. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
285. **Rees, W. A., W. R. Keller, J. P. Vesenka, G. Yang, and C. Bustamante.** 1993. Evidence for DNA bending in transcription complexes imaged by scanning for microscopy. *Science* **260**: 1646-1649.
286. **Rhee, K. Y., M. Opel, E. Ito, S. P. Hung, S. M. Arfin, and G. W. Hatfield.** 1999. Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 14294-14299.
287. **Rhee, K. Y., D. F. Senear, and G. W. Hatfield.** 1998. Activation of gene expression by a ligand-induced conformational change of a protein-DNA complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 11257-11266.
288. **Rhodes, D., and A. Klug.** 1990. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* **286**: 573-578.
289. **Richardson, J. P.** 1975. Initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase from supercoiled and nonsupercoiled bacteriophage PM2 DNA. *J. Mol. Biol.* **91**: 477-487.

290. **Richardson, S. M. H., C. F. Higgins, and D. M. J. Lilley.** 1988. DNA supercoiling and the *leu500* promoter mutation of *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **7**: 1863-1869.
291. **Richardson, S. M. H., C. F. Higgins, and D. M. J. Lilley.** 1984. The genetic control of DNA supercoiling in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **3**: 1745-1752.
292. **Rinquist, S., and C. L. Smith.** 1992. The *Escherichia coli* chromosome contains specific, unmethylated *dam* and *dcm* sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 4539-4543.
293. **Roberts, J. A., M. B. Kaack, and E. N. Fussell.** 1989. Bacterial adherence in urinary tract infections: preliminary studies in a primate model. *Infection* **17**: 401-404.
294. **Rohde, J. R., J. M. Fox, and S. A. Minnich.** 1994. Thermoregulation in *Yersinia enterocolitica* is coincident with changes in DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **12**: 187-199.
295. **Roosendaal, B., J. Damoiseaux, W. Jordi, and F. K. de Graaf.** 1989. Transcriptional organization of the DNA region controlling expression of the K99 gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 250-256.
296. **Roosendaal, B., P. M. P. vanBergenen-Henegouwen, and F. K. deGraff.** 1986. Subcellular localization of K99 fimbrial subunits and effect of temperature on subunit synthesis and assembly. *J. Bacteriol.* **165**: 1029-1032.
297. **Rouvière-Yaniv, J., and N. O. Kjeldgaard.** 1979. Native *Escherichia coli* HU protein is a heterotypic dimer. *FEBS Lett.* **106**: 297-300.
298. **Salyers, A. A., and D. D. Whitt.** 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington, D.C.
299. **Sanzey, B.** 1979. Modulation of gene expression by drugs affecting deoxyribonucleic acid gyrase. *J. Bacteriol.* **138**: 40-47.
300. **Sasse-Dwight, S., and J. D. Gralla.** 1989.  $\text{KMnO}_4$  as a probe for *lac* promoter DNA melting and mechanism *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **264**: 8074-8081.
301. **Saucier, J.-M., and J. C. Wang.** 1972. Angular alteration of the DNA helix by *E. coli* RNA polymerase. *Nature New Biol.* **239**: 167-170.
302. **Schneider, R., T. Kutateladze, A. Travers, and G. Muskhelishvili.** 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**: 953-964.
303. **Schneider, R., A. Travers, and G. Muskhelishvili.** 2000. The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol. Microbiol.* **38**: 167-175.
304. **Schneider, R., A. Travers, and G. Muskhelishvili.** 1997. FIS modulates growth-phase dependent topological transitions of DNA in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **26**: 519-530.
305. **Schofield, M. A., R. Agbunag, M. L. Michaels, and J. H. Miller.** 1992. Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J. Bacteriol.* **174**: 5168-5170.
306. **Schultz, S. C., G. C. Shields, and T. A. Steitz.** 1991. Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253**: 1001-1007.
307. **Shishido, K., S. Ishii, and N. Komiyama.** 1989. The presence of the region on pBR322 that encodes resistance to tetracycline is responsible for high levels of plasmid DNA knotting in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I deletion mutant. *Nucl. Acids Res.* **17**: 9749-9759.

308. **Sinden, R., and D. Pettijohn.** 1981. Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**: 224-228.
309. **Smith, G. R.** 1981. DNA supercoiling: another level for regulating gene expression. Cell **24**: 599-600.
310. **Smyth, C. J., M. Marron, and S. G. J. Smith.** 1994. Fimbriae of *Escherichia coli*, p. 365-398. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.
311. **Snyder, L., and W. Champness.** 1997. Molecular genetics of bacteria. ASM Press, Washington, D.C.
312. **Snyder, M., and K. Drlica.** 1979. DNA Gyrase on the Bacterial Chromosome: DNA Cleavage Induced by Oxonolic Acid. J. Mol. Biol. **131**: 287-302.
313. **Soto, G. E., K. W. Dodson, D. Ogg, C. Liu, J. Heuser, S. Knight, J. Kihlberg, C. H. Jones, and S. J. Hultgren.** 1998. Periplasmic chaperone recognition motif of subunits mediates quaternary interactions in the pilus. EMBO J. **17**: 6155-6167.
314. **Soto, G. E., and S. J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. MiniReview. J. Bacteriol. **181**: 1059-1071.
315. **Spirito, F., and L. Bossi.** 1996. Long-distance effect of downstream transcription on activity of the supercoiling-sensitive *leu-500* promoter in a *topA* mutant of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **178**: 7129-7137.
316. **Srivenugopal, K. S., D. Lokshon, and D. R. Morris.** 1984. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterisation of a new type I enzyme. Biochem. **23**: 1899-1906.
317. **Staczek, P., and N. P. Higgins.** 1998. Gyrase and Topo IV modulate chromosome domain size *in vivo*. Mol. Microbiol. **29**: 1435-1448.
318. **Steck, R. T., and K. Drlica.** 1984. Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. Cell **36**: 1081-1088.
319. **Steck, T. R., R. J. Franco, and K. Drlica.** 1993. Topoisomerases mutations affect the relative abundance of many *Escherichia coli* proteins. Mol. Microbiol. **10**: 473-481.
320. **Sternglanz, R., S. DiNardo, K. A. Voelkel, Y. Nishimura, Y. Hirota, K. Bechera, L. Zumstein, and J. C. Wang.** 1981. Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* topoisomerase I affect transcription and transposition. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**: 2747-2751.
321. **Stirdivant, S. M., L. D. Crossland, and L. Bogorad.** 1985. DNA supercoiling affects *in vitro* transcription of two maize chloroplast genes differently. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**: 4886-4890.
322. **Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock.** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. Microbiol. Rev. **53**: 450-490.
323. **Suerbaum, S., T. Brauer-Steppkes, A. Labigne, B. Cameron, and K. Drlica.** 1998. Topoisomerase I of *Helicobacter pylori*: juxtaposition with a flagellin gene (*flaB*) and functional requirement of a fourth zinc finger motif. Gene **210**: 151-161.
324. **Sun, L., and J. A. Fuchs.** 1994. Regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon: role of DNA supercoiling. J. Bacteriol. **176**: 4617-4626.
325. **Sussman, M.** 1985. *Escherichia coli* in human and animal disease, p. 7-45. In M. Sussman (ed.), The virulence of *Escherichia coli*. M. Academic Press, New York.
326. **Svanborg, C., M. Hedlund, H. Connell, A. Nilsson, and B. Wullt.** 1996. Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signalling. Ann. N.Y. Acad. Sci. **797**: 177-190.

327. **Tan, J., L. Shu, and H.-Y. Wu.** 1994. Activation of the *leu-500* promoter by adjacent transcription. *J. Bacteriol.* **176**: 1077-1086.
328. **Teich, A., H. Y. Lin, L. Andersson, S. Meyer, and P. Neubauer.** 1998. Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of *Escherichia coli* after IPTG induction. *J. Biotechnol.* **64**: 197-210.
329. **Tennent, J. M., S. Hultgren, B.-I. Marklund, K. Forsman, M. Göransson, B. E. Uhlin, and S. Normark (ed.).** 1990. The bacteria: genetics of adhesin expression in *Escherichia coli*, Chapter 5, vol. XI. Academic Press.
330. **Tennent, J. M., F. Lindberg, and S. Normark.** 1990. Integrity of *Escherichia coli* P pili during biogenesis: properties and role of PapJ. *Mol. Microbiol.* **4**: 747-758.
331. **Tessier, M.-C., M. Drolet, C. Martin, and J. Harel.** Divergent transcription influences *fooBp* activity in *Escherichia coli* *foo* operon: the strong *trcp* counteracts the requirement for FooI activator protein in *topA*<sup>+</sup> strains and *tetA* expression overcomes the effect of *gyrB225* mutation. *In preparation.*
332. **Tessier, M.-C., M. Drolet, C. Martin, and J. Harel.** *Escherichia coli* 4787 *foo* operon responsiveness to DNA supercoiling level: basal transcription, phase variation, DNA methylation pattern, and FooI activator role. *In preparation.*
333. **Thanassi, D. G., E. T. Saulino, and S. J. Hultgren.** 1998. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 223-231.
334. **Thanassi, D. G., E. T. Saulino, M.-J. Lombardo, R. Roth, J. Heuser, and S. J. Hultgren.** 1998. The PapC usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 3146-3151.
335. **Thompson, J. F., and A. Landy.** 1988. Empirical estimation of protein-induced bending angles: application to  $\lambda$  site-specific recombination complexes. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9687-9705.
336. **Tobe, T., M. Yoshikawa, and C. Sasakawa.** 1995. Thermoregulation of *virB* in *Shigella flexneri* by sensing of changes in local DNA superhelicity. *J. Bacteriol.* **177**: 1094-1097.
337. **Togna, A. P., M. L. Shuler, and D. B. Wilson.** 1993. Effects of plasmid copy number and runaway plasmid replication on overproduction and excretion of Beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **9**: 31-39.
338. **Travers, A. A.** 1990. Why bend DNA? *Cell* **60**: 177-180.
339. **Tsao, Y.-P., H.-Y. Wu, and L. F. Liu.** 1989. Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell* **56**: 111-118.
340. **Tse-Dinh, Y.-C., and R. K. Beran.** 1988. Multiple promoters for transcription of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.* **202**: 735-742.
341. **Tse-Dinh, Y.-C., and R. K. Beran-Steed.** 1988. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I is a zinc metalloprotein with three repetitive zinc-binding domains. *J. Biol. Chem.* **263**: 15857-15859.
342. **Uhl, M. A., and J. F. Miller.** 1995. p. 333-349. *In* J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), Two-component signal transduction. ASM Press, Washington, D.C.
343. **Uhlin, B. E., C. Balsalobre, K. Forsman-Semb, M. Göransson, J. Jass, J. Johansson, S. Naureckiene, B. Sonden, J. Urbonaviciene, and Y. Xia.** 2000. Control mechanisms in the Pap-pili system. Review. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**: 113-118.

344. **Ussery, D. W., J. C. Hinton, B. J. Jordi, P. E. Granum, A. Seirafi, R. J. Stephen, A. E. Tupper, G. Berridge, J. M. Sidebotham, and C. F. Higgins.** 1994. The chromatin-associated protein H-NS. *Biochimie* **76**: 968-980.
345. **van der Woude, M., B. Braaten, and D. Low.** 1996. Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*. Review. *Trends Microbiol.* **4**: 5-9.
346. **van der Woude, M., W. B. Hale, and D. A. Low.** 1998. Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in *gut* and *pap* operons. *J. Bacteriol.* **180**: 5913-5920.
347. **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*. *MicroReview. Mol. Microbiol.* **6**: 2429-2435.
348. **van der Woude, M. W., L. S. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1995. Leucine-responsive regulatory protein plays dual roles as both an activator and a repressor of the *Escherichia coli pap* fimbrial operon. *Mol. Microbiol.* **17**: 303-312.
349. **van der Woude, M. W., and D. A. Low.** 1994. Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the *sfa* and *daa* pili operons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **11**: 605-618.
350. **VanBogelen, R. A., and F. C. Neidhardt.** 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 5589-5593.
351. **von Freiesleben, U., and K. V. Rasmussen.** 1992. The level of supercoiling affects the regulation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **143**: 655-663.
352. **Wang, J. C.** 1971. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein  $\omega$ . *J. Mol. Biol.* **55**: 523-533.
353. **Wang, J. C.** 1974. Interactions between twisted DNAs and enzymes: the effects of superhelical turns. *J. Mol. Biol.* **87**: 797-816.
354. **Wang, J. C.** 1987. Recent studies of DNA topoisomerases. Harvey Lecture. *Biochim. Biophys. Acta* **909**: 1-9.
355. **Wang, J. C.** 1992. Template topology and transcription, p. 1253-1269. *In* S. McKnight and K. Yamamoto (ed.), *Transcriptional regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
356. **Wang, J. C., and G. Giaever.** 1988. Action at a distance along a DNA. *Science* **240**: 300-304.
357. **Wang, J. C., and A. S. Lynch.** 1996. Effects of DNA supercoiling on gene expression, p. 127-147. *In* E. C. C. Lin and A. S. Lynch (ed.), *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA.
358. **Wang, J. Y., and M. Syvanen.** 1992. DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol. Microbiol.* **6**: 1861-1866.
359. **Weinstein-Fisher, D., M. Elgrably-Weiss, and S. Altuvia.** 2000. *Escherichia coli* response to hydrogen peroxyde: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. *Mol. Microbiol.* **65**: 1413-1420.
360. **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.
361. **Weyand, N. J., and D. A. Low.** 2000. Regulation of Pap phase variation: Lrp is sufficient for the establishment of the phase OFF *pap* DNA methylation pattern and repression of *pap* transcription *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **275**: 3192-3200.

362. **White-Ziegler, C. A., M. L. Angus Hill, B. A. Braaten, M. W. van der Woude, and 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.
363. **White-Ziegler, C. A., L. B. Blyn, B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1990. Identification of an *Escherichia coli* genetic locus involved in thermoregulation of the *pap* operon. *J. Bacteriol.* **172**: 1775-1782.
364. **White-Ziegler, C. A., and D. A. Low.** 1992. Thermoregulation of the *pap* operon: evidence for the involvement of RimJ, the N-terminal acetylase of ribosomal protein S5. *J. Bacteriol.* **174**: 7003-7012.
365. **Whitson, P. A., W. T. Hsieh, R. D. Wells, and K. S. Matthews.** 1987. Influence of supercoiling and sequence context on operator DNA binding with *lac* repressor. *J. Biol. Chem.* **262**: 14592-14599.
366. **Williams, R. M., and S. Rimsky.** 1997. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 175-185.
367. **Wu, H.-M., and D. M. Crothers.** 1984. The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature (London)* **308**: 509-513.
368. **Wu, H.-Y., S. Shyy, J. C. Wang, and L. F. Liu.** 1988. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**: 433-440.
369. **Wu, H.-Y., J. Tan, and M. Fang.** 1995. Long-range interaction between two promoters: activation of the *leu-500* promoter by a distant upstream promoter. *Cell* **82**: 445-451.
370. **Xia, Y., K. Forsman, J. Jass, and B. E. Uhlin.** 1998. Oligomeric interaction of the PapB transcriptional regulator with the upstream activating region of pili adhesin gene. *Mol. Microbiol.* **30**: 513-523.
371. **Xia, Y., K. Forsman-Semb, J. Jass, and B. E. Uhlin.** 2000. Structural and functional studies of the fimbrial adhesin gene regulator PapB from uropathogenic *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**: 123-126.
372. **Xia, Y., D. Gally, K. Forsman-Semb, and 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.
373. **Xia, Y., and B. E. Uhlin.** 1999. Mutational analysis of the PapB transcriptional regulator in *Escherichia coli*. Regions important for DNA binding and oligomerization. *J. Biol. Chem.* **274**: 19723-19730.
374. **Yang, H.-L., K. Heller, M. Gellert, and G. Zubay.** 1979. Differential sensitivity of gene expression *in vitro* to inhibitors of DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 3304-3308.
375. **Zechiedrich, E. L., and N. R. Cozzarelli.** 1995. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **9**: 2859-2869.
376. **Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, S. Bachellier, R. Schneider, D. Chen, D. M. Lilley, and N. R. Cozzarelli.** 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 8103-13.
377. **Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, and N. R. Cozzarelli.** 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**: 2580-2592.
378. **Zhang, J. P., and S. Normark.** 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* **273**: 1234-1236.

