

Université de Montréal

MISE AU POINT DE TECHNIQUES MOLÉCULAIRES POUR L'ÉTUDE DE
L'INTERACTION DE L_{trp} AVEC LA RÉGION RÉGULATRICE DE L'OPÉRON
FIMBRIARE *foo* (F165₁).

Par

MARIE-CLAUDE CHAMPAGNE

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

Juin, 2006

©Marie-Claude Champagne, 2006



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

MISE AU POINT DE TECHNIQUES MOLÉCULAIRES POUR L'ÉTUDE DE
L'INTERACTION DE L_{rp} AVEC LA RÉGION RÉGULATRICE DE L'OPÉRON
FIMBRIARE *foo* (F165₁).

présenté par

MARIE-CLAUDE CHAMPAGNE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

J. Daniel Dubreuil, président-rapporteur

Josée Harel, directrice de recherche

Christine Martin, codirectrice et membre externe

Michaël Mourez, membre du jury

Résumé

La synthèse d'adhésines fimbriaires, telle que F165₁ retrouvées chez les souches de *Escherichia coli* O115:KV165 5131 et 4787 responsables de septicémies chez le porcelet et le veau, est soumise à une régulation complexe en réponse à différents facteurs environnementaux. Cette régulation contrôle d'une part, le niveau de base de la transcription et d'autre part, la quantité de bactéries synthétisant l'adhésine au sein d'une même population. Notre laboratoire a démontré dans le passé que la leucine et l'alanine inhibent fortement la production de F165₁ en réprimant la transcription de base de l'opéron *foo* codant pour cette adhésine. Par contre, les mécanismes moléculaires par lesquels ces acides aminés agissent sont encore mal connus. Nous savons que le régulateur global Lrp joue un rôle dans la variation de phase et dans les mécanismes de régulation impliqués au niveau de la transcription de base. Cependant, le rôle biologique de la variation de phase de F165₁ est peu connu. Dans des conditions environnementales où la plupart des systèmes d'adhésion sont en phase OFF, les souches F165₁ sont majoritairement en phase ON. Or, lorsqu'on compare le système F165₁ avec son homologue Pap-17, on note des différences de séquence des régulateurs spécifiques ainsi qu'au niveau de la région régulatrice intercistronique.

L'objectif majeur de notre laboratoire consiste à comprendre les mécanismes moléculaires de l'action de Lrp et de FooI ainsi que l'effet qu'ils peuvent exercer sur l'expression de l'opéron *foo*. Par des techniques d'empreinte de protection à la DNaseI, les sites de liaison de Lrp sur l'ADN de la région régulatrice de *foo*, seront déterminés et caractérisés. De plus, l'affinité de Lrp pour ceux-ci sera déterminée dans différentes conditions. Pour déterminer et caractériser les sites de liaison de Lrp sur l'ADN de la région régulatrice de *foo*, différents outils ont été mis au point. Les différents régulateurs tels que Lrp et FooI ont été produits sous forme de protéines de fusion et purifiés pour simuler *in vitro* les conditions de régulation. De surcroît, les régions régulatrices ont été produites, purifiées, marquées au ³²P et testées grâce à la méthode d'empreinte génomique.

Ces travaux nous permettront dans un futur rapproché de caractériser les interactions moléculaires entre les différents régulateurs, et entre l'ADN et ces régulateurs, complexés ou non entre eux, interactions qui influencent la régulation de l'expression de l'opéron *foo*. En conclusion, nous avons produit des protéines régulatrices (Lrp et FooI) exerçant un effet sur l'expression de l'opéron *foo* et nous avons tenté de mettre au point la méthode d'empreinte génomique pour déterminer et caractériser les sites de liaison de Lrp sur l'ADN de la région régulatrice de *foo*.

Mots clés :

Escherichia coli/ septicémie/ fimbriae/ régulation/ Leucine-responsive regulatory protein (Lrp)/ FooI/ protéine de fusion/ variation de phase/ transcription basale/ empreinte génomique à la DNaseI.

Abstract

The synthesis of fimbrial adhesins, such as F165₁ found in strains of *Escherichia coli* O115:KV165 5131 and 4787 which are responsible of septicemia in piglets and calves, undergoes a complex regulation in response of many environmental factors. This regulation controls the level of steady-state transcription and the quantity of bacteria who synthesized the fimbriae, resulting in phase variation in the population. In the past, our laboratory has demonstrated that leucine and alanine highly inhibit the production of F165₁ by repressing basal transcription of the *foo* operon coding for this adhesin. However, the molecular mechanisms by which those aliphatic amino acids act are not well understood. We know that the global regulator Lrp plays a role in phase variation and in regulation mechanisms, and this involves the steady-state transcription. However, the biological role of phase variation of F165₁ is poorly known. In environmental conditions where most of adhesion systems are in OFF phase, F165₁ strains are mostly in ON phase. But, when we compare F165₁ system with its homologous, Pap-17, we observed a small number of differences in specific regulator sequences and also in the regulatory region sequence.

The main goal of our laboratory is to understand the molecular mechanisms leading the action of Lrp and FooI and their effects on the expression of the *foo* operon. By DNaseI footprint technique, Lrp binding sites on the regulatory region of *foo*, will be determined and characterized. Moreover, the affinity of Lrp for these sites will be determined in different conditions. For the determination and the characterization of the binding sites of Lrp on the regulatory region of *foo*, many tools have been produced. The different regulators such as Lrp and FooI were produced as fusion protein and purified to simulate *in vitro* the regulation conditions. Furthermore, the regulatory regions were labeled with ³²P, purified and tested with the DNaseI footprint technique. The sequences protected by Lrp were analyzed using DNaseI footprint technique in presence or absence of alanine.

This work will allow us, in a near future, to characterize molecular interactions between the different regulators and the DNA. It will also allow us to understand the interaction between the DNA and those regulators, together or not, and how those

interactions influence the regulation of the expression of the *foo* operon. In conclusion, we have produced regulatory proteins, such as Lrp and FooI and we have attempt to set up a DNaseI footprint technique for the determination and the characterization of the binding sites of Lrp on *foo* operon regulatory region.

Keywords:

Escherichia coli/ septicemia/ fimbriae/ regulation/ Leucine-responsive regulatory protein (Lrp)/ FooI/ fusion protein/ phase variation/ steady-state transcription/ DNaseI footprint.

Table des matières

<u>RÉSUMÉ</u>	<u>III</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>V</u>
<u>TABLE DES MATIÈRES</u>	<u>VII</u>
<u>LISTE DES TABLEAUX.....</u>	<u>X</u>
<u>LISTE DES FIGURES.....</u>	<u>XI</u>
<u>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</u>	<u>XII</u>
<u>UNITÉS DE MESURE.....</u>	<u>XV</u>
<u>SYMBOLES</u>	<u>XV</u>
<u>REMERCIEMENTS.....</u>	<u>XVI</u>
<u>SECTION I- INTRODUCTION.....</u>	<u>1</u>
PROBLÉMATIQUE	2
<u>SECTION II- RECENSION DE LITTÉRATURE.....</u>	<u>4</u>
RECENSION DE LITTÉRATURE.....	5
<i>Première partie : Généralités concernant Escherichia coli.....</i>	<i>5</i>
1.1 La pathogénie d' <i>Escherichia coli</i>	5
1.2 Le facteur de virulence - fimbriae	6
<i>Deuxième partie : Le complexe F165.....</i>	<i>8</i>
2.1 Les souches d' <i>Escherichia coli</i> F165-positives	8
2.2 Description du complexe fimbriaire F165.....	9
2.2.1 Rôles des fimbriae F165 ₁ et F165 ₂ chez <i>E. coli</i> O115:KV165.....	9
2.2.2 Propriétés d'adhésion de F165 ₁ et F165 ₂	10
2.2.3 Description génétique des fimbriae F165 ₁ et F165 ₂	11
2.3 Organisation génétique des opérons <i>foo</i> et <i>pap</i>	13
2.3.1 Les régions régulatrices des opérons <i>foo</i> et <i>pap</i>	13
2.3.2 L'organisation de la région codante de l'opéron <i>foo</i> et de l'opéron <i>pap</i>	15
2.3.3 Les rôles et caractéristiques des produits codés par les gènes de l'opéron <i>foo</i> et de l'opéron <i>pap</i>	16
2.4 Régulation de l'expression de l'opéron <i>foo</i> et de l'opéron <i>pap</i>	20
2.4.1 Description des mécanismes de régulation	20
2.4.2 Le mécanisme de variation de phase de <i>foo</i> et de <i>pap</i>	22
2.4.3 La transcription basale des opérons <i>foo</i> et <i>pap</i>	29

2.4.4	L'implication de CRP, PapB, H-NS et du système Cpx dans le contrôle de la variation de phase et de la transcription basale de <i>pap</i>	29
2.4.5	Autres opérons régulés de façon similaire à <i>pap</i>	36
2.5	Modulation de l'expression du fimbriae F165 ₁ par différentes conditions environnementales.....	37
<i>Troisième partie : La protéine Lrp</i>		42
3.1	Généralités concernant Lrp	42
3.2	Rôle structural de Lrp dans la régulation	43
3.3	Sites de liaison de Lrp.....	43
3.4	Régulation de la biosynthèse de Lrp.....	44
3.5	La structure de la protéine Lrp.....	47
3.5.1	Les domaines fonctionnels de la protéine Lrp	47
3.5.2	La région <i>pap</i> spécifique de Lrp	51
3.6	Le classement des différents systèmes régulés par Lrp.....	51
3.7	Le mécanisme d'action des acides aminés leucine et alanine	52
<i>Quatrième partie : L'empreinte génomique</i>		56
4.1	Généralités concernant l'empreinte génomique	56
4.2	Description et caractéristiques du matériel.....	56
4.2.1	Les agents de coupures	56
4.2.2	La sélection de l'agent de coupure.....	62
4.2.3	L'empreinte génomique <i>in vivo</i>	63
4.3	Généralités sur le retard sur gel.....	65
4.3.1	Les avantages de la méthode de retard sur gel	66
4.3.2	Les mécanismes du retard sur gel	66
4.3.3	La mesure des constantes de dissociation des complexes ADN-protéine par le retard sur gel	67
4.3.4	La mobilité des complexes ADN-protéine.....	68
4.3.5	Les principes pratiques.....	69
4.4	L'étude par empreinte génomique de la liaison de Lrp avec la région de régulation de l'opéron fimbriaire <i>pap</i>	72
<u>SECTION III- MÉTHODOLOGIE</u>		75
1.	Condition de croissance des souches bactériennes	76
2.	Production et purification des protéines de fusion	76
2.1	La protéine de fusion Lrp-His ₆	76
2.2	La protéine de fusion Lrp ^{L136R} -His ₆	78
2.3	La protéine de fusion FooI-CBP	79
3.	Vérification de l'intégrité des protéines de fusion par SDS-PAGE et Western blot	81
3.1	Préparation du gel de polyacrylamide et migration du gel SDS-PAGE.....	81
3.2	Réaction de Western blot.....	81
4.	Construction de protéines de fusion alternatives FooI-His ₆	82
4.1	Constructions de protéine de fusion FooI-His ₆ dans pET-32a	82
4.2	Constructions de protéine de fusion FooI-His ₆ dans pIVEX 2.3	83
5.	Production et purification de l'ADN matrice des régions régulatrices.....	85
5.1	La région régulatrice de l'opéron <i>foo</i>	85

5.2	La région régulatrice de l'opéron <i>pap</i>	85
5.3	La région régulatrice de l'opéron <i>clp</i>	86
6.	Sélection des amorces oligonucléotidiques	86
6.1	Les amorces pour la région régulatrice de l'opéron <i>foo</i>	86
6.2	Les amorces pour la région régulatrice de l'opéron <i>pap</i>	87
6.3	Les amorces pour la région régulatrice de l'opéron <i>clp</i>	87
7.	Empreinte génomique.....	87
7.1	Marquage des amorces oligonucléotidiques au ³² P.....	87
7.2	Production et purification des régions régulatrices marquées au ³² P	88
7.3	Mise au point de la digestion à 50 % par l'enzyme DNaseI	89
7.4	Digestion par l'enzyme DNaseI et purification de la région d'intérêt	89
7.5	Séquençage de la région d'intérêt par la méthode de Maxam-Gilbert.....	90
7.6	Protection de la région d'intérêt par la protéine Lrp	92
8.	Analyse des échantillons sur gel dénaturant Urée/Acryl : Bis-Acrylamide	93
8.1	Préparation du gel 8% Urée/Acryl : Bis-Acrylamide	93
8.2	Traitement, dépôt des échantillons et migration du gel de séquençage	93
8.3	Traitement du gel de séquençage.....	94

SECTION IV- RÉSULTATS..... 95

1.	Production et purification des protéines de fusion	96
1.1	La protéine de fusion Lrp-His ₆	96
1.2	La protéine de fusion Lrp ^{L136R} -His ₆	97
1.3	La protéine de fusion FooI-CBP	99
2.	Construction de protéines de fusion alternatives FooI-His ₆	101
2.1	Constructions de protéine de fusion FooI-His ₆ dans pET-32a.....	101
2.2	Constructions de protéine de fusion FooI-His ₆ dans pIVEX 2.3	101
3.	Production et purification de l'ADN matrice des régions régulatrices.....	102
3.1	La région régulatrice de l'opéron <i>foo</i>	102
3.2	La région régulatrice de l'opéron <i>pap</i>	102
3.3	La région régulatrice de l'opéron <i>clp</i>	102
4.	Sélection des amorces oligonucléotidiques	103
5.	Mise au point de la digestion à 50 % par l'enzyme DNaseI	103
6.	Analyse des régions d'intérêts sur gel dénaturant Urée/Acryl :Bis-Acrylmide.....	105
7.	Séquençage de la région d'intérêt par la méthode de Maxam-Gilbert	109

SECTION V- DISCUSSION 111

Discussion	112
------------------	-----

SECTION VI- CONCLUSION..... 115

Conclusion.....	116
-----------------	-----

SECTION VII- BIBLIOGRAPHIE 117

Bibliographie.....	118
--------------------	-----

Liste des tableaux

Tableau I : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude.....	77
Tableau II : Abrégé du protocole de Maxam-Gilbert.....	91

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule d' <i>Escherichia coli</i> interagissant avec les tissus de l'hôte	6
Figure 2 : Organisation de la région régulatrice de l'opéron <i>pap</i>	14
Figure 3 : Organisation génétique de la région codante de l'opéron <i>pap</i>	15
Figure 4 : Régulation post-transcriptionnelle de l'opéron <i>pap</i>	16
Figure 5 : Modèle de l'assemblage du fimbriae Pap	19
Figure 6 : Régulation transcriptionnelle de l'opéron <i>foo</i>	21
Figure 7 : Comparaison des régions intercistroniques de <i>foo4787</i> et <i>pap17</i>	22
Figure 8 : Représentation schématique de la variation de phase de l'opéron <i>pap</i>	24
Figure 9 : Modèle de la variation de phase de <i>pap</i> selon la méthylation différentielle	28
Figure 10 : Interaction entre l'ARN polymérase (α CTD) et CRP (AR1)	32
Figure 11 : Carte fonctionnelle de Lrp	48
Figure 12 : Modèle des divers effets de la leucine sur la fonction de Lrp	54
Figure 13 : Représentation schématique d'une empreinte génomique accompagnée d'une réaction de Maxam-Gilbert	60
Figure 14 : Courbe de titration de l'empreinte génomique	68
Figure 15 : Vecteur pET-32a	83
Figure 16 : Vecteur pIVEX 2.3	84
Figure 17 : Profil théorique de la réaction de Maxam-Gilbert sur la région régulatrice de l'opéron <i>foo</i>	92
Figure 18 : Séquence de la région intergénique de l'opéron <i>foo</i>	92
Figure 19 : Gel SDS-PAGE de la protéine de fusion Lrp-His ₆	96
Figure 20 : Western blot anti-His ₆ dirigé sur la protéine de fusion Lrp-His ₆	97
Figure 21 : Gel SDS-PAGE de la protéine de fusion Lrp ^{L136R} -His ₆	98
Figure 22 : Western blot Anti-His ₆ dirigé sur la protéine de fusion Lrp ^{L136R} -His ₆	98
Figure 23 : Gel SDS-PAGE de la protéine de fusion Fool-CBP	99
Figure 24 : Western blot Anti-Fool dirigé sur la protéine de fusion Fool-CBP	100
Figure 25 : Région régulatrice de l'opéron <i>foo</i> et de l'opéron <i>pap</i>	104
Figure 26 : Région régulatrice de l'opéron <i>clp</i>	104
Figure 27 : Réaction de Maxam-Gilbert et empreinte génomique à la DNaseI sur l'opéron <i>foo</i>	107
Figure 28 : Empreinte génomique à la DNaseI sur l'opéron <i>foo</i> en présence de 10 mM d'alanine	108
Figure 29 : Réaction de Maxam-Gilbert sur l'opéron <i>foo</i>	110

Liste des sigles et abréviations

A	Adénine (pour ADN) ou L-Alanine (pour protéine)
ADN (<i>DNA</i>)	Acide désoxyribonucléique (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
α CTD	Domaine C-terminal de la sous-unité alpha de l'ARN polymérase
Afa	<i>Afimbrial adhesin</i>
Ala	L-Alanine
Amp	Ampicilline
Amp ^R	Résistance à l'ampicilline
AMPC	AMP cyclique ou adénosine monophosphate cyclique
Antigène O	Antigène oligosaccharidique
Antigène K	Antigène capsulaire
AR1	<i>Activation region 1</i> (Région d'activation de CRP ou CAP)
ARN (<i>RNA</i>)	Acide ribonucléique (<i>Ribonucleic acid</i>)
ARNase	Acide ribonucléase (<i>RNase</i>)
ARNm	ARN messager (<i>mRNA</i>)
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
β -gal.	β -galactosidase
C	Cytosine
CAP ou CRP	<i>Catabolite Activator Protein</i> ou <i>cAMP Receptor Protein</i> (Protéine de répression catabolique)
Cm	Chloramphénicol
Cm ^R	Résistance au chloramphénicol
C-terminal	Carboxy-terminal
Dam	<i>Deoxyadenosine Methylase, DNA Adenine Methylase</i> ou <i>Deoxyadenosine Methyltransferase</i> (Déoxyadénosine méthyltransférase)
DNase I	Désoxyribonucléase I
E	Acide glutamique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic E. coli</i> (<i>E. coli</i> entérotoxigène)
ExPEC	<i>Extra-intestinal Pathogenic E. coli</i> (<i>E. coli</i> pathogénique extra-intestinale)
<i>foo</i>	F165 ₁ : <i>fimbriae one hundred and sixty-five one</i>
<i>fot</i>	F165 ₂ : <i>fimbriae one hundred and sixty-five two</i>
G	Guanine (pour ADN) ou Glycine (pour protéine)
g	Nombre de générations

Gal α (1 \rightarrow 4)gal	α -D-galactosyl-(1,4)- β -galactopyranose (Gal-Gal ou Gal α (1,4)Gal)
GalNAc-GalNAc	Galactose-N-acetyl- α -(1,3)-galactose-N-acetyl
GATC-I	GATC ¹⁰²⁸ ou GATC ^{dist} (GATC distal)
GATC-II	GATC ¹¹³⁰ ou GATC ^{prox} (GATC proximal)
Glu	Acide glutamique
H-NS	<i>Histone-Like Nucleoid Structuring protein</i> (Protéine de type histone pour la structure du nucléoïde)
His ₆	<i>His-tag</i> (Étiquette de poly-histidine)
HTH	<i>Helix-Turn-Helix</i> (Hélice-Tour-Hélice)
IHB	<i>ilvIH Binding Protein</i> (Protéine de liaison de l'opéron <i>ilvIH</i>)
IHF	<i>Integration Host Factor</i> (Facteur d'intégration à l'hôte)
Ile	L-Isoleucine
Kd	Constante de dissociation
Km	Kanamycine
Km ^R	Résistance à la kanamycine
L	L-Leucine
Lac	Phénotype lactose
LB media	<i>Luria-Bertani media</i> (Milieu Luria-Bertani)
Leu	L-leucine
LPS	Lipopolysaccharide
Lrp	<i>Leucine-Responsive Regulatory Protein</i> ou <i>Leucine Responsive Protein</i> (Protéine de réponse à la leucine)
Lrp ₈	Forme octamérique de Lrp
Lrp ₁₆	Forme hexa-décamérique de Lrp
Lrp ₈ -Leu	Forme octamérique de Lrp liant la leucine
LT	Toxine thermolabile
M	Nombre de cellules ayant effectuées une variation de phase
Met	Méthionine
MR	<i>Mannose Resistance</i> (Résistance au mannose)
MRHA	<i>Mannose Resistance Haemagglutination</i> (Hémagglutination résistante au mannose)
MS	<i>Mannose Sensitive</i> (Sensible au mannose)
N	Nombre total de cellules évaluées
n	Nucléotide
N-terminal	Amino-terminal
N.D.	Colonies non-dénombrées
OD ou DO	<i>Optical density</i> (Densité optique)
OFF	Phase OFF: phase de non-expression du fimbriae
OFF \rightarrow ON	Transition de OFF vers ON
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i> (Protéine de la membrane externe)
ON	Phase ON : phase d'expression du fimbriae

ON→OFF	Transition de ON vers OFF
ON↔OFF	Transition de ON vers OFF et de OFF vers ON
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Cadre de lecture ouvert)
P	Proline
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide)
Pap ou P ou <i>pap</i>	<i>Pyelonephritis Associated Pili</i> (Fimbriae associé à la pyélonéphrite)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampon saline phosphate)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en chaîne due à la polymérase)
PhoA ou <i>phoA</i>	Phosphatase alcaline
pI	point isoélectrique
PMA	<i>Phorbol Myriastate Acetate</i> (Acétate myriastate phorbol)
PMLs	<i>Porcine Polymorphonuclear Leukocytes</i> (Leucocytes polymorphonucléaires porcins)
ppGpp	Guanidine 3',5' bispyrophosphate
Prs ou <i>prs</i>	<i>pap-related sequence</i> (Séquence apparentée à <i>pap</i>)
R	Arginine
RAM	<i>Regulation of amino acid metabolism domain</i> (Domaine de régulation du métabolisme des acides amines)
Rbl	<i>Regulation by leucine</i> (Régulation par la leucine)
RNase E	Ribonucléase E
RNase H	Ribonucléase H
rpm	Révolution par minute
S	L-sérine
SDS	<i>Sodium-dodecyl-sulfate</i>
ST	Toxine thermostable
T	Thymine
Tc	Tétracycline
Tc ^R	<i>Tetracycline resistance</i> (Résistance à la tétracycline)
Thr	Thréonine
Tn	Transposon
Tn10	Transposon codant pour la résistance à la tétracycline
Tn <i>phoA</i>	Transposon codant pour la phosphatase alcaline
Tyr	Tyrosine
V ou Val	L-Valine
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

Unités de mesure

g	gramme
kb	kilobase (10^3 bases)
kDa	kiloDaltons
kV	kiloVolts
h	heure
L	litre
M	molaire
m	mètre
mg	milligramme (10^{-3} gramme)
ml	millilitre (10^{-3} litre)
mM	Millimolaire (10^{-3} molaire)
MU ou UM	<i>Miller Units</i> ou Unités de Miller
ng	nanogramme (10^{-9} gramme)
nm	nanomètre (10^{-9} mètre)
nM	nanomolaire (10^{-9} molaire)
min	minute
pb (<i>bp</i>)	paire de bases (<i>base pair</i>)
μ g	microgramme (10^{-6} gramme)
μ l	microlitre (10^{-6} litre)
μ M	micromolaire (10^{-6} molaire)
V	Volts

Symboles

α	Alpha
β	Bêta
Δ	Delta (délétion génétique)
λ	Lambda
σ	Sigma
γ	Gamma
\pm	Plus ou moins
<	Plus petit que
>	Plus grand que
°	Degré
°C	Degré Celsius

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement tous ceux et celles qui ont rendu ce projet de maîtrise possible, et plus particulièrement :

- Le GREMIP et le CRSNG pour le financement de ce projet de maîtrise...
- Dre Josée Harel (directrice de recherche) pour votre patience, vos idées, vos connaissances et surtout pour avoir cru en moi...
- Dre Christine Martin (codirectrice de recherche).
- Dr Daniel Dubreuil, pour votre disponibilité et vos suggestions pertinentes.
- Dr Michaël Mourez, pour votre aide et sans oublier votre sens de l'humour...
- Les membres du laboratoire, d'hier et d'aujourd'hui, pour le partage de vos idées et pour les bons moments passés ensemble...
- Les membres du GREMIP, chercheurs, collègues et ami(e)s.
- Les membres de BIOVET, collègues et ami(e)s.
- Josée Labrie, pour m'avoir tellement aidé...
- Josée St-Louis, pour ta disponibilité et ton amitié...
- Frédéric Berthiaume, pour ton savoir et ton aide précieuse...
- Stéphanie Penel, pour ton aide et ton amitié...
- Carina Gonçalves, pour TOUT...
- Mes ami(e)s pour vos encouragements...
- Ma famille : Jacqueline, Denis et Jacinthe, Stéphanie et Ève pour vos encouragements...
- Mon conjoint Luc Marin, mon fils Nathaniel et ma fille Azaëlle pour votre compréhension, votre soutien et vos sourires...

SECTION I- Introduction

Problématique

Les souches 4787 et 5131 d'*Escherichia coli* O115:KV165, produisant les antigènes fimbriaires F165₁, sont associées à la septicémie chez les porcelets et les veaux (Fairbrother *et al.*, 1986). L'opéron *foo*, qui code pour F165₁, présente une organisation génétique similaire à l'opéron *pap* qui est le principal membre de la famille des pili de type P (Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000). L'expression de *foo* est soumise à une régulation complexe en réponse à différents facteurs environnementaux. Cette régulation contrôle d'une part, le niveau de la transcription basale et d'autre part, la quantité de bactéries synthétisant l'adhésine au sein d'une même population (Harel *et al.*, 2000). L'expression de F165₁ est dépendante, comme pour son homologue Pap, de plusieurs régulateurs globaux tels que CRP et Lrp, ainsi que de certains régulateurs spécifiques tels que FooI et FooB, qui sont des homologues des régulateurs PapI et PapB (Harel *et al.*, 2000; Daigle *et al.*, 2000).

Comme pour la plupart des fimbriae, l'expression de F165₁ n'est pas constitutive. Elle se produit seulement dans un environnement particulier et est modulée par plusieurs conditions environnementales (Daigle *et al.*, 1997) permettant ainsi une économie importante d'énergie (Harel et Martin, 1999).

Cependant, dans des conditions environnementales où la plupart des systèmes d'adhésion sont en phase OFF, les souches F165₁ sont majoritairement en phase ON. Lorsqu'on compare les systèmes Pap-17 et F165₁, on remarque des différences de séquence pour les régulateurs spécifiques de l'opéron (I et B) ainsi qu'au niveau de la région régulatrice intercistronique. De plus, la présence de deux acides aminés (la leucine et l'alanine) dans le milieu de croissance de la bactérie réprime de façon considérable la biosynthèse de F165₁ (Daigle *et al.*, 1997; 2000) tandis que ces mêmes acides aminés n'ont aucune influence sur la production du fimbriae Pap. La leucine et l'alanine pourraient servir d'indicateur des conditions nutritionnelles rencontrées par la bactérie selon Newman (Newman *et al.*, 1992; 1995). Le mécanisme moléculaire par lequel ces acides aminés agissent sur l'expression du fimbriae est mal connu. Cependant, il a été démontré que l'action de la protéine Lrp envers certains promoteurs cibles est modifié par la leucine et l'alanine (Zhi *et al.*,

1999; Chen and Newman, 1998; Ricca *et al.*, 1989) de façon agoniste ou antagoniste selon le cas.

L'objectif majeur de notre étude consiste à comprendre les mécanismes moléculaires de l'action de Lrp et des régulateurs tels que FooI et FooB ainsi que l'effet qu'ils peuvent exercer sur l'expression de l'opéron *foo*. Par des techniques d'empreinte génomique à la DNaseI, les sites de liaison de Lrp sur l'ADN de la région régulatrice de *foo*, seront déterminés et caractérisés. De plus, l'affinité de Lrp pour ceux-ci sera déterminée dans différentes conditions (absence versus présence d'alanine ou de leucine). Pour ces expériences, les différents régulateurs tels que Lrp et FooI ont été produits sous forme de protéines de fusion et purifiés. De plus, les régions régulatrices ont été produites, purifiées, marquées au ^{32}P et testées. Finalement, un début de mise au point a été fait pour les techniques d'empreinte génomique à la DNaseI et de séquençage chimique à l'aide de la méthode de Maxam-Gilbert pour la région régulatrice de l'opéron *foo*. Ces travaux nous permettront de caractériser les interactions moléculaires entre les différents régulateurs, et entre l'ADN et ces régulateurs, complexés ou non entre eux, interactions qui influencent la régulation de l'expression de l'opéron.

En conclusion, nous espérons comprendre comment des protéines régulatrices (Lrp) ainsi que des homologues de PapI et PapB (FooI et FooB) peuvent exercer un effet sur l'expression de l'opéron *foo*.

SECTION II- Recension de Littérature

Recension de littérature

Première partie : Généralités concernant *Escherichia coli*

1.1 La pathogénie d'*Escherichia coli*

C'est en 1885, qu'*Escherichia coli* fut décrit pour la première fois, par Theodor Escherich. Il le caractérisa comme un bâtonnet Gram-négatif, non-sporulant de la famille des *Enterobacteriaceae*. De plus, il le classa comme un organisme qui survit de matières organiques inertes (saprophyte) (Orskov et Orskov, 1985). Il a été démontré plus tard que certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes et causent chez l'animal une grande variété d'infections intestinales et certaines infections extra-intestinales, telles que des septicémies, des méningites, des polysérites, des cystites, des pyélonéphrites et autres infections du tractus urinaire (Salyers et Whitt, 2002; Orskov et Orskov, 1985). Chez le porcelet et le veau, la majorité des *E. coli* qui sont responsables de diarrhée appartiennent à la catégorie des *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC) (Salyers et Whitt, 2002). Ces souches peuvent causer une diarrhée aqueuse en colonisant le petit intestin et en produisant différents facteurs de virulence (Salyers et Whitt, 2002). Cette colonisation est le résultat de l'adhérence de la souche pathogène sur la muqueuse intestinale soit de façon non spécifique par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes et/ou électrostatiques entre les bactéries et les cellules de l'hôte, soit de façon spécifique par l'intermédiaire d'adhésines.

Les mécanismes de virulence des souches d'*Escherichia coli*, qui sont responsables d'infections systémiques ou localisées, sont complexes et partiellement caractérisés. Ces mécanismes se résument en la capacité à coloniser la muqueuse intestinale, à envahir les tissus extra-intestinaux, à résister à l'effet bactéricide du complément, à survivre et à se multiplier dans les fluides corporels malgré la faible concentration en fer, à échapper à la phagocytose et à la destruction intracellulaire par les phagocytes, et à induire des dommages tissulaire en libérant des cytotoxines (Orskov et Orskov, 1985). Plusieurs facteurs de virulence sont associés à la capacité de causer des infections extra-intestinales tel que les lipopolysaccharides (LPS), les hémolysines, les entérochélateurs (augmentation de la captation du fer), la capsule (antigène K) (Korhonen *et al.*, 1985; Orskov et Orskov, 1985), le plasmide ColV et l'aérobactine

(Aguero *et al.*, 1989), les antigènes favorisant l'héماغglutination mannose-résistante (MRHA, P, S, 31A, F165) ainsi que les fimbriae (Contrefois *et al.*, 1989; Fairbrother *et al.*, 1986; Korhonen *et al.*, 1985) (figure 1).

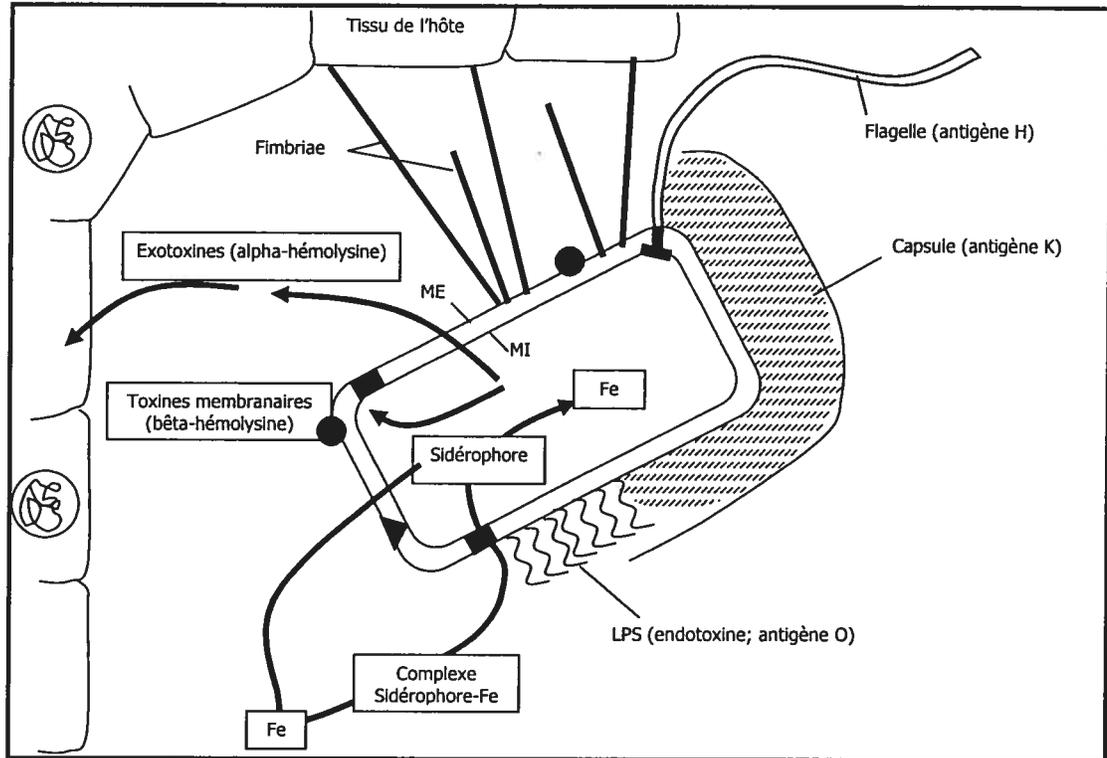


Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule d'*Escherichia coli* interagissant avec les tissus de l'hôte, soulignant les facteurs de virulence bactériens. Les protéines membranaires impliquées dans le transport et la résistance au sérum sont indiquées par des carrés, triangles et ronds noirs. (ME, membrane externe; MI, membrane interne; LPS, lipopolysaccharide). (Figure adaptée de Johnson, *Clinical Microbiology Reviews*, 1991).

1.2 Le facteur de virulence - fimbriae

La colonisation est l'étape primordiale dans la majorité des infections causées par *Escherichia coli*. Lorsque la bactérie rencontre la surface d'une cellule hôte, il doit y avoir adhésion pour permettre la colonisation et l'invasion bactérienne. L'adhésion est essentielle dans des endroits tels que la bouche, le petit intestin et la vessie puisque leurs surfaces muqueuses sont constamment nettoyées par le flux des liquides biologiques (Salyers et Whitt, 2002). Ce sont des filaments de petit diamètre (2 à 10 nm, rigides ou flexibles, de nature protéique) situés à la surface des bactéries Gram-négatives et que l'on nomme pili ou **fimbriae** (Sauer *et al.*, 2000; Low *et al.*, 1996) qui

procurent cette adhérence. Les fimbriae sont formés d'une sous-unité majeure nommée piline, de plusieurs sous-unités mineures ainsi que de l'adhésine qui est responsable de l'adhésion au récepteur (Low *et al.*, 1996). Il est possible pour *E. coli* d'exprimer différents types d'adhésines reconnaissant spécifiquement divers récepteurs, généralement de nature glycolipidique ou glycoprotéinique, présents à la surface des cellules cibles (Salyers et Whitt, 2002). Les fimbriae, à l'aide de leurs adhésines, établissent ainsi le lien entre la cellule eucaryote et la bactérie. Cependant, certaines adhésines ne font pas partie d'un pili et de ce fait, sont considérées comme des adhésines afimbriaires (Dr, AFAI, AFAII) (Salyers et Whitt, 2002).

Il est important de noter que l'adhérence est une fonction très spécifique. Par exemple le «pyelonephritis associated pili» (codé par l'opéron *pap*) est un fimbriae possédant une adhésine spécifique pour les antigènes P des érythrocytes humains (fimbriae P) et est associé aux infections du tractus urinaire (Lund *et al.*, 1987). Cette spécificité est essentielle pour permettre à la bactérie d'exprimer les fimbriae appropriés à chacun des sites spécifiques chez l'hôte. Un autre exemple, l'opéron *fim* qui code pour le fimbriae de type 1, possède une spécificité de liaison unique pour les récepteurs possédant du mannose (Gally *et al.*, 1993). L'adhésine S, quant à elle, fait partie d'un groupe important d'adhésines MR et est associée aux souches d'*Escherichia coli* responsables de méningites néonatales et de septicémies (Hacker *et al.*, 1985; Korhonen *et al.*, 1985).

Les fimbriae sont également caractérisés par une biosynthèse finement régulée. L'expression de leurs gènes est influencée par des régulateurs globaux tels que H-NS et Lrp et par plusieurs autres régulateurs spécifiques (Harel et Martin, 1999). La production de ces fimbriae, qui n'est pas constitutive, est influencée par les conditions environnementales qui entourent la bactérie. Lorsque la bactérie détecte l'environnement où elle se trouve, elle module l'expression des gènes selon leur nécessité à être exprimés.

Deuxième partie : Le complexe F165

2.1 Les souches d'*Escherichia coli* F165-positives

L'antigène fimbriaire F165, produit par des souches d'*Escherichia coli* qui causent des septicémies chez le porcelet et qui possède un schéma d'hémagglutination résistant au mannose, est présent chez des souches d'*E. coli* non-entérotoxigéniques (Dezfulian *et al.*, 2001; Fairbrother *et al.*, 1986). Cet antigène se retrouve aussi chez des isolats d'*E. coli* qui proviennent de veaux et de porcelets atteints de diarrhée (Contrepois *et al.*, 1989; Fairbrother *et al.*, 1986) et des humains atteints de septicémie (Cherifi *et al.*, 1990). Néanmoins, avec un modèle d'infection expérimental chez le porcelet, la majorité des isolats F165-positifs d'origine intestinale ou extra-intestinale induisent des polysérites ou des septicémies, mais rarement des lésions entériques ou une diarrhée (Dezfulian *et al.*, 2004; Fairbrother *et al.*, 1993; Fairbrother *et al.*, 1989). Selon Harel et ses collaborateurs (1991), un nombre restreint de sérogroupes, majoritairement O8, O9, O15, O78, O101 et O115, sont retrouvés dans les isolats F165-positifs.