## **ANNEXES**

## ANNEXE I

**Daigle, F., C. Forget, C. Martin, M. Drolet, M.-C. Tessier, H. Dezfulian, and J. Harel.**  
2000. Effects of environmental conditions and global regulatory proteins on regulation of F165<sub>1</sub> (Prs-like) and F165<sub>2</sub> (F1C-like) fimbrial expression in *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. Res. Microbiol. **151**: 563-574.

### Contribution à cet article en tant que co-auteur

Ma contribution à cet article concerne d'abord l'effet du surenroulement local de l'ADN. C'est entre autres grâce à l'une des constructions plasmidiques que j'ai réalisée que nous avons pu observer l'effet du surenroulement local généré par la transcription adjacente du gène *tetA* sur l'expression de *foo*.

J'ai aussi participé à la rédaction de la section qui a trait à l'effet du surenroulement de l'ADN sur l'expression de *foo*: « *Effect of Altered DNA Supercoiling* ».

De plus, j'ai été impliquée dans la correction du manuscrit.

J'ai également fait séquencer de nouveau la région régulatrice *fooIB* de *E. coli* 4787. Les analyses de séquence que j'ai effectué nous ont permis de constater qu'il y avait des erreurs dans la séquence précédemment publiée dans GenBank: L07420.

## Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs

France Daigle<sup>d</sup>, Céline Forget<sup>a</sup>, Christine Martin<sup>b</sup>, Marc Drolet<sup>c</sup>, Marie-Catherine Tessier<sup>a</sup>, Hojabr Dezfulian<sup>a</sup>, Josée Harel<sup>1a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Pathology and Microbiology, University of Montreal, C.P. 5000, St. Hyacinthe, Québec, Canada  
<sup>b</sup>Laboratoire de microbiologie, Inra Clermont-Ferrand-Theix, 62122 Saint-Genès-Champanelle, France  
<sup>c</sup>Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, C.P. 5000, St. Hyacinthe, Québec, J2S7C6, Canada

<sup>d</sup>Washington University, One Brookings Drive, Box 1137, St. Louis, MO 63130, USA

Received 30 December 1999; accepted 6 March 2000

**Abstract** – *Escherichia coli* O115:F165 strains are associated with septicaemia in young pigs and possess at least two types of fimbriae. F165<sub>1</sub> fimbriae belong to the P fimbrial family and F165<sub>2</sub> fimbriae belong to the S fimbrial family. Regulatory regions of *foo* (F165<sub>1</sub>) and *fof* (F165<sub>2</sub>) fimbrial gene clusters from wild-type strain 4787 were sequenced and characterised. Expression of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbrial genes was analysed by using *lacZ* and/or *luxAB* as reporter genes under the control of the native fimbrial promoters. Differential expression of fimbrial genes was observed. Global regulatory mechanisms such as catabolite repression, leucine-responsive regulatory protein (Lrp), methylation and DNA supercoiling were demonstrated to influence *foo* and *fof* expression. *foo* and *fof* expression was optimal at 37 °C and under aerobic conditions. Expression of *foo* was higher on minimal medium, whereas *fof* expression was higher on complex Luria-Bertani medium. This could reflect an in vivo differential expression. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

*Escherichia coli* / fimbriae / regulation / septicaemia

### 1. Introduction

*Escherichia coli* strains can cause extraintestinal diseases such as septicaemia, meningitis or urinary tract infection (UTI). Many virulence determinants including fimbrial adhesins contribute to extraintestinal *E. coli* pathogenicity [19, 27, 49]. F165 is a complex of fimbriae produced by *E. coli* isolates associated with septicaemia in piglets, calves [8, 14, 20] and humans [7]. F165 fimbriae-producing strains of *E. coli* O115 that cause septicaemia in pigs produce at least two serologically and genetically distinct

fimbriae, F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> [15, 21, 24]. F165<sub>1</sub>, encoded by the *foo* gene cluster, are related to F11 fimbriae, members of the P fimbrial family, and bear a class III G-adhesin similar to Prs with slightly different binding capacities [21, 34]. F165<sub>1</sub>-negative mutants of a pathogenic *E. coli* O115 strain are less virulent in experimentally infected pigs [22, 42]. F165<sub>2</sub> fimbriae, encoded by the *fof* gene cluster, are closely related to F1C, a member of the S fimbrial family [45, 52]. Strains producing F1C fimbriae are mostly isolated from cases of UTI [13, 24]. F1C fimbriae have recently been shown to bind to plasminogen and enhance the formation of plasmin in the presence of tissue-type plasminogen activator [26]. To date, it is unknown whether F165<sub>2</sub> fimbriae contribute to the development of porcine colisepticaemia.

\* Correspondence and reprints: harelj@ere.umontreal.ca  
Abbreviations: Crp: cAMP receptor protein; Dam: deoxyadenosine methylase; Lrp: leucine-responsive protein; ORF: open reading frame; UTI: urinary tract infection.

*E. coli* 0115 strains producing both F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbrial antigens possess many characteristics usually associated with uropathogenic strains such as serum resistance, mannose-resistant haemagglutination, aerobactin and ColV [23]. However, unlike most of the uropathogenic strains, these strains are non-haemolytic, do not produce cytotoxic necrotising factor and belong to serogroup O115, a serogroup commonly associated with porcine F165-positive *E. coli* [14].

As with many other virulence determinants, fimbriae are not synthesised constitutively. Fimbrial production is modulated by environmental conditions, such as nutrients, osmolarity and temperature. Global regulators such as cAMP receptor protein (Crp), leucine-responsive regulatory protein (Lrp), and deoxyadenosine methylase (Dam) regulate expression of several genes and have been implicated in regulation of expression of P- and S-encoding operons [30, 32]. Global regulatory control of fimbrial gene expression also implicates DNA topology [10].

Previously, the production of fimbrial complex F165 in the wild-type strain was found to be dependent on the composition of the culture medium and repressed in the presence of alanine or glucose, in anaerobic conditions or at temperatures below 37 °C [15]. Production of F165<sub>2</sub> fimbriae was greater than that of F165<sub>1</sub> when bacteria were grown in a fermentor broth culture [13]. Expression of *foo* genes, encoding F165<sub>1</sub>, as measured by a *fooA::phoA* reporter gene fusion in wild-type *E. coli* strain 0115: F165 was negatively regulated in the presence of glucose or leucine or when grown at 18 °C [9]. This paper examines regulation of *foo* and *fof* gene expression by global regulatory proteins and by different environmental conditions. Characterisation of the *foo* and *fof* fimbrial regulatory regions demonstrated a similar organisation to those of the P- and S-encoding operons.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

LB, MD-1 and M9 glycerol media were prepared as described previously [9]. Bacteria

grown in broth were incubated with or without agitation. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin and kanamycin, 50 µg·mL<sup>-1</sup>; tetracycline, 10 µg·mL<sup>-1</sup>; chloramphenicol, 10 µg·mL<sup>-1</sup>. Influence of temperature, oxygen, Dam methylation, and DNA supercoiling on fimbrial gene expression was measured after cultivation of bacteria on MD-1 agar plates. Anaerobiosis was achieved by use of GasPak anaerobic jars. Catabolite repression was measured after growing bacteria on minimal agar with or without 0.4% (w/v) glucose and/or 1 mM cyclic AMP [47]. Influence of Lrp was measured after growth in minimal broth with or without 1 mM leucine and supplemented with valine and isoleucine (each at 50 µg·mL<sup>-1</sup>) to compensate for the *ilvA* mutation in these strains [28]. See table 1 for a list of bacterial strains and plasmids used in this study.

### 2.2. Plasmid constructs

Plasmids pICJ7 and pYVAN carry the *foo* and *fof* gene clusters that encode for F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub>, respectively [21, 24]. The whole DNA regulatory regions of *foo* and *fof* operons were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from plasmids pICJ7 and pYVAN. The forward primers were located downstream of the *fooI* or *fofI* regulatory genes and each contained a *Bgl*II site added at its 5' end (figure 1). The reverse primers were located at the beginning of the *fooA* or *fofA* major subunit genes and each contained a *Bam*HI site at its 5' end (figure 1). The resulting amplicons of the *foo* and *fof* regulatory regions were each cloned into pCRII (Invitrogen). Then, the *Bgl*II–*Bam*HI fragments containing the *foo* or *fof* regulatory region were cloned into pAG derivatives which have ColE1-based replicons, are 20 copies per cells [18] and harbour either the *luxAB* genes (pAG3) or *lacZ* (pAG4) genes devoid of their own promoter. Insertion of *fooIB* or *fofIB* into the *Bam*HI site of pAG3 or pAG4 leads to a transcriptional fusion between these regulatory regions and *luxAB* or *lacZ*. pAG3 derivatives were termed pBEN1 (*fooIB* fused to *luxAB*) and pCEL1 (*fofIB* fused to *luxAB*) and pAG4 derivatives were termed

**Table I.** Bacterial strains and plasmids used in this study

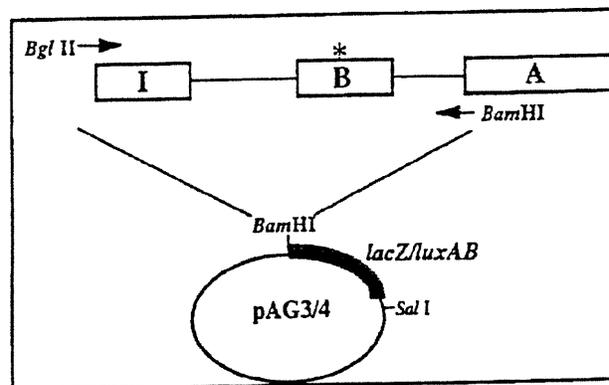
Strain or plasmid	Genotype or description	Reference or source
Strains		
4787	O115:K <sup>-</sup> V165 <sup>-</sup> :F165	[21]
HB101	<i>supE44 hsdS20(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK 2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	[5]
JM105	<i>supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi Δ(lacproAB)</i>	
C600	<i>F<sup>+</sup>thi-1 thr1 leuB6 lacY1 tonA21 hsdR hsdM recBC lop-11 lig<sup>+</sup></i>	[25]
TP610	C600 <i>cya-610</i>	[28]
Mew1	<i>ΔilvA Δlac</i>	[29]
Mew45	Mew1 <i>lrp::lacZ</i>	this work
Mew60	Mew <i>dam::Tr5</i>	[12]
RFM443	<i>Δlac74 galK2 rpsL</i>	[12]
RFM445	RFM443 <i>gyrB221(cou<sup>r</sup>) gyrB203(Ts)</i>	[12]
RFM475	RFM445 <i>Δ(topA cysB) 204 ΔtrpE</i>	[12]
Plasmids		
pICJ7	<i>foo</i> gene cluster coding for F165 <sub>1</sub> in pACYC184	[21]
pYVAN	<i>fof</i> gene cluster coding the F165 <sub>2</sub> in pACYC184	[24]
pSHB	regulatory region of <i>foo</i>	[34]
pSCI	3 kb <i>fofIB</i> regulatory region cloned in pBluescript	this work
pAG4	pRZ341-21::Trn5 <i>lac</i> with a <i>Bam</i> HI back-filled	[18]
pBEN2	1.2 kb <i>fofIB</i> regulatory region cloned in pAG4	this work
pCEL2	1.4 kb <i>fofIB</i> regulatory region cloned in pAG4	this work
pAG3	pRZ341-21::Trn5 <i>luxAB</i>	[18]
pBEN1	1.2 kb regulatory region of <i>fofIB</i> cloned in pAG3	this work
pCEL1	1.4 kb regulatory region of <i>fofIB</i> cloned in pAG3	this work
pCRA	0.7 kb <i>fofA</i> cloned in pCRII	this work
p4A4	0.9 kb <i>fofA</i> cloned in pCRII	this work
pCRII	cloning vector	Invitrogen
pANN801-13	<i>sfa</i> gene cluster encoding S fimbriae	[19]
pACYC184	cloning vector	[6]
pPAP5	<i>pap</i> gene cluster encoding F13	[32]

pBEN2 (*fofIB* fused to *lacZ*) and pCEL2 (*fofIB* fused to *lacZ*). Transcription from the *foo* or *fof* pB promoter was then monitored through β-galactosidase (β-gal) or luciferase activities.

Plasmid pSCI was constructed by inserting a 3 kb *Cla*I/*Eco*RI fragment containing the *fof* regulatory region which includes the intercistronic region and the two regulatory genes, *fofI* and *fofB* from plasmid pYVAN [24] into pBluescript II KS (Stratagene).

### 2.3. Sequencing

Plasmid DNA from pSHB [34] and pSCI, encoding the regulatory regions of the *foo* and *fof* fimbrial operons, respectively, were determined by the dideoxy-chain reaction termination method of Sanger et al. [46] as modified for use with a T7 sequencing kit (Pharmacia LKB



**Figure 1.** Fimbrial regulatory region. The genes *I* and *B* (coding for regulators) and *A* (coding for the major subunit protein) are presented. *fofB* encodes a hypothetical truncated *B* protein due to a stop codon (\*). Primers used for PCR amplification of the fimbrial regulatory region are indicated by arrows. The PCR product harbouring the fimbrial regulatory region was cloned into pAG-derivatives resulting in the transcriptional fusions. pAG3 contains *luxAB* and pAG4 contains *lacZYA* genes.

Biotechnology) using T3 or T7 and universal primers. Nucleotide sequences of the *foo* and *tot* regulatory regions were compared with those of other fimbrial sequences using the BLASTN and BLASTX programmes from NCBI [1].

#### 2.4. $\beta$ -gal and luciferase assays

Activities of the *fooB* and *totB* promoters were monitored using pBEN1, pBEN2, pCEL1 and pCEL2 through determination of luciferase and  $\beta$ -gal-specific activities. Specific  $\beta$ -gal or luciferase activities represented the mean data of at least three different experiments, adjusted against the background activities of the vectors alone.

Specific  $\beta$ -gal activity was determined by the method of Miller [38]. Clones containing the fimbrial *luxAB* fusion were detected by addition of 50  $\mu$ L of N-decyl aldehyde (Sigma) to bacterial colonies present on LB agar plates and exposing the plates to Kodak X-OMAT<sup>®</sup> AR5 film [18]. The X-ray films were developed after a 5-min exposure. For luciferase quantification, cells grown in different conditions were adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.1, and 1 mL of each cell dilution was assayed in a luminometer (Lumat LB 9501/Berthold) after addition of 50  $\mu$ L of N-decyl aldehyde.

#### 2.5. RNA isolation

Total RNA was extracted from recombinant strains containing plasmids encoding either F165<sub>1</sub> (pICJ7) or F165<sub>2</sub> (pYVAN), from control strains and from *E. coli* wild-type strain 4787 grown in different conditions. RNA was prepared using TRIzol reagent (Gibco BRL) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations and integrity were determined by A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> spectrophotometer readings and agarose gel electrophoresis, respectively.

#### 2.6. RNA slot blot hybridisation

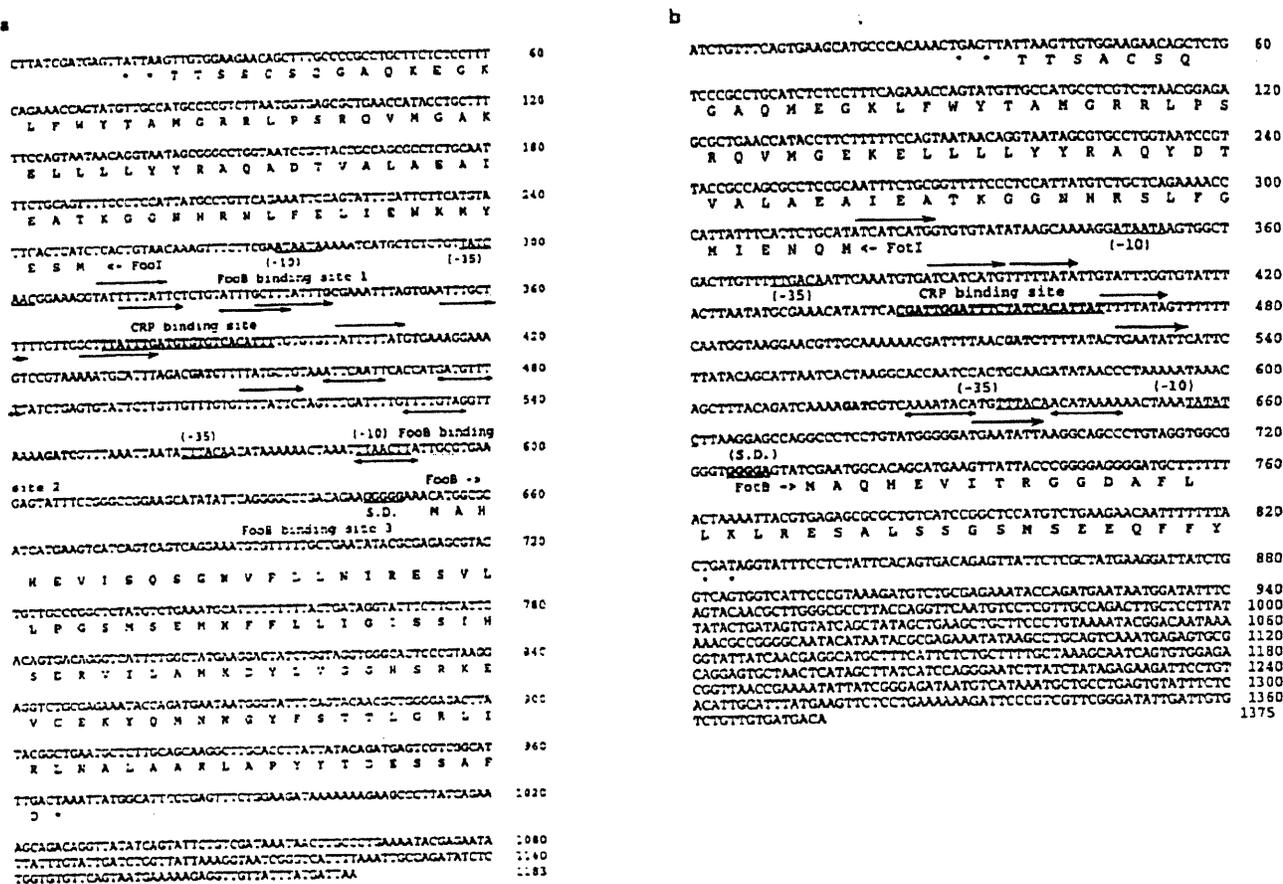
Digoxigenin-labelled *fooA*- and *totA*-specific RNA probes were produced by transcribing the linearised plasmids pPCRA and p4A4, encoding the major subunits of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub>,

respectively, with SP6 RNA polymerase using a digoxigenin RNA Labelling Kit (SP6-T7) according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim). Ten micrograms of denatured total RNA from each sample were transferred to a positively charged membrane (Boehringer Mannheim) using a Bio-Dot SF blotting apparatus (Bio-Rad). Membranes were fixed by UV cross-linking (Bio-Rad). Filters were prehybridised and subsequently incubated at 68 °C with the digoxigenin-labelled specific probe in 50% (v/v) formamide, 5 × SSC; 2% (w/v) blocking reagent (Boehringer Mannheim), 0.1% (w/v) N-laurylsarcosine, 0.02% (w/v) SDS. The blots were hybridised overnight and subjected to stringency washes in 0.1 × SSC and 0.1% (w/v) SDS. Hybridisation signals were detected with a DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim) according to manufacturer's instructions. Strains containing plasmid pPAP5 (encoding for P fimbriae) or pANN801-13 (encoding for S fimbriae) were used as positive controls and strain HB101 [5] harbouring the cloning vector pACYC184 [6] was the negative control. A 0.4 kb *EcoRI/ScaI* fragment from pACYC184 was used as an internal control. Quantification of mRNA was determined by analysing the hybridisation signals with ColImage<sup>®</sup> software (Photodyne) on a Foto/Eclipse<sup>®</sup> image digitising machine (Photodyne) or with GelScan XL (Pharmacia LKB Biotechnology).

### 3. Results

#### 3.1. Nucleotide sequences of the F165 regulatory genes

The sequences of the *foo* and *tot* regulatory regions of strain 4787 were determined and appear in the EMBL/GenBank/DBJ Nucleotide Sequence Data Libraries under the accession numbers L07420 and U09857, respectively. The *foo* and *tot* regulatory sequences contain two open reading frames (ORFs), running in opposite directions, and coding for the I and B genes (figure 2). The two divergent putative promoters are arranged similarly to those of the *pap* operon encoding P fimbriae [17, 50]. The



**Figure 2.** Nucleotide sequence. The *foo* (*f165<sub>1</sub>*) regulatory region (figure 2a) and the *fot* (*f165<sub>2</sub>*) regulatory region (figure 2b). The amino acid sequences of Fool and FotI and FooB and FotB are given below the nucleotide sequence. Potential promoter regions (-35 and -10 sites) (underlined), ribosomal binding site (S.D.) (underlined in bold), GATC sequences (in bold), FooB binding sites (underlined by dotted lines) and a cAMP-Crp binding site (in bold and underlined) are indicated. Direct repeats are indicated by single headed arrows and inverted repeats by double headed arrows. The repeats are paired by the same type of arrow heads.

intercistronic regions between the *fool* and *foob* or the *foiI* and *foiB* genes contain two GATC sites for *dam* methylation separated by 102 bp. These are characteristics of members of the *pap* regulatory family whose expression is modulated by differential methylation of GATC sites and by Lrp. Moreover, a potential Crp binding site and putative Lrp binding sites (GNNNTT) [43] could be identified in both *foo* and *fot* intercistronic regions (figure 2). Sequences identical to the binding sites of the PapB regulatory protein are found in the *foo* sequence. Considering the high homology between the PapB and FooB proteins (see below), these sequences are potential FooB binding sites [54]. The GC content of these regulatory genes varied from 44–47%, while the GC content of their intercis-

tronic regions was 33%. Interestingly, the intercistronic regions shared a 51-bp stretch between *foo* and *fot* (86% homology) and also with intercistronic regions of members of the *pap* family and *sfa* operon (88–98% homology). Moreover, the presence of inverted repeats and direct repeats of 8–9 bp was noted within the intercistronic regions (figure 2).

**3.2. Comparison with other fimbrial regulatory genes**

At the nucleotide level, the entire *foo* regulatory region showed an overall 97% identity with the regulatory region of the *pap* gene cluster encoding P fimbriae of serotype F13 from strain J96 [35]. The predicted amino acid sequence of Fool was identical to that of the Fsol regulatory

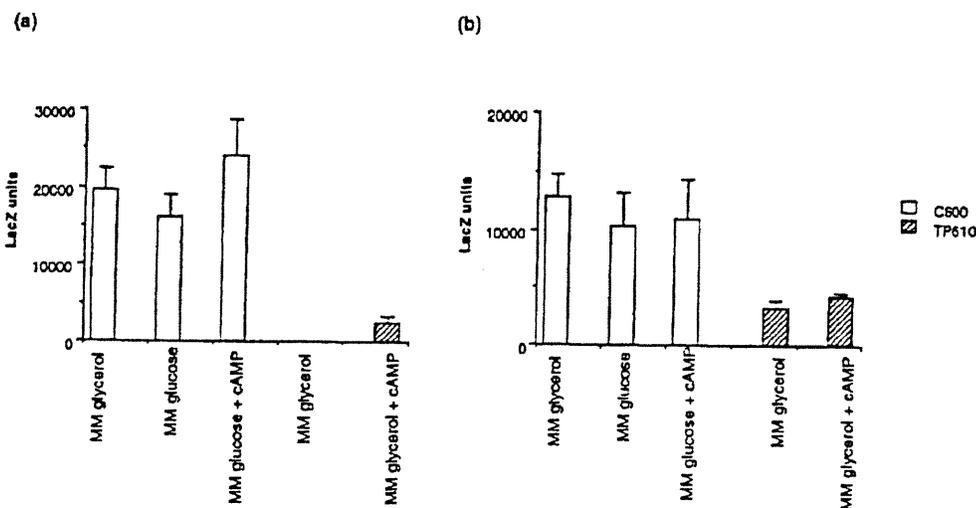
protein of F7<sub>1</sub> fimbriae from strain KS71 [44] and almost identical to that of PapI-17 of strain C1212, with a change at position 17 (aspartate to asparagine) [31]. FooB demonstrated two changes in the N-terminal region at position 9 (arginine to glutamine) and 13 (alanine to valine) with respect to the PapB-17 of strain C1212 and PapB protein of strain J96.

The nucleotide sequence of the *foo* regulatory region showed an overall 97% identity with the regulatory region of the *sfa* gene cluster encoding Sfa fimbriae from strain 536 [3, 48]. At the amino acid level, FotI protein demonstrated changes at position 14 (valine to glycine) and at position 59 (threonine to phenylalanine). The amino acid sequence deduced from the *fooB* sequence indicated that the FooB protein is truncated due to an extra nucleotide (T) at position 36 which causes a frameshift mutation and introduces a premature stop codon in the ORF of *fooB*. Many sequencing strategies from clone pYVAN or PCR products obtained from the amplification of the chromosomal DNA of the wild-type strain 4787 confirmed these results. Alignments disregarding the frameshift mutation in *fooB* indicated that FooB is homologous to the SfaB protein with the exception of one substitution at position 85 (leucine to phenylalanine). At the nucleotide level, *fooI* and *fooT*

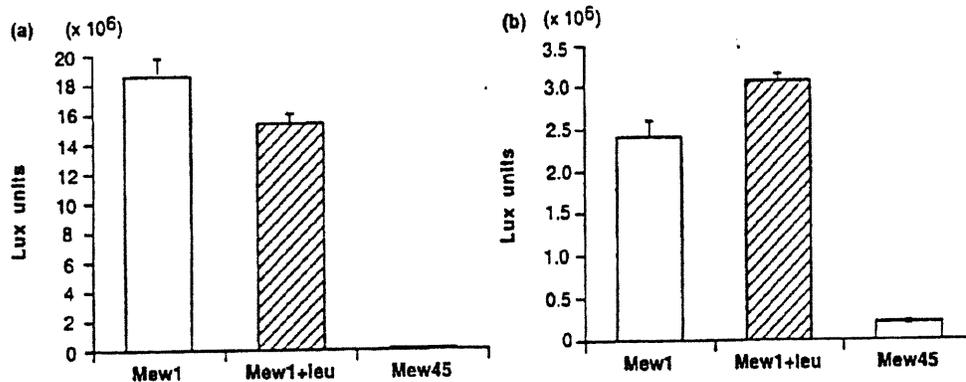
share 92% homology, while *fooB* and *fooT* share 84% homology. FooI has 90% identity with FotI and FooB has 92% identity with FotB. Consensus sequences of PapI-like and PapB-like proteins as determined by Low et al. [32] were also found in Foo and Fot fimbrial regulatory proteins.

### 3.3. Effect of global regulators on *foo* and *fooT* expression

Global regulatory proteins such as Crp, Lrp, and Dam influence the expression of a variety of genes and have been associated with P and S fimbrial phase variation [30]. The influence of these regulatory proteins on *foo* and *fooT* expression was analysed by using *lacZ* and/or *luxAB* reporter genes under the control of the *fooB* or *fooT* promoters, respectively. In order to determine whether *foo* or *fooT* expression is regulated by catabolite repression, strains were grown in the presence or absence of 0.4% glucose. In *E. coli* strain C600 containing either the *foo-lacZ* fusion or the *fooT-lacZ* fusion, the  $\beta$ -gal activity was reduced by about 25% when glucose was added to the medium (figure 3). Addition of cAMP to the glucose medium increased the  $\beta$ -gal activity (figure 3). The increased  $\beta$ -gal activity in the presence of cAMP was less important for the *fooT-lacZ* fusion. When plasmids



**Figure 3.** Catabolite repression.  $\beta$ -gal (LacZ) production, given as LacZ units of the *fooB* (a) or *fooT* (b) fusion grown in minimal broth with or without 0.4% glucose in a *cyo*<sup>+</sup> (open bar) or *cyo*<sup>-</sup> (hatched bar) background. Mean values  $\pm$  standard deviation are given.



**Figure 4.** Lrp effect on fimbrial expression. Luciferase production, given as Lux units (photon/s) of the *foo/B* (a) or *fot/B* (b) fusion grown in minimal broth with or without addition of 1 mM leucine. Mean values  $\pm$  standard deviation are given.

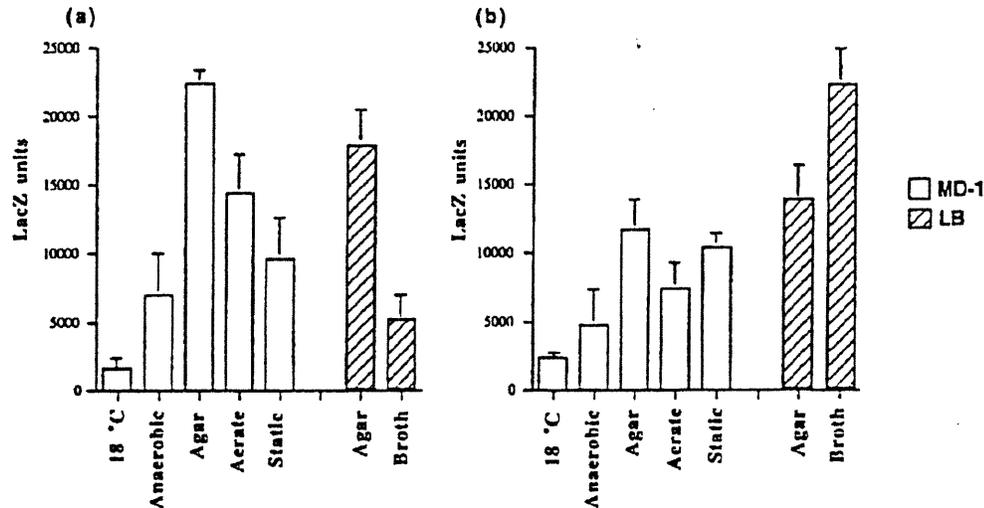
containing the *foo* and *fot* fusions were transformed into an isogenic *cya* strain (TP610) [25],  $\beta$ -gal activity was also greatly reduced, and higher levels were detected after addition of 1 mM cyclic AMP to the medium (0–2 414 U of  $\beta$ -gal activity for *foo* and 2 425–3 200 U for *fot*). However, addition of cAMP in the *cya*<sup>-</sup> derivatives did not completely restore the  $\beta$ -gal activities observed in the wild-type. Influence of catabolic repression on *foo* and *fot* activities determined by using luciferase gene fusions was similar to that observed for *lacZ* fusions (data not shown).