Lors d'une étude effectuée sur 91 souches F165-positives, de nombreux facteurs de virulence ont été identifiés. Selon les auteurs (Harel *et al.*, 1993), ces facteurs seraient impliqués dans la pathogénie chez les bactéries responsables de maladies extra-intestinales. Faisant partie de ces facteurs de virulence, il y a notamment : la résistance à l'effet bactéricide du sérum, probablement lié à la présence d'une capsule polysaccharidiques ou de LPS ; la production de colicine V ; la présence d'un système d'aérobactine et la production d'hémagglutination mannose-résistante (MRHA) (Dezfulian *et al.*, 2004; Dezfulian *et al.*, 2003; Harel *et al.*, 1993; Ngeleka *et al.*, 1992). Dans les isolats F165-positifs on retrouve, en plus du facteur F165, de nombreuses adhésines pouvant se fixer avec divers récepteurs indépendants. Harel et ses collaborateurs (1991) ont démontré, en examinant 160 souches d'*E. coli* F165-positives par hybridation de colonies dans le but de détecter la présence des opérons *pap* (codant pour le pili Pap), *afa* (codant pour le pili Afa) et *sfa* (codant pour le pili S) (ainsi que leurs de séquences apparentées respectives), que le système *pap* était prédominant chez les isolats F165-positifs. Harel et ses collaborateurs (1991) ont aussi démontré que le système *pap* pouvait être retrouvé en association avec le

système *afa* ou *sfa* mais que les systèmes *afa* et *sfa* ne sont jamais détectés ensemble dans un même isolat. La grande diversité de ces adhésines permettrait d'augmenter la virulence de la souche *E. coli* et serait nécessaire pour la reconnaissance et la fixation aux divers récepteurs durant la progression de l'infection extra-intestinale (Dezfulian, thèse de doctorat, 2003; Dezfulian *et al.*, 2003; Harel *et al.*, 1991).

2.2 Description du complexe fimbriaire F165

C'est en 1988 que Fairbrother et ses collaborateurs ont décrit les antigènes fimbriaires F165 comme étant rigides, longs et d'un diamètre de 5 à 8 nm (Fairbrother *et al.*, 1988). Pour les souches 4787 et 5131 d'*Escherichia coli* O115:KV165 : F165, le complexe fimbriaire F165 est constitué de deux fimbriae génétiquement et sérologiquement distincts. Tout d'abord le fimbriae F165₁ d'approximativement 18.5 kDa ainsi que le fimbriae F165₂ de 17.2 kDa (Harel *et al.*, 1995; Harel *et al.*, 1992; Dubreuil et Fairbrother, 1992; Fairbrother *et al.*, 1988).

2.2.1 Rôles des fimbriae F165₁ et F165₂ chez *E. coli* O115:KV165

Dans le but d'évaluer le rôle du système fimbriae F165₁ dans la septicémie, une étude sur des porcelets gnotobiotiques de deux jours a été réalisée. Ils ont été inoculés intra-gastriquement avec la souche sauvage 5131 d'*E. coli* O115:KV165 : F165 ou avec la souche mutante *TnphoA* F165₁-négatif afimbriaire M48 (Ngeleka *et al.*, 1993). Les porcelets inoculés avec la souche 5131 ont développé des signes cliniques (perte d'appétit, faiblesse musculaire, réduction des mouvements, manque de coordination motrice) et étaient mourant 48 heures après l'inoculation. De plus, lors de la nécropsie, des bactéries infectieuses ont été isolées de différents organes. La souche 5131 a été isolée dans le sang des porcelets inoculés six heures seulement après l'épreuve. Par contre, les porcelets inoculés avec la souche mutante M48 n'ont développé que de légers signes cliniques et ce, 96 heures après l'inoculation. De surcroit, aucune bactérie mutante n'a été isolée dans le sang de ces porcelets inoculés.

Ngeleka et ses collaborateurs (1993) ont démontré que F165₁ n'est pas impliqué dans l'attachement de la bactérie aux cellules de l'épithélium intestinal ou dans leur translocation à travers la barrière intestinale. Lors d'une étude compétitive dans laquelle la souche 5131 et le mutant M48 ont été inoculés simultanément, les porcs ont développé des signes cliniques de septicémie 24 heures après l'inoculation. Dans cette expérience, seule la souche sauvage 5131 a été isolée dans le sang des porcs inoculés.

Il a donc été établi, face à ces résultats, que le système fimbriaire F165₁ d'*E. coli* O115:KV165 joue un rôle important dans l'habileté de la bactérie à survivre dans le sang et à se disperser dans son hôte porcin (Ngeleka *et al.*, 1993). De plus, selon Ngeleka et ses collaborateurs (1994), F165₁ dirigerait l'attachement de la bactérie sur les leucocytes polymorphonucléaires porcins (PMNLs). En comparant avec le mutant F165₁-négatif, il a été déterminé que la présence du fimbriae F165₁ chez la souche pathogène 5131 d'*E. coli* est fortement reliée à la résistance de la bactérie aux mécanismes bactéricides des PMNLs (Ngeleka *et al.*, 1994). Cette résistance semble être due à l'inhibition de la réponse oxydative. Dans le but de confirmer que le fimbriae F165₁ est impliqué dans cette inhibition Ngeleka et Fairbrother (1999) ont évalué les effets des souches F165₁-positive et F165₁-négative sur la réponse oxydative de neutrophiles porcins (pNs) stimulé avec du phorbol myristate acétate (PMA). L'incubation de pNs avec la souche pathogène 5131 résulte en une inhibition significative de la réponse oxydative comparativement aux pNs incubés avec les bactéries F165₁-négatives, selon les résultats aux tests sur la quantification du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de l'anion superoxyde (O₂•⁻) relâché par les cellules phagocytaires.

Pour ce qui est du rôle de F165₂ dans la virulence de la bactérie, les mécanismes demeurent très peu connus (Daigle *et al.*, 2000).

2.2.2 Propriétés d'adhésion de F165₁ et F165₂

Les souches extra-intestinales d'*Escherichia coli* peuvent être distinguées par les adhésines fimbriaires qu'elles produisent et par la spécificité de ces adhésines pour

leurs récepteurs. Les fimbriae de type P représentent le groupe majeur des fimbriae mannose-résistants associés aux infections du tractus urinaire. Ils possèdent une adhésine (PapG) qui reconnaît la partie α -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-galactopyranose (Gal-Gal) qu'on retrouve sur les cellules uro-épithéliales et sur les érythrocytes humains possédant l'antigène sanguin de groupe P (Lund *et al.*, 1987). D'une part, l'opéron *prs* (homologue de l'opéron *pap*) code pour un fimbriae de type P possédant une adhésine Prs (PrsG). Cette dernière lie préférentiellement la portion galactose-N-acétyl- α -(1-3)-galactose-N-acétyl (GalNac-GalNac) présente au niveau de l'antigène de Forssman (constituant majeure des érythrocytes de mouton). D'autre part, F165₁ porte une adhésine G de classe III similaire à celle des PrsG. Cette adhésine reconnaît la portion GalNac-GalNac sur l'antigène de Forssman mais diffère de PrsG parce qu'elle n'agglutine pas les érythrocytes porcins (Fairbrother *et al.*, 1993; Harel *et al.*, 1992; Lund *et al.*, 1987). En résumé, on peut dire que F165₁ appartient génétiquement à la classe fimbriaire P mais possède une adhésine ayant une structure et une spécificité de récepteur différente de celle de l'adhésine G liant la portion Gal-Gal associée au P (Harel *et al.*, 1992). F165₂, quant à lui, possède une adhésine similaire au fimbriae F1C (famille des fimbriae de type S) et ne possède aucune propriété d'adhésion spécifique connue (Harel *et al.*, 1995).

2.2.3 Description génétique des fimbriae F165₁ et F165₂

L'opéron *foo* code pour le fimbriae F165₁. Cet opéron présente une organisation génétique homologue à l'opéron *pap* codant pour le fimbriae P (Daigle *et al.*, 2000). La sous-unité majeure de 18.5 kDa (F165₁A) du fimbriae F165₁ est apparentée à celle du fimbriae F11 (membre de la famille fimbriaire P). Les sous-unité mineures F165₁ E, F et G, quant à elles, sont apparentées aux sous-unités Prs E, F et G du fimbriae Prs (membre de la famille fimbriaire P) (Maiti *et al.*, 1994).

L'opéron *fot* code pour le fimbriae F165₂. Cet opéron présente une organisation génétique semblable à celle de l'opéron *sfa* codant pour le fimbriae Sfa chez la souche 536 (Daigle *et al.*, 2000). La séquence en acides aminés de la sous-unité majeure (F165₂A) du fimbriae F165₂ ainsi que les séquences des sous-unités

mineures F165₂ F, G et H sont comparables à celles des antigènes fimbriaires S et F1C (Dezfulian *et al.*, 2003). Ces derniers sont produits par les souches d'*E. coli* causant des septicémies, des infections du tractus urinaire et des méningites néonatales (Harel *et al.*, 1995; Dubreuil and Fairbrother, 1992).

Le profil génotypique de virulence des bactéries *Escherichia coli* positives pour F-165 et la présence d'îlot de pathogénécité (PAIs) ont été étudiés dans 18 souches isolées de porcs et porcelets malades. Selon leur phénotype et génotype, ces souches ont été classées en trois groupes. Les souches du groupe 1 étaient positives pour *foo* et *fot* et les souches des groupes 2 et 3 étaient respectivement positives pour *foo* et *afa* ou on a retrouvés des gènes de virulence dont la plupart sont présents chez des souches d'*E. coli* causant des lésions extra-intestinales (ExPEC). Chez les souches du groupe 2 quoique positives pour *iucD*, *traT*, *papC* et la variante *papA* qui code pour le fimbriae F11, la distribution des gènes de virulence retrouvés dans les PAIs était souvent différente. L'allèle *papG III* a été détecté dans toutes les souches du groupe 1 et une souche du groupe 3. Toutes les autres souches étaient négatives pour les allèles connus qui codent pour l'adhésine PapG. L'association des gènes de virulence avec les gènes d'ARNt a été caractérisée chez ces souches par la technique d'électrophorèse à champs pulsés et par hybridation de l'ADN génomique avec des sondes correspondantes aux gènes d'ARNt et de virulence. Le site d'insertion de l'opéron *foo* est dans le locus d'ARNt *pheU* chez 16 des 18 souches et dans le locus d'ARNt *selC* des deux autres souches. De plus, huit des 18 souches portent l'îlot de pathogénie élevée (high pathogenicity island; HPI) qui est inséré soit dans le locus d'ARNt *asnT* ou dans le locus d'ARNt *asnVIU*. Lors d'infections expérimentales, il a été observé que les souches F165-positives partagent certains caractères de virulence d'ExPEC et que la plupart d'entre elles sont pathogènes chez les porcelets (Dezfulian *et al.*, 2003).

La souche septicémique d'*E. coli* 4787 (O115 : K- : H51 : F165) d'origine porcine possède au moins deux îlots de pathogénécité. PAI L₄₇₈₇ contient l'opéron *foo* comme seul déterminant de virulence. L'analyse de la séquence du PAI L₄₇₈₇, qui est d'environ 20 kb, révèle un gène potentiel de l'intégrase P4 et est localisé à proximité

du gène de l'ARNt spécifique de la phénylalanine, à 94 minutes sur le chromosome d'*E. coli*. PAI II₄₇₈₇ qui fait au moins 35 kb, contient l'opéron *fot* et est localisé à 6 minutes sur le chromosome d'*E. coli*, entre les gènes *proA* et *yagU*. De plus, l'îlot contient des gènes qui codent pour un système putatifs Iro (IroBCDEN) de sidérophore d'entérochéline retrouvé chez *E. coli* et *Salmonella spp* ainsi qu'une partie des gènes de la colicine V. Ainsi, les souches F165 contiennent des PAIs dont la composition génique est similaire à celles retrouvés chez les souches ExPEC. Ces PAIs ont probablement été acquis par transfert horizontal de gènes (Dezfulian *et al.*, 2004).

Les souches F165 sont porteuses de phages. Dans la souche 4787, après induction à la mitomycine, seules des structures ressemblant à des queues et des têtes de phage ont été observées au microscope électronique (Dezfulian, thèse de doctorat, 2003). Pour la souche 1401, des structures complètes de phage ont été observées et les caractéristiques permettent de le classer comme un Myovirus. Ce phage contient un ADN linéaire double-brin d'environ 50 kb. Afin de déterminer si les gènes de fimbriae (*foo*, *fot* et *afa*) sont associés aux phages, des analyses des lysats de phages ont été réalisées. Cependant ces dernières se sont avérées négatives (Dezfulian, thèse de doctorat, 2003). Ainsi, les îlots de pathogénie et les phages participent à la complexité génétique des souches ExPEC F165-positives.

2.3 Organisation génétique des opérons *foo* et *pap*

2.3.1 Les régions régulatrices des opérons *foo* et *pap*

Récemment, les séquences nucléotidiques de la région régulatrice de l'opéron *foo*, des souches 5131 et 4787 (codant pour F165₁) ont été déterminées et présentent une organisation génétique similaire à celle retrouvée chez l'opéron *pap* (Figure 2). De plus, les régions régulatrices des opérons *foo* des souches 5131 et 4787 sont identiques (Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000) et sont homologues à celle de *pap-17* à 93.1% ainsi qu'avec celle de *pap-21* à 92% chez la souche C1212 (Blyn *et al.*, 1989).

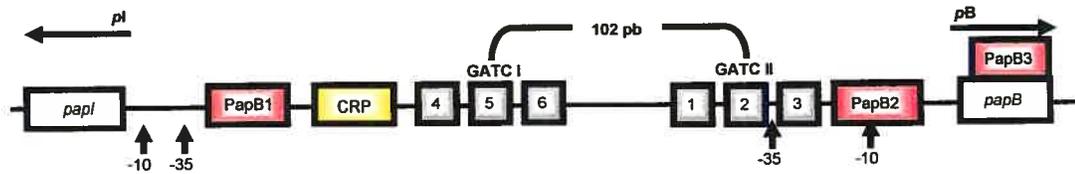


Figure 2 : Organisation de la région régulatrice de l'opéron *pap*. Les six zones grises carrées correspondent aux sites de liaison de Lrp. Les zones rectangulaires rouges correspondent aux sites de liaison de PapB. La zone rectangulaire jaune correspond au site de liaison de CRP. Il est à noter que cette figure n'est pas à l'échelle (Figure adaptée de Dezfulian *et al.*, 2001).

La région régulatrice de l'opéron *foo* contient deux cadres de lecture ouverts, orientés en directions opposées et qui codent pour les gènes *fooI* et *fooB*. Deux promoteurs divergents (*pBA* et *pI*) sont placés de façon homologue à ceux de l'opéron *pap* (van der Woude *et al.*, 1992 ; Goransson *et al.*, 1989b). De plus, la région intercistronique entre *fooI* et *fooB* contient deux sites GATC (GATC-I et GATC-II) séparés par 102 pb. Ces dernières caractéristiques sont très représentatives des membres de la famille de *pap*. Il est à noter que la régulation de *pap* est modulée par la méthylation différentielle de ces sites GATC et par la protéine Lrp. De surcroît, six sites putatifs de liaison pour la protéine Lrp (GnnnTTT) (Nou *et al.*, 1995), dans la même optique que pour *pap*, ont été identifiés dans la région intercistronique de *foo* (Figure 2). Chacun de ces sites est séparé par environ trois tours hélicaux. Les sites de liaison 1, 2 et 3 de la protéine Lrp sont proximaux par rapport au promoteur *pBA* tandis que les sites 4, 5 et 6 sont distaux. Les sites de méthylation GATC-I et GATC-II sont situés respectivement au niveau des sites de liaison 5 et 2 de la protéine Lrp (Nou *et al.*, 1995). De plus, un site potentiel de liaison pour la protéine CRP a été localisé dans la région régulatrice entre -203 et -229 pb par rapport au site d'initiation de la transcription de *fooBA* (Goransson *et al.*, 1989b), de façon homologue à *papBA*. De surcroît, un site potentiel de liaison pour la protéine CpxR serait présent entre les sites de liaison putatifs 5 et 6 dans la région régulatrice de *foo* (Dezfulian *et al.*, 2001). Finalement, trois séquences identiques aux sites de liaison de la protéine régulatrice PapB sont aussi retrouvées dans la séquence de *foo*, deux dans la région régulatrice (site 1 et 2 localisé par rapport à *pBA* à -285 et -234 pb, et à -27 et +6, respectivement) et une dans la séquence codante de *fooB* (site 3 localisé à

+92 et +125 par rapport à *pBA*) (Xia *et al.*, 1998; Forsman *et al.*, 1989). Considérant le haut degré d'homologie entre les protéines PapB et FooB, ces séquences sont des sites potentiels de liaison de FooB.

2.3.2 L'organisation de la région codante de l'opéron *foo* et de l'opéron *pap*

La région codante de l'opéron *foo* présenterait une organisation génétique similaire à celle de *pap* (Figure 3) si on se base sur les homologies de séquences nucléotidiques (Daigle *et al.*, 1997). L'opéron *pap* est composé de 11 gènes, qui codent pour l'adhésine (*papG*), pour des protéines d'assemblage (*pap H, C, D, J*), pour des sous-unités mineures (*pap K, E, F*), pour une sous-unité majeure (*papA*) et finalement pour des protéines régulatrices (*papI* et *papB*) (Kuehn *et al.*, 1992). De plus, le système génétique *pap* possède deux promoteurs divergents (Baga *et al.*, 1985).

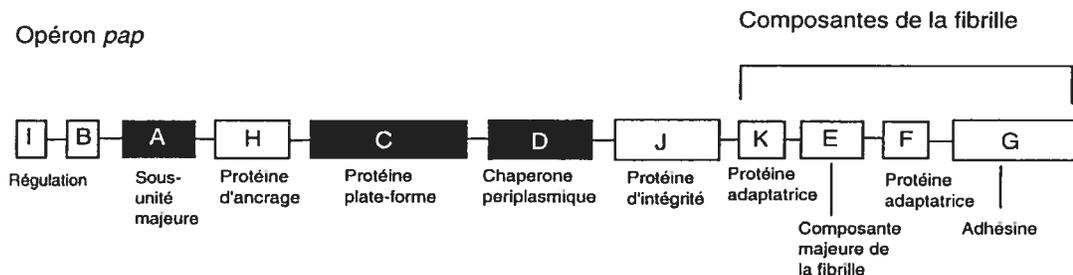


Figure 3 : Organisation génétique de la région codante de l'opéron *pap*. La fonction des protéines codées par chacun des gènes est indiquée (figure adaptée de Daigle *et al.*, 1997).

Le promoteur *pI* contrôle seulement la transcription du gène *papI* tandis que le promoteur *pBA* contrôle la transcription des autres gènes de l'opéron *pap*, soit *papBAHCDJKEFG*. Les deux premiers cistrons exprimés à partir du promoteur *pBA*, *papB* et *papA*, sont co-transcrits en un seul ARNm (Baga *et al.*, 1988; Baga *et al.*, 1985). L'expression différentielle des deux premiers gènes *B* et *A*, est réalisée grâce à un clivage endonucléotidique post-transcriptionnelle de l'ARNm par l'enzyme RNaseE dans la région intercistronique *papB-papA* (Nilsson *et al.*, 1996; Nilsson et Uhlin, 1991) (Figure 4).

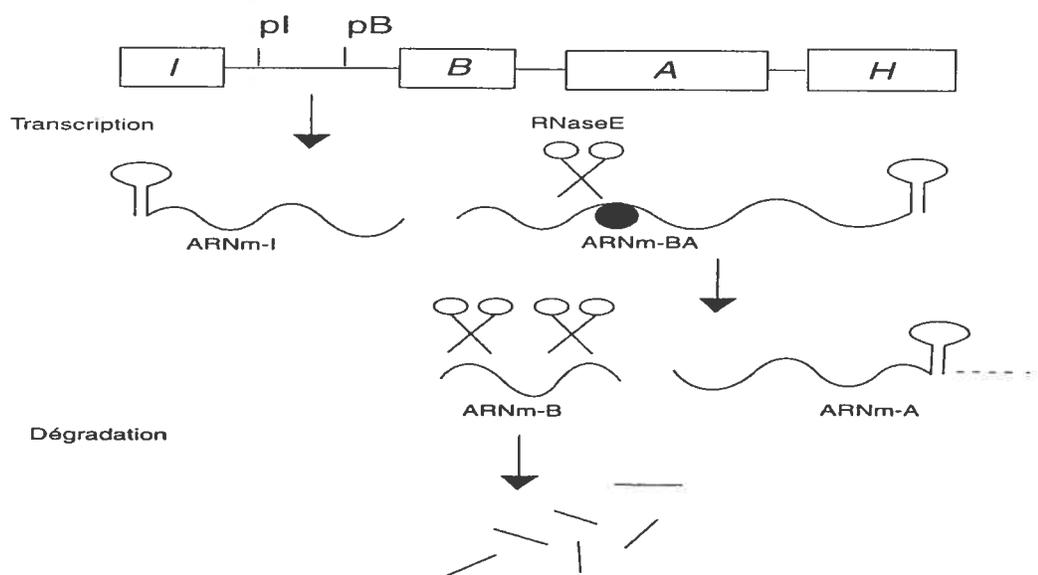


Figure 4 : Régulation post-transcriptionnelle de l'opéron *pap* (figure adaptée de Nilsson *et al.*, 1996).

Ce clivage est suivi d'une dégradation de l'ARNm correspondant à *papB* (demi-vie de 2,5 minutes) et de l'accumulation de l'ARNm correspondant à *papA* (ARNm-A) qui est plus stable (demi-vie de 27 minutes) (Nilsson et Uhlin, 1991; Baga *et al.*, 1988). L'accumulation excessive de l'ARNm-A amène une augmentation du niveau d'expression de la piline majeure PapA, contrairement à l'expression de la protéine régulatrice PapB (Nilsson *et al.*, 1996; Nilsson et Uhlin, 1991).

2.3.3 Les rôles et caractéristiques des produits codés par les gènes de l'opéron *foo* et de l'opéron *pap*

Les produits des gènes constituant l'opéron *foo* peuvent être regroupés en trois classes selon leurs fonctions. Premièrement les protéines de régulation, deuxièmement les protéines structurales du fimbriae et finalement les protéines impliquées dans l'assemblage du fimbriae. Ces fonctions seraient similaires à celles déjà démontrées au niveau des produits géniques de l'opéron *pap*. Les prochaines lignes décriront les fonctions des protéines codées par l'opéron *pap* et par conséquent celles de l'opéron *foo* qui sont homologues.

Protéines régulatrices

Les protéines synthétisées grâce aux gènes *papI* (PapI) et *papB* (PapB) sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle de l'opéron *pap* (Low *et al.*, 1996). Le rôle de ces protéines sera traité en détail dans la section sur la variation de phase de cette revue.

La séquence nucléotidique de l'opéron *pap17* de la souche C1212 d'*E. coli* a été comparée à celle de *foo* chez la souche 4787 (O115:KV165 : F165) (accession No. L07420) (Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000). Dans cette étude, il a été démontré que la séquence en acides aminés de FooI chez la souche 5131 est identique à celle de 4787 et à celle de PapI-21. D'un autre côté, cette dernière diffère d'un acide aminé en position 17 (Asp pour Asn) de la séquence de PapI-17. Pour ce qui est de la séquence en acides aminés de FooB pour la souche 5131, celle-ci est identique à celle de la souche 4787, cependant elle présente trois changements dans la région N-terminale aux positions 9 (Arg pour Glu), 13 (Ala pour Val) et 51 (Met pour Thr) lorsqu'on la compare à celle de PapB-17. D'un autre côté, la séquence de FooB diffère de celle de PapB-21 aux positions 12 (Arg pour Glu) et 16 (Ala pour Val) et possède deux résidus supplémentaires en position C-terminale. De plus, PapB-21 possède trois acides aminés additionnels en position N-terminale, absents chez FooB (Daigle *et al.*, 2000).

Protéines structurelles de Pap

Les fimbriae Pap sont fait d'une portion basale longue et rigide (la piline) et d'une structure hélicoïdale ouverte orientée vers la droite, courte et flexible (la fibrille) (Low *et al.*, 1996) (Figure 5A).

La piline est constituée majoritairement de la répétition de la sous-unité PapA (Baga *et al.*, 1984). Pour F165₁, la séquence en acides aminés de la protéine F165₁A a été comparée avec la séquence correspondante chez Pap et chez d'autres fimbriae de type P (Maiti *et al.*, 1994). Les analyses ont démontré que F165₁A est très similaire aux séquences de la protéine majeure correspondante chez le fimbriae F11.

La fibrille est composée majoritairement de plusieurs sous-unités PapE (Kuehn *et al.*, 1992). À l'extrémité distale de la fibrille on retrouve l'adhésine, cette structure qui permet la reconnaissance par le fimbriae de son récepteur spécifique présent sur la cellule eucaryote. Chez le pili Pap, l'adhésine est la protéine PapG et celle-ci lie le sucre Gal(α 1→4)Gal et est nécessaire pour le développement de la pyélonéphrite (Kuehn *et al.*, 1992; Lund *et al.*, 1987).

De surcroît, l'opéron *pap* code pour deux protéines adaptatrices. Premièrement PapK qui permet la liaison de la piline à la fibrille et deuxièmement PapF qui lie la fibrille à l'adhésine et est essentielle pour l'adhésion du fimbriae à son récepteur (Figure 5A) (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1993; Lund *et al.*, 1987).

Protéines d'assemblage du fimbriae Pap

On a identifié quatre protéines qui jouent un rôle essentiel dans la biogenèse du pili Pap.

Tout d'abord, PapD est une protéine chaperon périplasmique qui interagit avec les sous-unités nouvellement transloquées en les transportant à travers l'espace périplasmique (Figure 5B). Cette protéine lie les sous-unités correctement pliées, les stabilisent et forme une surface interactive prévenant une agrégation prématurée dans le périplasme (Lindberg *et al.*, 1989). PapD est aussi requise pour la stabilisation des sous-unités PapA, PapE, PapF, PapG, PapK et PapH (Soto et Hultgren, 1999; Thanassi *et al.*, 1998a; Lindberg *et al.*, 1989). Lorsque formé, le complexe PapD/sous-unités devient la cible d'une protéine plate-forme située dans la membrane externe.

Deuxièmement le polypeptide PapC (codé par le gène *papC*) est localisé au niveau de la membrane externe de la bactérie et forme une plate-forme qui permet l'assemblage des sous-unités du fimbriae (Thanassi *et al.*, 1998a; Thanassi *et al.*, 1998b). Le complexe PapC est constitué de six sous-unités qui forment un pore à travers la membrane externe et facilite l'assemblage du fimbriae (Thanassi *et al.*, 1998a; Thanassi *et al.*, 1998b). De plus, la protéine plate-forme semble avoir un rôle plus

La protéine PapH, quant à elle, permet l'ancrage du fimbriae à la membrane en se liant à sa portion basale (Figure 5B) (Baga *et al.*, 1987). L'ancrage du fimbriae Pap à la membrane de la bactérie est nécessaire pour son expression en surface. PapH joue aussi un rôle dans la modulation de la longueur du fimbriae en ajustant la longueur du fimbriae (Baga *et al.*, 1987).

Finalement, le rôle de la protéine PapJ dans la biogenèse du pili Pap n'a pas été le sujet de beaucoup d'études et par conséquent est peu connu. Cependant, selon Tennent et ses collaborateurs (1990), le gène *papJ* serait requis pour le maintien de l'intégrité du pili Pap. Selon cette étude, PapJ serait une protéine périplasmique qui n'aurait aucun effet sur les étapes de biosynthèse pour l'expression en surface de Pap. Elle assurerait plutôt l'assemblage adéquat, pour l'oligomérisation des sous-unités PapA dans le pili, en agissant directement ou indirectement en tant que chaperon moléculaire (Tennent *et al.*, 1990).

2.4 Régulation de l'expression de l'opéron *foo* et de l'opéron *pap*

2.4.1 Description des mécanismes de régulation

Le contrôle de l'expression génétique d'un pathogène au cours d'une infection s'avère une propriété importante pour sa survie dans l'hôte (Harel et Martin, 1999). Cette régulation permet à la bactérie d'éviter l'expression inadéquate de facteurs de virulence en certaines occasions. Elle permet aussi d'assurer leur expression rapide lorsqu'ils sont requis (Salyers et Whitt, 2002). L'expression de fimbriae est contrôlée à un niveau transcriptionnel par deux mécanismes qui modulent d'un côté, le pourcentage de cellules qui produisent des fimbriae dans une seule colonie (variation de phase) (Figure 6A) et d'un autre côté, la quantité d'antigènes à la surface d'une seule cellule (transcription basale) (Figure 6B). Ces deux types de régulation sont jumelés dans les cellules sauvages d'une même population (figure 6C). La transcription dans les cellules ON peut être plus ou moins active, ce qui entraîne la synthèse de plus ou moins de fimbriae pour une bactérie (Harel *et al.*, 2000).

Le mécanisme de variation de phase est défini comme l'aptitude de passer de la phase ON (où il y a synthèse de fimbriae) à la phase OFF (où il y a absence de synthèse de fimbriae) et vice versa, suite à une réplication de l'ADN. Le rôle biologique de la variation de phase de F165₁ est pour l'instant peu connu mais des théories ont été proposées.

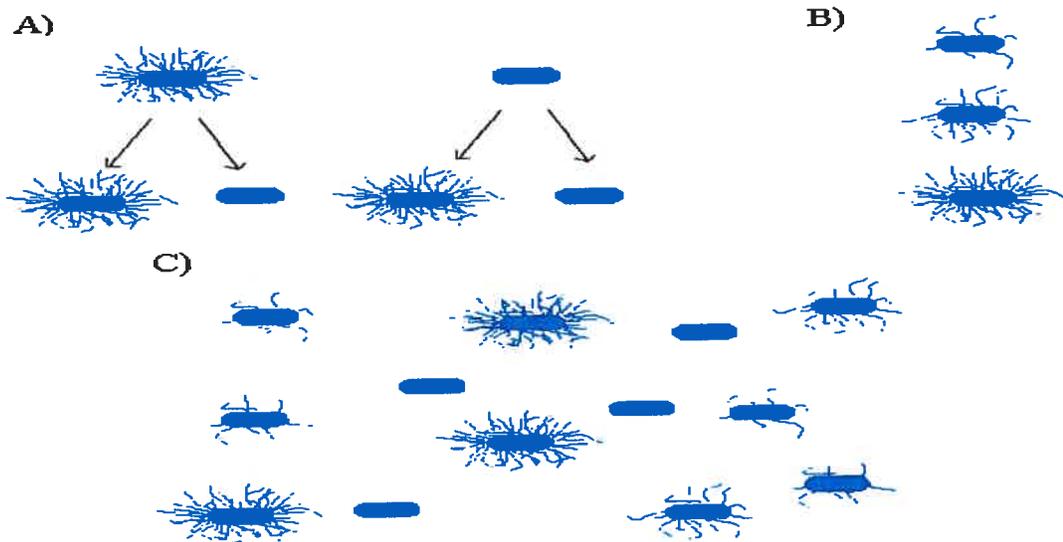


Figure 6 : Régulation transcriptionnelle de l'opéron *foo*. (A) Variation de phase. (B) Transcription basale. (C) Population hétérogène résultant de la combinaison des deux types de régulation (figure adaptée de Crost *et al.*, 2003).

Tout d'abord, la variation de phase serait une stratégie permettant l'adaptation de la bactérie à différents environnements en produisant des cellules avec des phénotypes variés ce qui favoriserait la survie en cas de changement environnemental brusque (Henderson *et al.*, 1999). De plus, la variation de phase serait un mécanisme qui permettrait de contourner le système immunitaire de l'hôte car les composantes de surface sont très immunogènes et par conséquent des cibles de choix pour les anticorps (Henderson *et al.*, 1999; Low, 1994; de Ree et van den Bosch, 1987; Low *et al.*, 1987).

Subséquentement, la variation de phase serait un mécanisme d'économie énergétique puisque l'expression constitutive de fimbriae serait métaboliquement très coûteuse (Low, 1994). Finalement, la variation de phase permettrait à la bactérie de se

détacher des surfaces colonisées et de se propager chez l'hôte ou vers un nouvel hôte (Henderson *et al.*, 1999).

2.4.2 Le mécanisme de variation de phase de *foo* et de *pap*

Nous savons que la région régulatrice de *foo* a une organisation génétique similaire à celle de *pap* (Figure 7), que les protéines FooI et FooB sont des homologues des protéines PapI et PapB, et que la transcription de *foo* dépend des mêmes régulateurs globaux (Lrp et Dam) que *pap* (Crost *et al.*, 2004; Dezfulian *et al.*, 2001; Daigle *et al.*, 2000). En se basant sur ces faits, l'hypothèse que la variation de phase de *foo* (F165₁) utilise un mécanisme similaire à celui de *pap* a été émise. Ce mécanisme consiste en l'altération de la méthylation de l'ADN (un mécanisme épigénétique) (Dezfulian *et al.*, 2001; Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000).

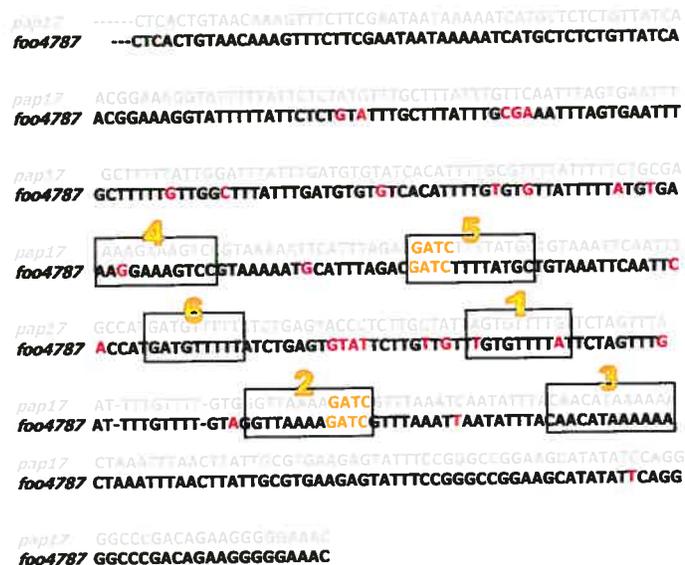


Figure 7 : Comparaison des régions intercristoniques de *foo4787* (GenBank Accession Nb AY560911) et *pap17* (GenBank Accession Nb X14471). Les sites putatifs de Lrp sont encadrés et numérotés (figure adaptée de Nou *et al.*, 1995). Les sites GATC sont indiqués en orange. Les différences observées entre les deux séquences sont indiquées par la couleur rouge.

2.4.2.1 L'implication des protéines Dam, Lrp et PapI dans la variation de phase de *pap*

Dam

La méthylation de l'ADN est essentielle pour un grand nombre de processus cellulaires comme la réparation de mauvais appariements au niveau de l'ADN nouvellement synthétisé, la transposition, la réplication de l'ADN et la ségrégation chromosomique (Messer et Noyer-Weidner, 1988). La variation de phase chez *pap*, est reliée à la méthylation différentielle de deux sites GATC (GATC-I et GATC-II) (Low *et al.*, 2001). La déoxyadénosine méthylase (Dam) joue un rôle direct dans la variation de phase de *pap* en reconnaissant et en méthylant l'adénosine des deux sites GATC (Braaten *et al.*, 1994; Blyn *et al.*, 1990). Il est à noter que la concentration de Dam présente dans la cellule influence énormément la transcription de *pap*. En effet, la transcription est abolie chez les souches déficientes en Dam ainsi que chez les souches surexprimant cette dernière (Braaten *et al.*, 1994; Blyn *et al.*, 1990).

Lrp

La méthylation différentielle est le résultat d'une compétition entre Dam et une autre protéine pour la méthylation des sites GATC (Figure 8). Des analyses mutationnelles et de complémentation ont montré que le gène *mbf* correspond au gène *lrp* codant pour la protéine Lrp (Leucine-responsive regulatory protein), un régulateur global de certains opérons chez *E. coli* (Braaten *et al.*, 1992). Des études de protection de la méthylation *in vitro* ont démontré que la liaison de Lrp à la région régulatrice de *pap* est suffisante pour la formation de motifs de méthylation de l'ADN (van der Woude *et al.*, 1998). Ces résultats confirment les études *in vivo* démontrant que Lrp est requise pour contrer la méthylation des sites GATC-I et GATC-II par Dam. Lrp est essentielle pour la transcription et la variation de phase de *pap* (Braaten *et al.*, 1991). Comme décrit précédemment, six sites de liaison de Lrp, ayant la séquence consensus GnnTTT, chacun séparés par environ trois tours d'hélice, ont été identifiés dans la région régulatrice de *pap* (Nou *et al.*, 1995). La protéine Lrp a plus d'affinité pour les sites 1, 2 et 3 situés à proximité du promoteur *pBA* que pour les sites 4, 5 et 6 plus distants de ce même promoteur (Hernday *et al.*, 2002; Weyand et Low, 2000;

PapI

La liaison de la protéine Lrp aux sites 4, 5 et 6 nécessite la présence de la protéine PapI codée par le gène *papI*, contrairement à sa liaison aux sites 1, 2 et 3 (Figure 8) (Kaltenbach *et al.*, 1998; Kaltenbach *et al.*, 1995; Nou *et al.*, 1993; Nou *et al.*, 1995). La liaison unique de la protéine Lrp aux sites 4, 5 et 6 est insuffisante pour l'activation de la transcription de *pap* (Nou *et al.*, 1993). PapI est une protéine (8.8 kDa) qui intervient dans la régulation positive de la transcription de *pBA* (Baga *et al.*, 1985) et dans la transition vers la phase ON (Nou *et al.*, 1993). Des études de liaisons croisées ont indiqué que Lrp et PapI interagissent directement (Kaltenbach *et al.*, 1995) en augmentant l'affinité de Lrp pour les sites 4, 5 et 6 ainsi qu'en diminuant l'affinité de la protéine pour les sites 1, 2 et 3 (Kaltenbach *et al.*, 1998; Nou *et al.*, 1995). PapI se lie spécifiquement au complexe Lrp-ADN mais pas à la protéine Lrp libre ou à l'ADN seul. De plus, PapI n'aurait aucun effet sur la transcription à partir des promoteurs *pI* et *pBA* à moins que la protéine Lrp ne soit présente (Kaltenbach *et al.*, 1995; Nou *et al.*, 1993). Hernday et ses collaborateurs (2002) ont démontrés que Lrp se lie à des sites adjacents ou chevauchants une séquence contenue dans la région régulatrice de *pap*, incluant ACGATC et interagit avec PapI, stabilisant ainsi le complexe PapI-ADN. La liaison de Lrp, en présence de PapI, au site GATC-I stimule huit fois plus la transcription de *pap* (van der Woude *et al.*, 1995). De surcroît, sous certaines conditions, PapI agit en tant qu'autorégulateur puisque la surexpression de PapI induit la transition des cellules en phase OFF (Hernday *et al.*, 2002).