As there are similarities in the structural organisation of *pap* and *foo* or of *sfa* and *fot* regulatory regions, the effect of Lrp on the regulation of *foo* and *fot* transcription was investigated. Plasmids bearing *foo*- or *fot*-*luxAB* fusions were transformed into Mew1 and isogenic *lrp* mutant (Mew45) *E. coli* strains [28, 29]. The strain Mew45 has a *lacZ* insertion in the *lrp* gene, and therefore only *lux* fusions could be tested [28]. For both *foo*- and *fot*-*luxAB* fusions, luciferase activity was strongly reduced in the Lrp<sup>-</sup> background (figure 4). Addition of 1 mM of leucine slightly modified luciferase activity although the effect was not significant (figure 4). The positive regulatory effect of Lrp on the production of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbriae was also observed by quantification of immunodot experiments which demonstrated 3-fold-lower signals compared to the Lrp<sup>+</sup> strain (data not shown).

As GATC deoxyadenosine methylase (Dam) methylation sites are conserved in the regulatory regions of the *foo* and *fot* gene clusters, the effect of Dam methylation on *foo* and *fot* expression was verified. The *foo*- and *fot*-*lacZ* regulatory fusions were transferred to a Dam-defective host strain Mew1 *dam*::Tn5. The  $\beta$ -gal activities were reduced in the Dam<sup>-</sup> strain compared to the wild-type isogenic strain at least 4-fold for *foo* (8 227 U vs 32 025 U) and 9-fold for *fot* (1 039 U vs 9 401 U).

#### 3.4. Influence of environmental conditions on *foo* and *fot* expression

To determine the influence of environmental conditions on transcription of *foo* and *fot* operons, strains bearing plasmids containing reporter gene fusions were grown in different environmental conditions. Influence of the composition of the growth medium on *foo* and *fot* expression was investigated using minimal MD-1 and complex LB liquid or solid media. In *foo*-*lacZ* fusions, the highest levels of  $\beta$ -gal activity were observed when strains were grown on minimal MD-1 agar (figure 2a). In addition, when grown in MD-1 broth, cells produced more  $\beta$ -gal activity when the broth was shaken than in static culture (figure 5a). In contrast, for *fot*-*lacZ* fusions,  $\beta$ -gal activity levels were higher when strains were grown in LB broth than on LB agar or MD-1 agar (figure 5b). In addition, cell growth in static MD-1 broth produced more  $\beta$ -gal activity compared to cells grown in MD-1 broth with agita-



**Figure 5.** F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> expression in different growth conditions.  $\beta$ -gal (LacZ) production, given as LacZ units of the *fooB* (a) or *foiB* (b) fusion grown in different culture conditions and media. 18 °C and anaerobic conditions were tested on minimal agar. Mean values  $\pm$  standard deviation are given.

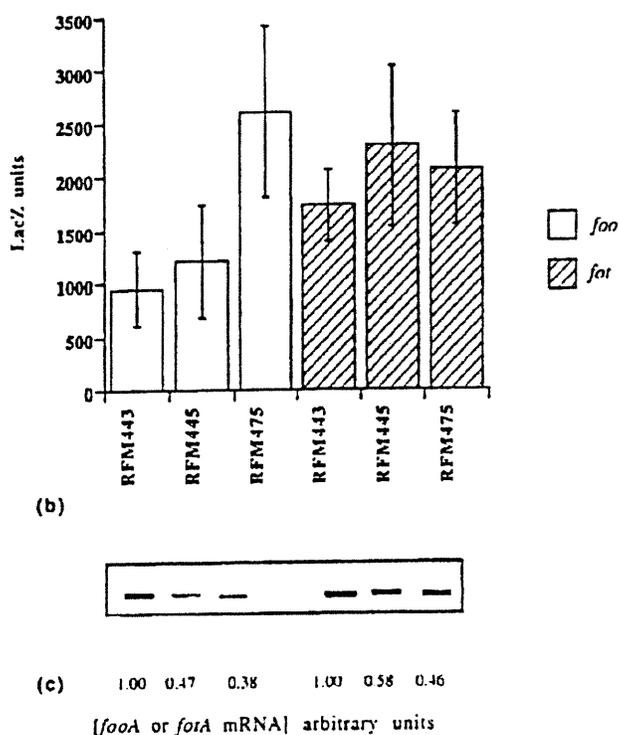
tion (figure 5b). Luciferase reporter activity gave results similar to those obtained by using  $\beta$ -gal reporter activity (data not shown).

Influence of temperature was determined by growing strains on MD-1 agar at either 18 or 37 °C. The  $\beta$ -gal activity for *foo*- and *foi*-lacZ fusions was 10-fold and 4-fold higher, respectively, when strains were grown at 37 °C than when grown at 18 °C (figure 5). Strains were grown under aerobic or anaerobic conditions on MD-1 agar. The  $\beta$ -gal activity of both *foo*- and *foi*-lacZ fusions was at least 2-fold higher when strains were grown in aerobic conditions (figure 5). Similar results were obtained with luciferase activity (data not shown).

### 3.5. Effect of altered DNA supercoiling

DNA supercoiling affects expression of different virulence determinants [10]. In order to examine if *foo* and *foi* expression is responsive to the level of DNA supercoiling, the *foo*- or *foi*-lacZ fusions were transferred to isogenic strains RFM443 (WT), RFM445 [*gyrB* (Ts)] and RFM475 [*Dcys-topA*, *gyrB*(Ts)] and these strains were grown at 37 °C [12]. The  $\beta$ -gal activity demonstrated by the *foo* and *foi*-lacZ fusions was increased in the *topA* (RFM475) strain when

compared to wild-type background (RFM443) (figure 6). Similar results were obtained with luciferase activity (data not shown). In these experiments the fusions were carried by pAG-derivative plasmids that harbour the *tetA* gene. It was shown that high levels of negative supercoiling can be generated during transcription and translation of the *tetA* gene in *topA* mutants [33]. The gene fusions were also inserted into the *Bam*HI site of pACYC184, in this case inactivating the *tetA* gene. In contrast with the results obtained with pAG-derivatives, in these constructions, the  $\beta$ -gal activity in the *gyrB-topA* mutant strain (RFM475) was reduced by two-fold (4 000 U) as compared to the fusions in the wild-type strain (RFM443) (9 438 U), and a slight decrease (7 760 U) was also observed for the *gyrB* mutant (RFM445) at 37 °C. mRNA quantification of the major subunit gene transcripts was done using pACYC184 derivative-plasmids carrying an inactivated *tetA* gene. A similar effect on mRNA levels was also observed. A two-fold lower level of *fooA* and *foiA* mRNA transcript was observed in both the *gyrB* and *gyrB-topA* mutants as compared to the wild-type strain (figure 6). Altogether, these experi-



**Figure 6.** Effect of DNA supercoiling. (a)  $\beta$ -gal (LacZ) production, given as LacZ units of the *fooB* (open bar) or *fooA* (hatched bar) fusion grown in minimal broth medium. Mean values  $\pm$  standard deviation are given. (b) *fooA* mRNA and *fooB* mRNA were detected by RNA slot blotting in strain RFM443 (wild type), RFM445 (*gyrBts*) or RFM475 (*gyrBts-topA*) harbouring plasmid pICJ7 or pYYAN. (c) Levels of mRNA were determined using a densitometer and expressed as proportions of the RFM443 (pICJ7) or RFM443 (pYYAN) value.

ments also suggest that DNA topology is important for fimbrial gene expression.

#### 4. Discussion

For this report, we investigated the transcriptional regulation of the *foo* and *fof* operons, encoding F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbriae, respectively, and environmental conditions that affect this regulation. Expression of fimbriae is controlled at the transcriptional level by two mechanisms which modulate, on one hand, the percentage of cells producing fimbriae in a single colony (phase variation) and, on the other hand, the amount of antigen at the surface of a single cell. These two types of regulation are superimposed

in wild-type cells and are mediated by several *trans*-regulators. F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbrial phase variation was observed in the wild-type strains (data not shown). However, this report focused on the regulation mechanism which controls the amount of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> per cell. For this purpose, the activity of the *foo* and *fof* promoters, monitored by expression of a reporter gene, *lacZ* or *luxAB*, was studied in cells with a defined genetic background. Because of the multicopy plasmid used, the cells harbouring a *lacZ* fusion had a uniform Lac-positive phenotype, indicating that phase variation was absent.

The regulatory regions of the *foo* (F165<sub>1</sub>) and *fof* (F165<sub>2</sub>) gene clusters showed a similar organisation to those encoding P and S fimbriae, respectively, with two genes, *I* and *B*, transcribed in opposite directions (figures 1 and 2). The nucleotide sequence of the *fofB* gene revealed that the FofB protein is truncated as compared to its homologues (SfaB). SfaB and PapB are positive regulators of fimbrial gene transcription [2, 40]. The *foo* and *fof* regulatory regions also contain all the putative Lrp and Crp binding sites implicated for phase variation and catabolite repression, and the GATC Dam methylation sites separated by 102 bp.

The *foo* and *fof* transcriptional activities were sensitive to addition of glucose to the medium and decreased in *cya* mutants. Thus, *foo* and *fof* operons are probably subjected to catabolite repression, a global regulation known to act on *pap* and *sfa* expression [16, 17, 47]. Lrp regulates a variety of fimbrial operons and many genes in *E. coli* [30, 36, 41]. Lrp can act as a negative or positive regulator and many of the genes regulated by Lrp are responsive to leucine [41]. Lrp seems to act as a positive regulator for *foo* and *fof*, as a lowered expression was observed in a *lrp*<sup>-</sup> background. It has been shown that leucine and alanine decrease production of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbriae. In our experiments, leucine did not seem to influence *foo* and *fof* transcription. Perhaps the effect of leucine was not detectable due to the multicopy status of the plasmids harbouring the gene fusions, or leucine acts on the phase variation mechanism which is not apparent in our conditions. Another possibility

is that leucine alters expression of fimbriae in a post-transcriptional step. The GATC sequences in *E. coli* DNA are methylated at the adenosine by deoxyadenosine methylase (Dam). Dam and Lrp are essential for P and S phase variation and for the maintenance of the differential methylation states of the two 102 bp-separated GATC sites in the regulatory region [32]. Two GATC sites separated by 102 bp were also found in each of the *foo* and *fol* regulatory regions. Moreover, the *foo* and *fol* promoter activities and production of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> were reduced in a *dam*-negative background. Thus, modulation of gene expression by global regulators is observed in spite of the use of multicopy pAG derivatives carrying the gene fusions that have a ColE1 origin and a copy number of 20 per cell [18]. These results suggest that F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbriae are under a similar pattern of regulation by Lrp and by differential methylation of the GATC sites by Dam [50, 51, 53]. However, the effect of Dam and Lrp could be underestimated if these regulators are in limited amounts in the cell in terms of the multicopy status of their binding sites on plasmids. This is also why the phase variation phenomenon could not be observed [4, 31].

The *foo* expression was maximal after growth on solid minimal medium at 37 °C and in aerobic conditions as observed previously for P and S fimbriae [16, 32]. In contrast, expression of *fol* was found to be higher in LB broth medium. Whether this difference is due to the truncated FotB protein is not known, since the role of PapB homologues in fimbrial gene expression is not well understood. The difference between the *foo* and *fol* expression in LB or minimal media could reflect an *in vivo* differential expression that permits the bacteria to optimise colonisation and survival in different environmental niches.

Initiation and elongation of gene transcription are affected by the supercoiling state of the DNA. Thus, DNA topology can act as a global regulator with the potential to influence any gene in the cell. The level of supercoiling can be affected by several environmental factors such as temperature, anaerobiosis and osmolarity

[11]. Some environmental stimuli have also been found to affect fimbrial expression [17, 47]. It has been proposed that pathogenic bacteria can use this mechanism of DNA supercoiling modification for the regulation of different virulence genes [10]. Topoisomerases, such as TopI encoded by *topA*, which relaxes negatively supercoiled DNA, and gyrase encoded by *gyrA* and *gyrB*, which negatively supercoils DNA, are essential for an equilibrium of the DNA supercoiling level and the survival of the cell. The *pB* promoters of *foo* and *fol* operons are sensitive to DNA supercoiling, as demonstrated by different levels of fimbrial expression in the *gyrB*(Ts) and *gyrB*(Ts)-*topA* mutants at 37 °C. At this temperature, global negative supercoiling is lower in these mutant strains as compared to the isogenic wild-type strain [12, 37]. Moreover, *foo* and *fol* expression also seems to be sensitive to local changes in supercoiling, such as high levels of negative supercoiling generated during transcription and translation of the *tetA* gene. This is an interesting observation considering the fact that *pB* and *pI* are divergently transcribed and that some promoters can be affected by divergent transcription [39].

The two F165 fimbrial gene clusters share similar acting regulatory components. *In vitro* expression of both F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> is dependent on global regulation, including DNA supercoiling, and on environmental conditions. They are expressed similarly upon global regulation. However, different environmental conditions induce the production of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbriae. In conclusion, F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub>-encoding operons from a porcine strain showed a genetic organisation of the regulatory region similar to that of P- and S-encoding operons from strains implicated in extraintestinal diseases in humans. This could reflect a similar role and importance for F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbriae in the pathogenesis of septicæmia in pigs.

EMBL accession numbers for the nucleotide sequences reported in this paper are L07420 (*foo*) and U09857 (*fol*).

## Acknowledgments

We thank E.B. Newman (U. Concordia) for providing the *lrp* wild-type and mutant strains, C. Cupples (U. Concordia) for providing the P1 (*dam::Tn5*) lysate, and A. Guzzo, M.S. DuBow (U. McGill) and M. Frenette (U. Laval) for the gift of bacterial strains and plasmids. We thank C.M. Dozois for critically reading the manuscript. This work was supported in part by a grant to J.H. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (OGP0025120) and by a NATO grant to C.M., F.D. and M.-C.T. were funded by a scholarship from the Fonds des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec and NSERC, respectively.