2.4.2.2 Patron de la phase ON et OFF

La protéine Lrp se lie en phase OFF sur les sites de haute affinité 1, 2 et 3 situés près du promoteur *pBA* (Nou *et al.*, 1995) protégeant ainsi le site GATC-II de la méthylation par la protéine Dam (van der Woude *et al.*, 1998; Nou *et al.*, 1995; Blyn *et al.*, 1990) (Figure 8). Des analyses génétiques et biochimiques ont indiqué que la liaison coopérative de Lrp à ces trois sites bloque la transcription de *papBA* (Weyand et Low, 2000; Braaten *et al.*, 1994). Parallèlement, les sites de liaison 4, 5 et 6 pour

Lrp sont libres et GATC-I est méthylé (Nou *et al.*, 1995; Blyn *et al.*, 1990) ce qui empêche par encombrement stérique la liaison du complexe Lrp-PapI à ces trois sites (Nou *et al.*, 1995; Braaten *et al.*, 1994; Nou *et al.*, 1993). Selon une étude de Braaten et ses collaborateurs (1994), la méthylation du site GATC-I serait requise pour la transition vers la phase OFF.

En phase ON, la protéine Lrp est liée aux sites de faible affinité 4, 5 et 6 protégeant GATC-I de la méthylation par la protéine Dam. En revanche, les sites 1, 2 et 3 sont libres et GATC-II est méthylé (Crost *et al.*, 2003; van der Woude *et al.*, 1998; Nou *et al.*, 1995). La protéine PapI est indispensable pour la protection de GATC-I contre la méthylation et pour la translocation de la protéine Lrp des sites 1, 2 et 3 vers les sites 4, 5 et 6 (Kaltenbach *et al.*, 1998; Nou *et al.*, 1995; Nou *et al.*, 1993). La protéine PapI se lie donc à la partie Lrp du complexe Lrp-ADN permettant la libération de Lrp liée aux sites 1, 2 et 3 en changeant la conformation de Lrp. Ce phénomène permet aussi la liaison de la protéine aux sites 4, 5 et 6 (Kaltenbach *et al.*, 1995). Une étude d'empreinte génomique, réalisée par Nou et ses collaborateurs (1995), a indiqué que la protéine PapI réduit l'affinité de la protéine Lrp pour les sites 1, 2 et 3 de deux fois et augmente l'affinité de Lrp pour les sites 4, 5 et 6 de quatre fois. De plus, la réduction d'affinité de Lrp pour les sites 1, 2 et 3 exige la présence du site GATC-I.

Par ailleurs, une analyse mutationnelle a démontré que la méthylation de GATC-II est requise pour la transition en phase ON ainsi que pour la transcription de *pap* (Braaten *et al.*, 1994). Le site de liaison 3 est localisé entre la région -35 et -10 du site de liaison de l'ARN polymérase (Nou *et al.*, 1995). La liaison de Lrp près de GATC-II inhibe la transcription de *pap* ce qui permet le phénotype OFF (Crost *et al.*, 2003; Weyand et Low, 2000; Braaten *et al.*, 1994). Ainsi l'effet répresseur de Lrp a pour conséquence l'inhibition de la liaison de l'ARN polymérase sur la région promotrice par l'encombrement stérique engendré par la liaison de Lrp à l'ADN (Weyand et Low, 2000; van der Woude *et al.*, 1995). Il y a donc compétition entre la protéine Lrp et l'ARN polymérase au niveau de la région promotrice de *pap*. Par conséquent, la méthylation de GATC-II empêche la liaison coopérative de Lrp aux sites 1, 2 et 3 prévenant la répression de l'expression de *pap* engendrée par Lrp (Braaten *et al.*, 1994). De plus, σ_{70} est le facteur de transcription primaire responsable de la

transcription de *papBA*. La liaison de Lrp à la région entre -35 et -10 inhibe l'affinité de l'ARN polymérase- σ_{70} pour son site de liaison (Weyand et Low, 2000).

La transition entre la phase OFF et ON requiert la réplication de l'ADN (Braaten *et al.*, 1994; Blyn *et al.*, 1990). Le modèle suggéré par Braaten et ses collaborateurs (1994) est représenté à la figure 9.

Après le passage de la boucle de réplication, le site GATC-I méthylé (phase OFF), est converti vers un état d'hémiméthylation. La protéine Lrp est déplacée du site GATC-I par la machinerie de réplication (Figure 9A et 9B). Il a été démontré que le complexe Lrp/PapI et la protéine Lrp se lient à la région contenant les sites GATC-I et GATC-II hémiméthylés (Kaltenbach *et al.*, 1998; Nou *et al.*, 1993). Pourtant, après la première réplication, le complexe Lrp/PapI se lie auprès de GATC-I hémiméthylé tandis que le site GATC-II (inoccupé), est méthylé par la protéine Dam (Figure 9C). À la deuxième réplication, l'ADN présente un site GATC-I non-méthylé lié par Lrp/PapI représentant ainsi la phase ON (Figure 9D). Dans le cas où le complexe Lrp/PapI ne s'associe pas de nouveau avec le site GATC-I, la transition de la phase ON vers la phase OFF n'a pas lieu après la réplication de l'ADN (Figure 9E). Le site GATC-I reste non-protégé et méthylé par la protéine Dam prévenant ainsi une réassociation ultérieure de Lrp/PapI avec ce site (Figure 9F). En absence de la liaison du complexe Lrp/PapI au site GATC-I, la protéine Lrp se lie au site GATC-II hémiméthylé et protège celui-ci de la méthylation par la protéine Dam. Après un cycle additionnel de réplication, l'ADN de *pap* en phase OFF se retrouve méthylé au niveau du site GATC-I alors que le site GATC-II est occupé par Lrp et est non-méthylé (Figure 9A) (Braaten *et al.*, 1994).

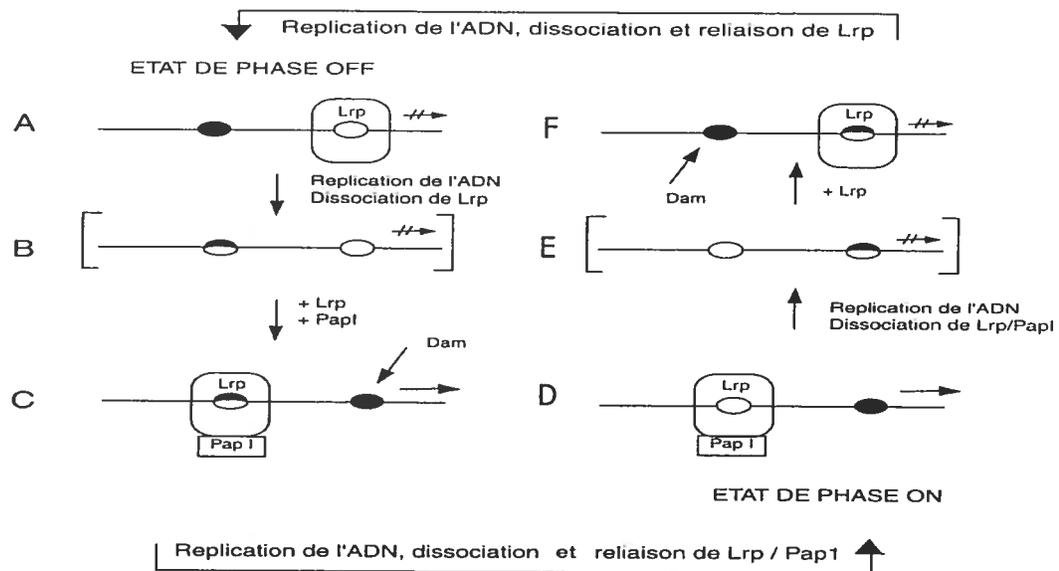


Figure 9 : Modèle de la variation de phase de *pap* selon la méthylation différentielle. Les sites GATC hémiméthylés résultant de la réplication de l'ADN sont indiqués par des cercles à demi remplis tandis que les sites GATC méthylés sont indiqués par des cercles pleins. La transcription du promoteur *ppapBA* est indiquée par les flèches. Les flèches brisées indiquent l'absence de transcription (Figure adaptée de Braaten *et al.*, 1994).

2.4.2.3 Comparaison de la variation de phase du fimbriae F165₁ versus la variation de phase du fimbriae Pap

Il a été démontré chez la souche sauvage 5131 d'*E. coli*, par des tests d'immunofluorescence, que la variation de phase de F165₁ résulte en une majorité (98%) de cellules en phase ON (Harel *et al.*, 2000). De plus, la fréquence de la transition de ON vers OFF est dix fois plus faible que celle observée de OFF vers ON. Ces résultats sont très différents de ceux observés pour la variation de phase chez Pap-17 où la majorité des cellules sont en phase OFF (Blyn *et al.*, 1989). La protéine régulatrice PapI est nécessaire pour la transition de OFF vers ON par son interaction avec Lrp (Nou *et al.*, 1993). Une différence d'un seul acide aminé entre FooI et PapI-17 (Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000), pourrait être responsable en partie des écarts de pourcentage de cellules obtenues en phase ON. De plus, il a été constaté que la variation de phase d'un autre fimbriae apparenté, Pap-21 (identique à 100% avec FooI) (Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000), résulte aussi en une majorité de cellules en phase ON (90%) (Blyn *et al.*, 1989). De surcroît, la fréquence de transition de ON vers OFF entre Pap-21 et F165₁ est similaire (3.7×10^{-3} et

1.26×10^{-3} respectivement), mais la fréquence de transition de OFF vers ON est 71 fois supérieure pour Pap-21. La protéine FooI n'est donc pas le seul facteur impliqué. Dans la région régulatrice, une différence de 25 pb est présente entre *pap-17* et *pap-21* et une différence de 31 pb entre *pap-21* et *foo*. Ces différences se situent au niveau du site de liaison numéro 1 de la protéine PapB et non au niveau de ceux de Lrp. Ce changement de 31 pb aurait un impact sur l'affinité de liaison de la protéine PapB et par conséquent une influence sur la fréquence de transition des cellules de la phase OFF vers la phase ON (Crost *et al.*, 2004; Crost, thèse de doctorat, 2003; Dezfulian *et al.*, 2001).

Alors que la majorité de souches *foo*-positives sont en phase ON, la corrélation du profil de méthylation avec les cellules en phase ON ou OFF est moins bien définie que pour *pap* ou *clp*. De surcroît, l'affinité de Lrp telle que mesurée par retard sur gel est identique pour les deux régions GATC (Crost, thèse de doctorat, 2003).

2.4.3 La transcription basale des opérons *foo* et *pap*

À l'opposé de la variation de phase, la régulation de la transcription basale de *foo* et *pap* est très peu détaillée dans la littérature. Le régulateur global Lrp et les régulateurs spécifiques (FooI et FooB ainsi que PapI et PapB) seraient aussi impliqués dans le contrôle du niveau de transcription dans les cellules en phase ON ou dans les cellules qui ne sont pas assujettis à la variation de phase (Harel et Martin, 1999). La quantité de protéines liées à l'ADN et/ou le site de liaison des protéines sur l'ADN (dans le cas de Lrp) déterminerait le taux de transcription des gènes de ces opérons.

2.4.4 L'implication de CRP, PapB, H-NS et du système Cpx dans le contrôle de la variation de phase et de la transcription basale de *pap*

En plus des régulateurs Lrp, Dam et FooI, d'autres régulateurs globaux ou spécifiques, comme CRP, PapB, H-NS et le système Cpx, sont impliqués dans les deux types de régulation de *pap*. Voici une description des implications de chacun.

2.4.4.1 La protéine CRP (Catabolite Repressive Protein)

L'expression de plusieurs gènes et opérons est sous le contrôle de la répression catabolique ou communément appelé effet glucose. C'est un type de régulation globale face aux sources de carbone. En présence de glucose, la concentration d'AMPc bactérien diminue drastiquement, entraînant ainsi une désactivation de la protéine activatrice du catabolisme (nommée CRP ou CAP) dépendante de l'AMPc (Prescott, 1995). Cette chute d'AMPc occasionnée par une réduction de l'activité de l'adénylate cyclase (enzyme de synthèse de l'AMPc). L'expression de *pap* est affectée par le phénomène de répression catabolique puisqu'il a été démontré que la présence de glucose diminue l'expression de *papBA* de trois à quatre fois (Baga *et al.*, 1985). Appuyant ces résultats, l'expression de *pap* est restreinte à la fois chez un mutant déficient en *crp* ou en *cya* (codant pour l'adénylate cyclase) (Baga *et al.*, 1985). De plus, la fréquence de transition de OFF vers ON est réduite de 35 fois et la fréquence de transition de ON vers OFF est accrue de 1,4 fois en comparaison avec une autre source de carbone comme le glycérol (Blyn *et al.*, 1989).

Le gène *crp* code pour la protéine CRP (Catabolite Repressive Protein). Cette protéine de 45 kDa lie l'AMPc et agit en tant que régulateur global positif ou négatif de plusieurs opérons chez *E. coli*. CRP est essentielle pour l'activation transcriptionnelle de *papBA* et de *papI* (Goransson *et al.*, 1989b; Baga *et al.*, 1985). Il a été démontré par une étude de retard sur gel que CRP interagit avec la région régulatrice de *pap* de manière dépendante de l'AMPc (Goransson *et al.*, 1989b). Le site de liaison du complexe CRP-AMPc sur l'ADN a été localisé par empreinte génomique dans une région située entre -203 et -229 pb du site d'initiation de la transcription de *papBA*, soit à proximité du promoteur de *papI* (Goransson *et al.*, 1989b). Des analyses mutationnelles du site de liaison de CRP ont démontré que celui-ci est requis pour la transcription de *papBA* (Forsman *et al.*, 1989). Trois mécanismes différents pouvant expliquer l'activation transcriptionnelle de *papBA* ont été suggérés dans différentes études.

1^{er} mécanisme

Le complexe CRP-AMPc est requis pour l'activation de la transcription de *papI* (Forsman *et al.*, 1989; Goransson *et al.*, 1989b). Ainsi, CRP-AMPc activerait la transcription de *papBA* indirectement en stimulant l'expression du co-activateur PapI via le promoteur divergent *pI* (Goransson *et al.*, 1989b). De cette façon, dans des conditions où le taux d'AMPc est élevé (e.g. milieu M9-glycérol), le niveau de PapI augmente dans la cellule ce qui facilite la liaison de Lrp aux sites de liaison 4, 5 et 6. Cette liaison accroît la probabilité de transition vers la phase ON (Low, 1996). Dernièrement, l'hypothèse que CRP activerait indirectement la transcription de *papBA* via *papI* a été étudiée grâce à l'addition d'un plasmide qui favoriserait l'expression constitutive de PapI (Weyand *et al.*, 2001). La mutation au niveau du site de liaison de CRP ou du gène *crp* diminue la transcription de *papBA* chez *E. coli* même en présence de PapI exprimée de façon constitutive. Le complexe CRP-AMPc active la transcription indépendamment de l'expression de PapI, rejetant ainsi l'hypothèse d'une activation indirecte (Weyand *et al.*, 2001).

2^e mécanisme

Le complexe CRP-AMPc ainsi que la protéine PapB inhiberaient l'activité répressive de la protéine H-NS (Histone-like nucleoid structuring protein) (Forsman *et al.*, 1992). Il a été démontré que la transcription de *pap* chez un mutant *crp⁻* et *papB⁻* est fortement réduite (Forsman *et al.*, 1992; Goransson *et al.*, 1989b; Baga *et al.*, 1985). Néanmoins, l'introduction d'une mutation *hns* (mutant *drdX-*) dans cette souche restaure la transcription de *pap* (Forsman *et al.*, 1992). Donc, en se basant sur ces résultats, il a été proposé que le complexe CRP-AMPc et PapB agirait comme anti-répresseurs de l'activité de H-NS. Cette déduction est basée sur une étude où la fusion *pap-lacZ* est portée par des plasmides multicopies de sorte que la variation de phase est abolie. Selon une étude effectuée dernièrement à l'aide d'une fusion chromosomique *papBA-lacZ*, cette hypothèse s'est avérée inexacte puisque les résultats obtenus démontrent que CRP est nécessaire pour l'activation de la transcription de *papBA* en absence de H-NS (Weyand *et al.*, 2001).

3^e mécanisme

Le troisième mécanisme suggère que le complexe CRP-AMPc active la transcription de *papBA* par contact direct avec l'ARN polymérase comme un promoteur de classe I par la protéine CRP (Weyand *et al.*, 2001; Goransson *et al.*, 1989b). Pour ce genre de promoteur, il y a contact direct entre la région AR1 de CRP et les sous-unités α CTD de l'ARN polymérase (Figure 10).

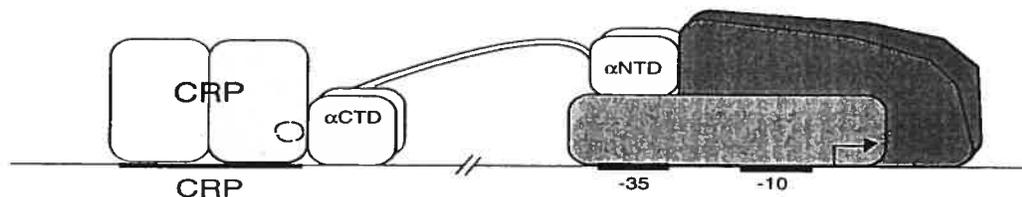


Figure 10 : Interaction entre l'ARN polymérase (α CTD) et CRP (AR1). (Figure adaptée de Busby *et al.*, 1999).

Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation de mutants dont l'activation transcriptionnelle de *papBA* a été éliminée par des mutations dans la région d'activation un (1) de CRP et également dans le domaine C-terminal (α CTD) de la sous-unité α de l'ARN polymérase (Weyand *et al.*, 2001). Néanmoins, comme le site de liaison de CRP-AMPc est situé à plus de 200 pb du promoteur de *papBA*, l'induction d'une courbure de l'ADN au niveau de la région régulatrice est nécessaire pour une interaction protéine-protéine (Weyand *et al.*, 2001; van der Woude *et al.*, 1992; Goransson *et al.*, 1989b). Selon Goransson et ses collaborateurs (1989b), cette courbure de l'ADN serait occasionnée par la protéine CRP. En revanche, Weyand et ses collaborateurs (2001) proposent une liaison coopérative de Lrp aux sites 4, 5 et 6 en aval du site de liaison de CRP pour la formation de cette courbure de l'ADN. La formation d'un complexe nucléoprotéique facilite ainsi l'interaction entre CRP, l'ARN polymérase et la région promotrice de *papBA*. Ce complexe nucléoprotéique réduirait la distance entre la protéine CRP et l'ARN polymérase et/ou alignerait la région d'activation un (1) de CRP avec le domaine α CTD de l'ARN polymérase.

2.4.4.2 La protéine PapB

PapB est une protéine régulatrice neutre (12 kDa) qui se lie à l'ADN. Elle est codée par le gène *papB* (Forsman *et al.*, 1989). Des études *in vitro* ont démontré que PapB se lie à trois sites distincts sur l'ADN. Deux de ces sites sont situés dans la région régulatrice entre les gènes *papI* et *papB*, et un autre est situé dans la séquence codante du gène *papB*. Des études d'empreinte génomique ont démontré que la protéine reconnaît un motif incluant 9 pb répétées contenant des triplets A/T en position conservée et occupe une région d'ADN supérieure à 50 pb en s'oligomérisant en un complexe de huit à dix protéines par site (Xia *et al.*, 1998). À l'aide d'expériences de mutagenèse, des régions sur PapB impliquées dans la liaison à l'ADN et dans l'oligomérisation ont été identifiées (Xia and Uhlin, 1999). En relation avec le site de liaison sur l'ADN, PapB agit comme activateur ou répresseur transcriptionnel de *pap* (Forsman *et al.*, 1989).

Le site de liaison [1] pour PapB est situé à plus de 260 pb en amont du promoteur de *papBA* et directement adjacent au site de liaison de CRP-AMPc dans la région régulatrice. PapB se lie avec une grande affinité le site [1] (Forsman *et al.*, 1989) et active en *trans* indirectement la transcription de *papBA* en stimulant celle de *papI* via le promoteur *pI* de la même façon que CRP (Forsman *et al.*, 1992; Goransson *et al.*, 1989b). La protéine PapB et le complexe CRP-AMPc agissent de façon coopérative pour stimuler la transcription à partir des promoteurs *pBA* et *pI* (Forsman *et al.*, 1989; Goransson *et al.*, 1989b). De plus, tout comme le complexe CRP-AMPc, la protéine PapB stimule la transcription de *papBA* en agissant comme anti-répresseur qui module l'activité de la protéine H-NS (Forsman *et al.*, 1992).

Le site [2] chevauche la région -10 du promoteur de *papBA*. Contrairement au phénomène associé au site [1], la protéine PapB se lie au site [2] avec une faible affinité et cette liaison entraîne une répression de la transcription de *papBA* (Forsman *et al.*, 1989). Par l'entremise du site [2], PapB exerce une autorégulation de sa transcription (Forsman *et al.*, 1989). Le site de liaison [2] fonctionne comme un opérateur où la liaison de PapB prévient l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase (Forsman *et al.*, 1989). Donc, en se basant sur les rôles opposés des sites

[1] et [2], lors de la transition de la phase OFF à ON, la protéine PapB stimule l'expression de *pap* en premier mais supprime par la suite la synthèse du fimbriae lorsque le régulateur augmente dans la cellule (Blomfield, 2001). De cette manière, PapB contrôle l'expression de *pap* au niveau de la variation de phase (en contrôlant la quantité de PapI) ainsi qu'au niveau de la transcription basale de *pBA* pour les cellules en phase ON.

Le site [3] est un site de faible affinité situé dans la région codante du gène *papB* et son rôle est indéterminé pour l'instant. Néanmoins, il a été démontré qu'une délétion du site [3] n'abolit pas l'autorégulation occasionnée par PapB (Xia *et al.*, 1998).

2.4.4.3 La thermorégulation et H-NS

Le mécanisme de thermorégulation régit l'expression de plusieurs facteurs de virulence. La bactérie a la capacité de détecter des variations de température ce qui lui sert de signal environnemental afin de déterminer si elle se trouve à l'extérieur ou à l'intérieur d'un hôte. Cette capacité lui permet d'économiser ses ressources énergétiques en prévenant la synthèse de facteurs de virulence qui seraient indispensables à la survie chez l'hôte mais nuisible ou inutile lorsque exprimé en dehors (White-Ziegler *et al.*, 1998). Par exemple, l'expression du pili Pap est abolie à une température inférieure à 26°C (White-Ziegler *et al.*, 1998; Goransson *et al.*, 1990; White-Ziegler *et al.*, 1990; Goransson *et al.*, 1989a). Pour ce qui est de *pap*, la thermorégulation s'effectue au niveau transcriptionnel (Goransson *et al.*, 1990; Blyn *et al.*, 1989). Il a été démontré, en utilisant une fusion chromosomique *papBA-lacZ*, que l'expression de l'ARNm *papBA* est assujettie à une variation de phase et à des mécanismes de thermorégulation (Blyn *et al.*, 1989). À une température de 37°C, des colonies présentent à la fois des phénotypes ON et OFF résultant de la variation de phase. À 23°C, on trouve seulement des colonies de phénotype OFF, ce qui indique que la transcription de *papBA* est abolie à des températures plus faibles (Blyn *et al.*, 1989).

Même si le mécanisme de thermorégulation de *pap* n'est pas complètement élucidé, des analyses génétiques ont indiqué que le régulateur global H-NS joue un rôle

essentiel en réprimant la transcription de l'opéron (White-Ziegler *et al.*, 1998; van der Woude *et al.*, 1995; Goransson *et al.*, 1990). La protéine H-NS (16 kDa) est présente sous forme dimérique et appartient à la famille des histones. Ce type de protéines réprime la transcription d'opérons chez *E. coli* ainsi que chez plusieurs autres bactéries entériques en modifiant la structure générale de l'ADN (Atlung et Ingmer, 1997).

Selon Goransson et ses collaborateurs (1990), la protéine H-NS agit comme «silencer» en formant des structures nucléoprotéiques semblables à la chromatine des eucaryotes qui est transcriptionnellement inactive. Selon White-Ziegler et ses collaborateurs (1998), la protéine H-NS est sensible à la température de l'environnement. À 23°C, l'oligomérisation de H-NS est altérée ce qui permet la formation d'un complexe nucléoprotéique spécifique dans la région régulatrice de *pap*. Il a été démontré *in vivo*, qu'à une température de 23°C, H-NS inhibe la méthylation des deux sites GATC dans la région régulatrice mais qu'elle n'a pas cette fonction à 37°C. Donc, la protéine H-NS bloquerait la méthylation des sites GATC directement en se liant à la région régulatrice ou indirectement via la régulation d'une autre protéine de liaison à l'ADN. La première hypothèse semble être privilégiée puisqu'il a été démontré *in vitro* que H-NS lie spécifiquement la région régulatrice contenant les sites GATC-I et GATC-II. De ce fait, la protéine H-NS bloquerait la transcription de *pap* par l'intermédiaire d'un mécanisme d'action similaire à celui de Lrp. De plus, la liaison de H-NS à l'ADN serait atténuée par des anti-répresseurs potentiels tels que CRP et PapB (Forsman *et al.*, 1992). De surcroît, il a été suggéré récemment que H-NS compromettrait la transcription de *pap* indirectement puisque que la protéine régule le niveau de protéine CRP présent chez *E. coli* (Weyand *et al.*, 2001). Malgré le peu d'information, la thermorégulation impliquerait en plus de H-NS la protéine RimJ, une N-acétyltransférase de la protéine ribosomale S5 (White-Ziegler *et al.*, 2002).

2.4.4.4 Le système Cpx

Le système Cpx est un système de transduction à deux composantes qui contrôle la réponse à un stress. Il est activé par la présence dans le périplasma de protéines de synthèse du pili (mal repliées ou agrégées) qui peuvent être toxiques pour la bactérie (Sauer *et al.*, 2000). Ce système de protection inclut une histidine kinase de la membrane interne appelée CpxA. Cette histidine kinase phosphoryle la protéine régulatrice périplasmique (CpxR) qui elle est impliquée dans l'activation de gènes codant pour des protéases (*degP*) ou pour des protéines catalysant le repliement des sous-unités fimbriaires (*dsbA*).

Il a été démontré dernièrement que le système Cpx est non seulement impliqué dans la réponse au stress cellulaire mais contrôle aussi les gènes nécessaires à la biogenèse du fimbriae et est impliqué dans la régulation de la variation de phase de *pap*. De surcroît, selon Hung et ses collaborateurs (2001), une mutation qui délaisse *cpxR* résulte en une grande augmentation du pourcentage de cellules dépourvues de Pap. Ce résultat suggère que *cpxR* joue un rôle critique dans la variation de phase, en maintenant les cellules en phase ON. De plus, une fois la voie Cpx activée, la transcription de *pI* et *pBA* est doublée (Hernday *et al.*, 2002). Pour expliquer ce rôle d'activateur, l'hypothèse a été posée que CpxR-P se lie spécifiquement à la région de *pap* contenant les sites 1 et 3 de liaison de Lrp augmentant ainsi la transition en phase ON et réduisant l'affinité de Lrp pour ces trois sites (Hernday *et al.*, 2002).

2.4.5 Autres opérons régulés de façon similaire à *pap*

L'opéron *pap* fut le premier système bactérien dans lequel a été décrit le motif de méthylation de l'ADN contrôlant l'expression génique. Aujourd'hui, nous savons qu'en plus de l'opéron *foo*, il existe plusieurs opérons chez *E. coli* et *Salmonella spp* qui partagent des caractéristiques communes avec *pap*. Par exemple, l'opéron *sfa* (codant pour le fimbriae S) et l'opéron *daa* (codant pour le pili F1845) chez *E. coli* ainsi que l'opéron *pef* (codant pour le pili Pef) chez *Salmonella typhimurium* font partie de ceux-ci (Nicholson et Low, 2000 ; van der Woude et Low, 1994). L'expression de ces opérons est dépendante de Lrp et de Dam et est régulée par le

processus de la variation de phase. De plus, ces opérons possèdent, tout comme *pap*, deux sites GATC séparés par 102 pb dans leur région régulatrice (Nicholson et Low, 2000; van der Woude et Low, 1994). Finalement, chacun de ces opérons code pour des protéines régulatrices présentant un haut degré d'homologie avec PapI et PapB.

2.5 Modulation de l'expression du fimbriae F165₁ par différentes conditions environnementales

L'expression des gènes de virulence est soumise à une régulation selon les conditions environnementales rencontrées par la bactérie afin d'optimiser le rendement énergétique de celle-ci (Crost *et al.*, 2004; Crost, thèse de doctorat, 2003; Harel et Martin, 1999). L'expression de F165₁, comme pour plusieurs autres fimbriae, est régulée par les conditions environnementales, ce qui permet une meilleure adaptation de la bactérie chez son hôte. La présence de nutriments, l'osmolarité et la température, font parti de ces facteurs environnementaux. La production du complexe F165₁ chez la souche sauvage O115 dépend de la composition du milieu de culture. Elle est réprimée en présence d'alanine ou de glucose, en condition anaérobie et/ou à une température inférieure à 37°C (Fairbrother *et al.*, 1988).

Pour quantifier l'expression de F165₁ dans différents milieux, une fusion traductionnelle chez la souche 5131 entre *fooA* et *phoA* a été utilisée (Daigle *et al.*, 2000; Daigle *et al.*, 1997). Selon les résultats de ces expériences, l'expression de F165₁ est maximale après une croissance en milieu minimal solide à une température de 37°C et en condition aérobie (Daigle *et al.*, 2000; Daigle *et al.*, 1997). L'expression de F165₂ (codé par l'opéron *fof*) est maximale en milieu riche Luria-Bertani (LB) (Daigle *et al.*, 2000). Cette différence d'expression entre *foo* et *fof* semble être en relation directe avec l'expression différentielle *in vivo* permettant à la bactérie d'optimiser sa colonisation et sa survie sous les différentes conditions environnementales rencontrées (Dezfulian *et al.*, 2001; Daigle *et al.*, 2000). De surcroît, F165₁ est régulé par la répression catabolique comme pour le pili Pap. On observe une diminution supérieure à dix fois de l'expression de PhoA lorsque du

glucose est ajouté à une concentration de 0,4% au milieu de culture (Daigle *et al.*, 2000; Daigle *et al.*, 1997).

La présence de leucine ou d'alanine exogène régule l'expression de F165₁. Lorsqu'il y a présence de ces deux acides aminés aliphatiques dans le milieu de culture, aucune variation de phase de F165₁ n'est observée (Harel *et al.*, 2000). Il est important de noter que la leucine ou l'alanine n'ont aucun effet sur la variation de phase de Pap-17 et Pap-21 (Braaten *et al.*, 1992). La présence de ces acides aminés bloque aussi la variation de phase de CS31A (membre des systèmes de régulation P) (Martin, 1996). Le mécanisme moléculaire par lequel la leucine ou l'alanine agit sur la variation de phase de F165₁ n'est pas bien connu. Il a été démontré que la L-leucine modifie l'activité de la protéine Lrp sur divers promoteurs via une modification de la courbure de l'ADN (Newman et Lin, 1995; Platko et Calvo, 1993). Le mécanisme de régulation de la famille de type P est différent de la variation de phase du fimbriae de type I (impliquant l'inversion d'un fragment d'ADN par les deux recombinaisons FimB et FimE), cette dernière est potentialisée par la présence d'un des deux acides aminés. Récemment, il a été démontré que l'acide aminé L-leucine potentialise aussi l'effet de Lrp sur l'inversion en stimulant la transition de phase promue par FimB (bidirectionnelle) et par FimE (ON à OFF) (Crost, thèse de doctorat, 2003; Roesch et Blomfield, 1998; Gally *et al.*, 1993).

Selon Harel et ses collaborateurs (2000), en présence de L-leucine ou de L-alanine à une concentration de 1 mM, la transcription basale de *foo* est fortement réduite tandis qu'à 1.5 mM la transcription basale est complètement inhibée. De surcroît, il a été démontré que la leucine et l'alanine modulent de façon négative la transcription basale de l'opéron codant pour CS31A (Martin, 1996). Finalement, l'expression de K99 (codé par l'opéron *fan*) n'est pas sujette à la variation de phase, mais est aussi réprimée par la présence de L-leucine ou de L-alanine exogène (Braaten *et al.*, 1992). Donc, la L-leucine et la L-alanine influencent négativement l'expression de F165₁ en réprimant la transcription à deux niveaux. Ces deux niveaux étant premièrement la transcription basale et deuxièmement la variation de phase (possiblement via Lrp) (Girardeau *et al.*, 1982; de Graaf et Roorda, 1982).

Dans une étude récente, il a été démontré que l'opéron *foo* est transcrit proportionnellement à la quantité de Lrp synthétisée. Ainsi, la leucine et l'alanine exogènes ont un effet répressif sur la transcription basale de *foo* et sur la variation de phase engendrée par Lrp. De surcroit, ils ont démontré qu'une mutation en C-terminal de Lrp abolie complètement cette activité et que FooI n'est pas essentiel pour observer l'effet répressif des deux acides aminés (Berthiaume *et al.*, 2004).

L'influence de plusieurs conditions environnementales sur l'expression de *foo* et *clp* a été testée. L'alanine, le milieu LB et les basses températures ont augmenté le nombre de cellules en phase-OFF, le glucose et la leucine ont seulement diminué la transcription de base de *clp* et *foo* (Crost *et al.*, 2004; Harel *et al.*, 2000; Daigle *et al.*, 2000).

De plus *in vitro*, l'alanine et la leucine ont diminué l'affinité de Lrp pour les deux régions GATC des régions régulatrices de *foo* ainsi que mesuré par retard sur gel (Crost, thèse de doctorat, 2003). L'opéron *foo* présente un mécanisme différent de *clp* car en présence d'alanine, la protection de la méthylation des deux sites GATC a été augmentée, alors qu'en présence de leucine, la protection de la méthylation des deux sites GATC a été diminuée. Dans le cas de *clp*, l'augmentation de la méthylation du site GATC-I et la protection de la méthylation du site GATC-II favorisent le profil caractéristique des cellules réprimées (Crost *et al.*, 2004; Crost, thèse de doctorat, 2003).

De surcroit, il est apparu que 12 des 14 acides aminés testés répriment la transcription de *clp*. Cinq acides aminés (alanine, méthionine, leucine, thréonine et histidine) individuellement diminuent de 60% l'expression de *clp*. Pour ce qui est de *foo*, seulement la leucine et l'alanine diminuent grandement l'expression de ce gène. De plus, à la grande surprise, la thréonine active la transcription de *foo* (Crost *et al.*, 2004; Crost, thèse de doctorat, 2003).

En alternance, le niveau de transcription basale des opérons *foo* et *clp* observé en milieu minimal M9 supplémenté avec du glycérol comme source de carbone varie faiblement avec le pH et l'osmolarité (Crost *et al.*, 2004; Crost, thèse de doctorat, 2003). Cependant, l'activité du promoteur *foo* est significativement augmentée à un

pH 5.8 et réduit à un pH 7.9 pendant que le promoteur de *clp* est seulement augmenté à un pH 5.8. La transcription basale des deux opérons est réprimée à 20°C en milieu M9 lorsque le glucose est utilisé à la place du glycérol et en milieu LB. L'effet de répression du glucose est partiellement (*clp*) ou totalement (*foo*) compensé par l'addition d'AMPC au milieu de croissance. Cependant, aucune séquence consensus pour les sites de liaison de CAP (Barber *et al.*, 1993; Kolb *et al.*, 1993) n'a été trouvée devant le promoteur *clp*, tandis que des sites potentiels de liaison pour CAP existent devant le promoteur de *foo* (Crost *et al.*, 2004; Daigle *et al.*, 2000; Ramseier et Saier, 1995).

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 celle du fimbriae F165₁ chez *E. coli* 4787. Des études sur la réponse de *foo* au surenroulement de l'ADN réalisées en multicopies sur plasmide indiquaient que le promoteur *fooB* est sensible au surenroulement (Daigle *et al.*, 2000)

Une telle étude, réalisée grâce à des souches isogéniques portant des mutations *gyrB225* et/ou $\Delta topA$, a révélé que le promoteur *fooB* 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 (M.C. Tessier, mémoire de maîtrise, 2001).

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 (M.C. Tessier, mémoire de maîtrise, 2001). L'activité du promoteur *pfooB* n'est pas négativement affectée par la transcription à partir du promoteur divergent *pfooI* 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 de *pfooB* a été confirmé lors son expression en *trans*. Par ailleurs, il a été démontré que l'activité de *pfooB* est positivement influencée par

la transcription divergente d'une cassette *tetA*. La substitution du promoteur divergent sauvage *pfooI* par le promoteur plus fort *ptrc* a significativement accru le taux transcriptionnel à partir de *pfooB*. Subséquemment, *pfooB* 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 *pfooB* au degré du surenroulement de l'ADN pourrait permettre à la souche pathogène *E. coli* 4787 d'exprimer adéquatement le fimbriae F165₁ en vue d'établir avec succès la colonisation et l'infection d'un hôte.

Troisième partie : La protéine Lrp

3.1 Généralités concernant Lrp

La protéine Lrp codée par le gène *lrp*, qui est situé à 20 minutes sur le chromosome d'*Escherichia coli*, fut identifié en 1976 comme étant un locus régulant le transport des acides aminés (Anderson *et al.*, 1976). Au fil des années, ce gène fut caractérisé par différentes équipes travaillant sur diverses caractéristiques comme la dégradation des acides aminés (*sdaA*, *tdh*) et la biosynthèse (*ilvIH*, *serA*), le transport des peptides et l'expression des fimbriae. Ainsi, il est retrouvé sous plusieurs appellations tel que «the *ilvIH* binding protein» ou encore OppI (Platko *et al.*, 1990). Finalement, le nom de Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) fut conservé puisque la régulation exercée par cette protéine est influencée par la présence de leucine dans son environnement (Platko *et al.*, 1990).

Bien que plusieurs équipes aient cloné le gène *lrp*, il fut séquencé en 1991 par Willins et ses collaborateurs (1991). La protéine Lrp fut purifiée avec une homogénéité presque complète par cette même équipe (Willins *et al.*, 1991). Originellement, Lrp fut décrit comme une protéine basique (pH 9.3) ayant un poids moléculaire de 18,8 kDa et formant en solution des oligomères principalement de type dimères (Willins *et al.*, 1991). Cependant, l'équipe de Chen (2001b) a publié qu'en concentration de l'ordre du micro-molaire, la protéine s'auto-associerait majoritairement en hexadécamère et en octamère. La présence de la leucine, qui serait un indicateur des conditions nutritionnelles rencontrées par la bactérie, induirait une dissociation de l'hexadécamère en octamère lié à la leucine (Chen *et al.*, 2001b).