## References

- [1] Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [2] Baga M., Göransson M., Normark S., Uhlin B.E., Transcriptional activation of a *pap* pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J.* 4 (1985) 3887–3893.
- [3] Berger H., Hacker J., Juárez A., Hughes C., Goebel W., Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 152 (1982) 1241–1247.
- [4] Blyn L.B., Braaten B.A.A.W.-Z.C., Rolfson D.H., Low D.A., Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *EMBO J.* 8 (1989) 613–620.
- [5] Boyer H.W., Roulland-Dussoix D., A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41 (1969) 459–472.
- [6] Chang A.C.Y., Cohen S.N., Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134 (1978) 1141–1156.
- [7] Cherifi A., Contrepolis M., Picard B., Gouillet P., de Rycke J., Fairbrother J.M., Barnouin J., Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol. Lett.* 70 (1990) 279–284.
- [8] Contrepolis M., Fairbrother J.M., Kaura Y.K., Girardeau J.P., Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada, and India. *FEMS Microbiol. Lett.* 59 (1989) 319–324.
- [9] Daigle F., Dozois C.M., Jacques M., Harel J., Mutations in the *fl65A* and *fl65E* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microb. Pathog.* 22 (1997) 247–252.
- [10] Dorman C.J., DNA topology and the global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. *Microbiol.* 141 (1995) 1271–1280.
- [11] Drlica K., Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 425–433.
- [12] Drolet M., Phoenix P., Menzel R., Massé E., Liu L.F., Crouch R.J., Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 3526–3530.
- [13] Dubreuil J.D., Fairbrother J.M., Biochemical and serological characterization of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165<sub>2</sub>. *FEMS Microbiol. Lett.* 74 (1992) 219–224.
- [14] Fairbrother J.M., Larivière S., Lallier R., New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from pigs with diarrhea. *Infect. Immun.* 51 (1986) 10–15.
- [15] Fairbrother J.M., Lallier R., Leblanc L., Jacques M., Larivière S., Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. *FEMS Microbiol. Lett.* 56 (1988) 247–252.
- [16] Göransson M., Uhlin B.E., Environmental temperature regulates transcription of a virulence pili operon in *E. coli*. *EMBO J.* 3 (1984) 2885–2888.
- [17] Göransson M., Forsman P., Nilsson P., Uhlin B.E., Upstream activating sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3 (1989) 1557–1565.
- [18] Guzzo A., DuBow M.S., Construction of stable, single-copy luciferase gene fusions in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 156 (1991) 444–448.
- [19] Hacker J., Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 150 (1990) 1–27.
- [20] Harel J., Daigle F., Maiti S., Desautels C., Labigne A., Fairbrother J.M., Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol. Lett.* 82 (1991) 177–182.
- [21] Harel J., Forget C., Saint-Amand J., Daigle F., Dubreuil D., Jacques M., Fairbrother J., Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165<sub>1</sub>, a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicemic *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992) 95–102.
- [22] Harel J., Forget C., Ngeleka M., Jacques M., Fairbrother J., Isolation and characterization of adhesin-defective *TnpA* mutants of septicemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K<sup>-</sup>:F165. *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992) 2337–2345.
- [23] Harel J., Fairbrother J., Forget C., Desautels C., Moore J., Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet. Microbiol.* 38 (1993) 139–155.
- [24] Harel J., Jacques M., Fairbrother J.M., Bossé M., Forget C., Cloning of determinants encoding F165<sub>2</sub> fimbriae from porcine septicemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiol.* 141 (1995) 221–228.
- [25] Hedegaard L., Danchin A., The *cya* gene region of *Erwinia chrysanthemi* 13374: organization and gene products. *Mol. Gen. Genet.* 201 (1985) 38–42.
- [26] Khan A.S., Korhonen T.K., Virkola R., Lahteenmaki K., Kukkonen M., Hacker J., Binding of plasminogen to the F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* and its activation into plasmin. Abstracts in General Medical Microbiology, 98th ASM meeting (1998) D-108.
- [27] Korhonen T.K., Valtonen M.V., Parkkinen J., Väisänen-Rhen V., Finne J., Orskov F., Svenson S.B., Mäkelä H.P., Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect. Immun.* 48 (1985) 486–491.
- [28] Lin R., D'Ari R., Newman E.B., The leucine regulon of *Escherichia coli* K12: a mutation in *rbIA* alters expression of L-leucine-dependent metabolic operons. *J. Bacteriol.* 172 (1990) 4529–4535.
- [29] Lin R., D'Ari R., Newman E.B., Lambda *placMu* insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *J. Bacteriol.* 174 (1992) 1948–1955.
- [30] Low D.A., Methylation-dependent and Lrp-dependent fimbrial gene regulation in *Escherichia coli*. In: Miller V.L., Kaper J.B., Portnoy D.A., Isberg R.R. (Eds.), *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994, pp. 423–436.
- [31] Low D., Robinson E.N.J., McGee Z.A., Falkow S., The frequency of expression of pyelonephritis-associated pili is under regulatory control. *Mol. Microbiol.* 1 (1987) 335–346.

- [32] Low D., Braaten B., Van der Woude M., in: Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umbrager H.E. (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, DC, 1996, pp. 146–157.
- [33] Lynch A.S., Wang J.C., Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 1645–1655.
- [34] Maiti S.N., DesGroseillers L., Fairbrother J.M., Harel J., Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165<sub>1</sub> of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787, *Microb. Pathog.* 16 (1994) 15–25.
- [35] Marklund B.J., Tennent J.M., Garcia E., Hamers A., Baga M., Lindberg F., Gaastra W., Normark S., Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* *pap* and *prs* pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties, *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 2225–2242.
- [36] Martin M., The *cip* (CS31A) operon is negatively controlled by Lrp, ClpB, and L-alanine at the transcriptional level, *Mol. Microbiol.* 21 (1996) 281–292.
- [37] Massé E., Phoenix P., Drolet M., DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rmB* operon in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 12816–12823.
- [38] Miller J.H., in: Miller J.H. (Ed.), *A Short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1992.
- [39] Mojica F.J., Higgins C.F., Localized domains of DNA supercoiling: topological coupling between promoters, *Mol. Microbiol.* 22 (1996) 919–928.
- [40] Morschhäuser J., Uhlin B.E., Hacker J., Transcriptional analysis and regulation of the *sfa* determinant coding for S fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains, *Mol. Gen. Genet.* 238 (1993) 97–105.
- [41] Newman E.B., Lin R.T., The leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 747–775.
- [42] Ngeleka M., Jacques M., Martineau Doizé B., Daigle F., Harel J., Fairbrother J.M., Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K“V165” mutant negative for F165<sub>1</sub> fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs, *Infect. Immun.* 61 (1993) 836–843.
- [43] Nou X., Braaten B., Kaltenbach L., Low D.A., Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by PapI regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*, *EMBO J.* 14 (1995) 5785–5797.
- [44] Rhen M., Väisänen-Rhen V., Nucleotide sequence analysis of a P fimbrial regulatory element of the uropathogenic *Escherichia coli* strain KS71 (O4:K12), *Microb. Pathog.* 3 (1987) 387–391.
- [45] Riegman N., Kusters R., van Yeggel H., Bergmans H., van Bergen en Henegouwen P., Hacker J., van Die I., FIC fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: genetic and functional organization of the *foc* gene cluster and identification of minor subunits, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 1114–1120.
- [46] Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463–5467.
- [47] Schmoll T., Ott M., Oudega B., Hacker J., Use of a wild-type gene fusion to determine the influence of environmental conditions on expression of the S fimbrial adhesin in an *Escherichia coli* pathogen, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 5103–5111.
- [48] Schmoll T., Morschhäuser J., Ott M., Ludwig B., van Die I., Hacker J., Complete genetic organization and functional aspects of the *Escherichia coli* S fimbrial adhesin determinant: nucleotide sequence of the genes *sfa* B,C,D,E,F, *Microb. Pathog.* 9 (1990) 331–343.
- [49] Smyth C.J., Marron M., Smith S.G.J., in: Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Human. CAB International, Wallingford, UK, 1994, pp. 399–435.
- [50] van der Woud M.W., Braaten B.A., Low D.A., 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 (1993) 2429–2435.
- [51] van der Woude M., Braaten B., Low D., Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*, *Trends Microbiol.* 4 (1996) 5–9.
- [52] van Die I., van Geffen B., Hoekstra W., Bergmans H., Type 1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: cloning and characterization of the genes involved in the expression of the 1C antigen and nucleotide sequence of the subunit gene, *Gene* 34 (1985) 187–196.
- [53] White-Ziegler C.A., Angus Hill M.L., Braaten B.A., van der Woude M.W., Low D.A., Thermoregulation of *Escherichia coli* *pap* transcription is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 1121–1137.
- [54] Xia Y., Forsman K., Jass J., Uhlin B.E., Oligomeric interaction of the PapB transcriptional regulator with the upstream activating region of pili adhesin gene promoters in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 30 (1998) 513–523.

## ANNEXE II

**Harel, J., F. Daigle, C. Forget, M.-C. Tessier, C. Crost, and C. Martin.** 2000. Phase variation of F165<sub>1</sub> (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. *Can. J. Microbiol.* **46**: 1101-1107.

**Contribution à cet article en tant que co-auteure**

J'ai contribué à cet article en participant à l'élaboration des protocoles expérimentaux concernant la variation de phase.

J'ai aussi effectué des analyses de séquences sur la région intercistronique de *foo* provenant des souches *E. coli* 4787 et 5151.

J'ai également participé à la correction du manuscrit.

## Phase variation of F165<sub>1</sub> (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals

Josée Harel, France Daigle, Céline Forget, Marie-Catherine Tessier, Cécile Crost, and Christine Martin

**Abstract:** *Escherichia coli* O115:F165 strains are associated with septicaemia in young pigs and synthesize fimbriae involved in virulence, designated as F165<sub>1</sub>. F165<sub>1</sub> fimbriae belong to the P fimbrial family and are encoded by the *foo* gene cluster. The *foo* regulatory region of strain 5131 possesses characteristics similar to that of members of the P regulatory family, including *papI* and *papB* homologues, and two GATC sites separated by 102 bp, targets of differential Dam methylation. In wild-type strains, the synthesis of F165<sub>1</sub> is repressed by leucine and the fimbriae undergo phase variation. Immunofluorescence staining showed that phase variation of F165<sub>1</sub> results in a majority of cells (98%) in the ON phase, in contrast with phase variation of other members of this regulatory family, for which the majority of the cells are in the OFF state. Using a translational fusion in strain 5131 between *phoA* and *fooA*, encoding for the major structural subunit of F165<sub>1</sub>, it was shown that leucine inhibits the OFF to ON switch and modulates the basal transcription of the *foo* operon.

**Key words:** *Escherichia coli*, fimbriae, phase variation, regulation, septicaemia.

**Résumé :** Les souches d'*Escherichia coli* O115:F165 retrouvées dans les cas de septicémie chez les jeunes porcs synthétisent des fimbriae impliqués dans la virulence, désignés F165<sub>1</sub>. Les fimbriae F165<sub>1</sub> sont de la famille de fimbriae P et sont codés par le regroupement de gènes *foo*. La région régulatrice de *foo* de la souche 5131 recèle des caractéristiques semblables à celle de membres de la famille régulatrice P, incluant des homologues de *papI* et *papB*, et deux sites GATC espacés par 102 pb, cibles de la méthylation différentielle par Dam. Dans les souches sauvages, la synthèse de F165<sub>1</sub> est réprimée par la leucine et les fimbriae subissent une variation de phase. Un marquage à l'immunofluorescence a démontré que la variation de phase de F165<sub>1</sub> se solde par la phase OUVERTE (ON phase) dans la majorité des cellules (98%), contrairement à la variation de phase des autres membres de cette famille régulatrice, qui affichent un état FERMÉ (OFF state) dans la plupart des cellules. Nous avons démontré, en utilisant une fusion traductionnelle chez la souche 5131 entre *phoA* et *fooA* codant pour l'unité majeure de F165<sub>1</sub>, que la leucine inhibe le passage de l'état FERMÉ à l'état OUVERT et module la transcription basale de l'opéron *foo*.

**Mots clés :** *Escherichia coli*, fimbriae, variation de phase, régulation, septicémie.

[Traduit par la Rédaction]

### Introduction

*Escherichia coli* strains can cause extraintestinal diseases such as septicaemia, meningitis or urinary tract infection (UTI) (Ørskov and Ørskov 1985). Many virulence determinants including fimbrial adhesins contribute to extraintestinal *E. coli* pathogenicity (Hacker 1990; Smyth et al. 1994). F165 are fimbriae produced by *E. coli* isolates associated

with septicaemia in piglets, calves (Contrepois et al. 1989; Fairbrother et al. 1986; Harel et al. 1991), and humans (Cherifi et al. 1990). F165 producing strains of *E. coli* O115 that cause septicaemia in pigs express at least two serologically and genetically distinct fimbriae, F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> (Fairbrother et al. 1988; Harel et al. 1992a; Harel et al. 1995). F165<sub>1</sub>, encoded by the *foo* gene cluster, are related to F11 fimbriae, members of the P fimbrial family, and bear a class III G-adhesin similar to Prs with slightly different binding capacities (Harel et al. 1992a; Maiti et al. 1994). F165<sub>1</sub>-negative mutants of a pathogenic *E. coli* O115 strain are less virulent in experimentally infected pigs (Ngeleka et al. 1993). F165<sub>2</sub> fimbriae, encoded by the *fof* gene cluster, are closely related to F1C fimbriae (Dubreuil and Fairbrother 1992; Harel et al. 1995).

A group of *E. coli* strains O115 associated with septicaemia in piglets and calves, expresses both F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> fimbrial antigens. They possess many characteristics usually associated with uropathogenic strains such as serum resistance, mannose-resistant haemagglutination, aerobactin, and ColV (Harel et al. 1993). However, unlike most of the uropathogenic strains, these are non-haemolytic, and do not

Received January 3, 2000. Revision received September 7, 2000. Accepted September 14, 2000. Published on the NRC Research Press web site on November 10, 2000.

J. Harel,<sup>1</sup> F. Daigle,<sup>2</sup> C. Forget, M.-C. Tessier, and C. Crost. Département de Pathologie et Microbiologie, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, QC J2S 7C6, Canada.

C. Martin. Laboratoire de Microbiologie, INRA Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

<sup>1</sup>Author to whom all correspondence should be addressed (e-mail: harelj@ere.umontreal.ca).

<sup>2</sup>Present address: Washington University, One Brookings Drive, Box 1137, St. Louis, MO 63130, U.S.A.

produce cytotoxic necrotizing factors (Fairbrother et al. 1986). Using a piglet infection model, these strains are able to induce septicæmia (Fairbrother et al. 1989).

As with many other virulence determinants, fimbriae are not expressed constitutively and are subjected to a phase variation mechanism, defined as the ability to switch between ON (fimbriae-positive) and OFF (fimbriae-negative) states (Low et al. 1987; van der Woude et al. 1996; Low et al. 1996; Harel and Martin 1999). The phase variation mechanism is reversible and controlled at the level of transcription. It results in a phenotypically heterogeneous population. Fimbrial expression is modulated by environmental conditions, such as nutrients, osmolarity, and temperature. Global regulators such as cAMP receptor protein (CRP), leucine-responsive regulatory protein (Lrp), and deoxyadenosine methylase (Dam) regulate expression of several genes and have been implicated in regulation of expression of P and S fimbriae (Low 1994).