La protéine Lrp est un régulateur global (au même titre que CRP et H-NS) qui affecte l'expression de 35 à 75 gènes chez *E. coli* (Newman et Lin, 1996; Newman *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 1992). La protéine Lrp mature est composée de 164 résidus incluant tous les acides aminés à l'exception du tryptophane (Willins *et al.*, 1991). Jusqu'à présent, 42 protéines démontrant des homologies avec Lrp ont été identifiées (Friedberg *et al.*, 2001). Ces homologies se situent autour de 29%. Parmi celle-ci, la protéine LrfB de *Haemophilus influenzae*, un régulateur global putatif, possède la plus grande homologie avec Lrp avec une identité de 75% (Friedberg *et al.*, 2001).

De même, la protéine LrpA, de l'archaebactérie *Pyrococcus furiosus*, une protéine Lrp putative, présente 28% d'identité avec la protéine Lrp d'*E. coli* (Brinkman *et al.*, 2000). De surcroît, Lrp présente 25% d'homologie avec AsnC, un régulateur positif du gène *asnA* (codant pour l'asparagine synthétase A) d'*E. coli* et une relation évolutive entre ces deux protéines a été proposée (Willins *et al.*, 1991).

3.2 Rôle structurel de Lrp dans la régulation

La protéine Lrp exerce sa régulation en liant l'ADN double brin contenant un site opérateur mais pas l'ADN simple brin de la même séquence (Wang et Calvo, 1993b). Lrp agit en tant que régulateur global d'un groupe de gènes, mais aussi comme un élément influençant la conformation de l'ADN (Ali Azam et Ishihama, 1999; Newman et Lin, 1996; Wang et Calvo, 1993b; Newman *et al.*, 1992). Pour l'opéron *ilvIH*, il a été confirmé par permutation, que Lrp se lie à un seul site et engendre une courbure de l'ADN de 52 degrés. De plus, l'angle de la courbure augmenterait à 135 degrés lorsque la protéine lie deux sites adjacents (Wang et Calvo, 1993b). Finalement pour certains opérons, la régulation par la protéine Lrp et notamment les changements de conformation dont elle est à l'origine, impliquerait une association avec d'autres protéines liant l'ADN telles que HU, IHF et H-NS (Paul *et al.*, 2001).

3.3 Sites de liaison de Lrp

Selon plusieurs groupes de recherche, la protéine Lrp régulerait directement l'expression de certains gènes par liaison à des séquences spécifiques sur l'ADN (Ali Azam et Ishihama, 1999; Cui *et al.*, 1995; Wang et Calvo, 1993a). Dans une étude sur la régulation de l'opéron *tdh* par la protéine Lrp et la leucine, l'équipe de Rex (Rex *et al.*, 1991) proposa une séquence consensus asymétrique pour la liaison de Lrp. Cette dernière est composée de 12 pb (5'TTTATTCTnAAT3') et est située en amont du promoteur. La séquence consensus est également retrouvée au niveau d'autres régions régulatrices adjacentes à certains promoteurs régulés aussi par la protéine Lrp comme *lysU*, *livJ* et *livKHMGF* (Rex *et al.*, 1991). D'autre part, Wang

et Calvo (1993a) proposèrent un autre site de liaison pour Lrp. L'analyse des six sites de liaison de Lrp, situés dans la région régulatrice de l'opéron *ilvIH*, a permis de définir une seconde séquence consensus asymétrique (5'AGAATTTTATTCT3'). Si on compare les deux séquences consensus identifiées, seul le pentamère TTTAT est commun à celles-ci (van der Woude *et al.*, 1992). De surcroît, suite à l'analyse de 63 séquences d'ADN liant Lrp, Cui et ses collaborateurs (1995) ont proposé une séquence similaire à celle de Wang et Calvo (5'YAGHAWATTWTDCTR3', où Y= C ou T, H= pas G, W= A ou T, D= pas C et R= A ou G). Il est à noter que la séquence consensus retrouvée chez l'opéron *pap* (5'Gnn(n)TTTt3') diffère des autres séquences consensus rapportées précédemment (Nou *et al.*, 1995). Il semble donc que la protéine Lrp reconnaisse non pas une séquence spécifique sur l'ADN, mais plutôt un motif répété de A et de T ou un motif structural (Newman *et al.*, 1996; Newman et Lin, 1996; Calvo et Matthews, 1994). Finalement, la protéine Lrp lierait différemment l'ADN selon la sensibilité des opérons à la leucine (ex: *ilvIH*) versus (ex: *pap*) (van der Woude *et al.*, 1992).

3.4 Régulation de la biosynthèse de Lrp

La protéine Lrp est relativement abondante dans la cellule en «milieu minimal en glucose». Elle représente environ 0,1% des protéines cellulaires totales, ce qui correspond à environ 3000 dimères par cellule tel qu'estimé par Western blot par l'équipe de Willins (Willins *et al.*, 1991). La présence de la protéine Lrp en concentration très élevée est létale pour la bactérie (Chen et Newman, 1998; Borst *et al.*, 1996) tandis qu'en concentration très faible, le temps de genèse est grandement augmenté (Borst *et al.*, 1996). Donc, la biosynthèse de cette protéine doit être régulée précisément, comme pour la plupart des facteurs de transcription, dans le but d'assurer la survie et la croissance de la bactérie. La protéine Lrp contrôle sa propre transcription (Wang *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1992). Des études effectuées avec une fusion chromosomique *lrp::lacZ* ont appuyé la théorie selon laquelle le gène *lrp* est régulé de façon autogène. Selon les expériences de Wang et ses collaborateurs (1994), en milieu pauvre en glucose, l'expression de la fusion *lrp::lacZ* est augmentée de deux à trois fois chez une souche sans *lrp* fonctionnel. En revanche,

selon Lin et ses collaborateurs (1992), l'expression est diminuée de dix fois par la présence de *lrp* inséré dans un plasmide présent en multicopies. Cette autorégulation implique la liaison de la protéine Lrp entre 32 et 80 pb en amont du site d'origine de la transcription de *lrp* comme l'équipe de Wang (1994) a pu le constater par des études de retard sur gel et d'empreinte génomique, ainsi que par des études de mutations et de délétions.

Les conditions de croissance ont un effet étonnant sur l'expression du gène *lrp*. Il a été observé par l'équipe de Lin (1992), à l'aide d'une fusion chromosomique *lrp::lacZ*, qu'en milieu riche LB l'expression du gène *lrp* est diminuée de plus de dix fois. Ce même «effet répresseur» observé en milieu LB a presque été égalé en ajoutant des acides aminés, à une concentration de 1%, au milieu pauvre en glucose (Chen *et al.*, 1997). Ces résultats indiquent que la plupart des effets du milieu LB sur la concentration de la protéine Lrp sont dues à la présence des acides aminés. Donc, la protéine Lrp est moins synthétisée en présence d'une forte concentration en métabolites ou encore en milieu riche (e.g. tractus intestinal). Ces résultats supportent la théorie du festin versus celui de la carence décrits par Calvo et Matthews (1994). En condition de carence, c'est-à-dire dans des conditions de croissance pauvre en métabolites, Lrp active à un niveau optimal les gènes de synthèse (gènes de biosynthèse des acides aminés, gènes impliqués dans l'assimilation de l'ammonium, certains gènes codant pour des pili). En revanche, lors de festin, la protéine Lrp réprime les gènes impliqués dans le catabolisme et le transport des acides aminés. De ce fait, la protéine Lrp permet l'adaptation d'*E. coli* aux changements majeurs de son environnement (Hung *et al.*, 2001; Calvo et Matthews, 1994).

Cette chute d'expression de la protéine Lrp en milieu riche est régulé par un mécanisme qui demeure encore inconnu car cette diminution ne dépendrait pas seulement de l'autorégulation de la protéine (Lin *et al.*, 1992). D'un côté, la diminution de concentration de la protéine Lrp en milieu riche s'explique en partie par une dilution de la protéine entraînée par la division cellulaire ou par la dégradation des protéines existantes (Ernsting *et al.*, 1993). D'un autre côté, l'expression du gène *lrp* serait régulée par le taux de croissance plutôt que par les composantes du milieu (Landgraf *et al.*, 1996). Dans cette même étude, il a été

stipulé que l'environnement nutritionnel régule l'expression du gène *lrp* et que le niveau d'activité du promoteur est stimulé par la guanidine 3',5' bis-pyrophosphate (ppGpp) dont le niveau fluctue lorsque le taux de croissance augmente. De ce fait, le faible taux de croissance en milieu pauvre favorise une augmentation du niveau de ppGpp encourageant une expression bonifiée de la protéine Lrp. Cependant, les résultats obtenus par Landgraf et ses collaborateurs (1996) furent remis en question lors d'une étude effectuée par l'équipe d'Ali Azam (1999). La concentration cellulaire de Lrp fût déterminée à différentes phases de croissance en milieu LB riche à l'aide de Western blot effectués avec des anticorps dirigés contre Lrp. Les résultats obtenus ont indiqué que la concentration intracellulaire de Lrp est de 2500 molécules par cellule en phase exponentielle de croissance et une chute rapide du niveau de Lrp est observée en phase stationnaire. Cette découverte ébranle ainsi l'hypothèse de l'équipe de Landgraf (1996) qui suggère que le niveau de Lrp est inversement proportionnel au taux de croissance.

Selon les résultats obtenus par l'équipe de Chen (1997), certains acides aminés ont des effets sur l'expression du gène *lrp*. Ils ont démontré à l'aide d'une fusion transcriptionnelle *lrp::lacZ* que l'addition de la plupart des acides aminés réprime l'expression du gène *lrp*. Seul la leucine et les acides aminés aromatiques n'ont pas d'effet sur l'expression de ce gène (Chen *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1992). La source de carbone disponible en milieu pauvre peut également faire varier le niveau intracellulaire de la protéine Lrp (Chen *et al.*, 1997; Newman et Lin, 1996; Newman *et al.*, 1996).

De plus, la liaison non-spécifique de la protéine Lrp à l'ADN dans un modèle *in vivo* affecte la concentration de la protéine Lrp libre dans la cellule ce qui influence l'interaction de Lrp avec les séquences d'ADN cibles spécifiques. Récemment l'équipe de Chen (2001a) ont étudié la distribution de Lrp et de ppGpp dans la cellule lors de la croissance bactérienne dans diverses conditions nutritionnelles. Lors de cette étude, ils ont démontré la chute de la concentration de protéine Lrp lorsque le taux de croissance augmente et la diminution de la proportion de Lrp libre après l'apport supplémentaire en leucine. Cette diminution est encore plus prononcée lorsque les cellules se multiplient rapidement comme en milieu LB riche. Par

conséquent, ces résultats sont en accord avec le fait que la protéine Lrp active les voies de biosynthèse et réprime les voies de dégradation. En considérant le cas d'*Escherichia coli*, qui se développe relativement lentement en milieu minimal, donc beaucoup de protéine Lrp libres, peu de Lrp liées non-spécifiquement. Les opérons activés par la protéine Lrp dans des conditions de croissance correspondant à la famine (opérons de biosynthèse) et ont des sites de liaison (à proximité de leur promoteur), intégralement occupés par la protéine Lrp. Le même patron est plausible pour les opérons réprimés par la protéine Lrp (opéron de dégradation). Inversement, lors d'un scénario au cours duquel il y aurait croissance rapide en milieu riche (peu de protéine Lrp libres, beaucoup de protéine Lrp liées non-spécifiquement), ces opérons de biosynthèse seront inactifs alors que les opérons de dégradation seront stimulés.

3.5 La structure de la protéine Lrp

3.5.1 Les domaines fonctionnels de la protéine Lrp

La protéine Lrp est constituée de trois domaines fonctionnels (domaine de liaison à l'ADN, domaine d'activation de la transcription, domaine d'auto-association et de réponse à la leucine). Ces domaines furent identifiés lors d'une étude dans laquelle le gène *lrp*, inséré dans un plasmide, a été soumis à une mutagenèse *in vitro*. Ce plasmide fut introduit dans une souche possédant une fusion transcriptionnelle *ilvIH::lacZ* (Platko et Calvo, 1993).

A) La région N-terminale : Domaine de liaison à l'ADN

Le domaine de liaison à l'ADN est situé entre les acides aminés 16 à 70 de la partie N-terminale de la protéine (Figure 11). Il a été démontré par retard sur gel que les protéines ayant des mutations dans la région N-terminale perdent leur capacité à se lier aux sites situés en amont d'*ilvIH*. De surcroît, le degré d'expression du promoteur d'*ilvIH*, mesuré par l'activité de la β -galactosidase, est très faible *in vivo*. Les modifications au niveau de cette partie annihilent la possibilité de formation du

complexe Lrp-ADN et diminue le degré d'expression du promoteur (Platko et Calvo, 1993). Par conséquent, cette région de la protéine coïncide avec le domaine de liaison à l'ADN.

Chez les procaryotes, les protéines qui se lient à l'ADN ont souvent un motif structural « hélice-tour-hélice (HTH) ». Ces protéines sont constituées d'une courte hélice α , d'un tour (incluant dans la plupart des cas une glycine) et d'une seconde hélice pouvant former un contact spécifique avec certaines bases à l'intérieur du site de liaison à l'ADN (Prescott et Klein, 1995). Pourtant, selon des alignements de séquences avec des motifs protéiques connus, la protéine Lrp dispose seulement d'un motif HTH putatif (Platko et Calvo, 1993). La protéine Lrp possède généralement la première hélice α et le tour entre les résidus 29 et 41 mais la région correspondant à l'hélice de reconnaissance de l'ADN est moins bien définie. Une étude faite par Platko et Calvo (1993) démontre que les mutations affectant la liaison à l'ADN sont situées très près ou à l'intérieur de la région HTH putative.

De plus, selon une étude de Zinser et Kolter (2000), la présence du motif est également supportée par le fait que la délétion de la glycine 39 inhibe la liaison de la protéine à l'ADN. Suite à une étude cristallographique d'une protéine Lrp, la présence de la région HTH putative chez la protéine Lrp d'*E. coli* a été suggérée. Dans cette même étude, des analyses de la structure et des comparaisons de séquences ont confirmé la présence du motif HTH dans la région N-terminale entre les résidus 21 et 45 (Leonard *et al.*, 2001).

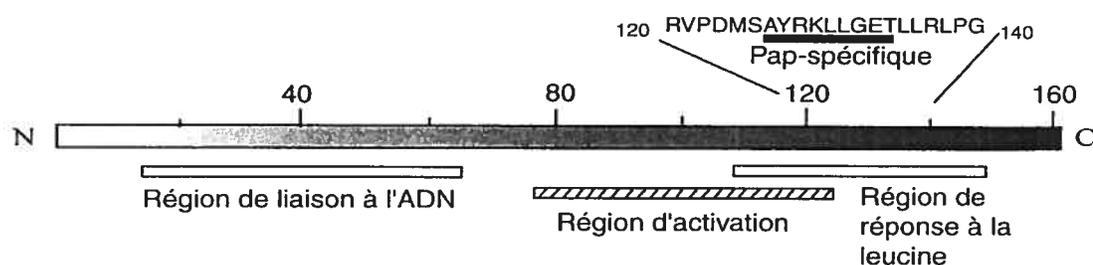


Figure 11: Carte fonctionnelle de Lrp. Les régions requises pour la liaison à l'ADN, l'activation et la réponse à la leucine décrites par Platko et Calvo (1993) sont indiquées. La région *pap*-spécifique décrite par Kaltenbach *et al.* (1998) est également présentée (Figure adaptée de Kaltenbach *et al.*, 1998).

B) Région centrale : Domaine d'activation de la transcription

Le domaine d'activation est situé au centre de la molécule (Figure 11) entre les résidus 76 et 125. Platko et Calvo (1993) ont démontré que des mutations ponctuelles dans cette région n'affectent pas le patron de liaison de Lrp aux sites en amont d'*ilvIH* *in vitro*. Cependant, ces mutations affectent l'expression du promoteur de *ilvIH* qui est réduite de 3 à 12 fois.

Dans la région centrale une hélice α amphipathique a été retrouvée contenant de nombreux résidus chargés négativement. Cette structure est fréquemment retrouvée chez des facteurs de transcription de procaryotes et d'eucaryotes. Elle est primordiale au mécanisme d'activation. Pourtant, les mutations qui affectent l'activation de la transcription sont situées à l'extérieur de cet arrangement (Platko and Calvo, 1993).

C) Région C-terminale : Domaine d'auto-association et de réponse à la leucine

Il a été stipulé récemment que pour une concentration de l'ordre du μM , la protéine Lrp s'oligomérisse majoritairement en hexadécamères et à un moindre niveau en octamères. De surcroît, la région C-terminale de Lrp est essentielle dans l'auto-association des monomères puisque la délétion des 11 derniers résidus affecte fortement la capacité d'oligomérisation de la protéine. La région C-terminale de la protéine est donc impliquée dans l'auto-association de la protéine Lrp.

Dans plusieurs études, il a été démontré que la présence de la leucine diminue la liaison de la protéine Lrp aux sites situés en amont du promoteur de *ilvIH* (Marasco *et al.*, 1994; Ricca *et al.*, 1989). Cependant, lorsqu'il y a des mutations spécifiques dans la région C-terminale de la protéine, *in vitro*, la leucine n'affecte pas le patron de liaison de la protéine Lrp à l'ADN et l'expression du promoteur du gène *ilvIH* reste identique en présence ainsi qu'en absence de l'acide aminé leucine (Platko et Calvo, 1993). La région C-terminale représente donc un domaine nécessaire à l'effet de répression produit par l'acide aminé leucine. Ce domaine situé entre les résidus 108 et 149 de la molécule, entrecoupe le domaine d'activation (Figure 11). Platko et Calvo (1993) ont isolé sept mutations permettant cette insensibilité (Leu108, Asp114,

Met124, Leu136, Tyr147, Val148 et Val149). Ces structures mutées ont dernièrement été comparées à la structure cristalline de l'homologue LrpA, qui est insensible à l'acide aminé leucine, de *Pyrococcus furiosus* (28% d'identité), présent seulement sous forme octamérique (tétramère de dimères). Suite à cette comparaison aux résidus homologues, il a été observé que cinq de ces sept résidus mutés sont regroupés en une seule région traversant l'interface du dimère tandis que les deux autres mutations se situent plutôt dans une région adjacente impliquée dans l'auto-association des dimères. Ces résultats suggèrent que ce secteur influence l'état multimérique de la protéine. De plus, les séquences de Lrp et de son homologue AsnC ont été comparées à la structure de LrpA afin d'identifier des sites possibles de liaison avec la leucine ou avec l'arginine (Leonard *et al.*, 2001). Contre toute attente, aucun site chevauchant la région de réponse à la leucine localisée en C-terminal n'a été obtenu par l'alignement de séquence/structure. Néanmoins, trois sites putatifs de liaison ont été identifiés dans le domaine N-terminal de la protéine Lrp, ce qui n'apporte aucun indice structurel concernant l'interaction entre l'acide aminé et la protéine en C-terminal.

Des résultats obtenus par Chen et Calvo (2002) par mesure de fluorescence, suggèrent que la protéine Lrp a deux sites de liaison à la leucine, un de faible affinité et un autre de haute affinité. Le site de faible affinité est primordial dans le maintien de l'état multimérique de la protéine Lrp tandis que le rôle de celui de haute affinité demeure obscur. En contrepartie, l'intégrité du site de haute affinité serait requise pour que la protéine lie l'acide aminé au site de faible affinité. La localisation exacte sur la protéine de ces deux sites essentiels n'a pas encore été identifiée.

Pour comprendre le lien entre la fonction d'auto-association et la fonction de réponse à la leucine de la région C-terminale de la protéine Lrp, une étude a été réalisée par l'équipe de Chen (2001b). Il a été démontré, que la présence de leucine induit la dissociation de l'hexadécamère en octamères liés à l'acide aminé leucine. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus par cristallographie de la protéine LrpA, suggèrent que la leucine agit sur l'interaction entre les domaines C-terminaux menant à l'auto-association de la protéine Lrp.

3.5.2 La région *pap* spécifique de Lrp

Selon les études faites par l'équipe de Nou (1995), l'activation par la protéine Lrp de la transcription du gène *pap*, contrairement au gène *ilvIH*, exige la présence du co-régulateur PapI. Selon l'équipe de Blyn (1990), la transcription est aussi dépendante de la méthylation. Grâce à des révélations chromogéniques de l'activité des fusions transcriptionnelles permettant de différencier l'activité des promoteurs (*papBA-phoA*, *ilvIH-lacZ*), des mutations inhibant la variation de phase de Pap, au niveau de la protéine Lrp, mais ayant peu d'effet sur la transcription de *ilvIH* ont été identifiées (Kaltenbach *et al.*, 1998). Selon l'équipe de Kaltenbach (1998), la substitution des acides aminés Ala126, Glu133 et Thr134 de Lrp, situés en dehors du domaine de liaison à l'ADN et du domaine d'activation de la transcription, réduit fortement la transition vers la phase ON chez le pili Pap. Lors d'analyses *in vitro*, il a été observé que les mutants Lrp^{T134A} et Lrp^{E133G} maintiennent la même affinité pour l'ADN de *pap* et d'*ilvIH*. De plus, ces mutants répondent aussi bien à la protéine PapI que la souche contenant la protéine Lrp sauvage. Ces résultats indiquent que les mutants Lrp sont déficients lors d'une interaction requise pour la transition de la phase OFF vers la phase ON chez *pap* et non requise chez *ilvIH*. Cependant, le rôle spécifique de la région *pap* ainsi que ces différentes interactions demeurent encore inconnus.

3.6 Le classement des différents systèmes régulés par Lrp

La protéine Lrp peut agir soit comme activateur ou comme répresseur transcriptionnel. De surcroît, son activité peut être réprimée, potentialisée ou demeure inchangée en présence de leucine et/ou d'alanine (acides aminés aliphatiques). Peu d'études réalisées jusqu'à présent avec l'alanine démontrent un effet similaire à celui de la leucine. Le classement se fait donc dans six familles selon le rôle de la protéine Lrp et l'effet de l'acide aminé leucine :

● La Famille 1:

Comprend les gènes activés par la protéine Lrp et la présence de la leucine qui inhibe l'action Lrp.

● La Famille 2:

Comprend les gènes réprimés par la protéine Lrp et la présence de la leucine qui inhibe l'action de Lrp.

● La Famille 3:

Comprend les gènes activés par la protéine Lrp et la présence de la leucine qui potentialise l'action de Lrp.

● La Famille 4:

Comprend les gènes réprimés par la protéine Lrp et la présence de la leucine qui potentialise l'action de Lrp.

● La Famille 5:

Comprend les gènes activés par la protéine Lrp et la présence de la leucine qui n'intervient pas avec l'action de Lrp.

● La Famille 6 :

Comprend les gènes réprimés par la protéine Lrp et la présence de la leucine qui n'intervient pas avec l'action de Lrp.

3.7 Le mécanisme d'action des acides aminés leucine et alanine

La protéine Lrp a été décrite comme étant la médiatrice de l'effet que la leucine a sur certains gènes ou opérons. Cette caractéristique explique la provenance de son nom : Leucine-Responsive Regulatory Protein. Selon l'équipe de Marasco (1994), la protéine Lrp se lie à la L-leucine avec une constante de dissociation de 1.22×10^{-5} M. Approximativement 2 Moles de L-leucine se fixent par Mole de dimère de protéine Lrp.

La leucine interagit directement avec la protéine Lrp ce qui conduit à un changement conformationnel de la protéine réduisant ainsi son affinité pour la région promotrice

(Marasco *et al.*, 1994). Plusieurs études de retard sur gel soutiennent ce point de vue. De surcroît, plusieurs équipes dont Nou et ses collaborateurs (1995) ont confirmé que la leucine inhibe l'effet activateur de la protéine Lrp sur les promoteurs d'*ilvIH* et de *gltBDF*. La leucine inhibe aussi l'effet répresseur de la protéine Lrp sur le promoteur de *lysU* en réduisant l'affinité de la protéine pour ses sites de liaison (Ernsting *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1992; Ricca *et al.*, 1989). Dans un même ordre d'idée, l'équipe de Zhi (1999) a démontré d'une part, que la leucine et l'alanine, qui activent l'expression de *dadAX*, diminuent l'affinité de la protéine Lrp pour les sites répresseurs sans avoir d'effet sur la liaison de la protéine sur les sites activateurs. D'autre part, selon l'équipe d'Ernsting (1993), l'effet de l'acide aminé leucine sur la liaison de la protéine Lrp à l'ADN est saturable ce qui suggère que la liaison de la leucine à Lrp module mais n'abolit pas l'affinité de Lrp pour la région promotrice de l'opéron.

Une étude comparative d'Ernsting et de son équipe (1993) entre les promoteurs de *gltBDF* et d'*ilvIH* régulés positivement par la protéine Lrp suggère un modèle qui explique l'action de la leucine. Selon ce modèle, les gènes ou les opérons ayant des sites de liaison de forte affinité pour Lrp (ex: *gltBDF*, $K_d = 2,0$ nM) sont moins influencés par l'effet de la leucine que ceux liant la protéine Lrp avec une faible affinité (ex: *ilvIH*, $K_d = 6,9$ nM). De surcroît, ce modèle suggère que pour chaque gène correspond une concentration de protéine Lrp à laquelle l'effet de la leucine sur l'expression est maximale. À une concentration suffisamment élevée de Lrp, il y a formation de complexes Lrp/promoteur tant en présence qu'en absence de l'acide aminé leucine. De plus, le promoteur devient insensible à la présence de cette dernière à forte concentration. Cependant, à une concentration suffisamment faible de Lrp, les opérons régulés par Lrp sont plus sensibles à la présence de la leucine (Ernsting *et al.*, 1993).

L'équipe de Chen (2001b) a étudié les mécanismes permettant à la leucine d'affecter l'expression de certains gènes régulée par la protéine Lrp. Lors de cette étude, l'auto-association de la protéine Lrp et l'effet de la leucine sur cette auto-association ont été examinés de différentes façons (par diffusion de la lumière, par liaison chimique croisée et par ultracentrifugation analytique). Comme mentionné précédemment, la leucine régule l'activité de la protéine Lrp en agissant sur l'interaction entre les

domaines C-terminaux menant à l'auto-association de Lrp. En se fondant sur les résultats obtenus, un modèle a été suggéré pour expliquer les six patrons de régulation de la protéine Lrp et de la leucine sur certains gènes (Figure 12). Selon cette hypothèse, les hexadécamères/octamères et les octamères liés à la leucine sont des formes actives de Lrp qui régulent la transcription de nombreux opérons. L'ajout de leucine favorise la transformation de l'hexadécamère ou de l'octamère en octamère lié à la leucine, forme inactive de la protéine Lrp pour ces opérons. Inversement, pour les opérons qui sont activés ou réprimés par la protéine Lrp et pour lesquels l'effet de cette protéine est potentialisé par la leucine, l'octamère lié à l'acide aminé est la forme active. Dans le cas de ces gènes, la leucine intensifie l'effet de la protéine Lrp en favorisant la conversion des hexadécamères ou des octamères en octamères liés à la leucine. Somme toute, l'hexadécamère, l'octamère et l'octamère lié à la leucine sont hypothétiquement les formes actives pour les opérons régulés par la protéine Lrp et sont insensibles à la présence de la leucine exogène.

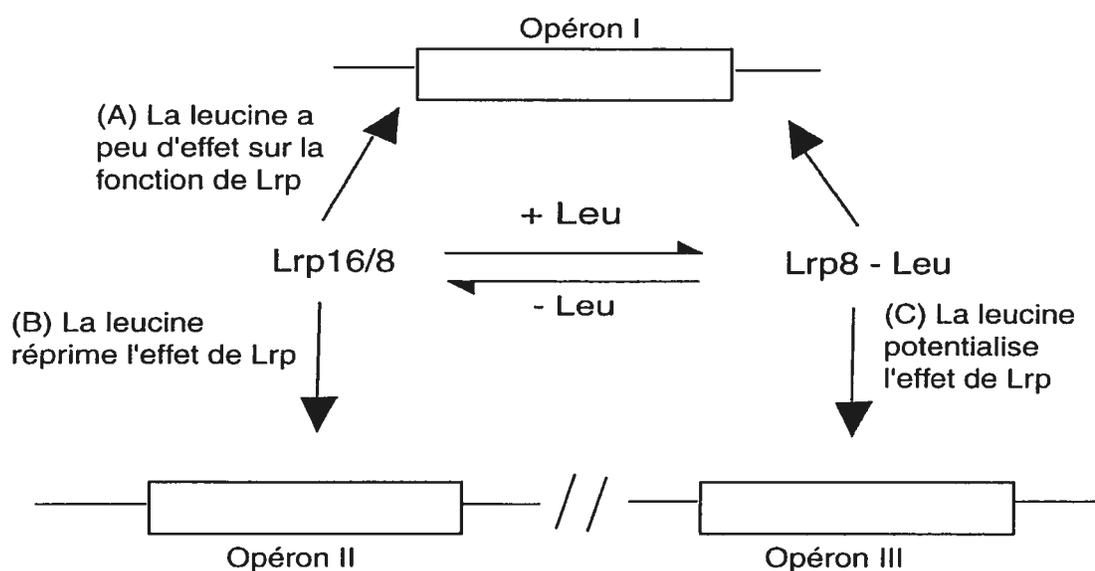


Figure 12: Modèle des divers effets de la leucine sur la fonction de Lrp (Figure adaptée de Chen *et al.*, 2001b).

Une étude réalisée récemment par Chen et Calvo (2002) suggère que l'hypothèse de l'état multimérique de la protéine Lrp semble jouer un rôle indispensable dans la réponse à la leucine. Lors de cette étude, l'auto-association des protéines Lrp

mutantes insensibles à la leucine (Asp114 et Leu136) a été examinée et un état octamérique paraît être privilégié, à l'inverse pour la protéine sauvage où c'est l'hexadécamère. D'autre part, la capacité de liaison de la leucine à ces protéines Lrp mutantes a également été étudiée et aucune différence n'a été perçue. En conséquence, ces résultats suggèrent que la transition de l'hexadécamère vers la forme octamérique lié à la leucine est requise pour la sensibilité à la leucine.

L'effet de l'alanine exogène sur la protéine Lrp, contrairement à la leucine, a été très peu étudié jusqu'à ce jour. Grâce à des profils de protéines observés à l'aide de gels d'électrophorèse en 2D (Ernsting *et al.*, 1992) et des études de retard sur gel (Zhi *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1992), l'effet de l'alanine sur les gènes régulés par la protéine Lrp apparaît similaire à celui observé avec la leucine. Aucun gène régulé par l'alanine et n'étant pas régulé par la leucine n'a été identifié jusqu'à ce jour (Braaten *et al.*, 1992).

Quatrième partie : L’empreinte génomique

4.1 Généralités concernant l’empreinte génomique

L'empreinte génomique est une méthode qui sert à visualiser directement la liaison d'une protéine sur une séquence spécifique de l'ADN (Galas et Schmitz, 1978). Cette expérience est habituellement utilisée en combinaison avec le retard sur gel pour identifier des facteurs nucléaires (chez les eucaryotes) et cytoplasmiques (chez les procaryotes) qui se lient à des séquences dans les régions régulatrices d'un gène. L'empreinte génomique est générée lorsqu'un facteur de transcription protège un segment de l'ADN de l'activité nucléotidique d'un agent de coupure. Dans une expérience typique, les patrons de coupure obtenus pour un fragment d'ADN cible, en présence ou en absence de l'extrait nucléaire ou cytoplasmique sont comparés. L'empreinte génomique apparaît comme un endroit où aucune coupure n'a été faite en présence d'un extrait protéique. En comparant la mobilité électrophorétique des produits de la coupure à ceux d'une échelle dérivée du même fragment d'ADN, la position de l'empreinte génomique (l'endroit où la protéine se lie sur l'ADN), pourra être déterminée. En résumé, cette méthode est sensible et procure une résolution de niveau nucléotidique.

La clé du succès avec l'empreinte génomique repose sur l'établissement des conditions de coupure qui vont générer des différences reproductibles lorsque ce même segment d'ADN sera traité en présence et en absence de la protéine. L'avantage de cette méthode repose dans la comparaison côte à côte sur un gel de séquençage des produits coupés obtenus en présence et en absence de la protéine.

4.2 Description et caractéristiques du matériel

4.2.1 Les agents de coupures

Deux types d'agents de coupure pour l'ADN peuvent être utilisés pour l'empreinte génomique. Une enzyme comme la DNaseI est utilisée car elle coupe les liens phosphodiester de la charpente de l'ADN. Alternativement, des agents chimiques

comme les radicaux hydroxyles et les ions cuivre-phénanthroline sont des complexes qui coupent en oxydant la partie désoxyribose de l'ADN (Hertzberg et Dervan, 1984; Sigman *et al.*, 1979).

La DNaseI

À l'origine, l'enzyme DNaseI a été utilisée pour développer la méthode d'empreinte génomique (Schmitz et Galas, 1979; Galas et Schmitz, 1978). Malgré la découverte subséquente de méthodes chimiques élégantes pour couper l'ADN, la DNaseI demeure encore aujourd'hui le premier choix pour l'empreinte génomique. L'enzyme DNaseI, en présence de Mg^{2+} , introduit des coupures entre chaque brin du double-brin d'ADN, indépendamment. Néanmoins, les coupures produites apparaissent au «hasard» (coupures non-spécifiques), ce qui cause des résultats discordants entre plusieurs groupes de recherche. D'un côté, l'analyse biochimique du produit de la digestion de l'ADN montre seulement quelques faiblesses dans la spécificité (Bernardi *et al.*, 1975; Ehrlich *et al.*, 1973). D'un autre côté, l'équipe de Scheffler (1968) a démontré que la DNaseI a une préférence marquée pour les coupures poly[d(A-T)]•poly[d(A-T)] à l'extrémité 5' de résidus T. Ce résultat est confirmé par l'homopolydimérique [d(A-T)]_n de Lomonossoff et ses collaborateurs (1981). Néanmoins, cette spécificité est due à une conformation inhabituelle de l'association de la DNaseI avec l'homopolydimère plutôt qu'à une préférence de l'enzyme pour une séquence particulière (Klug *et al.*, 1979).

L'analyse des structures cristallines des complexes formés par la DNaseI et de courts oligonucléotides double-brin démontre qu'une boucle exposée de l'enzyme se lie, dans un site mineur de l'ADN avec les deux brins d'acides nucléiques (Suck et Oefner, 1986; Suck *et al.*, 1984). Les régions de l'ADN riches en thymine et adénine sont très rigides et sont des sites mineurs de liaison. L'équipe de Suck (1988) a suggéré que les liens A-T de l'ADN peuvent être relativement résistants à la coupure par l'enzyme DNaseI.

En regard de cette confusion, il est prudent de vérifier que la DNaseI ne montre pas de différences majeures dans son patron de coupure sur l'ADN cible radio-marqué qui n'a pas été incubée avec la protéine. Les différences peuvent être éliminées par

des expériences pilotes, qui servent à établir les conditions optimales de coupure par la DNaseI, de l'ADN cible radio-marqué. Le but de ces expériences est de couper chaque molécule d'ADN, une fois entre chaque site de marquage radioactif et une fois à l'extrémité distale du site de liaison. Plus grande est la distance entre chaque radio-marquage et le site de liaison, plus faible est la quantité de coupures requises. Les expériences pilotes sont habituellement effectuée en utilisant plusieurs concentrations d'enzyme pour déterminer les conditions sous lesquelles l'ADN nu sous-réagit (la majorité du fragment original demeure non-coupé et les bandes formées par l'échelle sont pâles) ou sur-réagit (peu du fragment original demeure non-coupé et les fragments les plus petits sont sur-représentés dans la digestion). Comme guide rudimentaire, une quantité de DNaseI devrait être utilisée pour couper environ 50% des molécules radio-marquées lors de la réaction. Pour des variations du protocole, on peut consulter plusieurs études de référence (Lakin, 1993; Hochschild, 1991; Tullius *et al.*, 1987).

Le but est d'établir des conditions où une coupure partielle de l'ADN cible par la DNaseI produit des brins différents les uns des autres en longueur par une seule base après la digestion. Idéalement, il ne devrait pas y avoir d'espace dans cette échelle et pas de différences dramatiques dans l'intensité des bandes. En pratique cependant, il est habituellement impossible d'obtenir ce niveau de discrimination, même avec de l'ADN nu.

Une observation fréquemment associée avec l'utilisation de la DNaseI pour l'empreinte génomique est l'apparition de bandes intenses lors de l'autoradiogramme des échantillons incubés avec la protéine qui lie l'ADN et l'enzyme de coupure. Ces sites sont appelés hypersensibles, ce qui reflète une augmentation des coupures de l'ADN par la DNaseI. Ces bandes intenses sont le résultat de changements conformationnels de l'ADN double-brin se liant à la protéine ou encore, d'interactions protéine-protéine entre la nucléase et la protéine qui devrait se lier à l'ADN. La nature de ces changements conformationnels n'est pas encore très bien comprise, mais ils peuvent être reliés à l'emplacement des liaisons, aux changements de bases (Klimasauskas *et al.*, 1994) ou à l'augmentation de l'ADN simple-brin

(Kimball *et al.*, 1995) dans l'ADN apportée par la liaison avec la protéine. Les sites hypersensibles accompagnent toujours une véritable empreinte génomique.

Lorsque des brins d'ADN courts sont utilisés comme substrat pour la DNaseI, «l'effet de terminaison» devient apparent (Lomonossoff *et al.*, 1981; Galas et Schmitz, 1978). La probabilité qu'un lien phosphodiester particulier soit coupé augmente en fonction de la distance avec l'extrémité 5' du brin d'ADN, au moins aussi loin que le huitième lien phosphodiester. Il est donc important de s'assurer que la région d'empreinte génomique ne se trouve pas très proche de l'extrémité 5' marquée du fragment d'ADN.

Habituellement, les réactions d'empreinte génomique sont analysées côte à côte à l'aide de la réaction de Maxam-Gilbert sur un gel de séquençage d'ADN. Si l'empreinte du fragment d'ADN est marquée à son extrémité 5', les bandes autoradiographiques obtenues des deux ensembles de réactions ne peuvent pas être alignées parce que les produits radio-marqués transportent des groupes différents à leur extrémité 3'. Les réactions chimiques reliées à des bases spécifiques provoquent le retrait d'une base et de son sucre, ce qui génère un brin d'ADN phosphorylé à son extrémité 3' hydroxyle. La mobilité électrophorétique de cette réaction de coupures chimiques est relativement meilleure que celle des fragments produits par la digestion avec l'enzyme DNaseI. Ce problème est d'autant plus sévère lorsque de petits fragments d'ADN sont à l'étude.