Previously, the production of fimbrial complex F165 in the wild-type strains *E. coli* O115:F165 was found to be dependent on the composition of the culture medium and repressed in the presence of alanine or glucose, in anaerobic conditions, or at temperatures below 37°C (Fairbrother et al. 1988). In a previous study, adhesin-defective mutants were generated in the wild-type pathogenic strain 5131 of *E. coli* O115:K<sup>V</sup>165<sup>S</sup>:F165 using the transposon *TnphoA* (Harel et al. 1992b). *TnphoA* insertions were localized either in the *fooA* gene, which encodes for the major fimbrial subunit or in the *fooE* gene, which encodes a minor fimbrial subunit. *TnphoA* gene fusions were used to measure expression of F165<sub>1</sub> fimbrial genes in different environmental conditions. The expression of F165<sub>1</sub> tested by PhoA levels in *fooA::phoA* fusions was shown to be negatively regulated in the presence of glucose, L-leucine, or when grown at 18°C (Daigle et al. 1997). In the present study, we determined the nucleotide sequence of the *foo* regulatory region, including the *fooI* and *fooB* regulatory genes. We show that F165<sub>1</sub> phase variation occurs in wild-type F165-positive strains and that leucine inhibits phase variation and modulates the basal expression of the *foo* operon.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

Wild-type pathogenic O115:K<sup>V</sup>165<sup>S</sup>:F165 *E. coli* strains 5131 and 4787 cause septicæmia in pigs and encode fimbriae F165<sub>1</sub> (Prs-like). Strain M48 derives from 5131 following a *TnphoA* transposition event resulting in a translational fusion between *fooA* (encoding the major F165<sub>1</sub> subunit) and *phoA* (Harel et al. 1992b; Daigle et al. 1997). The collection of 17 F165-positive strains used to study the expression of F165<sub>1</sub> was described previously (Maiti et al. 1993). Luria-Bertani (LB) agar, and M9 glycerol agar were prepared as described previously (Miller 1992). The alkaline phosphatase substrate XP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ont., Canada) was included in the agar at a concentration of 40 µg/mL. When necessary, leucine (1 mM or 1.5 mM) or alanine (1.5 mM) were added to M9 glycerol agar plates supplemented with valine and isoleucine (each at 50 µg/mL).

### Sequencing

DNA regulatory region of *foo* from strain 5131 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into vector pCRII

(Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.). The forward primer is located downstream of the *fooI* regulatory gene from strain 4787 (L07420) with a *Bgl*III site added at the 5' end. The reverse primer is located at the beginning of the *fooA* major subunit gene from strain 4787 (L07420) with a *Bam*HI site added at the 5' end. The sequence was determined by the dideoxy-chain reaction termination method of Sanger et al. (1977), as modified for use with a T7 sequencing kit (Pharmacia LKB Biotechnology, Baie d'Urfé, Que.) using T3 or T7 and universal primers. Nucleotide sequence of the *foo* regulatory region from strain 5131 was compared with those of other fimbrial sequences using the BLAST program (Altschul et al. 1990) from National Center for Biotechnology Information (Washington, D.C.).

### Phase variation

F165<sub>1</sub> phase variation on wild-type *E. coli* strains, 4787 and 5131, was estimated by using indirect immunofluorescence and phase contrast microscopy. One bacterial colony was resuspended in PBS after three successive passages on M9 glycerol at 30°C. A drop of this suspension was fixed on a slide and incubated with the rabbit polyclonal anti-F165<sub>1</sub> at a dilution of 1:200 and prepared as described previously (Harel et al. 1992a). Binding of the antibody was detected by incubation with anti-rabbit IgG-fluorescein. Fluorescent and non-fluorescent bacteria in a field were counted and bacteria expressing F165<sub>1</sub> were considered to be in phase ON.

### Phase transition rates

Phase transition rates of F165<sub>1</sub> were measured using the wild-type derivative strain M48 (5131 *fooA::TnphoA*) inoculated onto M9 glycerol with XP as described (Blyn et al. 1989). To measure the influence of L-alanine and L-leucine on phase variation, these amino acids were added at 1 mM or 1.5 mM to M9 glycerol XP plates. Colonies showing a complete blue (XP<sup>+</sup>) or white (XP<sup>-</sup>) phenotype were excised from the agar and resuspended in M9 salts. Appropriate dilutions were inoculated onto M9 glycerol agar at 30°C. After 48 h of growth, the colonies were scored for the XP phenotype. Transition rates were calculated by the formula  $(M/N)/g$ , where  $M$  is the number of cells that underwent a phase variation,  $N$  the total number of cells evaluated and  $g$  the total number of generations that gave rise to the colony (for M48  $g = 23$ ). The weighted average of frequencies was calculated based on the frequency switch of 3 colonies.

### Alkaline phosphatase assay

Alkaline phosphatase activity of single colonies grown overnight at 30°C on M9 glycerol XP agar plates supplemented or not with L-leucine or L-alanine was measured as described previously (Harel et al. 1992b). Briefly, colonies were excised from the agar and resuspended in M9 salts. The optical density at 600 nm of cells was monitored, and 40 µg/mL of XP was added to permeabilized cells. Production of color at 660 nm was monitored, and specific PhoA activity was expressed in enzyme units per min. An isogenic mutant of 5131 (mutant 2) which expresses PhoA constitutively was used as a positive control and strain 5131 was used as a negative control (Harel et al. 1992b).

### Isolation of fimbriae and dot blot

Crude fimbrial extracts were prepared from bacteria (OD<sub>600</sub> = 1.0) grown on minimal agar plates in presence or absence of L-leucine (1.0 mM) as described (Fairbrother et al. 1988). A nitrocellulose membrane was dotted with 2 µL of the fimbrial preparations (Harel et al. 1992a). The membrane was saturated for 1 h with Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl) supplemented with 5% (w/v) skim milk. The membrane was incubated for 1 h with a rabbit polyclonal antiserum directed against F165<sub>1</sub> diluted 1/1000 in TTBS (TBS containing 0.05% (v/v) Tween 20) plus 2% (w/v) skim milk. The filter is then incu-

**Fig. 1.** Comparison of intergenic regions of *foo* with intergenic regions of *pap17* and *pap21*. The potential promoter regions (-35 and -10 sites) are indicated by dotted lines. The putative Lrp sites are boxed and numbered according to Nou et al. (1995). The sequence differences observed in *foo* and *pap21* when compared to the sequence of *pap17* are underlined.

**Intergenic regions of *pap/foo***

	-10	-35	
Pap17	CTCACTGTAACAAAGTTTCTTCGAATAATAAAAAATCATGCTCTCTGTTATCAACGG		
Pap21	CTCACTGTAACAAAGTTTCTTCGAATAATAAAAAATCATGCTCTCTGTTATCAACGG		
5131	CTCACTGTAACAAAGTTTCTTCGAATAATAAAAAATCATGCTCTCTGTTATCAACGG		
Pap17	AAAGGTATTTTATTCTCTATGTTTGCT-----TTATTGTTCAATTTAGTGA		
Pap21	AAAGGTATTTTATTCTCTCTGTTTGGCTGTTTGGCTTTATTGTTCAATTTAGTGA		
5131	AAAGGTATTTTATTCTCTCTGTTTGGCT-----TTATTGCGAAATTTAGTGA		
Pap17	ATTTCCTTTTATTGGATTTATTGATGFGTATCACATTTGCGTTTATTTTTCTG		
Pap21	ATTTCCTTTTATTGGCTTTATTGATATGTTATCACATTTGCGTTTATTTTTCTG		
5131	ATTTCCTTTTATTGGCTTTATTGATGTTGTTATCACATTTGTTGTTATTTTTATG		
	4	5	
Pap17	CGAAAAGAAAGTCCGTAATAATTCATTTAGACGATCTTTTATGCTGTAAATTC AATT		
Pap21	TGAAAAGAAAGTCCGTAATAATTCATTTAGACGATCTTTTATGCTGTAAATTTA AATT		
5131	TGAAAAGAAAGTCCGTAATAATTCATTTAGACGATCTTTTATGCTGTAAATTC AATT		
	6	1	
Pap17	TGCCATGATGTTTTTATCTGAGTACCTCTTGCTATTAATGTTTGTTC TAGTTTAA		
Pap21	TACTATGATGTTTTTATCTGAGTGCATTCCTATTATTAATGTTTGTTC TAGTTTAA		
5131	CACCATGATGTTTTTATCTGAGTGTATTCCTTGTGTTTGTGTTTGTTC TAGTTTGA		
	2	-35	3
Pap17	TTTTGTTTGTGGTTAAAAGATCGTTTAAATCAATATTACAAACATAAAAAAC TAA		
Pap21	TTTTGTTTGTGGTTAAAAGATCGTTTAAATCAATATTACAAACATAAAAAAC TAA		
5131	TTTTGTTTGTAGTTAAAAGATCGTTTAAATTAATATTACAAACATAAAAAAC TAA		
	-10		
Pap17	ATTTAACTTATTGCGTGAAGAGTATTTCCGGGCCGGAAGCATATATCCAGGGGCCCG		
Pap21	ATTTAACTTATTGCAAGAGTATTTCCGGGCCGGAAGCATATATCCAGGGGCCCG		
5131	ATTTAACTTATTGCGTGAAGAGTATTTCCGGGCCGGAAGCATATATCCAGGGGCCCG		
Pap17	ACAGAAGGGGAAAC		
Pap21	ACAGAAGGGGAAAC		
5131	ACAGAAGGGGAAAC		

bated for 1 h in a 1/5000 dilution of biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G. The membrane was rinsed in TTBS and incubated for 1 h in a 1/1000 dilution of peroxidase-labelled avidine in TBS. After washing the membrane, color development was carried out with hydrogen peroxide and 4-chloro-1-naphthol chromogen. Polyclonal antibodies were generated against F165<sub>1</sub> purified fimbriae from *E. coli* HB101 containing the pCJ7 plasmid that carries the *foo* fimbrial operon. The anti-F165<sub>1</sub> antibodies were absorbed against whole HB101 cells (Harel et al. 1992a).

Quantitative reactivities were determined by densitometric analysis (Alpha Imager 2000; Canberra Packard Ltd, Montréal, Que., Canada) of the nitrocellulose membranes. The results shown are the mean ± standard deviation of triplicate determinations and represent quantitative expression of F165<sub>1</sub> expressed as densitometric units (DU).

## Results

### Nucleotide sequence of the *foo* regulatory region of strain 5131

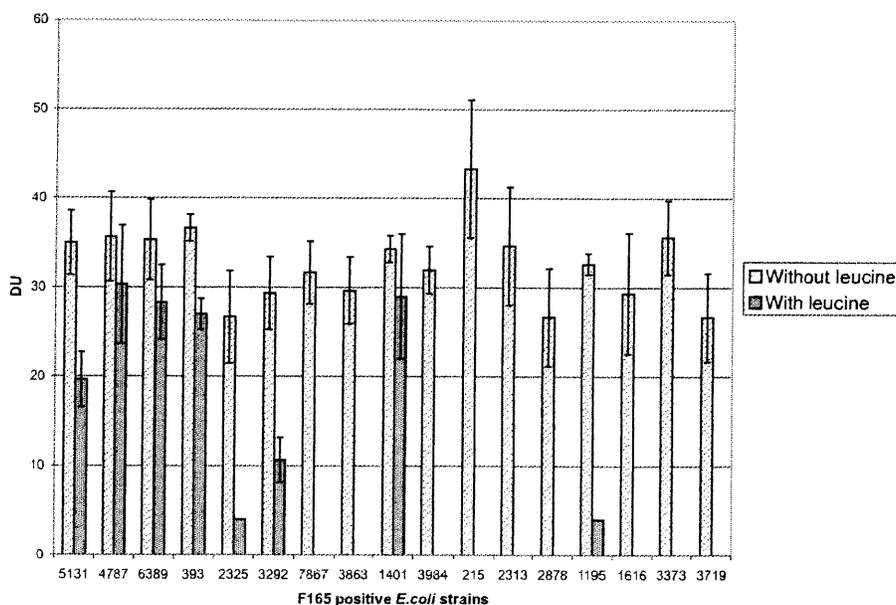
The sequence of the *foo* regulatory region of strain 5131 was determined and appears in the EMBL/GenBank/DBJ Nucleotide Sequence Data Libraries under accession number AF109675. The *foo* regulatory sequence of 5131 contains

two open reading frames (ORFs), running in opposite directions, and codes for the *I* and *B* genes. The two divergent promoters are arranged similarly to those of the *pap* operon (Göransson et al. 1989; van der Woude et al. 1992; Xia et al. 1998). The intergenic region between the *fooI* and *fooB* contains two GATC sites separated by 102 bp. These are characteristics of members of the *pap* regulatory family whose expression is modulated by the differential methylation of the GATC sites and by Lrp (Braaten et al. 1992; van der Woude et al. 1992; White-Ziegler et al. 1998).

### Comparison with other regulatory regions of members of the *pap* regulatory family

The 5131 nucleotide sequence of the *foo* intergenic regulatory region is identical to that of strain 4787 (O115:K<sup>+</sup>V165<sup>+</sup>:F165) (accession No. L07420) (Daigle et al. 2000) and showed an overall 93.1% and 92% to those of the *pap* gene clusters encoding Pap-17 and Pap-21 fimbriae respectively from strain C1212 (Low 1994; Blyn et al. 1989) (Fig. 1). The *foo* intergenic region thus contains sequences homologous to the PapB binding sites as characterized by Forsman et al. (1989) and the six Lrp binding sites described by Nou et al. (1995) (Fig. 1). The amino acid se-

**Fig. 2.** Effect of leucine on F165<sub>1</sub> production of *E. coli* F165-positive strains. The F165<sub>1</sub> production is tested by immunodot using anti-F165<sub>1</sub> serum. Values represent the average of triplicate experiments analysed by densitometry. The standard deviation from the mean is shown. The strains are indicated on the X axis. The densitometric units (DU) are indicated on the Y axis.



quence of FooI of strain 5131 was identical to that of 4787 and to the Pap-I 21 of strain C1212. It differs in one amino-acid residue at position 17 (aspartic acid to asparagine) from the sequence of PapI-17. The predicted amino acid sequence of the 5131 FooB is identical to that of 4787, but it presents three changes in the N-terminal region at positions 9 (arginine to glutamine), 13 (alanine to valine), and 51 (methionine to threonine) with respect to the PapB-protein. FooB-5131 has similar changes with respect to PapB-21 but at position 12 (arginine to glutamine), and 16 (alanine to valine), since PapB-21 has three additional amino-acids in amino-terminal end and also lacks the two terminal residues in the carboxyl end.

#### L-leucine effect on F165<sub>1</sub> synthesis in different strains

A survey of seventeen F165-positive strains indicated that the F165<sub>1</sub> fimbrial production of most F165 strains is affected by the addition of L-leucine in the medium (Fig. 2). The production of F165<sub>1</sub> of twelve strains was reduced, in presence of 1 mM L-leucine, to less than 50% of the production being observed in the absence of leucine. The synthesis of F165<sub>1</sub> of some of these strains was completely abolished. Quantitative dot-blot experiments showed that fimbriae synthesis in the presence of leucine represented 55% for strain 5131 and 83% for strain 4787 of fimbriae produced in the absence of leucine. This was a global estimation of fimbriae synthesis by the total population of cells. If phase variation occurred, these experiments would not allow us to determine the effects of leucine on individual cells. Therefore, to further characterize the leucine effect, we investigated whether F165<sub>1</sub> phase variation indeed occurred in strain 5131.

#### Phase variation

Immunofluorescence microscopy was used to determine the expression of F165<sub>1</sub> fimbrial antigen in wild-type *E. coli*

strains 4787 and 5131 (data not shown). About 92% of bacterial cells within a single colony of the wild-type strains 4787 or 5131 were in phase ON.

Phase variation was further measured using strain M48, a *TnphoA* mutant derived from strain 5131, which possesses a *phoA* translational fusion in the major subunit of *foo* (Table 1). Blue colonies on M9-agar plates supplemented with glycerol and XP were considered to be in the ON phase, white colonies in the OFF phase. The frequency of transition from phase ON to phase OFF ( $\alpha$ ) for M48 using M9 (glycerol) was  $1.26 \times 10^{-3}$ /cell/generation. The frequency of transition from phase OFF to phase ON ( $\beta$ ) was  $2.16 \times 10^{-2}$ /cell/generation (Table 1). Quantitative measurement of PhoA activity indicated that the average activity of a colony in phase OFF (1.15 U) corresponded to 9% of the activity of a colony in phase ON (11.6 U) (Table 1).

#### L-leucine effect on the *foo* expression

No phase variation occurred in strain M48 in the presence of either L-leucine or L-alanine, and the colonies showed a uniform light blue phenotype (Table 1). PhoA activity of such colonies grown in the presence of 1mM leucine represented 31% of the PhoA activity of colonies in the ON phase. Thus, it seems that leucine not only inhibits the mechanism of phase variation, but also represses the basal expression of the operon, since the switch ON to OFF or OFF to ON did no longer occur and cells were blocked in an intermediate state where *foo* transcription was higher than in OFF cells but lower than in ON cells. Furthermore, a leucine dosage effect is observed as the PhoA activity of the colonies dropped to 6.9% of the ON phase in the presence of 1.5 mM leucine, which was lower than the PhoA activity of the OFF phase colonies without leucine. In a similar experiment, 1.5 mM leucine was replaced by 1.5 mM alanine. Data

**Table 1.** Effect of L-leucine and L-alanine on phase variation of *E. coli* strain 5131 *fooA-phoA*

Phenotype <sup>a</sup>	Total no. of colonies	No. of PhoA <sup>+</sup> / PhoA <sup>-</sup>	% of PhoA <sup>+</sup> colonies	Switch frequency ( $\alpha$ or $\beta$ ) <sup>b</sup>	Average mean of switch frequency	Average mean of PhoA <sup>c</sup> units/min/colony
<b>Blue-M9-glycerol</b>	970	939/31	96.8	$1.38 \times 10^{-3}$		
2nd colony as above	1042	1012/30	97.1	$1.25 \times 10^{-3}$	$1.26 \times 10^{-3}$	11.61
3rd colony as above	670	652/18	97.3	$1.16 \times 10^{-3}$		
<b>White M9-glycerol</b>	671	347/324	51.7	$2.24 \times 10^{-2}$		
2nd colony as above	1026	558/468	54.3	$2.36 \times 10^{-2}$	$2.16 \times 10^{-2}$	1.15
3rd colony as above	1036	454/582	43.8	$1.90 \times 10^{-2}$		
<b>White M9-glycerol<sup>d</sup></b>						
1 mM leucine	1232	–	0			3.66
2nd colony as above	951	–	0			
3rd colony as above	1119	–	0			
<b>White M9-glycerol</b>						
1.5 mM leucine <sup>e</sup>	1090	–	0			0.81
2nd colony as above	630	–	0			
3rd colony as above	914	–	0			

<sup>a</sup>Medium refers to that used for inoculation and progeny colonies.

<sup>b</sup>The PhoA<sup>-</sup> to PhoA<sup>+</sup> switch frequency is designated  $\beta$ , and the PhoA<sup>+</sup> to PhoA<sup>-</sup> switch frequency is designated  $\alpha$ . The switch frequency is calculated by the formula  $(M/N)/g$ , where  $M$  is the number of cells that underwent phase variation,  $N$  is the total number of cells evaluated and  $g$  is the total number of generations.

<sup>c</sup>Mean average PhoA activity units of three colonies. The alkaline phosphatase activity was measured as described previously (Harel et al. 1992b).

<sup>d</sup>The colonies were white tinted with very pale blue.

<sup>e</sup>Similar results were obtained on M9-glycerol + 1.5 mM L-alanine.

showed that alanine exerted the same repressive effect on *foo* expression as leucine did.

## Discussion

Expression of fimbriae is controlled at the transcriptional level by two mechanisms which modulate, on one hand, the percentage of cells producing fimbriae in a single colony (phase variation) and, on the other hand, the amount of antigen at the surface of a single cell (basal transcription). The phase variation mechanism is defined as the ability to switch between ON and OFF states (Low et al. 1987; van der Woude et al. 1996). These two types of regulation are superimposed in wild-type cells so that transcription in ON cells may be more or less active, leading to more or less fimbrial synthesis. These regulations are mediated by several trans-regulators. Here we report that expression of F165<sub>1</sub>, a P-related fimbriae found on pathogenic *E. coli* strains isolated from animals, is modulated by leucine and alanine. This control is effective both on basal transcription and on the phase variation mechanism.

Immunofluorescence analysis as well as numeration of PhoA<sup>+</sup> and PhoA<sup>-</sup> colonies showed that about 97% of the cells expressed *foo* and thus synthesized F165<sub>1</sub> fimbriae. The frequency of transition from PhoA<sup>-</sup> to PhoA<sup>+</sup> was ten-fold lower than the PhoA<sup>+</sup> to PhoA<sup>-</sup> rate. Thus, the F165<sub>1</sub> phase ON cells were largely dominant in the bacterial population. This finding differs from observations made on Pap-17 phase variation, which was extensively studied (Low et al. 1996). It has been shown that a Pap-17 ON phase colony gave rise to only 1/3 ON-phase progeny, and a OFF-phase colony to 1/20 ON-phase progeny. In this case, an ON-phase colony contained mostly OFF-phase cells (Blyn et al. 1989).

The regulatory protein PapI is necessary for the switch from OFF to ON to occur. The F165<sub>1</sub> PapI homologue differs from the PapI-17 protein in one amino-acid residue. This change could be in part responsible for the differences observed in the percentage of ON-phase cells. It was observed that phase ON colonies expressing another P-related fimbriae, Pap-21 gave rise to 90% of phase ON progeny (Blyn et al. 1989; Low 1994). PapI-21 is 100% identical to the F165<sub>1</sub> PapI homologue. However, if the switch frequency  $\alpha$  (ON to OFF) is very similar for Pap-21 and F165<sub>1</sub> ( $3.7 \times 10^{-3}$  and  $1.26 \times 10^{-3}$ , respectively), the switch frequency  $\beta$  (OFF to ON) is 71-fold higher for Pap-21 than for F165<sub>1</sub>. Therefore, PapI homologues are not the sole factors involved. In the intergenic region between *papI* and *papB* homologues, which is the target of regulatory proteins, there is a 25 base pairs difference between *pap-17* and *pap-21*, and a 31 base pairs difference between *pap-21* and *foo* (Fig. 2). Although these differences do not map in the Lrp binding sites defined by Nou et al. (1995), they may have an influence on the frequency of switching and on the fraction of cells in the ON phase.

In the presence of leucine or alanine in the growth medium, phase variation did not occur. It is noteworthy that leucine has no effect on Pap-17 and Pap-21 phase variation, whereas alanine blocks phase variation of CS31A, another member of the P-regulatory system. Operons encoding F165<sub>1</sub> and CS31A are the only ones, described so far, belonging to this regulatory family, which are regulated by the presence of leucine or alanine in the growth medium (Martin 1996; Daigle et al. 1997). The molecular mechanism by which leucine influences F165<sub>1</sub> phase variation is not known. It has been shown that L-leucine modifies Lrp at some target promoters, agonising or antagonising the Lrp effect (Newman

and Lin 1995). Although the mechanism by which leucine acts is not known, it appears to interact with Lrp, since mutations mapping to the carboxyl end of Lrp which yield a leucine-non responsive phenotype have been isolated (Platko et al. 1993). Phase variation of type 1 fimbriae is modulated by leucine. However the regulatory mechanism is different from that of members of the P-regulatory family, as the phase variation switching of type 1 fimbriae involves inversion of a DNA fragment by two recombinases, FimB and FimE (Low et al. 1996). It has been shown recently that L-leucine potentiates the effect of Lrp on the switch, stimulating both FimB-promoted switching (bi-directional) as well as FimE-promoted switching (ON to OFF) (Gally et al. 1993; Roesch and Blomfield 1998).

In the presence of 1 mM leucine, F165<sub>1</sub> phase variation was not observed, but cells presented a uniform light blue phenotype. Determination of PhoA activities confirmed that the *foo* promoter was slightly active. At higher leucine concentrations (1.5 mM), basal transcription did not further occur. It has been shown that leucine and alanine negatively modulate the basal transcription of the CS31A encoding operon (Martin 1996). Also, the K99 expression is not submitted to phase variation control, but is repressed by leucine and alanine (Braaten et al. 1992; Inoue et al. 1993). Taken together, the results presented here suggest that leucine influences negatively F165<sub>1</sub> expression by repressing transcription at two levels: the basal transcription and the phase variation control. As phase variation involves a PapI homologue and Lrp, and the action of Lrp is known to be directly modulated by leucine in other operons, it is likely that the repressive action of leucine on F165<sub>1</sub> phase variation is mediated by Lrp. However, repression of the basal transcription may be independent of the former mechanism.

A survey of F165-positive strains indicates that the F165<sub>1</sub> fimbrial expression of most of them is negatively affected by L-leucine. Very little is known about the relative nutrient levels and environmental signals in the host and how these levels fluctuate with time and nutrient input. Gnotobiotic piglets infected with wild-type strain 5131 developed septicaemia and were moribund within 48 h, whereas a *fooA* mutant (M48) developed only mild signs after 4 days and no bacteria were isolated from the blood (Ngeleka et al. 1993). F165<sub>1</sub> fimbriae were required for survival in blood and systemic invasion of the host (Ngeleka et al. 1993, 1994). L-leucine could be an interesting nutrient additive to down regulate the expression of F165<sub>1</sub> fimbriae. It will be interesting to measure the effect of leucine in a swine infection model on the overall pathogenicity of F165 strains.

## Acknowledgements

We thank C.M. Dozois and Isabelle Batisson for critically reading the manuscript. We thank Clarisse Désautels for technical help in immunofluorescence studies. This work was supported in part by a grant to J.H. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (OGP0025120) and by a NATO grant to C.M. F.D. and M.-C.T. were funded by a scholarship from the Fonds des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec and NSERC, respectively.

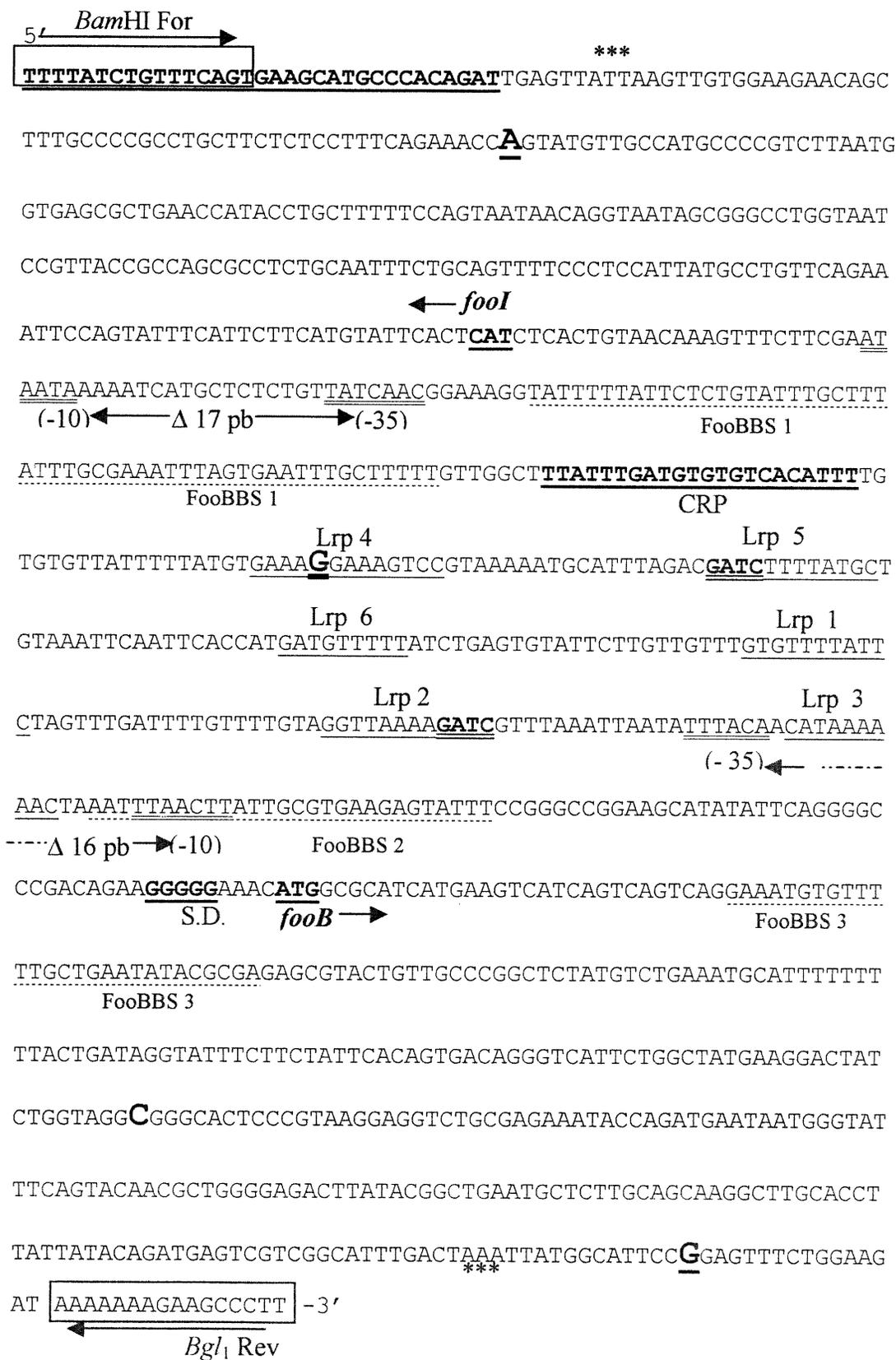
## References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- Blyn, L.B., Braaten, B.A., White-Ziegler, C.A., Rolfson, D.H., and Low, D.A. 1989. Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: Evidence for transcriptional regulation. *EMBO J.* **8**: 613–620.
- Braaten, B.A., Platko, J.V., van der Woude, M.W., Simons, B.H., de Graaf, F.K., Calvo, J.M., and Low, D.A. 1992. Leucine-responsive regulatory protein controls the expression of both the pap and fan pili operons in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 4250–4254.
- Cherifi, A., Contrepois, M., Picard, B., Goulet, P., de Rycke, J., Fairbrother, J.M., and Barnouin, J. 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicaemia. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**: 279–284.
- Contrepois, M., Fairbrother, J.M., Kaura, Y.K., and Girardeau, J.P. 1989. Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada, and India. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 319–324.
- Daigle, F., Dozois, C.M., Jacques, M., and Harel, J. 1997. Mutations in the *f165<sub>1</sub>A* and *f165<sub>1</sub>E* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicaemia in pigs. *Microb. Pathog.* **22**: 247–252.
- Daigle, F., Forget, C., Martin, C., Drolet, M., Tessier, M.-C., Dezfulian, H., and Harel, J. 2000. Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165<sub>1</sub> and F165<sub>2</sub> produced by *Escherichia coli* strain causing septicaemia in pigs. *Res. Microbiol.* **151**: 1–12.
- Dubreuil, J.D., and Fairbrother, J.M. 1992. Biochemical and serological characterization of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165<sub>2</sub>. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**: 219–224.
- Fairbrother, J.M., Larivière, S., and Lallier, R. 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from pigs with diarrhea. *Infect. Immun.* **51**: 10–15.
- Fairbrother, J.M., Lallier, R., Leblanc, L., Jacques, M., and Larivière, S. 1988. Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 247–252.
- Fairbrother, J.M., Broes, R., Jacques, M., and Larivière, S. 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* **50**: 1029–1036.
- Forsman, K., Goransson, M., and Uhlin, B.E. 1989. Autoregulation and multiple DNA interactions by a transcriptional regulatory protein in *E. coli* pili biogenesis. *EMBO J.* **8**: 1271–1277.
- Gally, D.L., Bogan, J.A., Eisenstein, B.I., and Blomfield, I.C. 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.* **17**: 6186–6193.
- Göransson, M., Forsman, P., Nilsson, P., and Uhlin, B.E. 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.
- Hacker, J. 1990. Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **150**: 1–27.
- Harel, J., and Martin, C. 1999. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* **30**: 131–155.
- Harel, J., Daigle, F., Maiti, S., Desautels, C., Labigne, A., and Fairbrother, J.M. 1991. Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**: 177–182.
- Harel, J., Forget, C., Saint-Amand, J., Daigle, F., Dubreuil, D., Jacques, M., and Fairbrother, J. 1992a. Molecular cloning of a