Les fragments d'ADN représentant des promoteurs eucaryotiques contiennent souvent de multiples sites de liaison pour un ou plusieurs facteurs de transcription. Pour définir précisément les liens de chaque empreinte génomique, il est préférable d'expérimenter des méthodes où les fragments d'ADN sont marqués en 5' dans une expérience et en 3' dans une seconde. En comparant les régions d'ADN protégées dans les deux expérimentations, les subtilités dans les liens peuvent être détectées, et un portrait plus précis du site de liaison et de sa relation avec les protéines peut être établi. L'utilisation de fragments marqués en 3' élimine aussi le problème des différences de migration électrophorétique entre l'ADN standard généré par la coupure de Maxam-Gilbert (Figure 13) et l'empreinte génomique, puisque dans ce cas, tous les fragments d'ADN vont avoir une extrémité 3' phosphorylée.

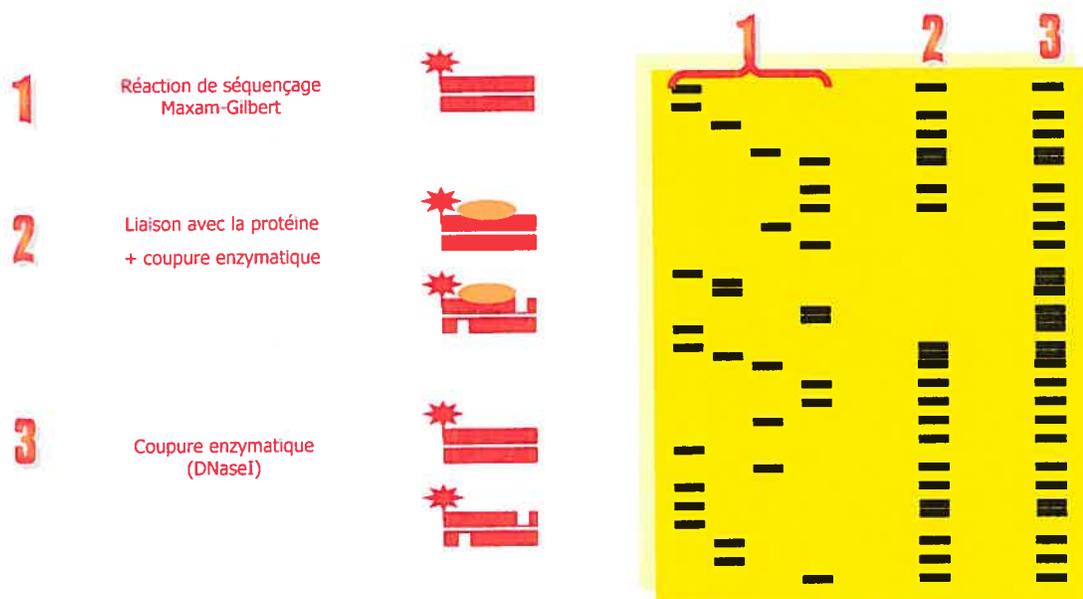


Figure 13 : Représentation schématique d'une empreinte génomique accompagnée d'une réaction de Maxam-Gilbert. Un fragment d'ADN double-brin de longueur définie est premièrement marqué à l'extrémité de un des ces brins, incubé avec une protéine qui a une liaison putative avec l'ADN puis incubé avec un agent de coupure sous des conditions qui résulte en un événement de coupure moyen par molécule marquée. L'ADN est ensuite purifié et analysé par électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide. Si les coupures adviennent au hasard, la population résultante de fragments d'ADN simple-brin va différer en longueur par un simple nucléotide et va apparaître comme une échelle semi-continue après une autoradiographie du gel. De plus, si une région de l'ADN est protégée de la coupure par la protéine liée, il y aura un espace dans l'échelle de fragments radioactifs. Cette empreinte génomique peut être précisément localisé par l'alignement de cet espace avec un ensemble de réactions séquentielles Maxam-Gilbert, qui proviennent du même ADN radio-marqué.

Les radicaux hydroxyles

Les radicaux hydroxyles coupe l'ADN en retirant un atome d'hydrogène de la partie désoxyribose (Price et Tullius, 1992; Hertzberg et Dervan, 1984). Ces radicaux sont générés par la réaction des complexes Fe(II) de l'EDTA et du H₂O₂ (Wardman et Candeias, 1996 (lois de Fenton, 1894)).



Le Fe(II) est régénéré à partir du Fe(III) produit par l'addition d'ascorbate à la réaction. Les radicaux hydroxyles, qui ont une demi-vie particulièrement courte et

qui sont diffusibles, réagissent avec les résidus désoxyriboses sur la surface de l'ADN. De plus, les coupures sont faites de manière indépendante de la séquence nucléotidique (Henner *et al.*, 1982). À cause de leur très petite taille, les radicaux hydroxyles peuvent réagir plus efficacement que la DNaseI avec les nucléotides sur la périphérie des sites de liaison. Cet accès veut dire que cette région de contact serrée entre la protéine et son site de liaison peut être définie avec plus de précision. L'efficacité de la coupure de l'ADN ne peut être améliorée si le complexe Fe(II)-EDTA est lié au ligand ADN-lié (ADN : protéine), par utilisation du propylméthidium (Tullius *et al.*, 1987; Hertzberg et Dervan, 1984). Néanmoins, la coupure de la structure dépend dans ce cas de l'insertion de la partie méthidium dans le double-brin d'ADN. Lorsque ces insertions sont évitées par la liaison de la protéine, l'empreinte génomique qui en résulte est plus large que celle obtenue avec le Fe(II)-EDTA libre et est très similaire à celle produite par la digestion avec la DNaseI (Tullius *et al.*, 1987; Van Dyke et Dervan, 1983).

Le cuivre-1,10-phénanthroline

Le principe de la réaction chimique du cuivre-1,10-phénanthroline avec l'ADN est semblable à celle du Fe(II)-EDTA, à l'exception du complexe cuivré tétraédrique qui lie le site mineur de l'ADN et les ions de cuivre près du résidu désoxyribose. L'oxydation des ions cuivré par le peroxyde d'hydrogène génère des espèces oxo-cuivre qui enlèvent efficacement l'atome hydrogène du désoxyribose (Sigman et Chen, 1990; Spassky et Sigman, 1985).



Contrairement à Fe(II)-EDTA, le cuivre(I)-1,10-phénanthroline coupe l'ADN nu d'une façon qui est très influencée par la séquence nucléotidique. Cet effet est apparemment une conséquence de la variation séquence-spécifique de la présentation structurelle du site mineur de l'ADN.

Les autres réactifs

Plusieurs réactifs chimiques additionnels coupant l'ADN sont utilisés pour étudier les interactions ADN-protéine. Par exemple, le complexe rhodium-1,10-phénanthroline (Chow et Barton, 1992) coupe l'ADN de façon légèrement dépendante et est sensible aux ingrédients communément retrouvés dans les tampons de laboratoire comme les cations divalents, l'EDTA, le glycérol, et les agents réducteurs (Sitlani et Barton, 1994), les dérivés de la porphyrine (Ward *et al.*, 1986) et les sels uranyles (l'acétate d'uranyle et le nitrate d'uranyle) (Gaynor et Unkenholz, 1989; Nielsen *et al.*, 1988a). Pour plusieurs de ces réactifs chimiques, il n'est pas clair s'ils procurent de l'information additionnelle à celle obtenue avec le cuivre-1,10-phénanthroline (Chow et Barton, 1992) ou avec les sels uranyles (Gaynor et Unkenholz, 1989) mais leur coupure de l'ARN peut être utilisée pour définir les interactions ARN-protéine.

4.2.2 La sélection de l'agent de coupure

Le choix de l'agent de coupure de l'ADN est une question d'intérêt. La DNaseI est relativement volumineuse (45 X 40 X 35 Å; Suck *et al.*, 1984) et peut avoir des difficultés pour atteindre les nucléotides en périphérie du site de liaison qui sont protégés stériquement par la liaison avec la protéine. Cette limitation peut expliquer pourquoi l'empreinte génomique avec la DNaseI a tendance à donner un patron d'empreinte moins bien défini, tandis que les radicaux hydroxyles donnent des patrons plus petits et plus précis (Tullius *et al.*, 1987; Sawadogo et Roeder, 1985). La DNaseI délimite les extrémités externes de l'aire de contact entre l'ADN et la protéine, tandis que les radicaux hydroxyles définissent un centre plus serré et interne. Comme nous pouvons le constater, les deux genres d'information sont très pratiques, et aujourd'hui il est fréquent de faire les expérimentations avec deux réactifs différents. La DNaseI est une mise sûre qui a acquis une large acceptation et a été utilisée avec succès par plusieurs laboratoires. Néanmoins, des réactifs chimiques comme le cuivre-1,10-phénanthroline, sont de meilleurs choix lorsque la coupure ne peut pas être détectée entre chaque paire de bases quand l'ADN nu contenant la région d'intérêt est partiellement dégradé par la DNaseI (Galas et

Schmitz, 1978) et aussi lorsque la région ciblée est suspectée (ou connue) de posséder de longues chaînes de résidus d'adénine ou de thymine.

Autant la DNaseI (Papavassiliou, 1993) que le cuivre-1,10-phénanthroline (Kuwabara and Sigman, 1987) peuvent être utilisés pour couper les parties d'ADN de complexes ADN-protéine sur une matrice de gel de séparation. Cette utilisation permet que l'empreinte génomique soit directement couplée à l'expérimentation de retard sur gel. Inversement, les radicaux hydroxyles, qui sont préférés lorsqu'une haute définition du contact ADN-protéine est requise, sont toujours utilisés avec des complexes ADN-protéine libre en solution. La DNaseI peut aussi être utilisée sur des complexes en solution ADN-protéine, mais il faut faire suivre cette partie de l'expérimentation par un gel d'électrophorèse pour séparer les complexes ADN-protéine de l'ADN libre. L'ADN peut ensuite être extraite, dénaturée et analysée sur des gels de séquençage.

4.2.3 L'empreinte génomique *in vivo*

Les régions 5' de plusieurs gènes eucaryotes et procaryotes contiennent des douzaines de sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription. De plus, il est relativement facile de documenter les propriétés des protéines à se lier à des sites spécifiques en utilisant l'empreinte génomique. Il est beaucoup plus difficile de confirmer quels sont les sites de liaison utilisés *in vivo* et lesquels sont une conséquence de l'utilisation de fortes concentrations d'ADN nu et enrichi de préparations de protéines nucléaires. Ces questions peuvent trouver une réponse en faisant des expériences d'empreinte génomique *in vivo* dans lesquelles l'habileté des protéines à se lier aux régions régulatrices du gène cible est déterminée dans une cellule exprimant le gène et les protéines en question. Des expériences antérieures, de cette nature, ont été faite par George Church et Walter Gilbert (1984), qui ont utilisé des agents de coupure chimiques pour examiner les patrons de méthylation des régions 5' des gènes qui codent pour les chaînes lourdes des immunoglobulines de souris. Pour détecter des signaux vraiment faibles émanant de gènes cibles simple-brin et de leur méthylation différentielle, un travail de titan a été requis. Ces mesures étant la génération de l'investigation de l'activité très spécifique, la séparation d'ADN génomique coupé

par l'électrophorèse de gels de séquençage suivi par un transfert électrophorétique de l'ADN sur des filtres de nylon et de l'analyse par Southern blot pour la détection des variations sensibles à la méthylation dans les coupures produites dérivées des gènes d'immunoglobulines.

Seulement quelques laboratoires peuvent combiner les spécificités techniques que demande la réalisation de ces réactions et leur application sur l'empreinte génomique *in vivo*. Cette technologie aurait pu être oubliée ou négligée si ce n'avait été de Barbara Wold et de ces collègues (Mueller and Wold, 1989), qui ont adapté cette méthode avec l'utilisation du PCR pour amplifier les fragments d'ADN dans l'empreinte génomique *in vivo*. Dans cette adaptation, qu'ils ont appelé PCR de ligation dirigé, l'ADN génomique de cellules vivantes est fragmenté par un agent de coupure de l'ADN comme le diméthylsulfate et l'ADN fragmenté est purifié par extraction au phénol:chloroforme et une précipitation à l'éthanol. Un cycle d'extension de l'amorce sur l'ADN traité définit la fin de la coupure et produit des fragments à bouts francs auxquels sont ajoutées des séquences par ligation. Un PCR est ensuite fait en utilisant l'amorce complémentaire à la séquence ajoutée et une deuxième amorce qui provient de l'ADN suspecté. En absence de liaison avec la protéine, une échelle de produits est amplifiée et peut être visualisée après une séparation sur gel par électrophorèse. Chaque fragment d'ADN dans l'échelle représente une coupure à un point précis du gène cible. Néanmoins, si une protéine se lie à un site entre les deux amorces d'amplification, le fragment d'ADN sera sous-représenté à cause de la protection de l'ADN face aux agents de coupure. Ces fragments auront une intensité réduite sur le gel lorsque comparés à l'ADN généré en absence du lien avec la protéine.

Des protocoles détaillés, pour le PCR de ligation dirigée, sont maintenant disponibles (Zaret, 1997) et en général, ces méthodes sont réalisables dans la plupart des laboratoires de biologie moléculaire. De surcroît, la méthode a été utilisée pour démontrer les liaisons *in vivo* de facteurs de transcription spécifiques dans des tissus (Mueller and Wold, 1989), pour cartographier des sites de méthylation dans des gènes inactifs et en combinaison avec d'autres agents de coupure enzymatiques et chimiques pour définir les interactions ADN-protéine et la présence de conformations

inhabituelles de l'ADN dans des gènes transcrits (Zaret, 1997). En variant les conditions dans lesquelles la cellule d'intérêt est cultivée ou le temps pendant lequel la cellule est stimulée par un organisme, il est possible de présenter un portrait détaillé de l'empreinte laissée par l'association dynamique de différents facteurs de transcription avec la région régulatrice du gène ciblé.

4.3 Généralités sur le retard sur gel

La migration de complexes ADN-protéine sur gel d'acrylamide non-dénaturant ou sur gel d'agarose est la méthode la plus simple et la plus répandue pour détecter les interactions spécifiques d'une protéine se liant à sa séquence nucléotidique cible. La méthode de retard sur gel standard implique premièrement la mise en présence de protéines avec des fragments d'ADN double-brin définis et marqués, deuxièmement la séparation des complexes ADN-protéine de l'ADN nu par électrophorèse et la visualisation de l'ADN par autoradiographie. La liaison d'une protéine réduit la mobilité électrophorétique de l'ADN cible, résultant en une bande discrète qui correspond aux complexes ADN-protéine individuels.

Le retard sur gel a été introduit par l'équipe de Dahlberg (1969) comme une technique pour expérimenter les interactions entre les protéines ribosomales et l'ARN ribosomal. Cette méthode est répandue aujourd'hui. Elle est la résultante d'une étude effectuée au début des années 80' sur l'équilibre et la cinétique de l'association de protéines régulatrices procaryotes purifiées avec leur séquence cible d'ADN (Hendrickson, 1985; Hendrickson et Schleif, 1985; Fried et Crothers, 1981; 1983; 1984a,b; Garner et Revzin, 1981). À l'époque, cette technique n'a pas été envisagée pour la détection de séquences spécifiques de liaison ADN-protéine dans des mixtures complexes. Cette possibilité n'est apparue qu'au moment où il a été démontré qu'un transporteur d'ADN supprime les liens non-spécifiques de la protéine avec l'ADN cible radio-marqué (Singh *et al.*, 1986; Carthew *et al.*, 1985; Strauss et Varshavsky, 1984). Depuis, cette technique a été étendue à l'analyse de complexes formés entre protéines et des conformation inhabituelles de l'ADN, incluant les jonctions Holliday (Dunderdale *et al.*, 1991; Parsons *et al.*, 1990), le mauvais

appariement de paires de bases (Jiricny *et al.*, 1988) et l'ADN-Z (Lane *et al.*, 1992; Nordheim et Meese, 1988). Néanmoins, la principale fonction de cette technique demeure la détection et l'analyse de complexes formés entre des protéines (en trans) et des séquences d'ADN (en cis) qui contrôlent l'expression de gènes chez les procaryotes et les eucaryotes.

4.3.1 Les avantages de la méthode de retard sur gel

Vitesse, haute sensibilité et discrimination :

Des quantités de l'ordre du femptomole de séquences spécifiques qui lient des protéines peuvent être détectées par leur effet sur la mobilité de l'ADN cible radio-marqué même lorsque d'autres protéines sont liées à l'ADN, comme par exemple dans des extraits de culture non purifiés. Le retard sur gel peut être complété en quelques heures et il est idéal pour doser la concentration de facteurs de transcription (en trans) et d'autres protéines qui se lient à des séquences spécifiques.

Des séquences cibles pour une liaison ADN-protéine peuvent être identifiées dans une population hétérogène de fragments d'ADN. La complexité entre les liaisons ADN-protéine et leur séquence cible peut être résolue pour plusieurs composantes qui reflètent une stochiométrie alternative, des interactions entre plusieurs protéines différentes ou encore plusieurs protéines compétitionnant pour le même site.

Cette méthode peut facilement être adaptée pour une détermination quantitative du taux de la constante d'association ou de dissociation, de la coopération, de l'abondance et de la spécificité.

4.3.2 Les mécanismes du retard sur gel

Initialement, la détection de complexes ADN-protéine, qui migrent en bandes discrètes sur gel, n'était pas anticipée puisque la demi-vie de nombreux complexes est généralement plus courte que le temps requis pour la migration d'un gel. Deux théories ont été proposées pour expliquer pourquoi les complexes ADN-protéine sont

cinétiquement plus stables en gel qu'en solution. La première théorie suggère que le gel affecte directement la constante de dissociation des complexes ADN-protéine. Même si cette hypothèse a été supportée par d'anciennes expériences (Fried et Crothers, 1981), des analyses subséquentes ont échoué pour confirmer cette stabilisation favorisée par le gel. En revanche, il semble que le gel agit comme une cage déshydratée qui prévient la diffusion des composantes dissociées. Cet effet de cage maintient une haute concentration locale de composantes et effectivement conduit à un équilibre de réassociation bimoléculaire. Une théorie robuste, marquée par ces arguments a été émise par Cann et ses collaborateurs (1989) et ses calculs montrent que le niveau optimal de concentration de l'ADN dans la méthode standard de retard sur gel est située entre 1×10^{-8} et $5 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ au dessus du niveau de la constante de liaison (10^9 à 10^{13} M^{-1}) avec un ratio optimal de protéines liées à l'ADN variant de 0,5 pour les interactions très fortes à 10 pour les interactions plus faibles.

4.3.3 La mesure des constantes de dissociation des complexes ADN-protéine par le retard sur gel

Pour mesurer la valeur de constante de dissociation (K_d) d'un complexe ADN-protéine, une série de réactions de liaison est organisée sur un large niveau. Le but est de trouver la concentration requise pour lier la moitié de l'ADN. Les données sont généralement identifiées comme une fraction de l'ADN libre (habituellement estimé à partir de la densitométrie d'une bande du gel) versus la concentration \log_{10} de la protéine dans la réaction de liaison. La constante d'équilibre peut être estimée à partir du résultat d'une courbe sigmoïde qui provient du ratio de protéine qui est disponible au site de liaison au point central de la réaction (Carey, 1988; 1991) (Figure 14).

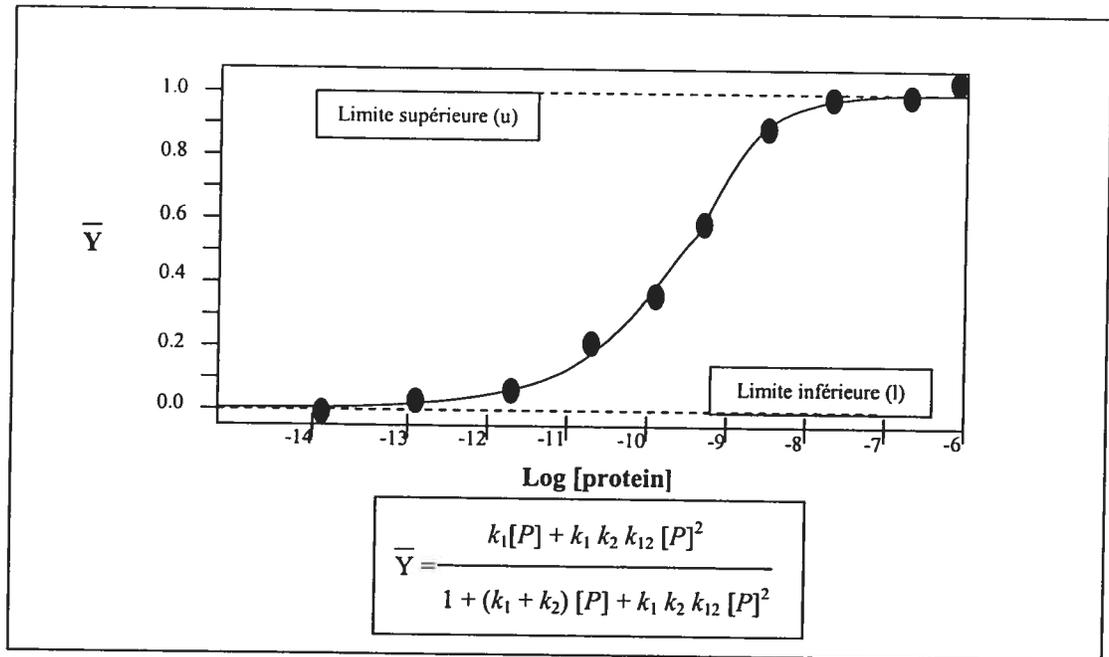


Figure 14 : Courbe de titration de l’empreinte génomique démontrant un échelonnage et un espacement adéquat de la concentration de protéine. Les limites supérieures et inférieures de la courbe de titration sont indiquées par des lignes pointillées (Figure adaptée de Carey, 1988)

Virtuellement, tout l’ADN de la réaction peut être conduit dans un complexe par un vaste excès de protéines et les données expérimentales correspondant à la courbe de liaison théorique sont calculées à partir d’une équation décrivant les liaisons entre des sites indépendants et équivalents. Pour des interactions non-coopératives, une augmentation de 1,81 \log_{10} unités dans la concentration de protéine est requise pour augmenter la fraction d’ADN qui apparaît dans le complexe de 10% à 90%. La déviation à partir de cette valeur indique que le lien est coopératif ou qu’il apparaît à de multiples sites. Les valeurs $<1,8 \log_{10}$ unités indiquent une coopération positive durant les réactions de liaison tandis que les valeurs $>1,8 \log_{10}$ unités indiquent une coopération négative (Carey, 1991).

4.3.4 La mobilité des complexes ADN-protéine

Trois facteurs majeurs affectent le degré de migration des complexes ADN-protéine à travers les gels. Ce sont la masse du complexe ADN-protéine, leur charge

d'ensemble et la conformation de l'ADN. Comme règle générale, la mobilité du complexe est reliée à la grosseur de la protéine libre (Carey, 1988). De plus, la mobilité des bandes retardées diminue typiquement comme une fonction monotone de la masse de la protéine (Bétermier *et al.*, 1989; Hope et Struhl, 1985). Si néanmoins la protéine liée est vraiment acide et transporte une forte charge négative, la mobilité du complexe peut ne pas être réellement différente de celle de l'ADN nu. Ce problème peut être résolu en faisant une électrophorèse à pH acide (Carey, 1988).

Dans certains cas, un ralentissement plus radical survient due à la masse de la protéine liée au fragment d'ADN. La mobilité du complexe est donc plus faible (parfois considérablement) que ce qui a été prédit par la simple masse de la protéine liée (Koo et Crothers, 1988). Cette position a été utilisé pour cartographier l'endroit où la protéine induit la dérivation de l'ADN (Kim *et al.*, 1989; Wu et Crothers, 1984).

L'effet induit par la conformation de l'ADN (ex. super-hélicoïdale), en général augmente la mobilité quand le complexe d'ADN-protéine est analysé par électrophorèse à basse température en présence de Mg^{2+} (Diekmann, 1987) et dans des gels de petits pores (Marini *et al.*, 1983). Cependant, il peut être réduit en présence de ligands d'ADN comme la distamycine (Wu et Crothers, 1984).

4.3.5 Les principes pratiques

En plus des principes théoriques discutés précédemment, les conseils pratiques qui suivent sont utiles pour la mise au point de retard sur gel :

La matrice du gel :

Des gels de 5% polyacrylamide sont utilisés pour analyser les complexes formés par des fragments d'ADN > 200 nucléotides en longueur et les gels de 10% polyacrylamide sont généralement utilisés pour des ADN plus courts. Les gels d'agarose ne sont pas utilisés sauf si la masse de la protéine ou de l'ADN est

supérieure à 1 kb. À cause de leurs larges pores, les gels d'agarose ne peuvent pas détecter les dérivations de l'ADN induites par la protéine liée.

Les tampons d'électrophorèse :

La plupart des complexes ADN-protéine sont stables et peuvent supporter une petite charge négative à un pH neutre. De plus, le tampon 0,5 X TBE est un choix standard. Néanmoins, dans une minorité de cas où les composantes de la protéine du complexe induisent une forte charge positive ou négative, il peut être nécessaire d'utiliser un tampon alcalin (50 mM Tris-Glycine à pH 9.2) ou acide (TAE à pH 6.0).

L'addition d'ADN transporteur :

De l'ADN transporteur non-marqué est généralement ajouté à la mixture de la liaison pour éliminer les liaisons non-spécifiques de protéines présentes dans l'extrait cellulaire d'ADN cible radio-marqué. Le but est d'ajouter juste assez d'ADN porteur pour absorber toutes les protéines qui ne se lient pas spécifiquement à l'ADN sans affecter la cinétique de formation ou la stabilité des complexes qui impliquent l'ADN cible. La quantité d'ADN transporteur requise dans certaines circonstances doit être déterminée empiriquement, mais cette tâche est plutôt simple puisque le niveau acceptable de la concentration d'ADN transporteur est habituellement relativement grand. Si une trop grande concentration de transporteur est utilisé aucun complexe avec l'ADN cible ne se formera, si une trop faible concentration de transporteur est utilisée toutes les sondes vont se lier non spécifiquement à des protéines dans l'extrait et vont ensuite prévenir l'entrée et la migration dans le gel.

L'ADN d'*Escherichia coli* a été le premier ADN transporteur utilisé comme compétiteur non-spécifique dans la méthode de retard sur gel (Strauss et Varshavsky, 1984) suivi de l'ADN chromosomal des eucaryotes de grande complexité (e.g. thymus de veau et ADN humain). Néanmoins, la possibilité que ces ADN contiennent des sites de liaison spécifique pour les protéines étudiées a vite conduit à leur remplacement par un co-polymère synthétique alternatif comme le

poly(dA-dT)•poly(dA-dT) ou le poly(dI-dC)•poly(dI-dC) ou encore par le carbonate d'héparine polysulfate (Singh *et al.*, 1986; Carthew *et al.*, 1985).

Les cofacteurs :

Certains facteurs de transcription, particulièrement ceux d'origine procaryotique, ont besoin de la présence de co-facteurs spécifiques pour une liaison optimale. Par exemple, la protéine CAP dépend de l'AMPc pour se lier (Fried et Crothers, 1983), tandis que le répresseur de tryptophane TrpR a besoin de tryptophane pour une liaison efficace (Carey, 1988).

Les extraits :

Les protéines de liaison de mammifères sont habituellement détectables dans des lysats concentrés de cellules entières ou dans des extraits de préparations nucléaires. La méthode pour préparer ces extraits a été optimisée lors de plusieurs études (Chodosh *et al.*, 1986; Kadonaga et Tjian, 1986; Singh *et al.*, 1986; Dignam *et al.*, 1983). Il y a très peu d'intérêt à essayer quelque chose de nouveau et de fantaisiste, au moins durant les phases initiales de la caractérisation de la protéine qui se lie à l'ADN.

La taille des protéines liées :

La taille de la protéine dans les complexes ADN-protéine peut être mesurée par liaison-croisée avec une irradiation aux UV et ensuite résolue par une électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE). Dans plusieurs cas, la présence de liaisons ADN-protéine déjà caractérisées peut être confirmée par des analyses immunologiques. Un anticorps spécifique à une protéine et à l'ADN peut, d'une part prévenir la formation de complexe ADN-protéine et d'autre part produire des «super retards» dans la mobilité électrophorétique (Kristie et Roizman, 1986).

4.4 L'étude par empreinte génomique de la liaison de Lrp avec la région de régulation de l'opéron fimbriaire *pap*

Comme il a été décrit précédemment, l'expression du «pyelonephritis-associated pili» (Pap) chez *E. coli* est sous le contrôle du mécanisme de variation de phase. Chaque cellule alterne entre la phase ON (pili+) et la phase OFF (pili-) à travers un processus qui implique la méthylation de l'ADN par la déoxyadénosine méthylase (Dam). La méthylation des deux sites GATC (GATC-I et GATC-II) sur la région de régulation de l'opéron *pap* est inhibée de façon différentielle dans les cellules en phase ON et en phase OFF. Le site GATC-I des cellules en phase ON est non-méthylé tandis que le GATC-II l'est complètement. Inversement, en phase OFF le site GATC-I est entièrement méthylé tandis que le site GATC-II ne l'est pas. Deux activateurs transcriptionnels, PapI et Lrp, sont requis pour l'inhibition de cette méthylation spécifique.

Dans une étude réalisée par Nou et ses collaborateurs (1993), il a été démontré à l'aide de l'empreinte génomique, par utilisation de l'ADN non-méthylé de *pap*, que Lrp se lie à une région autour du site GATC-II. De plus, ils ont démontré que PapI ne lie aucun site dans cette même région de régulation. Cependant, l'addition de Lrp et de PapI ensemble résulte en une protection additionnelle autour du site GATC-I. De surcroît, la méthylation par Dam inhibe la liaison du complexe Lrp/PapI près du site GATC-I et altère la liaison de Lrp sur le site GATC-II. Leurs résultats suggèrent un modèle d'inhibition par compétition où Dam et le complexe Lrp/PapI essaient de lier le site GATC-I, régulant l'état de méthylation de ce site GATC et par conséquent le niveau de transcription de *pap*.

En 1995, van der Woude et ses collaborateurs (1995) ont exploré le rôle de Lrp et de H-NS dans la régulation la variation de phase chez *pap*. Leurs résultats obtenus, grâce à l'empreinte génomique, démontrent que la phase OFF résulte de la répression intrinsèque du promoteur *papBA* par Lrp et H-NS, chacun pouvant agir comme répresseur transcriptionnel. De plus, ils ont démontré que Lrp nécessite une séquence particulière en amont du promoteur *papBA* tandis que pour H-NS, il n'en est rien. À l'opposé, lors de la phase ON, Lrp complexé avec PapI, active la transcription de *pap*. Cette activation n'est pas le résultat de l'inhibition de l'activité de H-NS mais plutôt

de l'augmentation de l'activité de transcription (8X) du promoteur *papBA*, par rapport au niveau de base, mesuré en absence de H-NS et de Lrp. L'analyse de l'activation par du Lrp modifié indique que la liaison de Lrp à des séquences d'ADN de *pap* n'est pas suffisante pour l'activation de la transcription, une protéine co-activatrice est généralement requise comme PapI. Leurs résultats démontrent aussi la fonction de Lrp comme activateur transcriptionnel dans des cellules en phase ON et comme répresseur de la transcription basale chez les cellules en phase OFF. Parce que la variation de phase de *pap* existe en absence de H-NS, le rôle de régulation que cette protéine joue dans la régulation de *pap* n'est pas encore éclairci.

L'équipe de Braaten (1994) a élaboré une étude où les sites GATC sont modifiés, empêchant ainsi la méthylation. Leurs résultats ont démontré que la méthylation du site GATC-I bloque la formation de la phase ON par inhibition de la liaison de Lrp et de PapI sur ce site. En revanche, la méthylation du site GATC-II est requise pour la transition vers la phase ON. À l'évidence, ceci indique que c'est ce qui se produit lors de l'inhibition de la liaison de Lrp sur les sites encombrés (méthylés par Dam) du promoteur du pili.

C'est en 1995 que Nou et ses collaborateurs ont démontré par empreinte génomique la présence de six sites de liaison pour la protéine Lrp sur la région régulatrice de l'opéron *pap*. De plus, l'équipe de Kaltenbach (1995) a émis l'hypothèse dans laquelle PapI faciliterait la transition entre la phase de transcription OFF et la phase de transcription ON par la liaison de Lrp en altérant, lors d'une expérience, l'affinité de Lrp pour les régions GATC-I et GATC-II de *pap*.

En 2003 à l'aide de l'empreinte génomique, l'équipe de Hernday a démontré que le régulateur PapI augmente l'affinité de Lrp pour la séquence nucléotidique **ACGATC** qui contient le site cible GATC. De plus, des analyses mutationnelles ont démontré que la méthylation par Dam du site GATC-II est requise pour la transition vers la phase ON. Ces mutants ont permis de bloquer la liaison de Lrp dépendante de PapI sur les sites proximaux du promoteur. De surcroît, leurs résultats ont confirmé l'hypothèse que la liaison de Lrp, dépendante de PapI, sur le site GATC-I hémiméthylé généré par la réplication de l'ADN, est une composante essentielle du mécanisme de variation de phase.

Récemment, Hernday et ses collaborateurs (2004) ont démontré que CpxAR inhibe la variation de phase de *pap* par la formation de CpxR phosphorylé. En effet, CpxR-P est un inhibiteur compétitif de Lrp pour la liaison sur les promoteurs proximal et distal de *pap*. Cette liaison inhibe la transcription *in vitro* du promoteur *pap* et par conséquent l'expression du pili. À l'inverse CpxR-P est insensible à la méthylation et ne forme pas de complexe ADN méthylé *in vivo*.

Parce que les coupures de l'ADN par la DNaseI sont non seulement affectées par la présence de protéines mais aussi par la séquence de l'ADN, les outils pour l'étude de l'interaction de l'opéron *foo* avec ses régulateurs (malgré son homologie avec l'opéron *pap*), ont dû être mis au point. De plus, le rôle de la liaison de la protéine Lrp et l'influence de la protéine FooI dans la régulation chez l'opéron *foo* n'étant pas entièrement connu, plusieurs variations dans les protocoles établis ont dû être apportées.

SECTION III- Méthodologie

1. Condition de croissance des souches bactériennes

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont énumérés dans le tableau I. Les souches d'*Escherichia coli* étaient ensemencées en bouillon Luria-Bertani (LB broth) et incubées à 37°C. Lorsque l'utilisation d'antibiotiques était nécessaire, ces derniers ont été ajoutés au milieu selon les concentrations suivantes : ampicilline (100 µg/ml), tétracycline (12,5 µg/ml), chloramphénicol (25 µg/ml), kanamycine (25 µg/ml).

2. Production et purification des protéines de fusion

2.1 La protéine de fusion Lrp-His₆

La production de protéines de fusion Lrp possédant une étiquette de 6 histidines en N-terminal a été effectuée de la façon suivante. La souche CV1494 (Gracieuseté de l'équipe de Calvo, Université de Californie-Santa Barbara) a été incubée en bouillon LB (50 ml) pendant 16 heures à 37°C sous agitation (150 rpm). Une fraction de cette culture (10 ml) a été récupérée, diluée dans du LB frais et incubée de nouveau jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,5. Par la suite, la production de la protéine de fusion Lrp-His₆ (21 kDa) a été induite par l'isopropylthiogalactoside (IPTG) (Sigma) à une concentration finale de 250 µM et par une nouvelle incubation du milieu jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 1,0.

Les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 7000 X g pendant 15 minutes à 4°C à l'aide de la centrifugeuse RC 5C (Sorvall) et suspendues dans 30 ml de tampon de lyse [50 mM NaH₂PO₄ [pH 8,0]; 300 mM NaCl; 10 mM imidazole] à pH 8,0 contenant 1 mg/ml de lysozyme. Le mélange a été incubé 30 minutes sur glace puis les cellules bactériennes ont été brisées à l'aide de la French Pressure Cell (Thermo) selon les indications du fabricant (cellule de 40 K; 10 tonnes; 1,36 kbar). À cet extrait de culture brute a été ajouté 10 µg de RNase et 5 µg de DNase puis le mélange a été placé sur glace pendant 15 minutes.

Tableau I : Souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude.

Souches, plasmides	Caractéristiques	Références
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
CT4A	<i>ilvA-</i> , <i>lac-</i> , <i>ara-</i> , <i>lrp</i> ::Tn10	Tuan <i>et al.</i> , 1990
Top10	<i>F-mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 <i>deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
MC4100	<i>F' araD 139</i> Δ (<i>lacI</i> POZYA- <i>argF</i>) U169 <i>rpsL thi-1</i>	Casadaban, 1976
DL1299	pDAL337	Braaten <i>et al.</i> , 1994
DL1976	MC4100 hns 651	Nou <i>et al.</i> , 1993
CV1494	<i>supE thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>ilvIH::MudI1734 lrp-35::Tn10/F' traD36 lacI^r Δ(lacZ) M15 proA⁺ B⁺/pCV294</i>	Matthews <i>et al.</i> , 2000
FB1006	CT4A <i>foolB-lacZ</i> / pBAD22CM- <i>lrp4</i>	Berthiaume <i>et al.</i> , 2004
MT001	pRS551:: <i>foolB-lacZ</i>	Tessier, M.C., Mémoire de maîtrise, 2001
MT006	MC4100 λ MT01 lysogen (<i>foolB-lacZ</i>)	Tessier, M.C., Mémoire de maîtrise, 2001
MT024	Top10/pMT012(pRS551:: <i>foolB-lacZ</i>)	Tessier, M.C., Mémoire de maîtrise, 2001
HB101/pPap5	<i>supE44 hsdS20(r_Bm_B) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK 2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i> / pPap5 (opéron <i>pap</i> entier)	Lund <i>et al.</i> , 1987
BL21(DE ₃)	<i>F-dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(c I ts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7)</i>	Stratagene
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI_q ΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene
JM109	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K m_K) supE44 relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lacI_q ΔM15</i>]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
JM109/ <i>clp</i>	JM109/ <i>pUC18::clp</i>	Martin <i>et al.</i> , 1996
Fool-CBP	pCALnEK-Fool	Crost <i>et al.</i> , 2003
MC1001	pET Fool01	Cette étude
MC1002	pIVEX Fool01	Cette étude
Plasmides		
pRS551	<i>amp-kan-lacZYA</i> pMB1 replicon	Simons <i>et al.</i> , 1987
pTZ19U	<i>amp</i> pMB1 replicon	U.S. Biochemical
pDAL337	pTZ19U contenant 1,76 kb <i>papIB</i> (séquence régulatrice)	Braaten <i>et al.</i> , 1994
pET-32(a)	<i>amp^R T7 HisTag STag TrxTag</i>	Novagen
pIVEX 2.3	<i>amp^R T7 HisTag</i>	Roche
pCALnEK	<i>amp^R T7lacO CBPTag</i>	Stratagene
pET-Fool01	Fool cloné dans pET 32	Cette étude
pIVEX-Fool01	Fool cloné dans pIVEX 2.3	Cette étude
pCALnEK-Fool	Fool cloné dans pCALnEK	Crost, C. thèse de doctorat, 2003

Les cellules ont été centrifugées de nouveau et le surnageant a été mélangé avec la résine Ni-NTA (Qiagen), équilibrée à 50% (v/v) avec le tampon de lavage [50 mM

NaH₂PO₄ [pH 8,0]; 300 mM NaCl; 100 mM imidazole] à pH 8,0 et le tout a été incubé pendant 16 heures à 4°C sous agitation (20 rpm).