- determinant coding for fimbrial antigen F165<sub>1</sub>, a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1495–1502.
- Harel, J., Forget, C., Ngeleka, M., Jacques, M., and Fairbrother, J. 1992b. Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K:F165. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2337–2345.
- Harel, J., Fairbrother, J., Forget, C., Desautels, C., and Moore, J. 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet. Microbiol.* **38**: 139–155.
- Harel, J., Jacques, M., Fairbrother, J.M., Bossé, M., and Forget, C. 1995. Cloning of determinants encoding F165<sub>2</sub> fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiology*, **141**: 221–228.
- Inoue, O.J., Lee, J.H., and Isaacson, R.E. 1993. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* pilus K99. *Mol. Microbiol.* **10**: 607–613.
- Low, D.A. 1994. Methylation-dependent and Lrp-dependent fimbrial gene regulation in *Escherichia coli*. In *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*. Edited by V.L. Miller, J.B. Kaper, D.A. Portnoy, and R.R. Isberg. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 423–436.
- Low, D., Robinson, E.N.J., McGee, Z.A., and Falkow, S. 1987. The frequency of expression of pyelonephritis-associated pili is under regulatory control. *Mol. Microbiol.* **1**: 335–346.
- Low, D., Braaten, B., and van der Woude, M. 1996. Fimbriae. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Edited by F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingrham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbrager. ASM Press, Washington D.C. pp. 146–157.
- Maiti, S.N., Harel, J., and Fairbrother, J.M. 1993. Structure and copy number analyses of *pap*, *sfa*-, and *afa*- related gene clusters in F165-positive bovine and porcine *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.* **61**: 2453–2461.
- Maiti, S.N., DesGroseillers, L., Fairbrother, J.M., and Harel, J. 1994. Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165<sub>1</sub> of porcine septicaemic *Escherichia coli* strain 4787. *Microb. Pathogen.* **16**: 15–25.
- 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.
- Miller, J.H. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Newman, E.B., and Lin, R.T. 1995. The leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 747–775.
- Ngeleka, M., Jacques, M., Martineau Doizé, B., Daigle, F., Harel, J., and Fairbrother, J.M. 1993. Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165<sub>1</sub> fimbriae in septicaemia of gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* **61**: 836–843.
- Ngeleka, M., Martineau Doizé, B., and Fairbrother, J.M. 1994. Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165<sub>1</sub> resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes *in vitro*: Role of F165<sub>1</sub> fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. *Infect. Immun.* **62**: 398–404.
- Nou, X., Braaten, B., Kaltenbach, L., and Low, D.A. 1995. Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by PapI regulates *Pap* phase variation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**: 5785–5797.
- Ørskov, I., and Ørskov, F. 1985. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. *J. Hyg.* **95**: 551–575.
- Platko, J.V., and Calvo, J.M. 1993. Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *J. Bacteriol.* **175**: 1110–1117.
- Roesch, P.L., and Blomfield, I.C. 1998. Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the *fim* switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **27**: 751–761.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463–5467.
- Smyth, C.J., Marron, M., and Smith, S.G.J. 1994. Fimbriae of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* in domestic animals and human. Edited by C.L. Gyles. CAB International, Wallingford, U.K. pp. 399–435.
- van der Woude, M.W., Braaten, B.A., and Low, D.A. 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.
- van der Woude, M., Braaten, B., and Low, D. 1996. Epigenetic phase variation of the *pap* operon in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **4**: 5–9.
- White-Ziegler, C.A., Angus Hill, M.L., Braaten, B.A., van der Woude, M.W., and Low, D.A. 1998. Thermoregulation of *Escherichia coli pap* transcription is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol. Microbiol.* **28**: 1121–1137.
- Xia, Y., Forsman, K., Jass, J., and Uhlin, B.E. 1998. Oligomeric interaction of the PapB transcriptional regulator with the upstream activating region of pili adhesin gene. *Mol. Microbiol.* **30**: 513–523.

### **ANNEXE III**

**Séquence corrigée de la région régulatrice *fooIB* de *E. coli* 4787.**

Séquence corrigée de la région régulatrice *fooIB* de *E. coli* 4787(éditée de pIB<sub>1</sub>CR2 séquencé par M13R/T7)

**Séquence de la page précédente:**

L'orientation divergente des gènes *fooI* et *fooB* est démontrée par des flèches près des codons initiateurs ATG, lesquels sont soulignés en gras. Les sites de liaison potentiels pour les régulateurs y sont indiqués : les sites Lrp 1-6 sont soulignés; les sites GATC sont soulignés en double dans les régions Lrp 2 et 5; les sites FooBBS 1-3 sont soulignés en pointillé; le site CRP est souligné. Les régions -35 et -10 des promoteurs sont soulignées en double de même que leur intervalle est indiqué par le symbole  $\Delta$ . Les codons *STOP* sont indiqués par le symbole \*\*\*. Les nucléotides soulignés et en caractère gras correspondent aux corrections à apporter à la séquence publiée dans GenBank: L07420. Les sites de liaison des amorces *Bam*HI For (en 5') et *Bgl*<sub>1</sub> Rev (en 3') qui ont servi à cloner le fragment *fooIB* de 1048 pb sont encadrés.

## **ANNEXE IV**

**Souches bactériennes et plasmides mentionnés dans les Annexes V et VI.**

**Tableau.** Souches bactériennes et plasmides mentionnés dans les Annexes V et VI.

Souche ou plasmide	Description	Référence et source
<b>souches <i>E. coli</i></b>		
<b><i>topA</i><sup>+</sup> <i>gyrB</i><sup>+</sup></b>		
MT025	pEM001/ MT008	cette étude
MT026	pEM003/ MT008	cette étude
MT027	pSK760/ MT008	cette étude
MT028	pSK762c/ MT008	cette étude
MT082	PH613 λMT04 lysogène (pMT021) [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> <i>fooI</i> en <i>trans</i> ]	cette étude
MT085	PH613 λMT05 lysogène (pMT021) [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> , <i>fooI</i> en <i>trans</i> ]	cette étude
MT091	PH613 λMT04 lysogène (pMT020) [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	cette étude
MT094	PH613 λMT05 lysogène (pMT020) [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	cette étude
<b><i>topA</i><sup>+</sup> <i>gyrB225</i></b>		
MT029	pEM001/ MT009	cette étude
MT030	pEM003/ MT009	cette étude
MT031	pSK760/ MT009	cette étude
MT032	pSK762c/ MT009	cette étude
MT083	PH615 λMT04 lysogène (pMT021) [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> , <i>fooI</i> en <i>trans</i> ]	cette étude
MT086	PH615 λMT05 lysogène (pMT021) [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> , <i>fooI</i> en <i>trans</i> ]	cette étude
MT092	PH615 λMT04 lysogène (pMT020) [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	cette étude
MT095	PH615 λMT05 lysogène (pMT020) [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	cette étude
<b>Δ<i>topA gyrB225</i></b>		
MT033	pEM001/ MT010	cette étude
MT034	pEM003/ MT010	cette étude
MT035	pSK760/ MT010	cette étude
MT036	pSK762c/ MT010	cette étude
MT084	PH617 λMT04 lysogène (pMT021) [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> , <i>fooI</i> en <i>trans</i> ]	cette étude
MT087	PH617 λMT05 lysogène (pMT021) [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> , <i>fooI</i> en <i>trans</i> ]	cette étude
MT093	PH617 λMT04 lysogène (pMT020) [ <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	cette étude
MT096	PH617 λMT05 lysogène (pMT020) [ <i>trcp-fooBpB-lacZ</i> ]	cette étude
<b>plasmides</b>		
pEM001	<i>rha</i> <sup>+</sup> pBR322-dérivé	Massé <i>et coll.</i> (1997)
pEM003	<i>rha</i> <sup>-</sup> pBR322-dérivé	Massé <i>et coll.</i> (1997)
pSK760	<i>rha</i> <sup>+</sup> pACYC184-dérivé	Drolet <i>et coll.</i> (1995)
pSK762c	<i>rha</i> <sup>-</sup> pACYC184-dérivé	Drolet <i>et coll.</i> (1995)

Pour une description des souches MT008, MT009, MT010, PH613, PH615 et PH617, des plasmides pMT020 et pMT021, ainsi que des fusions λMT04 et λMT05, voir les sections « *Tables and Figures* » des Articles 1 et 2.

## **ANNEXE V**

**Effet de l'expression de la RNase H sur l'activité du promoteur *fooBp*  
de la fusion *fooIB-lacZ* chez les souches topoisomérase isogéniques.**

**Tableau.** Effet de l'expression de la RNase H sur l'activité du promoteur *fooBp* de la fusion *fooB-lacZ* chez les souches topoisomérase isogéniques.

Souche <i>E. coli</i>	Plasmide présent	Gène d'intérêt	Activité de la $\beta$ -galactosidase (Unités Miller) <sup>a, b</sup>	% d'activité de la $\beta$ -galactosidase ( <i>rha</i> <sup>+</sup> vs <i>rha</i> <sup>-</sup> )
<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>				
MT008	---	---	1516 ± 268	---
MT025	pEM001	<i>rha</i> <sup>+</sup>	600 ± 17	} 155
MT026	pEM003	<i>rha</i> <sup>-</sup>	386 ± 15	
MT027	pSK760	<i>rha</i> <sup>+</sup>	1103 ± 238	} 78
MT028	pSK762c	<i>rha</i> <sup>-</sup>	1413 ± 28	
<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>				
MT009	---	---	939 ± 262	---
MT029	pEM001	<i>rha</i> <sup>+</sup>	409 ± 14	} 144
MT030	pEM003	<i>rha</i> <sup>-</sup>	284 ± 109	
MT031	pSK760	<i>rha</i> <sup>+</sup>	751 ± 188	} 86
MT032	pSK762c	<i>rha</i> <sup>-</sup>	873 ± 260	
$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>				
MT010	---	---	425 ± 187	---
MT033	pEM001	<i>rha</i> <sup>+</sup>	148 ± 13	} 117
MT034	pEM003	<i>rha</i> <sup>-</sup>	126 ± 18	
MT035	pSK760	<i>rha</i> <sup>+</sup>	234 ± 10	} 76
MT036	pSK762c	<i>rha</i> <sup>-</sup>	309 ± 45	

<sup>a</sup> Pour connaître la procédure concernant la croissance des souches et la mesure de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, voir les sections « *Material and Methods* » des articles 1 et 2. Les accolades montrent les souches qui ont été comparées entre elles au niveau de l'activité RNase H.

<sup>b</sup> La moyenne et l'écart-type ont été calculés à partir des données obtenues pour au moins trois cultures indépendantes.

## **ANNEXE VI**

**Effets de la transcription divergente de *tetA*, en présence de FooI, sur l'activité du promoteur *fooBp* chez les souches topoisomérase isogéniques.**

**Tableau.** Effets de la transcription divergente de *tetA*, en présence de *FooI*, sur l'activité du promoteur *fooBp* chez les souches topoisomérase isogéniques.

Souche <i>E. coli</i> <sup>a</sup>	Génotype d'intérêt	Plasmides Présents <sup>a</sup>	Ajout d'IPTG (1 mM)	Activité de la $\beta$ -galactosidase (Unités Miller) <sup>a, b</sup>
<b>fusion <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i></b>				
<i>tetA</i> <sup>+</sup> , <i>trcp</i> <sup>+</sup> , <i>FooI</i> en trans				
MT082	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	932 ± 285
			+	919 ± 134
MT083	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	612 ± 257
			+	1035 ± 64
MT084	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	829 ± 330
			+	602 ± 121
<b>Contrôles négatifs</b>				
<b>fusion <i>tetA-trcp-fooBpB-lacZ</i></b>				
<i>tetA</i> <sup>+</sup> , <i>trcp</i> <sup>+</sup> , <i>FooI</i> <sup>-</sup>				
MT091	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	999 ± 305
			+	1081 ± 91
MT092	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	952 ± 362
			+	1442 ± 545
MT093	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	974 ± 202
			+	697 ± 121
<b>fusion <i>trcp-fooBpB-lacZ</i></b>				
<i>tetA</i> <sup>-</sup> , <i>trcp</i> <sup>+</sup> , <i>FooI</i> en trans				
MT085	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	1004 ± 189
			+	610 ± 73
MT086	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	909 ± 270
			+	652 ± 174
MT087	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	689 ± 111
			+	401 ± 36
<b>fusion <i>trcp-fooBpB-lacZ</i></b>				
<i>tetA</i> <sup>-</sup> , <i>trcp</i> <sup>+</sup> , <i>FooI</i> <sup>-</sup>				
MT094	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	721 ± 238
			+	831 ± 211
MT095	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	925 ± 295
			+	833 ± 292
MT096	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	731 ± 159
			+	598 ± 98
<b>fusion <i>fooIp-fooBpB-lacZ</i></b>				
<i>tetA</i> <sup>-</sup> , <i>trcp</i> <sup>+</sup> , <i>FooI</i> en trans				
MT079	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	938 ± 56
			+	551 ± 88
MT080	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	369 ± 140
			+	562 ± 180
MT081	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT021 ( <i>FooI</i> <sup>+</sup> )	-	134 ± 39
			+	136 ± 23
<b>fusion <i>fooIp-fooBpB-lacZ</i> <sup>a</sup></b>				
<i>tetA</i> <sup>-</sup> , <i>trcp</i> <sup>-</sup> , <i>FooI</i> <sup>-</sup> <sup>a</sup>				
MT088	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	256 ± 56
			+	304 ± 81
MT089	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	396 ± 110
			+	249 ± 77
MT090	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	242 ± 83
			+	222 ± 79
<b>Contrôles Positifs</b>				
<b>fusion <i>fooIB-lacZ</i></b>				
<i>tetA</i> <sup>-</sup> , <i>trcp</i> <sup>-</sup> , <i>FooI</i> en cis				
MT076	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	882 ± 148
			+	594 ± 118
MT077	<i>topA</i> <sup>+</sup> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	422 ± 96
			+	492 ± 129
MT078	$\Delta$ <i>topA</i> <i>gyrB225</i>	pMT020 (vecteur contrôle)	-	105 ± 24
			+	81 ± 26

**Tableau page précédente:**

- <sup>a</sup> Pour une description des fusions, des plasmides et de la procédure pour la croissance des souches et pour la mesure de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, voir les sections « *Material and Methods* » des articles 1 et 2.
- <sup>b</sup> La moyenne et l'écart-type ont été calculés à partir des données d'au moins trois cultures indépendantes.