La protéine Lrp-His₆ a été purifiée avec le kit «The QIAexpressionist» (Qiagen) selon les indications suggérées par le manufacturier à l'aide du tampon de lavage et du tampon d'élution [50 mM NaH₂PO₄ [pH 8,0]; 300 mM NaCl; 250 mM imidazole] à pH 8,0. L'identité de ces protéines a été confirmée par Western blot après migration sur un gel 15% acrylamide/bis-acrylamide en utilisant des anticorps anti-His₆ (Roche Molecular Biochemicals) selon les indications du fournisseur. Les protéines purifiées ont été quantifiées par densitométrie par comparaison avec différentes quantités connues de lysosyme (10 mg/ml ; 1 mg/ml ; 0,1 mg/ml) sur gel SDS-PAGE à l'aide d'un appareil alpha-imager (Alpha Innotech). En parallèle, des échantillons correspondants à chacune des étapes de purification ont été conservés à -20°C pour la vérification sur gel SDS-PAGE. La protéine finalement purifiée a été conservée à -20°C avant usage.

2.2 La protéine de fusion Lrp^{L136R}-His₆

La production de protéines de fusion Lrp^{L136R} possédant une étiquette de 6 histidines en N-terminal a été effectuée de façon *in vitro*. La souche FB1006 (Gracieuseté de F. Berthiaume, Université de Montréal) a été incubée en bouillon LB (50 ml) pendant 16 heures à 37°C sous agitation (150 rpm). Le plasmide pIVEX (contenant l'insert de la séquence protéique Lrp^{L136R}-His₆) a été extrait avec le kit d'extraction «QIAfilter Plasmid Midi» (Qiagen) selon les recommandations du manufacturier. Nous avons vérifié la quantité de plasmide (3400 pb) sur gel d'agarose et la présence de l'insert (655 pb) par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *NcoI* et *BamHI* (New England Biolabs).

La protéine Lrp^{L136R}-His₆ a été synthétisée *in vitro* en utilisant le kit «Rapid Translation System RTS500» (Roche Molecular Biochemicals) et l'appareil RTS 500 (Roche diagnostics) en suivant les indications du manufacturier.

La protéine Lrp^{L136R}-His₆ a ensuite été purifiée à l'aide d'agarose Ni-NTA, équilibrée à 50% (v/v) avec du tampon de lavage [50 mM NaH₂PO₄ [pH 8,0]; 300 mM NaCl; 100 mM imidazole] à pH 8,0. L'identité de ces protéines a été confirmée par Western blot après migration sur un gel de 15% acrylamide/bis-acrylamide en utilisant des anticorps anti-His₆ (Roche). Les protéines purifiées ont été quantifiées par densitométrie par comparaison avec différentes quantités connues de lysosyme (10 mg/ml ; 1 mg/ml ; 0,1 mg/ml) sur gel SDS-PAGE à l'aide d'un appareil alpha-imager. En parallèle, des échantillons correspondants à chacune des étapes de purification ont été conservés à -20°C pour la vérification sur gel SDS-PAGE. La protéine finalement purifiée a été conservée à -20°C avant usage.

2.3 La protéine de fusion FooI-CBP

La production des protéines de fusion FooI possédant une étiquette CBP (Calmodulin Binding Protein) en N-terminal a été effectuée de façon *in vivo*. La souche BL21DE3p_{lysS} FooIpCALnEK (Gracieuseté de C. Crost, Université de Montréal) a été incubée en bouillon LB (50 ml) pendant 16 heures à 37°C sous agitation (150 rpm). Un aliquot de cette culture (10 ml) a été récupérée, diluée dans du LB frais et incubée de nouveau jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm entre 0,3 et 0,5. La mixture a été incubée à 4°C pendant 5 minutes. Par la suite, la production de la protéine de fusion FooI-CBP a été induite par l'addition d'IPTG à une concentration de 2 mM et par une nouvelle incubation jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de environ 1,0.

Les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 7000 X g pendant 15 minutes à 4°C et suspendues dans 30 ml de tampon liaison CaCl₂ [50 mM Tris-HCl [pH 8,0]; 150 mM NaCl; 1 mM imidazole; 1 mM acétate de magnésium : 2 mM CaCl₂] à pH 8,0 contenant 1 mg/ml de lysozyme. Le mélange a été incubé 30 minutes sur glace puis les cellules bactériennes ont été brisées à l'aide de la French Pressure Cell (cellule de 40 K; 10 tonnes; 1,36 kbar). À cette mixture a été ajouté 10 µg de RNase et 5 µg de DNase puis le mélange a été placé sur glace pendant 15 minutes.

Les cellules ont été centrifugées de nouveau et le surnageant a été mélangé avec la résine d'affinité pour la protéine de fusion CBP (Stratagene) équilibrée à 50 % (v/v) avec du tampon de liaison CaCl_2 à pH 8,0. Le tout a été incubé pendant 16 heures à 4°C sous agitation (20 rpm).

La protéine FooI-CBP a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité et récupérée grâce au tampon d'éluion [50 mM Tris-HCl [pH 8,0] ; 150 mM NaCl ; 2mM EDTA]. Afin de prévenir la précipitation de la protéine, nous avons ajouté du TG₅₀ED [10 mM Tris-HCl [pH 8,0] ; 50% glycérol ; 0,1 mM EDTA ; 0,1 mM DTT ; 0,1 M NaCl] dans une proportion de 5 :1 (protéine/TG₅₀ED). L'identité de ces protéines a été confirmée par Western blot. Après migration sur un gel de 15% acrylamide/bis-acrylamide, la protéine a été reconnue en utilisant des anticorps anti-FooI [jaune d'œuf 1 volume ; 1 volume de PBS 1X ; 2 volumes de chloroforme ; vortexer jusqu'à l'obtention d'une pâte blanchâtre ; Centrifuger 15 minutes à 10 000 rpm (rotor SS34 de Sorvall) ; récupérer le surnageant [1/2000]] (Gracieuseté de C. Crost, Université de Montréal) selon les indications suggérées par le protocole précédemment établi (C. Crost, thèse de doctorat, 2003). Des anticorps de poulet (anti-IgY [1/1000]) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) couplés à la peroxydase ont permis la révélation à l'aide du 4-chloro-1-naphthol. Les protéines purifiées ont été quantifiées par densitométrie en comparant avec différentes quantités connues de lysosyme (10 mg/ml ; 1 mg/ml ; 0,1 mg/ml) sur gel SDS-PAGE à l'aide d'un appareil alpha-imager. En parallèle, des échantillons correspondants à chacune des étapes de purification ont été conservés à -20°C pour la vérification sur gel SDS-PAGE. La protéine finalement purifiée a été conservée à -20°C avant usage.

Diverses techniques ayant pour but d'éliminer l'étiquette CBP (4 kDa) liée à FooI (8,8 kDa) ont été testées. La première méthode consistait à couper l'étiquette à l'aide de l'enzyme entérokinase (Ek) (1 U/100 µg de protéine) (New England Biolabs) selon les recommandations du manufacturier (plusieurs temps d'incubation ont été testés [variant entre 2 heures et 24 heures]) et à purifier la protéine grâce à la résine d'affinité de protéine de fusion CBP. La seconde technique consistait à couper l'étiquette CBP à l'aide de l'enzyme Ek et à éliminer l'étiquette CBP par dialyse à

l'aide d'une membrane filtrante Spectra/Por 1 avec une porosité de 6000 à 8000 Daltons.

3. Vérification de l'intégrité des protéines de fusion par SDS-PAGE et Western blot

3.1 Préparation du gel de polyacrylamide et migration du gel SDS-PAGE

Les protéines ont été mélangées avec un tampon de solubilisation et bouillies 5 minutes. Ensuite, elles ont été transférées sur deux gels de polyacrylamide 12% [acrylamide/bis-acrylamide 12%; Tris-HCl 1.5M pH 8.8; Tris-HCl 0.5M pH 6.8; SDS 10%; persulfate d'ammonium 10%; TEMED] (épaisseur de 0.75 mm, avec gel de regroupement 4%, 10 puits) selon les recommandations de la méthode de Laemmli (1970). Les gels ont migré à 200 V pendant 90 minutes.

Un gel a été coloré au bleu de Coomassie [colorant : 0,1% bleu de Coomassie; 50% méthanol; 10% acide acétique et décolorant : 10% méthanol; 10% acide acétique] et l'autre gel a servi pour la réalisation d'un Western blot.

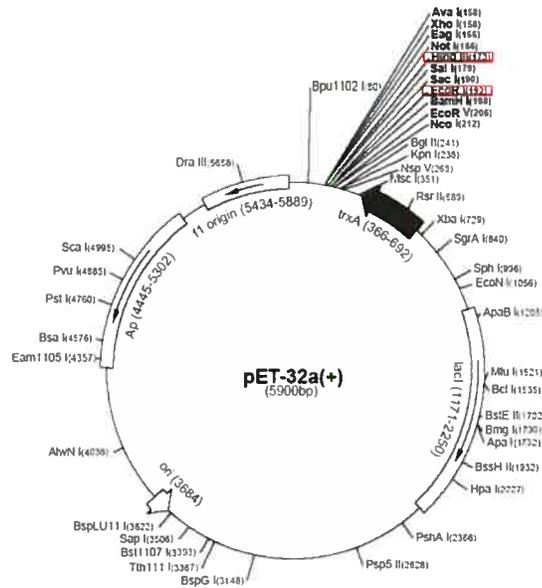
3.2 Réaction de Western blot

Un des gels a été transféré sur membrane de nitrocellulose à 100 V pendant 60 minutes. La membrane a été bloquée dans un bain de lait en poudre 2% (15 ml) [2 g de lait en poudre écrémé; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 M NaCl] pendant 60 minutes. Après lavage en tampon Tris-HCl [20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.5 M NaCl] la membrane a été incubée pendant 60 minutes avec l'anticorps primaire. Suivant cette étape, un nouveau lavage est réalisé grâce au tampon Tris-HCl. Puis, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire. La réaction a été visualisée après l'ajout de 4-chloro-1-naphthol [30 mg/ 10 ml méthanol froid] et de H₂O₂ [30 µl/ 50 ml Tris-HCl].

4. Construction de protéines de fusion alternatives FooI-His₆

4.1 Constructions de protéine de fusion FooI-His₆ dans pET-32a

Le plasmide pET-FooI01 a été construit de la façon suivante. Le gène *fooI* (234 pb) provenant de la souche MT006 (Gracieuseté de M.C. Tessier, Université de Montréal, FMV) a été amplifié par PCR [7 minutes de dénaturation à 94°C, 30 cycles à 94°C pendant 60 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 90 secondes et finalement 7 minutes d'élongation à 72°C] avec l'amorce directe (5' CCGAATTCATGAGTGAATACAT 3') contenant le site de coupure pour l'enzyme de restriction *EcoRI* (en jaune) et l'amorce inverse (5' CCAAGCTTGTAAAGTTGTGGAAGAA 3') contenant le site de coupure pour l'enzyme de restriction *HindIII* (en rouge). Les amorces ont été choisies pour que FooI soit en fusion avec l'étiquette de 6 histidines en N-terminal. Le produit PCR a été cloné dans le vecteur pET-32a (5900 pb) (Merck, Novagene). Pour ce faire, le gène *fooI* et le vecteur ont été digérés avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* (New England Biolabs). Le gène *fooI* a été inséré à l'intérieur de ces sites par ligation sur le vecteur pET-32a suivant le promoteur T7 et contenant le gène de résistance à l'ampicilline. La transformation du vecteur pET-FooI01 dans des cellules XL1 blue (Stratagene) a été effectuée par électroporation grâce à un appareil Gene Pulser (BioRad) selon les recommandations de Sambrook et Gething (1989). La souche MC1001 contenant le plasmide recombiné pET-FooI01 a été incubée en bouillon LB (5 ml) pendant 16 heures à 37°C à 150 rpm. L'extraction et la purification du plasmide contenant le gène *fooI* ont été effectuées grâce au kit d'extraction et de purification plasmidique «MiniPrep» (Qiagen). Le plasmide finalement purifié a été conservé à -20°C avant usage.



pET-32(a) + séquence codant pour la protéine FooI (234 pb) à l'intérieur des sites de restriction EcoRI et HindIII.

Figure 15 : Vecteur pET-32a et indication de l'endroit de l'insertion de la séquence de la protéine FooI (Figure adaptée de Novagene).

L'intégrité de l'insert a été vérifiée grâce aux amorces nucléotidiques (préalablement décrites) à l'aide de la méthode de séquençage (ATGénome.séquençage, FMV St-Hyacinthe, UdeM).

4.2 Constructions de protéine de fusion FooI-His₆ dans pIVEX 2.3

Le plasmide pIVEX-FooI02 a été construit de la façon suivante. Le gène *fooI* (234 pb) provenant de la souche MT006 (Gracieuseté de M.C. Tessier, Université de Montréal, FMV) a été amplifié par PCR [7 minutes de dénaturation à 94°C, 30 cycles à 94°C pendant 60 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 90 secondes et finalement 7 minutes d'élongation à 72°C] avec l'amorce directe (5' **CCCATGG**CTATGAGTGAATACAT 3') contenant le site de coupure pour l'enzyme de restriction *NcoI* (en jaune) et l'amorce inverse (5' ATATTA**CCCCGGG**AGTTGTGGAAGAA 3') contenant le site de coupure pour l'enzyme de restriction *SmaI* (en rouge). Les amorces ont été choisies pour que FooI soit en fusion avec l'étiquette de 6 histidines en N-terminal. Le produit PCR a été

cloné dans le vecteur pIVEX 2.3 (3530 pb) (Roche). Pour ce faire, le gène *fooI* et le vecteur ont été digérés avec les enzymes de restriction *NcoI* et *SmaI* (New England Biolabs). Le gène *fooI* a été inséré à l'intérieur de ces sites par ligation sur le vecteur pIVEX 2.3 suivant le promoteur T7 et contenant le gène de résistance à l'ampicilline. La transformation du vecteur pIVEX-FooI02 dans des cellules XL1 blue (Stratagene) a été effectuée par électroporation grâce à l'utilisation de l'appareil Gene Pulser (BioRad) selon les recommandations de Sambrook et collaborateurs (1989). La souche MC1002 contenant le plasmide recombiné pIVEX-FooI01 a été incubée en bouillon LB (5 ml) 16 heures à 37°C, 150 rpm. L'extraction et la purification du plasmide contenant le gène *fooI* ont été effectuées grâce au kit d'extraction et de purification plasmidique MiniPrep (Qiagen). Le plasmide finalement purifiée a été conservée à -20°C avant usage.

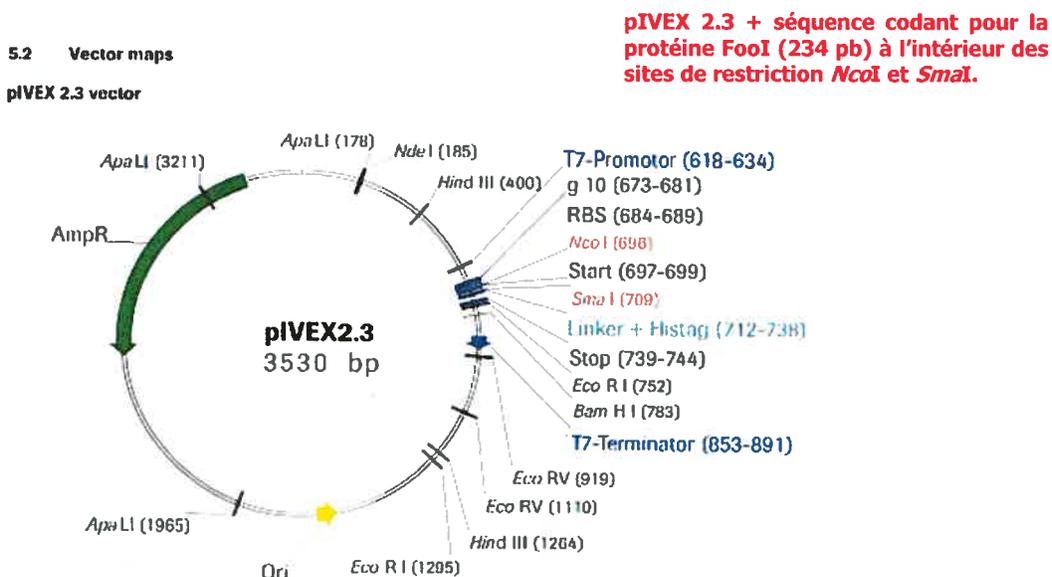


Figure 16 : Vecteur pIVEX 2.3 et indication de l'endroit de l'insertion de la séquence de la protéine FooI (Figure adaptée de Roche).

L'intégrité de l'insert a été vérifiée grâce aux amorces nucléotidiques (préalablement décrites) à l'aide de la méthode de séquençage (ATGénome.séquençage, FMV St-Hyacinthe, UdeM).

5. Production et purification de l'ADN matrice des régions régulatrices

5.1 La région régulatrice de l'opéron *foo*

La production de la région régulatrice de *foo* a été effectuée de la façon suivante. La souche MT024 (M.C. Tessier, Mémoire de Maîtrise (2001), Université de Montréal, FMV) contenant la région désirée a été incubée en bouillon LB (5 ml) pendant 16 heures à 37°C, sous agitation (150 rpm). L'extraction et la purification du plasmide pMT012 contenant la région désirée de l'opéron *foo* [*lacZ-fooI* tronqué ----- *fooB*] ont été effectuées grâce au kit d'extraction et de purification plasmidique MidiPrep (Qiagen). Nous avons vérifié la quantité de plasmide (13 200 pb) sur gel d'agarose et la présence de l'insert (787 pb) par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *BglI* et *BamHI* (New England Biolabs). Le plasmide finalement purifiée a été conservée à -20°C avant usage.

5.2 La région régulatrice de l'opéron *pap*

La production de la région régulatrice de *pap* a été effectuée de la façon suivante. La souche DL1299 contenant le plasmide pDAL337 (Gracieuseté de D. Low et B.A. Braaten, Université de Californie-Santa Barbara) contenant la région désirée a été incubée en bouillon LB (5 ml) pendant 16 heures à 37°C, sous agitation (150 rpm). L'extraction et la purification du plasmide pDAL 337 contenant la région régulatrice de l'opéron *pap* [*papI* -----*papB*] ont été effectuées grâce au kit d'extraction et de purification plasmidique MidiPrep (Qiagen). Nous avons vérifié la quantité de plasmide dont la taille est de 4545 pb sur gel d'agarose et la présence de l'insert (1760 pb) par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *BamHI* et *SmaI* (New England Biolabs). Le plasmide finalement purifiée a été conservée à -20°C avant usage.

5.3 La région régulatrice de l'opéron *clp*

La production de la région régulatrice de *clp* a été effectuée de la façon suivante. La souche JM109*clp* (Gracieuseté de C. Martin (1996), INRA, Clermont-Ferrant, France) contenant la région désirée a été incubée en bouillon LB (5 ml) pendant 16 heures à 37°C, sous agitation (150 rpm). L'extraction et la purification du plasmide pUC18 contenant la région régulatrice de l'opéron *clp* [-----*clpB*] ont été réalisées grâce au kit d'extraction et de purification plasmidique MidiPrep de Qiagen. Nous avons vérifié la quantité de plasmide (2686 pb) sur gel d'agarose et la présence de l'insert (332 pb) par digestion enzymatique à l'aide d'enzymes *HindIII* et *ScaI*. Le plasmide finalement purifiée a été conservée à -20°C avant usage.

Les plasmides purifiés ont été utilisés comme ADN de référence (matrice) dans une réaction PCR pour produire la région désirée en quantité suffisante pour les expérimentations prévues.

6. Sélection des amorces oligonucléotidiques

La sélection des amorces oligonucléotidiques s'est effectuée par l'analyse de chacune des séquences nucléotidiques (programme Clonagen). Les amorces PCR (description ci-dessous) furent synthétisées (Qiagen) pour permettre l'amplification d'une partie de la région de régulation des opérons étudiés.

6.1 Les amorces pour la région régulatrice de l'opéron *foo*

Les amorces *foo*-for (5' TTGATGTGTGTCACATTTTGTG 3') [8pmol/μl] et *foo*-rev (5' GCCCCTGAATATATGCTTCC 3') [8pmol/μl] ont permis d'amplifier sur 10 ng d'ADN un fragment de 260 pb à l'aide de l'appareil PCR (Stratagene) selon les conditions suivantes : 7 minutes de dénaturation à 94°C, 30 cycles à 94°C pendant 60 secondes, 49°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 90 secondes et finalement 7 minutes d'élongation à 72°C. Le produit PCR a été conservée à -20°C avant usage.

6.2 Les amorces pour la région régulatrice de l'opéron *pap*

Les amorces *pap*-for (5' TTGATGTGTATCACATTTTGCG 3') [8pmol/μl] et *pap*-rev (5' GCCCCTGGATATATGCTTCC 3') [8pmol/μl] ont permis d'amplifier sur 10 ng d'ADN un fragment de 260 pb selon les conditions suivantes : 7 minutes de dénaturation à 94°C, 30 cycles à 94°C pendant 60 secondes, 49°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 90 secondes et finalement 7 minutes d'élongation à 72°C. Le produit PCR a été conservée à -20°C avant usage.

6.3 Les amorces pour la région régulatrice de l'opéron *clp*

Les amorces *clp*-for (5' CTCTCCCTGTTTGATTTGATTTTCGTGC 3') [8pmol/μl] et *clp*-rev (5' CGTATTCACTCTGTTGCCGTCC 3') [8pmol/μl] ont permis d'amplifier sur 10 ng d'ADN un fragment de 332 pb selon les conditions suivantes : 7 minutes de dénaturation à 94°C, 30 cycles à 94°C pendant 60 secondes, 49°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 90 secondes et finalement 7 minutes d'élongation à 72°C. Le produit PCR a été conservée à -20°C avant usage.

7. Empreinte génomique

7.1 Marquage des amorces oligonucléotidiques au ³²P

Les radio-marquages des produits PCR ont été effectués par l'ajout de ³²P à chacune des amorces grâce à l'enzyme T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs). Le γ -³²P provenant du [γ -³²P]ATP (Perkin Elmer) a été transféré vers le groupe hydroxyle situé à l'extrémité 5' terminale des amorces oligonucléotidiques. Cette réaction *in vitro* a été catalysée par l'enzyme polynucléotide kinase du bactériophage T4 (New England Biolabs) selon les conditions suivantes : 60 minutes d'incubation à 37°C [tampon 10X T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs), 5 μl de γ ³²P-ATP (6000 Ci/mmol, Perkin Elmer), 100 pmols d'amorce oligonucléotidique, 10 U de T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs)]. Puis, la réaction fut

arrêtée en incubant le mélange 10 minutes à 65°C. Nous avons prélevé 1 µl de chacun des échantillons pour mesurer la concentration de ^{32}P à l'aide d'un compteur à scintillation (GE Healthcare Bio Sciences).

La purification des amorces oligonucléotidiques marquées a été effectuée grâce à des micro-colonnes chromatographiques Bio-Spin P-6 (Bio-Rad) selon les directives du fabricant. Nous avons prélevé 1 µl de chacun des échantillons purifiés pour mesurer la concentration de ^{32}P incorporée à l'aide d'un compteur à scintillation. Les amorces oligonucléotidiques marquées au ^{32}P ont été conservées à -20°C avant usage.

7.2 Production et purification des régions régulatrices marquées au ^{32}P

Pour l'empreinte génomique, les régions d'intérêt (opérons *foo*, *pap* et *clp*) ont été amplifiées et marquées au ^{32}P grâce à la technique de PCR selon les conditions suivantes : 7 minutes de dénaturation à 94°C, 30 cycles à 94°C pendant 60 secondes, 49°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 90 secondes et finalement 7 minutes d'élongation à 72°C. Dans un mélange contenant : [tampon 10X; 2 U de Taq (Amersham Biosciences); 20 mM dNTP; 20 pmols d'amorces non-marquées (rev); 20 pmols d'amorces marquées [250 000 cpm/µl] (for); 10 ng d'ADN matrice de la région d'intérêt](brin positif) et un second mélange contenant [tampon 10X; 2 U de Taq (Amersham Biosciences); 20 mM dNTP; 20 pmols d'amorces non-marquées (for); 20 pmols d'amorces marquées [250 000 cpm/µl] (rev); 10 ng d'ADN matrice de la région d'intérêt] (brin négatif).

La purification des produits PCR marqués a été effectuée grâce à l'utilisation du kit de purification PCR MinElute (Qiagen) selon les directives du fabricant. Cependant la dernière étape proposée a été révisée et l'ADN fut élué dans 15 µl de H₂O distillée à pH 8,0. Nous avons prélevé 1 µl de chacun des échantillons purifiés pour mesurer la concentration de ^{32}P incorporée grâce à un compteur à scintillation. Les produits PCR marqués au ^{32}P et purifiés ont été conservés à -20°C avant usage.

7.3 Mise au point de la digestion à 50 % par l'enzyme DNaseI

La mise au point de la digestion des régions d'intérêt (opéron *foo*, *pap* et *clp*) a été effectuée à partir du protocole fourni par Hernday et ses collaborateurs (2003) de la façon suivante. Chacune des régions d'intérêts marquées [125 000 cpm/ μ l] a été digérée à l'aide de l'enzyme DNaseI FPLCpure [30 U] (Amersham Biosciences) selon les conditions suivantes : incubation à 22°C pendant différents temps d'incubation [0; 1; 2; 5; 10; 15 minutes] [tampon 10X (600 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 400 mM KCl; 1 M NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM DTT); 30 U DNaseI; 0,3 nM produit PCR purifié; 3,4 μ g ADN de sperme de saumon (Sigma) soniqué; 2 μ g sérum d'albumine bovin acétylé (Sigma)]. La réaction de digestion a été arrêtée par l'ajout de 5 μ l de tampon d'arrêt [10% Glycérol; 250 mM EDTA] et par l'ajout de 120 μ l de tampon de précipitation [0,6 M d'ammonium acétate; 2 mg ARNt de levure (Roche) par ml].

L'ADN digéré a été récupéré et purifié par une extraction phénol/chloroforme selon les conditions du protocole original. Finalement, l'ADN purifié a été séché jusqu'à l'obtention d'un culot translucide à l'aide d'un Speedvac DNA120 (Thermo). Le produit fini a été conservées à -20°C avant usage.

7.4 Digestion par l'enzyme DNaseI et purification de la région d'intérêt

La mise au point de la digestion et de la purification de chacune des régions d'intérêt (opéron *foo*, *pap* et *clp*) a été effectuée de la façon suivante. Chacune des régions d'intérêts marquées [125 000 cpm/ μ l] a été digérée à l'aide de l'enzyme DNaseI FPLCpure [30 U] (Amersham Biosciences) selon les conditions suivantes : incubation à 22°C pendant 10 minutes (temps idéal préalablement déterminé) [tampon 10X (600 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 400 mM KCl; 1 M NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM DTT); 30 U DNaseI; 0,3 nM produit PCR purifié; 3,4 μ g ADN de sperme de saumon (Sigma) soniqué; 2 μ g sérum d'albumine bovin acétylé (Sigma)]. La réaction de digestion a été arrêtée par l'ajout de 5 μ l de tampon d'arrêt [10%

Glycérol; 250 mM EDTA] et par l'ajout de 120 μ l de tampon de précipitation [0,6 M d'ammonium acétate; 2 mg ARNt de levure (Roche) par ml].

L'ADN digéré a été récupéré et purifié par une extraction phénol/chloroforme selon les conditions du protocole original. Finalement, l'ADN purifié a été séché jusqu'à l'obtention d'un culot translucide à l'aide d'un Speedvac DNA120 (Thermo). Le lyophilisat a été conservées à -20°C avant usage.

7.5 Séquençage de la région d'intérêt par la méthode de Maxam-Gilbert

La mise au point du séquençage par la méthode de Maxam-Gilbert a été effectuée de la façon suivante. Chacune des séquences marquées d'intérêt a été traitée à l'aide de la méthode chimique standard de Maxam-Gilbert (Ausubel (1989) Current Protocols, 7.5.1). Cependant, certaines étapes ont été modifiées. La version modifiée consiste à mettre 20 μ l de l'ADN radio-marqué purifié [125 000 cpm/ μ l] orienté 5' ou 3' par tube, chaque tube correspondant à une réaction différente (G, G+A, T+C, C) pour déterminer la région protégée de l'ADN. Dans chacun des tubes les réactifs ont été ajoutés (G [DMS], G+A [formate de piperidine], T+C [hydrazine] et C [hydrazine + NaCl]) et les temps d'incubation ont été respectés selon les recommandations du protocole original. En revanche, les étapes de centrifugation ont été révisées passant de 5 à 15 minutes, toujours à 15 000X g. De plus, le culot a été lavé trois fois à l'aide d'éthanol 95% et séché avec un Speedvac pendant environ une heure. Les étapes subséquentes ont été effectuées selon le protocole standard (version abrégée tableau II). Les produits PCR marqués au 32 P et traités à l'aide de la méthode chimique standard de Maxam-Gilbert ont été conservées à -20°C avant usage.

Tableau II : Abrégé du protocole de Maxam-Gilbert.

Ajouter 20 μl dH₂O à l'ADN marqué (20 μl) (volume total de 40 μl).

Puis, ajouter 0.5 μl de sperme de saumon (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) \Rightarrow 5 μg .

	G	G + A	T + C	C
A. Préparation des échantillons d'ADN				
DNA (μl)	10	10	10	10
DMS Tampon de réaction (μl)	200			
dH ₂ O (μl)			10	5
5 M NaCl (μl)				5
B. Réactions spécifiques de coupure de l'ADN				
DMS (μl)	1			
Acide formique (μl)		25		
Hydrazine (μl)			30	30
Temps d'incubation en minutes à 25°C	4	5	8	8
C. Arrêt de la réaction avec le tampon d'arrêt et de l'éthanol 100 % à -20°C. Précipitation par immersion dans un bain de glace sèche/éthanol pour 5 minutes.				
DMS tampon d'arrêt (μl)	50			
Hydrazine tampon d'arrêt(μl)		200	200	200
100 % ethanol (μl)	750	750	750	750
D. Récolte de l'ADN par centrifugation 30 minutes à 15 000 X (g); Rincer 3 fois avec de l'éthanol 100% à -20°C ; Évaporer 60 min (Speedvac)				
E. Enlever toute trace de réactif par une centrifugation 30 minutes à 15 000X(g) ; Rincer 3 fois avec de l'éthanol 100% à -20°C ; Évaporer 60 min (Speedvac)				
dH ₂ O (μl)	200	200	200	200
3 M acétate de sodium (μl)	20	20	20	20
100 % éthanol à -20°C (μl)	500	500	500	500
F. Activation de la réaction de scission par une incubation de 30 min à 90°C avec de la piperidine; Enlever toute trace de piperidine par évaporation pendant 60 min (Speedvac)				
10 % piperidine (μl)	70	70	70	70
G. Enlever toute trace de piperidine par évaporation de l'eau deux fois des échantillons pendant 60 minutes (Speedvac)				
dH ₂ O Stérile (μl) (premier)	30	30	30	30
dH ₂ O Stérile (μl) (deuxième)	20	20	20	20

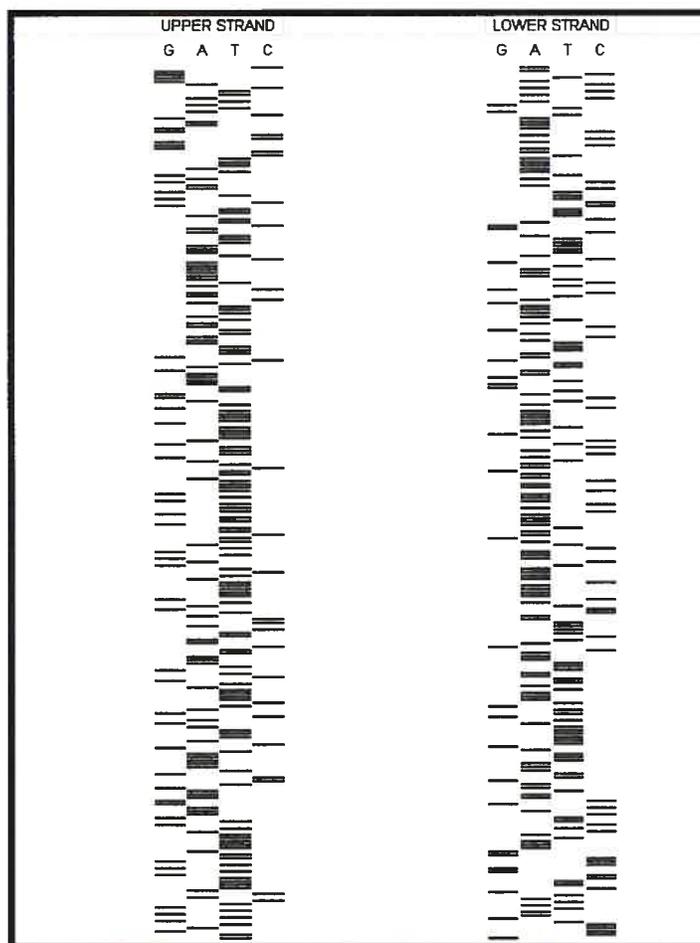


Figure 17 : Profil théorique de la réaction de Maxam-Gilbert sur la région régulatrice de l'opéron *foo*, d'après la séquence réelle de l'opéron *foo* amplifié par PCR avec les amorces sélectionnées (Figure conçue pour ce document).

^{5'}TTGATGTGTGTACATTTTGTGTGTTATTTTTATGTGAAAGGAAAGTCCGTAAAAATGCATTTAGACGATCTTTTA
 TGCTGTAATTCAATTCACCATGATGTTTTATCTGAGTGTATTCTTGTTGTTGTGTTTTATTCTAGTTTGATTTT
 GTTTTGTAGGTTAAAAGATCGTTTAAATTAATTTTACAACATAAAAACTAAATTTAACTTATTGCGTGAAGAGTAT
 TTCGGGCCGGAAGCATATATTCAGGGGC^{3'}

Figure 18 : Séquence de la région intergénique de l'opéron *foo* amplifié par PCR avec les amorces sélectionnées (en rouge), correspondant au brin positif (upper strand). (GenBank Accession Nb AY560911)

7.6 Protection de la région d'intérêt par la protéine Lrp

L'ADN marqué de chacune des régions d'intérêts (opéron *foo* brin positif et brin négatif) a été incubé 15 minutes avec différentes concentrations de la protéine Lrp (0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 et 0,4 μ g dans le tampon 10X). Lors des expériences en

présence de la protéine Lrp les volumes ont été ajustés à un volume final de 20 µl. Les étapes subséquentes ont été effectuées selon le protocole établi précédemment de digestion grâce à la DNaseI et les volumes ont été respectés. Le produit digéré a été purifié grâce au protocole phénol/chloroforme. Cette purification comprend tout d'abord l'extraction de l'ADN avec 75 µl de phénol saturé avec du TE et 75 µl de chloroforme:alcool iso-amylque (24:1). Après centrifugation à 12 000 rpm pendant 15 minutes, la phase aqueuse supérieure a été récupérée et précipitée avec 1 volume d'isopropanol 100%. L'échantillon a été incubé à -80°C pendant 16 heures. Le culot a été obtenu par centrifugation à 15 000 rpm pendant 15 minutes et lavé à l'éthanol 95%. Après évaporation au Speedvac, le culot a été conservées à -20°C avant usage.

8. Analyse des échantillons sur gel dénaturant Urée/Acryl : Bis-Acrylamide

Les ADN marqués traités par la méthode de Maxam-Gilbert et selon le protocole d'empreinte génomique ont été analysés selon les conditions suivantes :

8.1 Préparation du gel 8% Urée/Acryl : Bis-Acrylamide

La préparation du gel de séquençage 8% urée/acryl:bis-acrylamide [7 M urée; TBE 1X; 20% acryl/bis-acrylamide 19 :1 40% (Sigma)] a été effectuée selon les procédures de base recommandées par Ausubel (1989) (Current protocols, 7.6). Les plaques de verres (Bio-Rad ou Life Technologies Inc. BRL) utilisées pour la préparation du gel ont été préalablement traitées au Sigmacote (Sigma). Les intercalaires ainsi que le peigne (30 puits de forme carré) utilisés étant de 2 mm d'épaisseur.

8.2 Traitement, dépôt des échantillons et migration du gel de séquençage

Les échantillons d'ADN ont été resuspendus dans le tampon formamide [95% formamide; 10 mM EDTA [pH 8,0]; 0,1% bromophénol bleu; 0,1% xylène cyanol]

et chauffés à 90°C pendant 3 minutes, puis incubés sur glace (4°C) pendant 5 minutes, pour être ensuite déposés dans les puits sur un gel de séquençage 8% urée/acryl:bis-acrylamide pré-migré.

Finalement, la migration du gel s'est effectuée à 65 Watts (voltage constant) pendant 180 minutes grâce à l'appareil Sequi-Gen GT (Bio-Rad) ou l'appareil S2 sequencing gel electrophoresis apparatus (Life Technologies Inc. BRL).

8.3 Traitement du gel de séquençage

Le gel de séquençage a été séché en utilisant l'appareil 583 Gel Dryer (Bio-Rad) à 90°C pendant 120 minutes. Deux méthodes alternatives ont été utilisées pour l'observation des résultats. La première consistait en l'usage de films (Kodak) lors de l'exposition au gel de séquençage pendant 48 heures à -80°C et au développement du film.

La seconde méthode consistait en l'usage d'un écran phosphore (Molecular Dynamics) pour une exposition de 12 heures à 22°C. La lecture des résultats s'est faite grâce au lecteur STORM 840 (Molecular Dynamics).

SECTION IV- Résultats

1. Production et purification des protéines de fusion

Au cours de notre étude, nous avons produit et purifié certaines protéines de fusion dans le but de poursuivre des analyses sur les opérons *foo*, *pap* et *clp*. Ces protéines étant : Lrp-His₆, Lrp^{L136R}-His₆, FooI-CBP, FooI-His₆ dans pET-32a et FooI-His₆ dans pIVEX 2.3.

1.1 La protéine de fusion Lrp-His₆

Les protéines de fusion Lrp possédant une étiquette de 6 histidines en N-terminal ont été obtenues en ayant recours à la souche CV1494. Cette protéine servira dans des analyses subséquentes, son rôle étant de se fixer, sur l'ADN de la région régulatrice analysée, à des sites spécifiques lors de la régulation de la transcription.

L'identité de ces protéines a été confirmée par Western blot (figure 20) en utilisant des anticorps anti-His₆. Les protéines purifiées ont été quantifiées par densitométrie de comparaison sur gel SDS-PAGE à l'aide d'un appareil alpha-imager (données non-montrées). Ces gels nous démontrent que la préparation de la protéine Lrp- His₆ semble pure et qu'elle est quantifiable. De plus, le Western blot nous confirme que la bande de 21 kDa visualisée par bleu de Coomassie (figure 19) est bien la protéine Lrp- His₆.

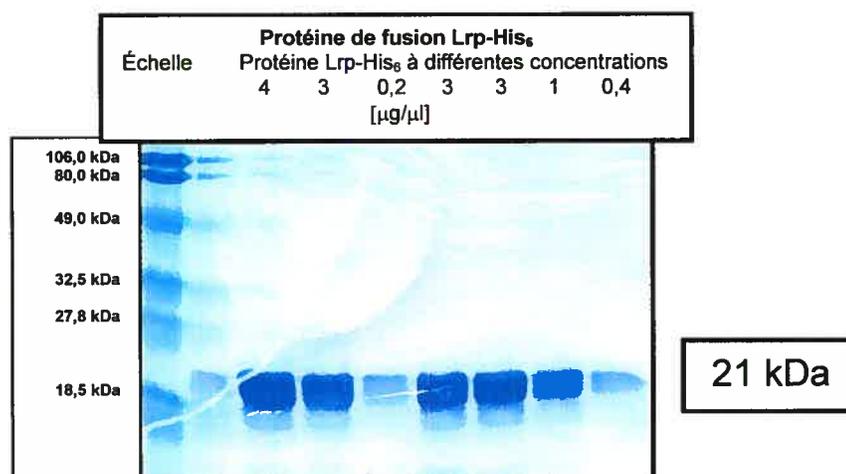


Figure 19 : Gel SDS-PAGE de la protéine de fusion Lrp-His₆.

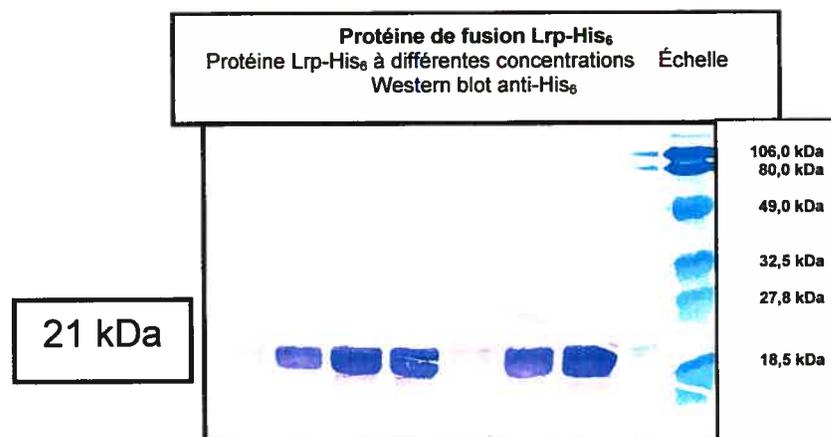


Figure 20 : Western blot anti-His₆ (même dépôts que le gel précédent) dirigé sur la protéine de fusion Lrp-His₆.

1.2 La protéine de fusion Lrp^{L136R}-His₆

Les protéines de fusion Lrp^{L136R} possédant une étiquette de 6 histidines en N-terminal ont été obtenues à l'aide de la souche FB1006. Cette protéine servira dans des analyses subséquentes comme témoin négatif puisqu'elle est insensible à la leucine, son rôle étant de se fixer sur l'ADN de la région régulatrice analysée sur des sites spécifiques lors de la régulation de la transcription.

Nous avons vérifié la quantité de plasmide (3400 pb) sur gel d'agarose. De plus, la présence de l'insert (655 pb) a été vérifiée par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *NcoI* et *BamHI* (New England Biolabs) (données non-montrées), cet insert possède le gène codant pour la protéine de fusion Lrp^{L136R}-His₆. Un deuxième contrôle par PCR ([5' CCCCATGGCTAYGAGTGAATACAT 3'; amorce *NcoI*] et [5' ATATTACCCGGAGTTGTGGAAGAA 3'; amorce *SmaI*]) a permis de confirmer les résultats observés par digestion enzymatique.

L'identité de ces protéines a été confirmée par Western blot en utilisant des anticorps anti-His₆ (Roche) (figure 22). Les protéines purifiées ont été quantifiées par

densitométrie de comparaison sur gel SDS-PAGE à l'aide de l'appareil alpha-imager (données non-montrées). Ces gels nous démontrent que la préparation de la protéine Lrp^{L136R} -His₆ semble pure et qu'elle est quantifiable. De plus, le Western blot nous confirme que la bande de 20,7 kDa visualisée par bleu de Coomassie (figure 21) est bien la protéine Lrp^{L136R} -His₆.

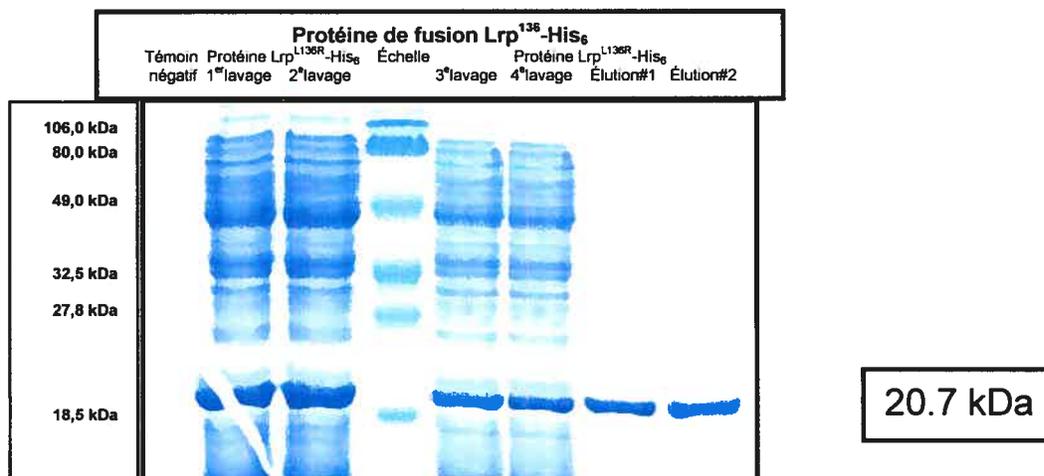


Figure 21 : Gel SDS-PAGE de la protéine de fusion Lrp^{L136R} -His₆. Chaque puits correspond à une étape de purification sur la colonne Ni-NTA [(4 lavages : 4 volumes de colonne) et (2 éluions : 2 volumes de colonne)].

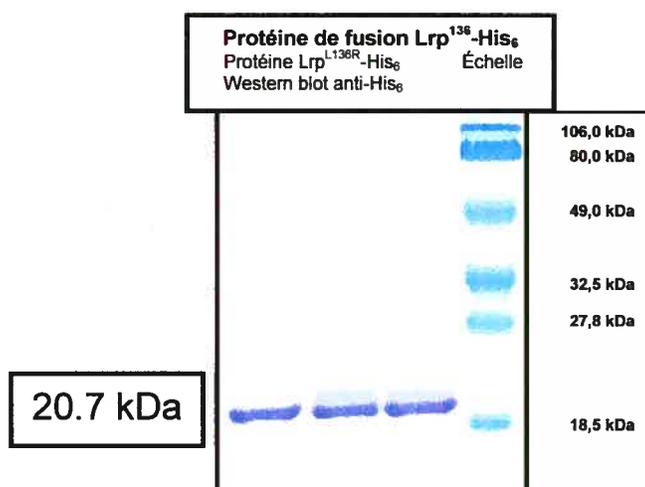


Figure 22 : Western blot anti-His₆ dirigé sur la protéine de fusion Lrp^{L136R} -His₆ sur trois fractions d'élution.

1.3 La protéine de fusion FooI-CBP

Les protéines de fusion FooI possédant une étiquette CBP en N-terminal ont été obtenues à l'aide de la souche BL21DE3p/ysS FooIpCALnEK. Cette protéine servira dans des analyses subséquentes, son rôle étant de se fixer, sur l'ADN de la région régulatrice analysée, à des sites spécifiques lors de la régulation de la transcription.

L'identité de ces protéines a été confirmée par Western blot en utilisant des anticorps (IgY) anti-FooI (figure 24). Les protéines purifiées ont été quantifiées par densitométrie de comparaison sur gel SDS-PAGE à l'aide d'un appareil alpha-imager (données non-montrées). Ces gels nous démontrent que la préparation de la protéine FooI-CBP semble pure et qu'elle est quantifiable. De plus, le Western blot nous confirme que la bande de 12,8 kDa visualisée par bleu de Coomassie (figure 23) est bien la protéine FooI-CBP.

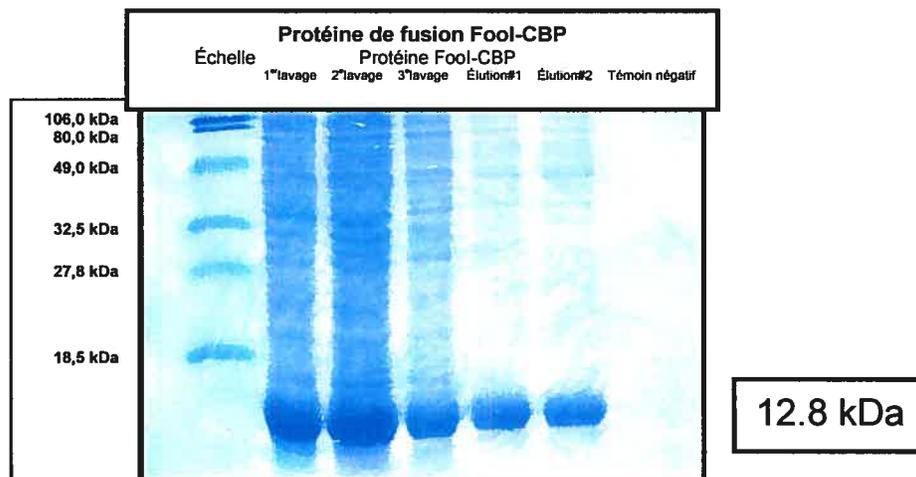


Figure 23 : Gel SDS-PAGE de la protéine de fusion FooI-CBP. Chaque puits correspond à une étape de purification sur la colonne CBP [(3 lavages : 3 volumes de colonne) et (2 éluions : 2 volumes de colonne)].

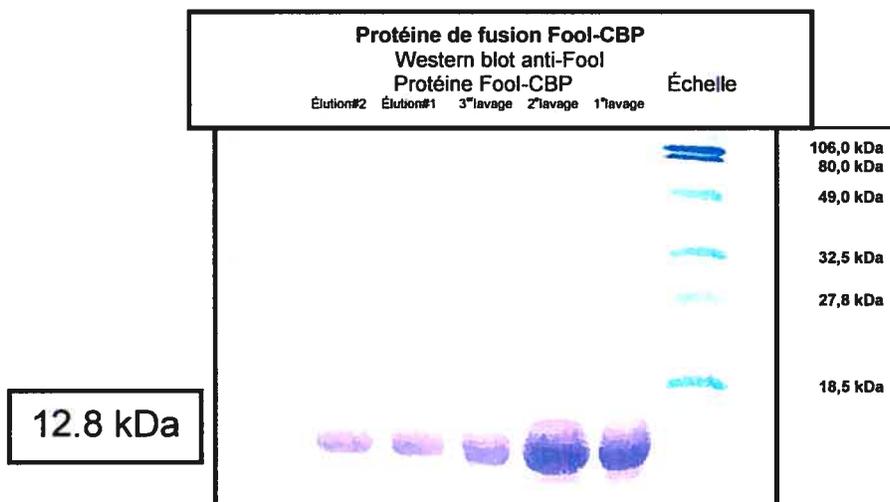


Figure 24 : Western blot anti-Fool dirigé sur la protéine de fusion Fool-CBP. Chaque puits correspond à une étape de purification sur la colonne CBP [(3 lavages : 3 volumes de colonne) et (2 éluions : 2 volumes de colonne)].

Diverses techniques ayant pour but d'éliminer l'étiquette CBP (4 kDa) liée à Fool (8,8 kDa) ont été testées. La première méthode consistait à couper l'étiquette à l'aide de l'enzyme enterokinase (Ek) (1 U/100 µg de protéine) (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant (plusieurs temps d'incubation ont été testés [variant entre 2 heures et 24 heures]) et à purifier la protéine grâce à la résine d'affinité de protéine de fusion CBP. La seconde technique consistait à couper l'étiquette CBP à l'aide de l'enzyme Ek et à éliminer l'étiquette CBP par dialyse à l'aide d'une membrane filtrante Spectra/Por 1, de porosité 6000 à 8000 Daltons. Quelque soit la technique utilisée nous n'avons pas observé de digestion au niveau du site de coupure inséré entre CBP et Fool (données non montrées). D'autres constructions de protéines de fusion ont été envisagées tel que : la protéine de fusion Fool-His₆ dans pET-32a et la protéine de fusion Fool-His₆ dans pIVEX 2.3.

2. Construction de protéines de fusion alternatives FooI-His₆

2.1 Constructions de protéine de fusion FooI-His₆ dans pET-32a

Le plasmide pET-FooI01 a été construit par insertion du produit PCR (gène *fooI* (234 pb) provenant de la souche MT006) dans le vecteur pET-32a (5900 pb).

Nous avons vérifié la quantité de plasmide (6134 pb) sur gel d'agarose et la présence de l'insert (269 pb [234 pb insert + 35pb vecteur]) par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *NcoI* et *XhoI* (New England Biolabs) (données non-montrées), cet insert possédant le gène codant pour la protéine de fusion FooI-His₆. Un deuxième contrôle par PCR ([5' CCGAATTCATGAGTGAATACAT 3'; amorce *EcoRI*] et [5' CCAAGCTTGTAAAGTTGTGGAAGAA 3'; amorce *HindIII*]) a permis de confirmer les résultats observés par digestion enzymatique. De plus, l'intégrité de l'insert a été vérifiée grâce aux amorces nucléotidiques décrites dans le protocole de séquençage (données non montrées).

2.2 Constructions de protéine de fusion FooI-His₆ dans pIVEX 2.3

Le plasmide pIVEX-FooI02 a été construit par l'insertion du produit PCR (gène *fooI* (234 pb) provenant de la souche MT006) dans le vecteur pIVEX 2.3 (3530 pb).

Nous avons vérifié la quantité de plasmide (3764 pb) sur gel d'agarose et la présence de l'insert (234 pb) par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *NcoI* et *SmaI* (New England Biolabs) (données non-montrées), cet insert possédant le gène codant pour la protéine de fusion Lrp^{L136R}-His₆. Un deuxième contrôle par PCR ([5' CCCCATGGCTATGAGTGAATACAT 3'; amorce *NcoI*] et [5' ATATTACCCGGGAGTTGTGGAAGAA 3'; amorce *SmaI*]) a permis de confirmer les résultats observés par digestion enzymatique. De plus, l'intégrité de l'insert a été vérifiée grâce aux amorces nucléotidiques décrites dans le protocole de séquençage ci-dessus (données non montrées).

3. Production et purification de l'ADN matrice des régions régulatrices

Afin de réaliser les expérimentations de séquençage, nous avons produit et purifié l'ADN matrice des régions régulatrices : l'opéron *foo*, *pap* et *clp*.

3.1 La région régulatrice de l'opéron *foo*

En ce qui a trait à la région régulatrice de *foo*, nous avons vérifié la taille du plasmide pMT012 (13 200 pb) (provenant de la souche MT024) sur gel d'agarose et la présence de l'insert (787 pb) par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *Bgl*I et *Bam*HI (données non montrées). De plus, un deuxième contrôle par PCR ([5' TTGATGTGTGTCACATTTTGTG 3'; amorce *foo*-for] et [5' GCCCCTGAATATAGCTTCC 3'; amorce *foo*-rev]) a permis de confirmer les résultats observés par digestion enzymatique (données non montrées).

3.2 La région régulatrice de l'opéron *pap*

Pour ce qui est de la région régulatrice de *pap*, nous avons vérifié la quantité de plasmide (HB101 contenant le plasmide pPap5, 4545 pb) sur gel d'agarose et la présence de l'insert (1760 pb) par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *Bam*HI et *Sma*I (données non montrées). De plus, un deuxième contrôle par PCR ([5' TTGATGTGTATCACATTTTGCG 3'; amorce *pap*-for] et [5' GCCCCTGGATATATGCTTCC 3'; amorce *pap*-rev]) a permis de confirmer les résultats observés par digestion enzymatique (données non montrées).

3.3 La région régulatrice de l'opéron *clp*

Pour la région régulatrice de *clp*, nous avons vérifié la quantité de plasmide pUC18 Hd Sca 12 (2686 pb) (provenant de la souche JM109) sur gel d'agarose et la présence de l'insert (332 pb) par digestion enzymatique à l'aide d'enzymes *Hind*III et *Sca*I (données non montrées). De plus, un deuxième contrôle par PCR

([5' CTCTCCCTGTTTGATTTCGTGC 3'; amorce *clp-for*] et [5' CGTATTCACCTCTGTTGCCGTCC 3'; amorce *clp-rev*]) a permis de confirmer les résultats observés par digestion enzymatique (données non montrées).

Les plasmides purifiés ont été utilisés comme substrat d'une réaction PCR pour produire la région désirée en quantité suffisante pour les expérimentations prévues.

4. Sélection des amorces oligonucléotidiques

La sélection des amorces oligonucléotidiques pour la production des régions régulatrices d'intérêts s'est effectuée par l'analyse de chacune des séquences nucléotidiques de ces régions avec le programme (clonagen). Le but étant d'obtenir la région désirée (région intercistronique contenant les sites potentiels de fixation de la protéine Lrp) lors de l'amplification. Les séquences sont décrites dans la figure 25 (région régulatrice de l'opéron *foo* comparée à la région régulatrice de l'opéron *pap*) et dans la figure 26 (région régulatrice de l'opéron *clp*).

5. Mise au point de la digestion à 50 % par l'enzyme DNaseI

Tel que décrit dans la partie de matériel et méthode, la mise au point de la digestion par la DNaseI des régions d'intérêt (opéron *foo*, *pap* et *clp*) a été effectuée de la façon suivante. Chacune des régions d'intérêts marquées [125 000 cpm/ μ l] a été digérée à l'aide de l'enzyme DNaseI FPLCpure [30 U] (Amersham Biosciences) pendant différents temps d'incubation [0; 1; 2; 5; 10; 15 minutes].

L'ADN digéré a été récupéré et purifié par une extraction phénol/chloroforme selon les conditions du protocole original. Finalement, l'ADN purifié a été séché jusqu'à l'obtention d'un culot translucide à l'aide d'un Speedvac DNA120 (Thermo).

Le produit fini a été suspendu dans un volume final de 15 µl de tampon formamide [95% formamide; 10 mM EDTA [pH 8,0]; 0,1% bromophénol bleu; 0,1% xylène cyanol].

Les différents produits ont migrés sur gel de séquençage 8% [7 M urée; TBE 1X; 20% acryl/bis-acrylamide 19 :1 40% (Sigma)]. Après analyse des résultats, nous avons déterminé qu'entre 0 et 2 minutes d'incubation en présence de la DNaseI les fragments ne sont pas digérés suffisamment pour être observables sur gel. En revanche, entre 10 et 15 minutes d'incubation on observe une échelle de fragments digérés adéquatement. Le résultat optimal étant obtenu lors d'une incubation de 10 minutes de la région d'intérêt en présence de la DNaseI (données non montrées).

6. Analyse des régions d'intérêts sur gel dénaturant Urée/Acryl :Bis-Acrylmidé

Tel que décrit dans la partie de matériel et méthode, chacune des régions d'intérêts séquencées radio-marquées a été traitée par la méthode chimique de Maxam-Gilbert (voir matériel et méthode, tableau II). Cette méthode permet d'identifier la région nucléotidique incluant les sites protégés de l'action de la DNaseI (échelle). Le produit fini a été suspendu dans un volume final de 15 µl de tampon formamide [95% formamide; 10 mM EDTA [pH 8,0]; 0,1% bromophénol bleu; 0,1% xylène cyanol].

De plus, chacune des régions d'intérêt radio-marquées [125 000 cpm (³²P)/ µl], en absence de protéine, a été digérée à l'aide de l'enzyme DNaseI [30 U] (témoin négatif). L'ADN digéré a été récupéré et purifié par une extraction phénol/chloroforme (voir matériel et méthode). Le produit fini a été suspendu dans un volume final de 15 µl de tampon formamide [95% formamide; 10 mM EDTA [pH 8,0]; 0,1% bromophénol bleu; 0,1% xylène cyanol].

Finalement pour identifier les nucléotides protégés, chacune des régions d'intérêt (opéron *foo* brin positif et brin négatif) a été incubée avec différentes concentrations de la protéine Lrp (0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 et 0,4 µg) et a ensuite été digérée grâce à la DNaseI [30 U] (empreinte génomique). Le produit digéré a été purifié grâce au

protocole phénol/chloroforme et suspendu dans un volume final de 15 μ l de tampon formamide [95% formamide; 10 mM EDTA [pH 8,0]; 0,1% bromophénol bleu; 0,1% xylène cyanol].

Les différents produits ont migrés sur gel de séquençage 8% [7 M urée; TBE 1X; 20% acryl/bis-acrylamide 19 :1 40% (Sigma)].

L'empreinte génomique à la DNaseI sur la région régulatrice de l'opéron *foo* (brin positif) a été réalisée en présence de différentes concentrations de la protéine Lrp [0 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 et 0,25 μ g]. La protection semble débiter approximativement à 0,2 μ g de Lrp (figure 27) cependant des analyses supplémentaires seront nécessaires pour confirmer cette concentration.

De surcroit, l'empreinte génomique à la DNaseI sur la région régulatrice de l'opéron *foo* (brin positif) a été réalisée en présence de différentes concentrations de la protéine Lrp [0 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 et 0,25 μ g] et en présence de 10 mM d'alanine. Cet acide aminé a été décrit comme ayant un effet répressif sur l'expression du gène *fooBA* présent sur l'opéron *foo*. Dans cette expérimentation, la protection semble débiter approximativement à 0,15 μ g de Lrp (figure 28) cependant des analyses supplémentaires seront nécessaires pour confirmer cette concentration. De plus, sur ce gel nous remarquons que certaines zones semblent ne pas être occupées aussi rapidement que les autres, ce qui nous amène à penser que la présence de la protéine FooI pourrait avoir un rôle dans l'interaction de Lrp avec la séquence correspondante à l'opéron *foo*. Cependant des analyses complémentaires en présence de FooI seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

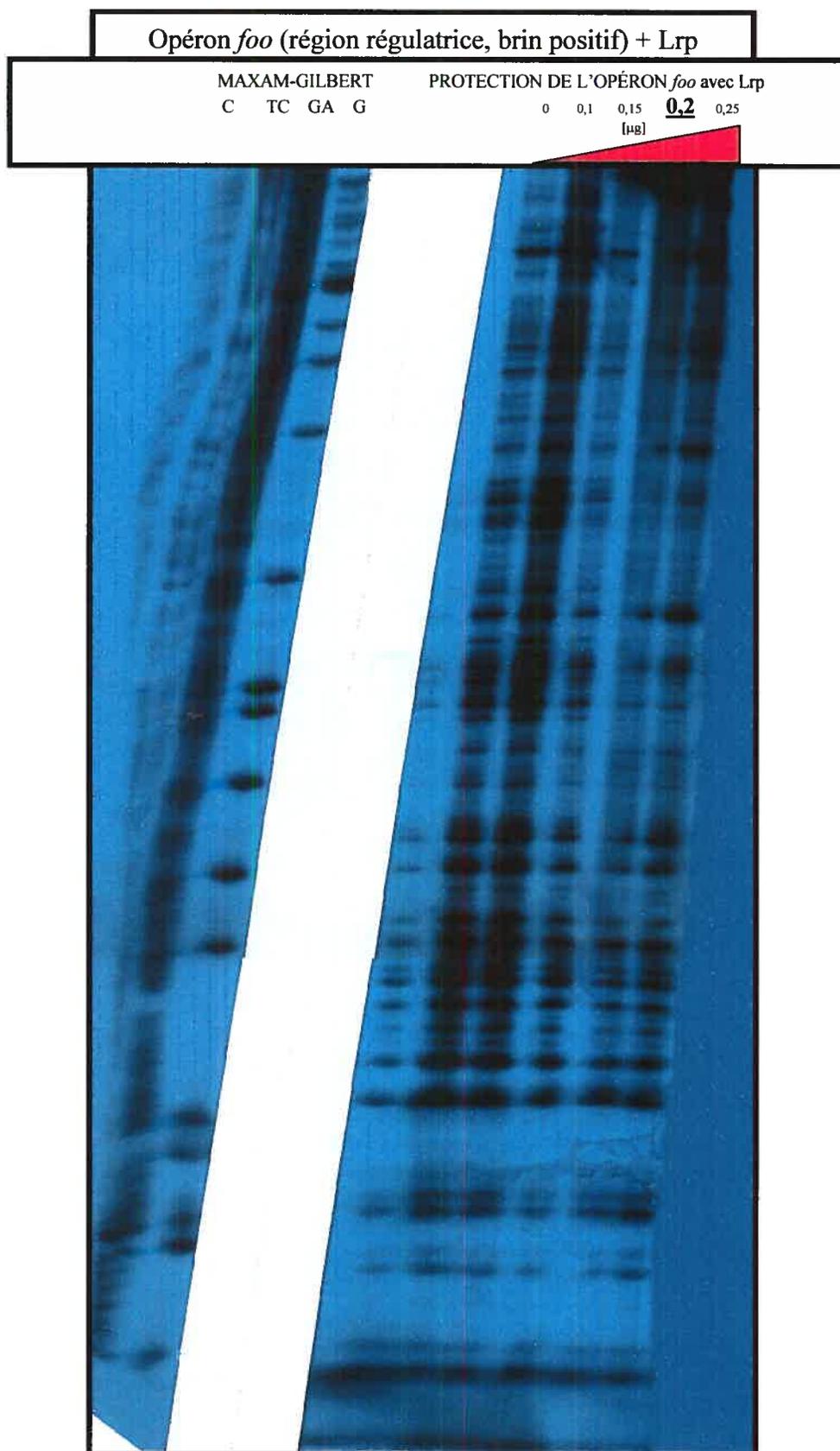


Figure 27 : Réaction de Maxam-Gilbert sur l'opéron *foo*, brin positif (à gauche). Empreinte génomique à la DNaseI sur la région régulatrice de l'opéron *foo* (brin positif) à l'aide de différentes concentrations de la protéine Lrp [0 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 et 0,25 µg]. La protection débute approximativement à 0,2µg de Lrp.

7. Séquençage de la région d'intérêt par la méthode de Maxam-Gilbert

Le début de mise au point du séquençage par la méthode Maxam-Gilbert a été effectuée de la façon suivante. Chacune des séquences marquées d'intérêt a été traitée à l'aide de la méthode chimique standard de Maxam-Gilbert (Ausubel (1989), Current Protocols, 7.5.1). Cependant, certaines étapes ont été modifiées. La version abrégée modifiée est décrite dans le tableau II de ce mémoire.

Les résultats préliminaires de l'analyse de la séquence de l'opéron *foo* (brin positif et brin négatif) sont présentés dans la figure 29. Suite à l'analyse de ce gel, une identification partielle de la séquence nucléotidique sur le gel a pu être faite. Un début de corrélation a été mis en évidence sur cette figure avec les séries de «G» et de «A» (AAAAA) en gras sur la séquence et les encadrés sur la photo. Avec les réactions indiquant les coupures après le GA et après les G, il sera possible se retrouver sur la séquence les nucléotides en question.

Des expériences supplémentaires de la réaction de séquençage de Maxam-Gilbert en parallèle avec l'empreinte génomique de la région régulatrice de l'opéron *foo* seront nécessaires pour une corrélation complète et une identification précise (au niveau nucléotidique) des régions protégées.

En résumé, nous avons produit et purifié en quantité suffisante certaines protéines de fusion dans le but de poursuivre des analyses sur les opérons *foo*, *pap* et *clp*. Ces protéines étant : Lrp-His₆, Lrp^{L136R}-His₆, FooI-CBP, FooI-His₆ dans pET-32a et FooI-His₆ dans pIVEX 2.3. De plus, afin de réaliser les expérimentations de séquençage, nous avons marqué au γ -³²P, produit et purifié l'ADN matrice des régions régulatrices : l'opéron *foo*, *pap* et *clp*. De surcroît, chacune des régions d'intérêts séquencées radio-marquées a été traitée par la méthode chimique de Maxam-Gilbert (échelle) ou a été digérée à l'aide de l'enzyme DNaseI [30 U] (témoin négatif). Finalement pour identifier les nucléotides protégés, chacune des régions d'intérêt (opéron *foo* brin positif et brin négatif) a été incubée avec différentes concentrations de la protéine Lrp (0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 et 0,4 μ g) et a ensuite été digérée grâce à la DNaseI [30 U] (empreinte génomique) et ce en présence versus en absence d'alanine.

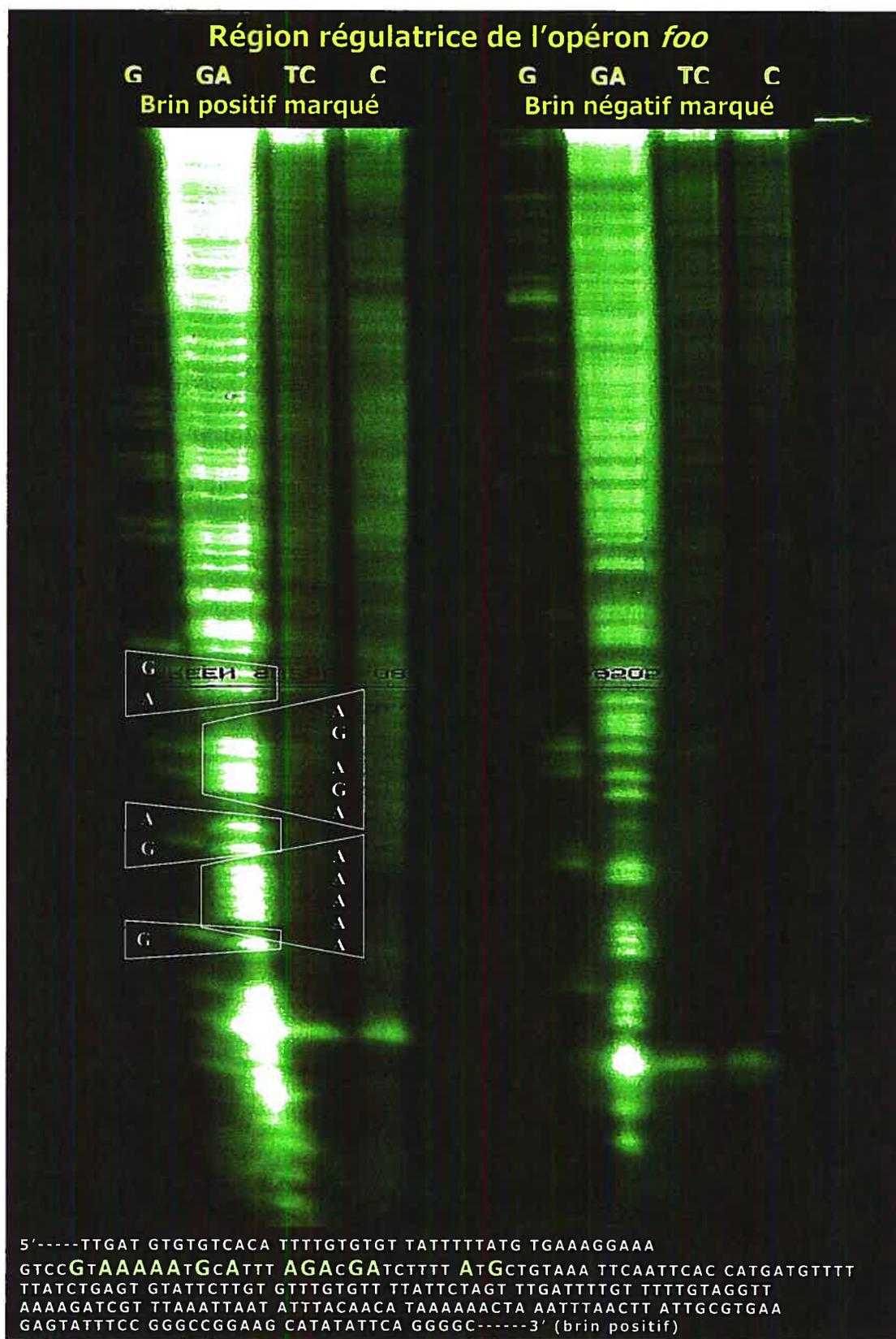


Figure 29 : Réaction de Maxam-Gilbert sur l'opéron *foo*, brin positif et brin négatif. Alignement partiel de la séquence nucléotidique. Un début de corrélation a été mis en évidence sur cette figure avec les séries de «G » et de «A» (AAAAA) en gras sur la séquence et les encadrés sur la photo.

SECTION V- Discussion

Discussion

L'opéron *foo* code pour les antigènes fimbriaires F165₁ produits par les souches 4787 et 5131 d'*Escherichia coli* O115:KV165. Cet opéron présente une organisation génétique similaire à l'opéron *pap* qui est le principal membre de la famille des pili de type P (Daigle *et al.*, 2000; Harel *et al.*, 2000). L'expression de *foo* est soumise à une régulation complexe en réponse à différents facteurs environnementaux. En effet, l'expression du fimbriae F165₁ est dépendante, comme pour son homologue, le fimbriae Pap, de plusieurs régulateurs globaux tels que CRP et Lrp, ainsi que de certains régulateurs spécifiques tels que FooI et FooB, qui sont des homologues de PapI et PapB (Harel *et al.*, 2000; Daigle *et al.*, 2000). De plus, la présence de deux acides aminés (la leucine et l'alanine) dans le milieu de croissance de la bactérie réprime de façon considérable la biosynthèse de F165₁ (Daigle *et al.*, 1997 ; 2000).

Notre étude nous a permis de commencer à mettre au point plusieurs outils pour identifier et caractériser les sites de liaison de la protéine Lrp sur les régions régulatrices (intercistroniques) des opérons *foo* et *clp*.

Le clonage du gène *fooI* par différentes constructions plasmidiques a permis la production de protéines de fusions (FooI-His₆) et la purification de celle-ci. D'autres protéines ont été produites et purifiées telles que : Lrp-His₆, Lrp^{L136R}-His₆, FooI-CBP, FooI-His₆ dans pET-32a (+) et FooI-His₆ dans pIVEX 2.3. Les protéines Lrp et FooI interviennent dans la régulation de la transcription des gènes *fooI* et *fooBA* et sont impliquées dans la méthylation de l'opéron *foo* au niveau des sites GATC-I et GATC-II.

La région régulatrice de *foo* a été purifiée et marquée au ³²P. Nous avons tenté d'adapter le protocole de séquençage Maxam-Gilbert pour l'analyse des régions régulatrices de l'opéron *foo* (brin positif et brin négatif). Les résultats restent encore sommaires à ce niveau.

De plus, nous avons commencé à mettre au point un protocole de digestion par la DnaseI de l'opéron *foo* (brin positif et brin négatif). Cette technique a été réalisée en présence de Lrp à différentes concentrations. Nous avons aussi testé l'effet de la

présence versus l'absence de l'acide aminé alanine. L'empreinte génomique à la DNaseI n'a pas permis l'observation précise des sites de liaisons de Lrp sur la région régulatrice de l'opéron *foo* car la réaction n'a pas fonctionné en même temps que la réaction de Maxam-Gilbert. Cependant, une approximation de la concentration en Lrp nécessaire pour l'obtention d'une variation dans la fixation de cette protéine sur les sites en question a pu être estimée (0,20 µg/µl).

Grâce à ces deux techniques, nous avons tenté de déterminer la présence de six sites de fixation pour la protéine Lrp au niveau de la région régulatrice de l'opéron fimbriaire *foo*. Cependant, après analyse de comparaison entre les empreintes génomiques sur l'opéron *pap* (Hernday *et al.*, 2002) et nos empreintes génomiques sur l'opéron *foo*, nous ne sommes pas arrivés à des résultats concluants. Les expériences ayant été réalisées deux fois, des analyses supplémentaires d'empreinte génomique sur l'opéron *foo* seront nécessaires afin de tirer des conclusions.

De plus, l'empreinte génomique nous a aussi permis d'estimer la concentration de protéine Lrp nécessaire pour protéger les six sites de liaison (différentes concentrations testées) et ce en présence versus absence de l'acide aminé alanine. Nous avons pu observer qu'en absence d'alanine la concentration de Lrp ayant un effet est approximativement de 0,20 µg (soit 0,01 µg/µl). Tandis qu'en présence d'alanine, la concentration de Lrp ayant un effet est approximativement de 0,15 µg (0,0075 µg/µl). Finalement, l'alanine modulerait légèrement l'action de la protéine Lrp en modifiant la reconnaissance de celle-ci pour chacun des sites sur l'ADN de l'opéron fimbriaire *foo* comme précédemment observé par Daigle *et al.*, 2000 et Harel *et al.*, 2000. Ces résultats étant préliminaires (un seul résultat), d'autres expériences seront nécessaires pour confirmer ces données.

L'identification des séquences protégées devra être confirmée par des expériences supplémentaires. Selon les expériences réalisées par Berthiaume *et al.* (2004) ainsi que Crost *et al.* (2003) la présence d'alanine ou de leucine affecte la liaison de la protéine Lrp sur la région de régulation de l'opéron fimbriaire *foo*. En effet, notre étude semble confirmer les résultats qui ont été récemment publiés par ces auteurs.

Les expériences réalisées par C. Crost (Crost, thèse de doctorat, 2003) nous ont permis d'identifier des régions de fixation de la protéine Lrp sur les régions de régulation des opérons *foo* et *clp*. La mise au point des techniques moléculaires tel que l'empreinte génomique ainsi que le séquençage par la méthode de séquençage de Maxam-Gilbert vont permettre de déterminer précisément les nucléotides où se fixe la protéine Lrp.

De plus, la mise au point de ces techniques va nous permettre de caractériser et d'identifier les différentes interactions moléculaires, telles que : entre régulateurs, entre l'ADN et les divers régulateurs complexés ou non entre eux. Ces interactions moléculaires permettront, après identification, de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de l'opéron fimbriaire de F165₁, et par conséquent, de comprendre également les mécanismes de variation de phase de l'opéron *foo*.

La mise au point d'outils et de techniques moléculaires lors de cette étude permettra des études plus approfondies dans un futur très rapproché.

SECTION VI- Conclusion

Conclusion

Lors de cette étude nous avons mis au point plusieurs outils ainsi que plusieurs techniques qui seront très utiles pour poursuivre les études sur l'opéron fimbriaire F165₁. Ces études permettront de mieux comprendre les mécanismes de variation de phase de l'opéron *foo* et l'influence des facteurs comme les protéines de régulation sur ce dernier.

De plus, nous avons tenté de déterminer la présence de sites de fixation pour la protéine Lrp au niveau de la région régulatrice de l'opéron fimbriaire *foo* grâce à la technique moléculaire de l'empreinte génomique.

De surcroît, l'empreinte génomique nous a aussi permis de commencer à déterminer la concentration de la protéine Lrp nécessaire pour la liaison à ces six sites et ce en présence de différents facteurs comme la protéine FooI et des l'acides aminés (alanine et leucine).

Finalement, nous avons tenté de vérifier que l'alanine module l'action de la protéine Lrp en modifiant la reconnaissance de celle-ci pour l'ADN de l'opéron fimbriaire *foo*.

Le début de mise au point d'outils et de techniques moléculaires lors de cette étude permettra des études plus approfondies et complémentaires dans un futur très rapproché.

SECTION VII- Bibliographie

Bibliographie

- Abraham, J.M., Freitag, C.S., Clements, J.R. et Eisenstein, B.I. (1985) An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 5724-5727.
- Aguero, M.E., de la Fuente, G., Vivaldi, E. et Cabello, F. (1989) ColV increases the virulence of *Escherichia coli* K1 strains in animal models of neonatal meningitis and urinary infection. *Med Microbiol Immunol* **178**: 211-216.
- Ali Azam, T. et Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* **274**: 33105-33113.
- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. et Ishihama, A. (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol* **181**: 6361-6370.
- Ambartsoumian, G., D'Ari, R., Lin, R.T. et Newman, E.B. (1994) Altered amino acid metabolism in *lrp* mutants of *Escherichia coli* K12 and their derivatives. *Microbiology* **140**: 1737-1744.
- Anderson, J.J., Quay, S.C. et Oxender, D.L. (1976) Mapping of two loci affecting the regulation of branched-chain amino acid transport in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **126**: 80-90.
- Atlung, T. et Ingmer, H. (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* **24**: 7-17.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. et Struhl, K. (1989), Current Protocols in Molecular Biology, Format: Loose-leaf, Five Volumes, Series Editor: Virginia Benson Chanda, Units 7.5; 7.6; 10.1; 10.2; 12.4.
- Baga, M., Normark, S., Hardy, J., O'Hanley, P., Lark, D., Olsson, O., Schoolnik, G. et Falkow, S. (1984) Nucleotide sequence of the *papA* gene encoding the Pap pilus subunit of human uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **157**: 330-333.
- Baga, M., Goransson, M., Normark, S. et Uhlin, B.E. (1985) Transcriptional activation of a *pap* pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *Embo J* **4**: 3887-3893.
- Baga, M., Norgren, M. et Normark, S. (1987) Biogenesis of *E. coli* Pap pili: *papH*, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell* **49**: 241-251.
- Baga, M., Goransson, M., Normark, S. et Uhlin, B.E. (1988) Processed mRNA with differential stability in the regulation of *E. coli* pilin gene expression. *Cell* **52**: 197-206.
- Barber, A.M., Zhurkin, V.B. et Adhya, S. (1993) CRP-binding sites: evidence for two structural classes with 6-bp and 8-bp spacers. *Gene* **130**: 1-8
- Bernardi, A., Gaillard, C. et Bernardi, G. (1975) The specificity of five DNAases as studied by the analysis of 5'-terminal doublets. *Eur J Biochem* **52**: 451-7.
- Berthiaume, F., Mémoire de Maîtrise, (2003) Influence de la L-leucine et de la L-alanine sur la régulation par Lrp de l'expression de l'opéron *foo* codant pour F165₁, chez *Escherichia coli*. Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire.
- Berthiaume, F., Crost, C., Labrie, V., Martin, C., Newman, E.B. et Harel, J. (2004) Influence of L-leucine and L-alanine on Lrp regulation of *foo*, coding for F165₁, a Pap homologue. *J Bacteriol* **186**:8537-41.

- Bétermier, M., Alazard, R., Lefrère, V. et Chandler, M. (1989) Functional domains of bacteriophage Mu transposase: properties of C-terminal deletions. *Mol Microbiol* **3**: 1159-71.
- Blomfield, I.C., Calie, P.J., Eberhardt, K.J., McClain, M.S. et Eisenstein, B.I. (1993) Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**: 27-36.
- Blomfield, I.C. (2001) The regulation of *pap* and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* **45**: 1-49.
- Blyn, L.B., Braaten, B.A., White-Ziegler, C.A., Rolfson, D.H. et Low, D.A. (1989) Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *Embo J* **8**: 613-620.
- Blyn, L.B., Braaten, B.A. et Low, D.A. (1990) Regulation of Pap pilin phase variation by a mechanism involving differential dam methylation states. *Embo J* **9**: 4045-4054.
- Borst, D.W., Blumenthal, R.M. et Matthews, R.G. (1996) Use of an in vivo titration method to study a global regulator: effect of varying Lrp levels on expression of *glxBDF* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6904-6912.
- Braaten, B.A., Blyn, L.B., Skinner, B.S. et Low, D.A. (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.
- Braaten, B.A., Platko, J.V., van der Woude, M.W., Simons, B.H., de Graaf, F.K., Calvo, J.M. et 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.
- Braaten, B.A., Nou, X., Kaltenbach, L.S. et Low, D.A. (1994) Methylation patterns in *pap* regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in *E. coli*. *Cell* **76**: 577-588.
- Brinkman, A.B., Dahlke, I., Tuininga, J.E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J.H., Thomm, M., de Vos, W.M. et van Der Oost, J. (2000) An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J Biol Chem* **275**: 38160-38169.
- Busby, S. et Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Calvo, J.M. et Matthews, R.G. (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 466-490.
- Cann, J.R., Rao, A.G. et Winzor, D.J. (1989) Numerical and experimental demonstrations of the need for caution in the use of zonal gel chromatography for characterizing ligand interactions with small acceptors. *Arch Biochem Biophys* **270**: 173-83.
- Carey, J. (1988) Gel retardation at low pH resolves trp repressor-DNA complexes for quantitative study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 975-9.
- Carey, J. (1991) Gel retardation. *Methods Enzymol* **208**: 103-17.
- Carthew, R.W., Chodosh, L.A. et Sharp, P.A. (1985) An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* **43**: 439-48.
- 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**: 541-55.
- Chen, C.F., Lan, J., Korovine, M., Shao, Z.Q., Tao, L., Zhang, J. et Newman, E.B. (1997) Metabolic regulation of *lrp* gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **143**: 2079-2084.

- Chen, C. et Newman, E.B. (1998) Comparison of the sensitivities of two *Escherichia coli* genes to in vivo variation of Lrp concentration. *J Bacteriol* **180**: 655-659.
- Chen, S., Hao, Z., Bieniek, E. et Calvo, J.M. (2001a) Modulation of Lrp action in *Escherichia coli* by leucine: effects on non-specific binding of Lrp to DNA. *J Mol Biol* **314**: 1067-1075.
- Chen, S., Rosner, M.H. et Calvo, J.M. (2001b) Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **312**: 625-635.
- Chen, S. et Calvo, J.M. (2002) Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *J Mol Biol* **318**: 1031-1042.
- Cherifi, A., Contrepois, M., Picard, B., Goulet, P., de Rycke, J., Fairbrother, J. et Barnouin, J. (1990) Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol Lett* **58**: 279-283.
- Chodosh, L.A., Carthew, R.W. et Sharp, P.A. (1986) A single polypeptide possesses the binding and transcription activities of the adenovirus major late transcription factor. *Mol Cell Biol* **6**: 4723-33.
- Chow, C.S. et Barton, J.K. (1992) Recognition of G-U mismatches by tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)rhodium(III). *Biochemistry* **31**: 5423-9.
- Church, G.M. et Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1991-5.
- Crost, C., Garrivier, A., Harel, J. et Martin, C. (2003) Leucine-responsive regulatory protein-mediated repression of *clp* (encoding CS31A) expression by L-leucine and L-alanine in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:1886-94. *J Bacteriol* **185**:2972.
- Crost, C., thèse de doctorat, (2003) Étude comparative de la régulation transcriptionnelle des opérons *foo* et *clp* codant pour les adhésines F165₁ et CS31A, produites par des *Escherichia coli* septicémiques. Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire.
- Crost, C., Harel, J., Berthiaume, F., Garrivier, A., Tessier, M.C., Rakotoarivonina, H. et Martin, C. (2004) Influence of environmental cues on transcriptional regulation of *foo* and *clp* coding for F165(1) and CS31A adhesins in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **155**: 475-82.
- Colland, F., Barth, M., Hengge-Aronis, R. et Kolb, A. (2000) sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Lrp transcription factors. *Embo J* **19**: 3028-3037.
- Contrepois, M., Fairbrother, J.M., Kaura, Y.K. et 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* **50**: 319-323.
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G.D. et Calvo, J.M. (1995) A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J Bacteriol* **177**: 4872-4880.
- Dahlberg, A.E., Dingman, C.W. et Peacock, A.C. (1969) Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in agarose-acrylamide composite gels. *J Mol Biol* **41**: 139-47.
- Daigle, F., Dozois, C.M., Jacques, M. et Harel, J. (1997) Mutations in the *fl65(1)A* and *fl65(1)E* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microb Pathog* **22**: 247-252.
- Daigle, F., Forget, C., Martin, C., Drolet, M., Tessier, M.C., Dezfoulian, H. et Harel, J. (2000) Effects of global regulatory proteins and environmental conditions on fimbrial gene expression of F165(1) and F165(2) produced by *Escherichia coli* causing septicaemia in pigs. *Res Microbiol* **151**: 563-574.

- de Graaf, F.K. et Roorda, I. (1982) Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect Immun* 36: 751-758.
- de Ree, J.M. et van den Bosch, J.F. (1987) Serological response to the P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis. *Infect Immun* 55: 2204-2207.
- Dezfulian, H., Crost, C. et Harel, J. (2001) A mini review on F165 fimbriae. *Recent Res. Devel. Microbiol* 5: 123-137.
- Dezfulian, H., Batisson, I., Fairbrother, J.M., Lau, P.C., Nassar, A., Szatmari, G. et Harel J. (2003) Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. *J Clin Microbiol* 41: 1375-85.
- Dezfulian, H., thèse de doctorat (2003) Localization and characterization of pathogenicity island(s) in F165-positive strains of septicemic *Escherichia coli*. Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire.
- Dezfulian, H., Tremblay, D. et Harel J. (2004) Molecular characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) pathogenicity islands in F165-positive *E. coli* strain from a diseased animal. *FEMS Microbiol Lett* 238: 321-32.
- Diekmann, S. (1987) Temperature and salt dependence of the gel migration anomaly of curved DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 15: 247-65.
- Diekmann, S. (1987) DNA methylation can enhance or induce DNA curvature. *EMBO J* 6: 4213-7.
- Dignam, J.D., Martin, P.L., Shastry, B.S. et Roeder, R.G. (1983) Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* 101: 582-98.
- Dubreuil, J.D. et Fairbrother, J.M. (1992) Biochemical and serological characterization of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165(2). *FEMS Microbiol Lett* 74: 219-224.
- Dunderdale, H.J., Benson, F.E., Parsons, C.A., Sharples, G.J., Lloyd, R.G. et West, S.C. (1991) Formation and resolution of recombination intermediates by *E. coli* RecA and RuvC proteins. *Nature* 354: 506-10.
- Ehrlich, S.D., Bertazzoni, U. et Bernardi, G. (1973) The specificity of *Escherichia coli* endonuclease I. *Eur J Biochem* 40: 149-53.
- Ernsting, B.R., Atkinson, M.R., Ninfa, A.J. et Matthews, R.G. (1992) Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 1109-1118.
- Ernsting, B.R., Denninger, J.W., Blumenthal, R.M. et Matthews, R.G. (1993) Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? *J Bacteriol* 175: 7160-7169.
- Fairbrother, J.M., Larivière, S. et Lallier, R. (1986) New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infect Immun* 51: 10-15.
- Fairbrother, J., Lallier, R., Leblanc, L., Jacques, M. et Larivière, S. (1988) Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. *FEMS Microbiol Lett* 56: 247-252.
- Fairbrother, J.M., Broes, A., Jacques, M. et Larivière, S. (1989) Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am J Vet Res* 50: 1029-1036.

- Fairbrother, J., Harel, J., Forget, C., Desautels, C. et Moore, J. (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.
- Ferrario, M., Ernsting, B.R., Borst, D.W., Wiese, D.E., 2nd, Blumenthal, R.M. et Matthews, R.G. (1995) The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*. *J Bacteriol* 177: 103-113.
- Forsman, K., Goransson, M. et Uhlin, B.E. (1989) Autoregulation and multiple DNA interactions by a transcriptional regulatory protein in *E. coli* pili biogenesis. *Embo J* 8: 1271-1277.
- Forsman, K., Sonden, B., Goransson, M. et Uhlin, B.E. (1992) Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP-cAMP receptor protein transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9880-9884.
- Friedberg, D., Midkiff, M. et Calvo, J.M. (2001) Global versus local regulatory roles for Lrp-related proteins: *Haemophilus influenzae* as a case study. *J Bacteriol* 183: 4004-4011.
- Fried, M. et Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9: 6505-25.
- Fried, M. et Crothers, D.M. (1983) CAP and RNA polymerase interactions with the lac promoter: binding stoichiometry and long range effects. *Nucleic Acids Res* 11: 141-58.
- Fried, M. et Crothers, D.M. (1984a) Equilibrium studies of the cyclic AMP receptor protein-DNA interaction. *J Mol Biol* 172: 241-62.
- Fried, M. et Crothers, D.M. (1984b) Kinetics and mechanism in the reaction of gene regulatory proteins with DNA. *J Mol Biol* 172: 263-82.
- Galas, D.J. et Schmitz, A. (1978) DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* 5: 3157-70.
- Gally, D.L., Bogan, J.A., Eisenstein, B.I. et 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* 175: 6186-6193.
- Gally, D.L., Rucker, T.J. et Blomfield, I.C. (1994) The leucine-responsive regulatory protein binds to the *fim* switch to control phase variation of type 1 fimbrial expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 176: 5665-5672.
- Garner, M.M. et Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 9: 3047-60.
- Gaynor, J.J. et Unkenholz, K.M. (1989) Sequence analysis of a genomic clone encoding an endochitinase from *Solanum tuberosum*. *Nucleic Acids Res* 17: 5855-6.
- Girardeau, J.P., Dubourguier, H.C. et Gouet, P. (1982) Inhibition of K99 antigen synthesis by L-alanine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 128: 463-470.
- Goransson, M., Forsman, K. et Uhlin, B.E. (1989a) Regulatory genes in the thermoregulation of *Escherichia coli* pili gene transcription. *Genes Dev* 3: 123-130.
- Goransson, M., Forsman, P., Nilsson, P. et Uhlin, B.E. (1989b) Upstream activating sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 3: 1557-1565.

- Goransson, M., Sonden, B., Nilsson, P., Dagberg, B., Forsman, K., Emanuelsson, K. et Uhlin, B.E. (1990) Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* **344**: 682-685.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. et Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-30.
- Hacker, J., Schmidt, G., Hughes, C., Knapp, S., Marget, M. et Goebel, W. (1985) Cloning and characterization of genes involved in production of mannose-resistant, neuraminidase-susceptible (X) fimbriae from a uropathogenic O6:K15:H31 *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **47**: 434-440.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Haney, S.A., Platko, J.V., Oxender, D.L. et Calvo, J.M. (1992) Lrp, a leucine-responsive protein, regulates branched-chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 108-115.
- Harel, J., Daigle, F., Maiti, S., Desautels, C., Labigne, A. et Fairbrother, J.M. (1991) Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS Microbiol Lett* **66**: 177-182.
- Harel, J., Forget, C., Saint-Amand, J., Daigle, F., Dubreuil, D., Jacques, M. et Fairbrother, J. (1992) Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165(1), a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **138**: 1495-1502.
- Harel, J., Fairbrother, J., Forget, C., Desautels, C. et 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., Bosse, M. et Forget, C. (1995) Cloning of determinants encoding F165(2) fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiology* **141**: 221-228.
- Harel, J. et Martin, C. (1999) Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* **30**: 131-155.
- Harel, J., Daigle, F., Forget, C., Tessier, M.C., Crost, C. et Martin, C. (2000) Phase variation of F165(1) (Prs-like) fimbriae from *Escherichia coli* causing septicaemia in animals. *Can J Microbiol* **46**: 1101-1107.
- Henderson, I.R., Owen, P. et Nataro, J.P. (1999) Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* **33**: 919-932.
- Hendrickson, W.A. (1985) Stereochemically restrained refinement of macromolecular structures. *Methods Enzymol* **115**: 252-70.
- Hendrickson, W. et Schleif, R. (1985) A dimer of AraC protein contacts three adjacent major groove regions of the *araI* DNA site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 3129-33.
- Henner, W.D., Grunberg, S.M. et Haseltine, W.A. (1982) Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks. *J Biol Chem* **257**: 11750-4.
- Hernday, A., Krabbe, M., Braaten, B. et Low, D. (2002) Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **29**: 29.
- Hernday, A.D., Braaten, B.A. et Low, D.A. (2003) The mechanism by which DNA adenine methylase and PapI activate the *pap* epigenetic switch. *Mol Cell* **12**:947-57.
- Hernday, A., Braaten, B. et Low, D. (2004) The intricate workings of a bacterial epigenetic switch. *Adv Exp Med Biol* **547**: 83-9.

- Hernday, A.D., Braaten, B.A., Broitman-Maduro, G., Engelberts, P. et Low, D.A. (2004) Regulation of the *pap* epigenetic switch by CpxAR: phosphorylated CpxR inhibits transition to the phase ON state by competition with Lrp. *Mol Cell* **19**: 537-47.
- Hertzberg, R.P. et Dervan, P.B. (1984) Cleavage of DNA with methidiumpropyl-EDTA-iron(II): reaction conditions and product analyses. *Biochemistry* **23**: 3934-45.
- Hochschild, A. (1991) Detecting cooperative protein-DNA interactions and DNA loop formation by footprinting. *Methods Enzymol* **208**: 343-361.
- Hope, I.A. et Struhl, K. (1985) GCN4 protein, synthesized *in vitro*, binds HIS3 regulatory sequences: implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast. *Cell* **43**: 177-88.
- Hung, D.L., Raivio, T.L., Jones, C.H., Silhavy, T.J. et Hultgren, S.J. (2001) Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *Embo J* **20**: 1508-1518.
- Jacob-Dubuisson, F., Heuser, J., Dodson, K., Normark, S. et Hultgren, S. (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.
- Jafri, S., Chen, S. et Calvo, J.M. (2002) *ilvIH* Operon Expression in *Escherichia coli* Requires Lrp Binding to Two Distinct Regions of DNA. *J Bacteriol* **184**: 5293-5300.
- Jiricny, J., Hughes, M., Corman, N. et Rudkin, B.B. (1988) A human 200-kDa protein binds selectively to DNA fragments containing G.T mismatches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8860-4.
- Johnson, JR. (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**:80-128.
- Jones, C.H., Danese, P.N., Pinkner, J.S., Silhavy, T.J. et Hultgren, S.J. (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *Embo J* **16**: 6394-6406.
- Kadonaga, J.T. et Tjian, R. (1986) Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5889-93.
- Kaltenbach, L.S., Braaten, B.A. et Low, D.A. (1995) Specific binding of PapI to Lrp-*pap* DNA complexes. *J Bacteriol* **177**: 6449-6455.
- Kaltenbach, L., Braaten, B., Tucker, J., Krabbe, M. et Low, D. (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.
- Khlebnikov, A., Datsenko, K.A., Skaug, Wanner, B.L. et Keasling, J.D. (2002) Homogeneous expression of the P(BAD) promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity *AraE* transporter. *Microbiol* **147**: 3241-3247.
- Kim, J., Zwieb, C., Wu, C. et Adhya, S. (1989) Bending of DNA by gene-regulatory proteins: construction and use of a DNA bending vector. *Gene* **85**: 15-23.
- Kim, J.I., Heuser, J. et Cox, M.M. (1989) Enhanced *recA* protein binding to Z DNA represents a kinetic perturbation of a general duplex DNA binding pathway. *J Biol Chem* **264**: 21848-56.
- Kimball, A.S., Kimball, M.L., Jayaram, M. et Tullius, T.D. (1995) Chemical probe and missing nucleoside analysis of Flp recombinase bound to the recombination target sequence. *Nucleic Acids Res* **23**: 3009-17.

- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J. et Cheng, X. (1994) *HhaI* methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**: 357-69.
- Klug, A., Jack, A., Viswamitra, M.A., Kennard, O., Shakked, Z. et Steitz, T.A. (1979) A hypothesis on a specific sequence-dependent conformation of DNA and its relation to the binding of the lac-repressor protein. *J Mol Biol* **131**: 669-80.
- Kolb, A., Igarashi, K., Ishihama, A., Lavigne, M., Buckle, M. et Buc, H. (1993) *E. coli* RNA polymerase, deleted in the C-terminal part of its alpha-subunit, interacts differently with the cAMP-CRP complex at the lacP1 and at the galP1 promoter. *Nucleic Acids Res* **21**: 319-26.
- Koo, H.S. et Crothers, D.M. (1988) Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 1763-7.
- Korhonen, T.K., Valtonen, M.V., Parkkinen, J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S.B. et Makela, P.H. (1985) Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* **48**: 486-491.
- Kristie, T.M. et Roizman, B. (1986) DNA-binding site of major regulatory protein alpha 4 specifically associated with promoter-regulatory domains of alpha genes of herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4700-4.
- Kuehn, M.J., Heuser, J., Normark, S. et Hultgren, S.J. (1992) P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* **356**: 252-255.
- Kuwabara, M.D. et Sigman, D.S. (1987) Footprinting DNA-protein complexes in situ following gel retardation assays using 1,10-phenanthroline-copper ion: *Escherichia coli* RNA polymerase-lac promoter complexes. *Biochemistry* **26**: 7234-8.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lakin, N.D. (1993) Transcription: factors, regulation and differentiation. *Keystone Symposium on Molecular Biology. Int J Exp Pathol* **74**: 423-4.
- Landgraf, J.R., Wu, J. et Calvo, J.M. (1996) Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6930-6936.
- Lane, D., Prentki, P. et Chandler, M. (1992) Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol Rev* **56**: 509-28.
- Leonard, P.M., Smits, S.H., Sedelnikova, S.E., Brinkman, A.B., de Vos, W.M., van der Oost, J., Rice, D.W. et Rafferty, J.B. (2001) Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Embo J* **20**: 990-997.
- Lin, R., D'Ari, R. et Newman, E.B. (1992) Lambda *placMu* insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *J Bacteriol* **174**: 1948-1955.
- Lindberg, F., Tennent, J.M., Hultgren, S.J., Lund, B. et Normark, S. (1989) PapD, a periplasmic transport protein in P-pilus biogenesis. *J Bacteriol* **171**: 6052-6058.
- Lodish, H., Baltimore, B., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira et Darnell, J. (1997) Biologie moléculaire de la cellule. In *Edition De Boeck Université*, pp. 64-65
- Lomonosoff, G.P., Butler, P.J. et Klug, A. (1981) Sequence-dependent variation in the conformation of DNA. *J Mol Biol* **149**: 745-60.
- Low, D., Robinson, E.N., Jr., McGee, Z.A. et Falkow, S. (1987) The frequency of expression of pyelonephritis-associated pili is under regulatory control. *Mol Microbiol* **1**: 335-346.

- Low, D.A. (1994) Methylation-dependent and Lrp-dependent fimbrial gene regulation in *Escherichia coli*. In V. L. Miller, J. B. Kaper, D. A. Portnoy, and R. R. Isberg (ed.), *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*. ASM Press, pp. 423-436.
- Low, D., Braaten, B. et van der Woude, M. (1996) Fimbriae. In *In F.C. Neidhardt (ed.) Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular microbiology* vol.1 Washington D.C.: ASM Press, pp. 146-157.
- Low, D.A., Weyand, N.J. et Mahan, M.J. (2001) Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun* **69**: 7197-7204.
- Lund, B., Lindberg, F., Marklund, B.I. et Normark, S. (1987) The PapG protein is the alpha-D-galactopyranosyl-(1---4)-beta-D- galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5898-5902.
- Maiti, S.N., DesGroseillers, L., Fairbrother, J.M. et Harel, J. (1994) Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165(1) of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. *Microb Pathog* **16**: 15-25.
- Marasco, R., Varcamonti, M., La Cara, F., Ricca, E., De Felice, M. et Sacco, M. (1994) In vivo footprinting analysis of Lrp binding to the *ilvIH* promoter region of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 5197-5201.
- Marini, J.C., Levene, S.D., Crothers, D.M. et Englund, P.T. (1983) A bent helix in kinetoplast DNA. *Spring Harb Symp Quant Biol* **47**: 279-83.
- 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.
- Matthews, R.G., Cui, Y., Friedberg, D. et Calvo, J.M. (2000) Wild-type and hexahistidine-tagged derivatives of leucine-responsive regulatory protein from *Escherichia coli*, *Methods in enzymology*, **324**: 322-329.
- McClain, M.S., Blomfield, I.C., Eberhardt, K.J. et Eisenstein, B.I. (1993) Inversion-independent phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 4335-4344.
- Messer, W. et Noyer-Weidner, M. (1988) Timing and targeting: the biological functions of Dam methylation in *E. coli*. *Cell* **54**: 735-737.
- Mueller, P.R. et Wold, B. (1989) In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* **246**: 780-6.
- Newman, E.B., D'Ari, R. et Lin, R.T. (1992) The leucine-Lrp regulon in *E. coli*: a global response in search of a raison d'être. *Cell* **68**: 617-619.
- Newman, E.B. et Lin, R. (1995) Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu Rev Microbiol* **49**: 747-775.
- Newman, E.B. et Lin, R. (1996) The leucine/Lrp regulon. In *In E. C. C. Lin and A. S. Lynch (ed.), Regulation of gene expression in Escherichia coli*. R.G. Landes Company, Austin, Texas, USA., pp. 419-433.
- Newman, E.B., Lin, R.T. et D'Ari, R. (1996) The leucine/Lrp regulon. In *In F. C. Neidhardt (ed), Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, ASM Press, vol. 1 pp. 1513-1525.
- Ngeleka, M., Harel, J., Jacques, M. et Fairbrother, J.M. (1992) Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect Immun* **60**: 5048-5056.

- Ngeleka, M., Jacques, M., Martineau-Doize, B., Daigle, F., Harel, J. et Fairbrother, J.M. (1993) Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165(1) fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infect Immun* 61: 836-843.
- Ngeleka, M., Martineau-Doize, B. et Fairbrother, J.M. (1994) Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" F165(1) resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes in vitro: role of F165(1) fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. *Infect Immun* 62: 398-404.
- Ngeleka, M. et Fairbrother, J.M. (1999) F165(1) fimbriae of the P fimbrial family inhibit the oxidative response of porcine neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 265-274.
- Nicholson, B. et Low, D. (2000) DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 35: 728-742.
- Nielsen, P.E., Jeppesen, C. et Buchardt, O. (1988a) Uranyl salts as photochemical agents for cleavage of DNA and probing of protein-DNA contacts. *FEBS Lett* 235: 122-4.
- Nielsen, P.E., Jeppesen, C., Egholm, M. et Buchardt, O. (1988b) Photochemical cleavage of DNA by nitrobenzamides linked to 9-aminoacridine. *Biochemistry* 27: 6338-43.
- Nilsson, P. et Uhlin, B.E. (1991) Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing. *Mol Microbiol* 5: 1791-1799.
- Nilsson, P., Naureckiene, S. et Uhlin, B.E. (1996) Mutations affecting mRNA processing and fimbrial biogenesis in the *Escherichia coli* *pap* operon. *J Bacteriol* 178: 683-690.
- Nordheim, A. et Meese, K. (1988) Topoisomer gel retardation: detection of anti-Z-DNA antibodies bound to Z-DNA within supercoiled DNA minicircles. *Nucleic Acids Res* 16: 21-37.
- Nou, X., Skinner, B., Braaten, B., Blyn, L., Hirsch, D. et Low, D. (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.
- Nou, X., Braaten, B., Kaltenbach, L. et Low, D.A. (1995) Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. *Embo J* 14: 5785-5797.
- Orskov, I. et Orskov, F. (1985) *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J Hyg (London)* 95: 551-575.
- Papavassiliou, A.G. (1993) Localisation of DNA-protein contact points by DMS resistance of complexes resolved in gel retardation assays. *Nucleic Acids Res* 21: 757-8.
- Parsons, C.A., Kemper, B. et West, S.C. (1990) Interaction of a four-way junction in DNA with T4 endonuclease VII. *J Biol Chem* 265: 9285-9.
- Paul, L., Blumenthal, R.M. et Matthews, R.G. (2001) Activation from a distance: roles of Lrp and integration host factor in transcriptional activation of *gltBDF*. *J Bacteriol* 183: 3910-3918.
- Platko, J.V., Willins, D.A. et Calvo, J.M. (1990) The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. *J Bacteriol* 172: 4563-4570.
- Platko, J.V. et 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.
- Prescott, H. et Klein (1995) Microbiologie. In *Edition De Boeck Université*, pp. 224-226.

- Price, M.A. et Tullius, T.D. (1992) Using hydroxyl radical to probe DNA structure. *Methods Enzymol* **212**: 194-219.
- Ramseier, T.M. et Saier, M.H. Jr (1995) cAMP-cAMP receptor protein complex: five binding sites in the control region of the *Escherichia coli* mannitol operon. *Microbiology* **141**: 1901-7.
- Rex, J.H., Aronson, B.D. et Somerville, R.L. (1991) The *tdh* and *serA* operons of *Escherichia coli*: mutational analysis of the regulatory elements of leucine-responsive genes. *J Bacteriol* **173**: 5944-5953.
- Ricca, E., Aker, D.A. et Calvo, J.M. (1989) A protein that binds to the regulatory region of the *Escherichia coli* *ilvIH* operon. *J Bacteriol* **171**: 1658-1664.
- Roesch, P.L. et 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.
- Salyers, A.A. et Whitt, D.D. (2002) «Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Second Edition» ASM Press.
- Sambrook, J. et Gething, M.J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**: 224-5.
- Sauer, F.G., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J. et Hultgren, S.J. (2000) Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **3**: 65-72.
- Sawadogo, M. et Roeder, R.G. (1985) Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* **43**: 165-75.
- Scheffler, I.E., Elson, E.L. et Baldwin, R.L. (1968) Helix formation by dAT oligomers. I. Hairpin and straight-chain helices. *J Mol Biol* **36**: 291-304.
- Schmitz, A. et Galas, D.J. (1979) The interaction of RNA polymerase and lac repressor with the lac control region. *Nucleic Acids Res* **6**: 111-37.
- Siegele, D.A. et Hu, J. (1997) Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8168-8172.
- Sigman, D.S., Graham, D.R., D'Aurora, V. et Stern, A.M. (1979) Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J Biol Chem* **254**: 12269-72.
- Sigman, D.S. et Chen, C.H. (1990) Chemical nucleases: new reagents in molecular biology. *Annu Rev Biochem* **59**: 207-36.
- Singh, M., Heaphy, S. et Gait, M.J. (1986) Oligonucleotide-directed misincorporation mutagenesis on single-stranded DNA templates. *Protein Eng* **1**: 75-6.
- Sitlani, A. et Barton, J.K. (1994) Sequence-specific recognition of DNA by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium(III): importance of steric and van der Waals interactions. *Biochemistry* **33**: 12100-8.
- Soto, G.E. et Hultgren, S.J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**: 1059-1071.
- Spassky, A. et Sigman, D.S. (1985) Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. Conformational analysis and footprinting of the lac operon. *Biochemistry* **24**: 8050-6.

- Squires, C.H., De Felice, M., Wessler, S.R. et Calvo, J.M. (1981) Physical characterization of the *ilvHI* operon of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **147**: 797-804.
- Strauss, F. et Varshavsky, A. (1984) A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell* **37**: 889-901.
- Su, H.S., Lang, B.F. et Newman, E.B. (1989) L-serine degradation in *Escherichia coli* K-12: cloning and sequencing of the *sdaA* gene. *J Bacteriol* **171**: 5095-5102.
- Suck, D., Oefner, C. et Kabsch, W. (1984) Three-dimensional structure of bovine pancreatic DNase I at 2.5 Å resolution. *EMBO J* **3**: 2423-30.
- Suck, D., Lahm, A. et Oefner, C. (1988) Structure refined to 2 Å of a nicked DNA octanucleotide complex with DNase I. *Nature* **332**: 464-8.
- Suck, D. et Oefner, C. (1986) Structure of DNase I at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature* **321**: 620-5.
- Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O. et Matthews, R.G. (2002) Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13471-13476.
- Tennent, J.M., Lindberg, F. et Normark, S. (1990) Integrity of *Escherichia coli* P pili during biogenesis: properties and role of PapJ. *Mol Microbiol* **4**: 747-758.
- Tessier M.-C., Mémoire de Maîtrise, (2001) Régulation transcriptionnelle de l'opéron *foo* chez *Escherichia coli*: rôle de la topologie de l'ADN dans l'expression de F165. Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire.
- Thanassi, D.G., Saulino, E.T. et Hultgren, S.J. (1998a) The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* **1**: 223-231.
- Thanassi, D.G., Saulino, E.T., Lombardo, M.J., Roth, R., Heuser, J. et Hultgren, S.J. (1998b) 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.
- Tuan, L.R., D'Ari, R. et Newman, E.B. (1990) The leucine regulon of *Escherichia coli* K-12: a mutation in *rbIA* alters expression of L-leucine-dependent metabolic operons. *J Bacteriol* **172**: 4529-4535.
- Tullius TD, Dombroski BA, Churchill ME, Kam L. (1987) Hydroxyl radical footprinting: a high-resolution method for mapping protein-DNA contacts. *Methods Enzymol* **155**: 537-58.
- Ursini, M.V., Arcari, P. et De Felice, M. (1981) Acetohydroxy acid synthase isoenzymes of *Escherichia coli* K-12: a trans-acting regulatory locus of *ilvHI* gene expression. *Mol Gen Genet* **181**: 491-496.
- van der Woude, M.W., Braaten, B.A. et 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.W. et Low, D.A. (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.
- van der Woude, M.W., Kaltenbach, L.S. et Low, D.A. (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.

- van der Woude, M., Hale, W.B. et Low, D.A. (1998) Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in *gut* and *pap* operons. *J Bacteriol* **180**: 5913-5920.
- Van Dyke MW, Dervan PB. (1983) Methidiumpropyl-EDTA.Fe(II) and DNase I footprinting report different small molecule binding site sizes on DNA. *Nucleic Acids Res* **11**: 5555-67.
- Wang, Q. et Calvo, J.M. (1993a) Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*. *J Mol Biol* **229**: 306-318.
- Wang, Q. et Calvo, J.M. (1993b) Lrp, a major regulatory protein in *Escherichia coli*, bends DNA and can organize the assembly of a higher-order nucleoprotein structure. *Embo J* **12**: 2495-2501.
- Wang, Q., Wu, J., Friedberg, D., Plakto, J. et Calvo, J.M. (1994) Regulation of the *Escherichia coli* *lrp* gene. *J Bacteriol* **176**: 1831-1839.
- Ward, B., Skorobogaty, A. et Dabrowiak, J.C. (1986) DNA cleavage specificity of a group of cationic metalloporphyrins. *Biochemistry* **25**: 6875-83.
- Ward, B., Skorobogaty, A. et Dabrowiak, J.C. (1986) DNA binding specificity of a series of cationic metalloporphyrin complexes. *Biochemistry* **25**: 7827-33.
- Wardman, P. et Candeias, L.P. (1996) Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* **145**: 523-31.
- Weyand, N.J. et Low, D.A. (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.
- Weyand, N.J., Braaten, B.A., van der Woude, M., Tucker, J. et Low, D.A. (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.
- White-Ziegler, C.A., Blyn, L.B., Braaten, B.A. et Low, D.A. (1990) Identification of an *Escherichia coli* genetic locus involved in thermoregulation of the *pap* operon. *J Bacteriol* **172**: 1775-1782.
- White-Ziegler, C.A., Angus Hill, M.L., Braaten, B.A., van der Woude, M.W. et Low, D.A. (1998) Thermoregulation of *Escherichia coli* *pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol Microbiol* **28**: 1121-1137.
- White-Ziegler, C.A., Black, A.M., Eliades, S.H., Young, S. et Porter, K. (2002) The N-acetyltransferase RimJ responds to environmental stimuli to repress *pap* fimbrial transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 4334-4342.
- Willins, D.A., Ryan, C.W., Platko, J.V. et Calvo, J.M. (1991) Characterization of Lrp, and *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *J Biol Chem* **266**: 10768-10774.
- Wu, H.M. et Crothers, D.M. (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* **308**: 509-13.
- Xia, Y., Forsman, K., Jass, J. et Uhlin, B.E. (1998) Oligomeric interaction of the PapB transcriptional regulator with the upstream activating region of pili adhesin gene promoters in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **30**: 513-523.
- Xia, Y. et Uhlin, B.E. (1999) Mutational analysis of the PapB transcriptional regulator in *Escherichia coli*. Regions important for DNA binding and oligomerization. *J Biol Chem* **274**: 19723-19730.
- Yang, L., Lin, R.T. et Newman, E.B. (2002) Structure of the Lrp-regulated *serA* promoter of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **43**: 323-333.

- Zaret, K. (1997) Identifying specific protein-DNA interactions within living cells, or in "*in vivo* footprinting". *Methods* **11**: 149-50.
- Zhi, J., Mathew, E. et Freundlich, M. (1999) Lrp binds to two regions in the *dadAX* promoter region of *Escherichia coli* to repress and activate transcription directly. *Mol Microbiol* **32**: 29-40.
- Zinser, E.R. et Kolter, R. (2000) Prolonged stationary-phase incubation selects for *lrp* mutations in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**: 4361-4365.

